

Université de Montréal

Optimisation de la domiciliation des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon ombilical:  
élucider les mécanismes en cause dépendant du CXCR4.

Par Sonia F. Desjardins

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en biochimie

1 décembre 2008

© Sonia F. DESJARDINS (2008)

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Optimisation de la domiciliation des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon ombilical:  
élucider les mécanismes en cause dépendant du CXCR4.

Présenté par :

Sonia F. Desjardins

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Guy Boileau

.....  
Président-rapporteur

Dr. Nikolaus Heveker

.....  
Directeur de recherche

Dr. Elie Haddad

.....  
Codirecteur de recherche

Dr. Daniel Sinnett

.....  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

Le sang provenant d'un cordon ombilical (SCO) représente une bonne source de cellules souches hématopoïétiques (CSH) pour des transplantations. Cependant, le nombre de cellules souches contenues dans ce sang est souvent insuffisant pour greffer un adulte. Le mécanisme intervenant dans la domiciliation de ces cellules au sein de la moelle osseuse (MO) est encore mal compris. On sait que l'interaction entre la chimiokine SDF-1 et le récepteur CXCR4, présent sur les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO, mène à la migration de ces cellules en direction de la MO. Nous pensons que l'augmentation de la proportion de cellules qui réussit à se greffer pourra pallier au problème du nombre.

Les produits de dégradation, C3a et le C3<sub>desarg</sub>, issus du système du complément, sont connus pour favoriser la réponse de cellules exprimant CXCR4 vers SDF-1. Nous avons analysé l'effet du C3<sub>adesarg</sub>, molécule non anaphylatoxique, sur la migration cellulaire vers SDF-1, de même que sur la prise de greffe des cellules CD34<sup>+</sup> issues de SCO suite à une transplantation sur des souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup>. Nos expériences ont démontré que le C3a ainsi que le C3<sub>adesarg</sub> augmentaient tous les deux la réponse des cellules CD34<sup>+</sup> vers SDF-1. Toutefois, nous n'avons pas pu démontrer que ces molécules liaient directement le récepteur CXCR4. Par contre, le composé C3<sub>adesarg</sub> favorise la prise de greffe des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO. Il serait donc un bon candidat pour poursuivre une optimisation de ses propriétés.

Nous avons également constaté que suite à une transplantation chez la souris, les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO subissent une hausse d'expression transitoire de leur CXCR4 environ quatre jours après la greffe. Cette hausse d'expression coïncide avec la multiplication des cellules CD34<sup>+</sup> dans la MO. Nous avons également confirmé qu'une cellule CD34<sup>+</sup> avec une forte expression de CXCR4 était dans un état prolifératif. Nos données suggèrent que l'interaction directe avec les cellules stromales soit responsable de cette hausse d'expression de CXCR4.

**Mots-clés:** cellules CD34<sup>+</sup>, domiciliation, récepteur CXCR4, chimiokine SDF-1, C3a, sang de cordon ombilical, transplantation, récepteurs couplés aux protéines G.

## ABSTRACT

Since the first successful cord blood (CB) transplant was performed there has been a gradual increase in the use of CB for haematopoietic stem cell (HSC) transplantation, but the number of stem cells per CB is in general too low to ensure successful transplantation in adult patients. We would like to bypass the limitation of insufficient number of these cells in CB by enhancing the engraftment efficiency. The chemokine stromal-derived factor (SDF)-1, that binds to its receptor, CXCR4, plays an important and unique role in regulating the trafficking of HSC and their homing/retention in bone marrow (BM), but molecular regulatory mechanism of niches for HSC maintenance remains unclear.

The complement C3 cleavage fragments, C3a and C3a<sub>desarg</sub>, modulate the responsiveness of CXCR4-expressing cell lines to SDF-1. We assessed the effect of the non anaphylatoxic complement fragment, C3a<sub>desarg</sub>, on SDF-1 responsiveness and engraftment of CB-HSC transplantation in a NOD/SCIDyC<sup>-</sup> mouse model. Complement breakdown products C3a and C3a<sub>desarg</sub> both increase the responsiveness of CD34<sup>+</sup> cells to SDF-1. We find no evidence for direct interaction of complement fragments with CXCR4. Our data suggest that C3a<sub>desarg</sub> might contribute to optimize CB-HSC homing to bone marrow, and therefore efficacy of cord blood transplantation.

We quantified the number of CXCR4 on the surface of CB-CD34<sup>+</sup> after transplantation in mice. Our results showed that there is a transient overexpression of CXCR4 on the surface of HSC CD34<sup>+</sup> found in the BM of NOD/SCIDyC<sup>-</sup> mice after 4-5 days post-injection. This transient overexpression correlated with multiplication of CD34<sup>+</sup> cells in the BM. We confirm that the cells with an overexpression of CXCR4 are in a proliferation state. Our data suggested that this transient overexpression is caused by an interaction with the stromal cells.

**Keywords:** homing, CXCR4 receptor, chemokine SDF-1, cord blood, transplantation, C3a, G proteins coupled receptors, CD34<sup>+</sup>.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations	xi
REMERCIEMENTS	xiii
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Les greffes et transplantations</b>	<b>2</b>
1.1.1 La transplantation hématopoïétique : principe général	2
1.1.2 Greffe de moelle osseuse (MO)	2
1.1.3 Greffe de sang de cordon ombilical (SCO)	4
<b>1.2 Les CSH et leur domiciliation dans la MO</b>	<b>7</b>
1.2.1 Les cellules CD34 <sup>+</sup>	8
<b>1.3 Les chimiokines</b>	<b>9</b>
1.3.1 La chimiokine SDF-1	9
<b>1.4 Les récepteurs de chimiokines</b>	<b>9</b>
1.4.1 CXCR4	11
1.4.2 CXCR4 et la migration	11
1.4.3 Effets de SDF-1 sur CXCR4	12
<b>1.5 Rôle de CXCR4/SDF-1 dans la domiciliation</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Molécules qui favorisent la migration dépendante de CXCR4/SDF-1</b>	<b>14</b>
1.6.1 Le système du complément	14
1.6.1.1 La composante C3	16
1.6.1.2 Le C3a et l'axe CXCR4/SDF-1	16
1.6.2 Facteurs lipidiques favorisant la migration	17
<b>1.7 L'utilisation modèle murin</b>	<b>18</b>
1.7.1 Les avantages	18
1.7.2 Les différents fonds génétiques	19

<b>1.8 Conclusion, synthèse</b>	<b>20</b>
<b>1.9 But de l'étude</b>	<b>20</b>
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>24</b>
<b>3. RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Modulation par le C3a et ses dérivés</b>	<b>33</b>
<b>3.1.1 Effet agoniste du C3a et de ses dérivés seuls sur les trois types cellulaires</b>	<b>34</b>
<b>3.1.2 Effet du C3a et de ses dérivés sur la migration des trois types cellulaires vers SDF-1</b>	<b>36</b>
3.1.2.1 Effet du C3a et de ses dérivés sur la migration de cellules CEM vers SDF-1	37
3.1.2.2 Effet du C3a <sub>70-77</sub> sur la migration des cellules REH	38
3.1.2.3 Effet du C3a et de ses dérivés sur la migration des cellules CD34 <sup>+</sup>	40
<b>3.1.3 Liaison directe du C3a sur le CXCR4</b>	<b>42</b>
<b>3.1.4 Effet <i>in vivo</i> du C3a<sub>desarg</sub> sur les cellules CD34<sup>+</sup></b>	<b>47</b>
<b>3.1.5 DISCUSSION</b>	<b>50</b>
<b>3.2 Modulation par des facteurs lipidiques</b>	<b>54</b>
3.2.1 Effet sur l'homodimère CXCR4; aspect fonctionnel	55
3.2.2 DISCUSSION	58
<b>3.3 Observations physiologiques de la prise de greffe</b>	<b>59</b>
<b>3.3.1 Comparaison des propriétés de différents cordons</b>	<b>59</b>
3.3.1.1 Capacités migratoires	59
3.3.1.2 Quantité de récepteurs	61
3.3.1.3 La prise de greffe	62
<b>3.3.2 DISCUSSION</b>	<b>64</b>

<b>3.3.3 Quantité de CXCR4 en surface lors de la domiciliation</b>	<b>66</b>
3.3.3.1. Exploration du mécanisme	73
3.3.4 DISCUSSION	75
<b>4. CONCLUSION</b>	<b>77</b>
<b>5. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>80</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Hématopoïèse	8
<b>Figure 2.</b> Représentation d'un récepteur couplé aux protéines G	10
<b>Figure 3.</b> Signalisation intracellulaire de CXCR4/SDF-1	12
<b>Figure 4.</b> Domiciliation dépendante de CXCR4/SDF-1	14
<b>Figure 5.</b> Système du complément	16
<b>Figure 6.</b> La molécule C3a du complément	17
<b>Figure 7.</b> Purification des cellules CD34 <sup>+</sup> de sang de cordon ombilical	26
<b>Figure 8.</b> Plaque de migration	26
<b>Figure 9.</b> Expérience de migration cellulaire	27
<b>Figure 10.</b> Principe de la méthode de BRET	28
<b>Figure 11.</b> Cytométrie en flux	29
<b>Figure 12.</b> Méthode de coculture entre les cellules CD34 <sup>+</sup> et les cellules de la MO murine	31
<b>Figure 13.</b> Effet agoniste du C3a <sub>70-77</sub> sur les cellules CEM	34
<b>Figure 14.</b> Effet agoniste des différentes molécules dérivées du complément C3a sur les cellules REH	35
<b>Figure 15.</b> Effet agoniste du complément C3a et C3a <sub>70-77</sub> sur les cellules CD34 <sup>+</sup> de SCO	36
<b>Figure 16.</b> Expérience de migrations des cellules CEM en présence de molécules dérivées du complément C3a	37
<b>Figure 17.</b> Expérience de migrations des cellules REH en présence de C3a <sub>70-77</sub>	39
<b>Figure 18.</b> Expérience de migrations des cellules CD34 <sup>+</sup> de SCO en présence de molécules dérivées du complément C3a	41
<b>Figure 19.</b> Hypothèses de liaison du C3a sur CXCR4	44
<b>Figure 20.</b> Expérience de BRET en réponse à différentes doses de SDF-1 sur l'homodimère CXCR4 en présence ou absence de C3a	45
<b>Figure 21.</b> Expérience de cytométrie en flux avec l'anticorps CXCR4 sur des	

cellules REH préincubées avec du SDF-1 ou du C3a	47
<b>Figure 22.</b> Injection IO de C3a <sub>desarg</sub> dans des souris NOD/SCIDyC <sup>-</sup>	49
<b>Figure 23.</b> Injection IO de C3a <sub>desarg</sub> dans un fémur de souris NOD/SCIDyC <sup>-</sup>	50
<b>Figure 24.</b> Expérience de migrations des cellules CEM en présence de SEW-2871 combiné au SDF-1	54
<b>Figure 25.</b> Expérience de BRET sur le dimère CXCR4 en fonction de différents ligands	56
<b>Figure 26.</b> Expérience de dose-réponse d'EtOH sur le dimère CXCR4 effectuée par BRET	57
<b>Figure 27.</b> Capacité migratoire intrinsèque de différents SCO	60
<b>Figure 28.</b> Expression quantitative du récepteur CXCR4 sur des cellules CD34 <sup>+</sup> de SCO différents	61
<b>Figure 29.</b> Prise de greffe des cellules CD34 <sup>+</sup> provenant de trois différents SCO	63
<b>Figure 30.</b> Expression quantitative de CXCR4 sur les cellules CD34 <sup>+</sup> de SCO	67
<b>Figure 31.</b> Expression quantitative de CXCR4 sur les cellules CD34 <sup>+</sup> de SCO	68
<b>Figure 32.</b> Quantification des cellules CD34 <sup>+</sup> dans la MO et du récepteur CXCR4 à leur surface	69
<b>Figure 33.</b> Analyse de l'état prolifératif des cellules CD34 <sup>+</sup> retrouvées dans la MO	70
<b>Figure 34.</b> Quantification de CXCR4 corrélée avec l'état prolifératif des cellules CD34 <sup>+</sup> à différents stades de différenciation	72
<b>Figure 35.</b> Coculture entre les cellules CD34 <sup>+</sup> de SCO et les cellules de la MO murine	74



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

7-AAD	7-Amino-actinomycin D
BD	Becton, Dickinson
BRET	<i>bioluminescence energy transfer</i>
BSA	bovine serum albumin
C	complément
CB	<i>cord blood</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CSH	cellule souche hématopoïétique
CXC (L ou R)	cystéine-X-cystéine (ligand ou récepteur)
DAG	diacylglycérol
DMSO	diméthyl sulfoxyde
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EtOH	éthanol
FLT-3	<i>FMS-Like tyrosine kinase 3</i>
GPCR	<i>G protein coupled receptors</i>
GvHD	<i>graft vs host disease</i>
HIF	<i>hypoxia-induced factor</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i>
IL	interleukine
IP3	inositol tri-phosphate
IO	intra-osseux
IV	intraveineux
LFA	<i>lymphocyte function-associated molecules</i>
LLA	leucémie lymphoblastique aiguë
LMA	leucémie myéloïde aiguë
LUC	luciférase

MCP1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MEK	metyl ethyl ketone
MEM	milieu minimum essentiel
MMP	métalloprotéinase
MO	moelle osseuse
NOD	<i>nonobese diabetic</i>
NK	<i>natural killer</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	phycoerythrine
PI3K	inositoltriphosphate kinase
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RCPG	récepteurs couplés aux protéines G
RPM	rotation par minute
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SCF	<i>stem cell factor</i>
SCO	sang de cordon ombilical
SDF-1	<i>stromal derived factor-1</i>
SVF	serum de veau foetal
TPO	thrombopoïétine
VLA	molécule d'adhésion
VIH	virus d'immunodéficience humaine
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

## REMERCIEMENTS

J'aimerais, tout d'abord, remercier mon directeur de recherche, le Dr. Nikolaus Heveker, ainsi que mon codirecteur le Dr. Elie Haddad. J'ai été vraiment choyée par cette collaboration qui m'a permis de réaliser un projet qui apporte, à la fois des réponses à des questions fondamentales, tout en étant utile cliniquement.

Je tiens vraiment et surtout à remercier François Fontaine, assistant de recherche du laboratoire du Dr. Haddad, qui est tout simplement indispensable. François est d'une aide totalement incroyable que ce soit pour des conseils ou de l'aide technique, pour le fonctionnement général du laboratoire ou tout simplement pour le moral des troupes.

Et merci à mes partenaires de laboratoire, qui assurent le soutien technique et moral au quotidien et qui font de ce lieu de travail un endroit si agréable; Joëlle Gregoire Gauthier, Yamina A. Berchiche, Geneviève St-Onge, Stéphanie Gravel, Arnaud Duval, Dominic Dulude et Martin Leduc.

Merci également au Dr. Daniel Sinnott, aux membres de son laboratoire ainsi qu'à ceux du Dr. Damien Labuda, qui m'ont vraiment transmis leur passion pour la recherche lors de mes débuts dans ce domaine et sans qui je ne serais probablement pas là aujourd'hui.

Un merci spécial au personnel animalier du CHU Sainte-Justine qui fait un travail formidable, un merci particulier pour Denise et Véronique.

Et bien sûr, merci à ma famille qui croit en moi et qui m'offre un support inconditionnel!

## **1. INTRODUCTION**

## **1.1 Les greffes et transplantations**

### **1.1.1 La transplantation hématopoïétique : principe général**

Chaque année, 26 % des nouveaux cas de cancer sont de type leucémique, et 32 % des décès chez les enfants y sont attribuables [2]. Le plus souvent, une chimiothérapie et/ou radiothérapie suffisent à traiter la leucémie chez les enfants. Cependant, parfois, ces traitements doivent être combinés avec une transplantation de cellules hématopoïétiques. La chimiothérapie a pour objectif de détruire les cellules cancéreuses, et de freiner leur prolifération incontrôlée. À cette fin, des composés cytotoxiques et génotoxiques s'attaquant aux cellules en prolifération rapide sont employés. Or, ce traitement ne fera pas de différence entre des cellules saines en prolifération (comme celles du système immunitaire) et des cellules leucémiques. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) provenant d'un donneur sain, a pour objectif de reconstituer le système immunitaire du patient greffé. Deux sources principales de cellules souches hématopoïétiques sont disponibles, la moelle osseuse (MO) et le sang de cordon ombilical (SCO); chacune des sources comporte des avantages et des inconvénients qui lui sont propres.

### **1.1.2 Greffe de moelle osseuse**

Depuis le début des années 1980, la greffe de MO a été de plus en plus adoptée comme traitement de nombreuses maladies hématologiques, dont la leucémie, le lymphome, l'anémie aplasique, la thalassémie majeure et des immunodéficiences, particulièrement l'immunodéficiences combinée sévère, ou SCID (*severe combined immunodeficiency*) [3]. Cependant, l'utilisation des cellules de la MO pour des transplantations comporte des inconvénients considérables. D'abord, le taux de compatibilité HLA (*human leukocyte antigen*) entre les cellules du donneur et celles du receveur est très important, et il est même déterminant du succès qu'aura la prise de la greffe par la suite [4]. Le système HLA est un système d'histocompatibilité entre des tissus ou des cellules d'origine différente qui repose sur leurs caractéristiques antigéniques [5]. Ces antigènes présents à la surface des globules blancs et des cellules

nucléées constituent une marque d'identité biologique propre à chaque individu [5]. Le code HLA d'un individu est déterminé par les différents allèles de chacun de ces gènes. Le typage HLA se limite souvent à l'identification de six antigènes dont la variabilité allélique est la plus importante. Il s'agit des gènes A, B et DR présents sur le chromosome 6. Pour chaque individu, trois de ces antigènes sont hérités de la mère, alors que les trois autres proviennent du père. L'allèle qu'occupent ces gènes chez un individu est représenté par un chiffre qui accompagne la lettre du gène, exemple DR2. Chaque couple lettre-chiffre représente un antigène différent. La probabilité que deux personnes soient héritières du même typage HLA est donc plus grande quand il s'agit de frères et sœurs issus d'un même père et d'une même mère (tableau 1).

Typage de la mère	Typage du père
A3, A28, B7, B8, DR9, DR17	A2, A11, B5, B8, DR11, DR15

Héritage des frères et des sœurs	A		B		DR	
Possibilité 1	3	11	7	5	9	15
Possibilité 2	3	2	7	8	9	11
Possibilité 3	28	11	8	5	17	15
Possibilité 4	28	2	8	8	17	11

**Tableau 1. Compatibilité HLA familiale.** Exemple de typage HLA retrouvé chez les membres de la famille d'un malade dont le typage HLA est le suivant : **A2, A3; B7, B8; DR9, DR11**. La probabilité que ce malade trouve un donneur compatible dans la famille est plus élevée. [6]

Les codes HLA du donneur et du receveur doivent être les plus apparentés possibles afin de permettre aux cellules du donneur d'occuper le corps du receveur sans déclencher une réaction de rejet. Le rejet peut s'effectuer dans les deux sens, soit l'hôte n'accepte pas le greffon comme sien, soit c'est le greffon qui ne tolère pas l'hôte.

Lors d'une transplantation de MO, le système immunitaire du receveur est très affaibli ou inexistant, ce n'est, par conséquent, pas l'hôte qui risque de rejeter le greffon.

Dans ce cas, il se produit alors l'apparition d'une GvHD (*graft vs host disease*), c'est-à-dire une attaque du greffon contre l'hôte. La GvHD survient lorsque les cellules du donneur reconnaissent les allo-antigènes des tissus de l'hôte, il se produit alors une activation et une prolifération des cellules T du greffon, suivi d'une production subséquente de cytokines qui génèrent des réactions inflammatoires au niveau de la peau, du tractus gastro-intestinal et du foie. Lorsqu'elle est grave, la GvHD peut se traduire par une érythrodermie généralisée de la peau, des hémorragies digestives et une insuffisance hépatique [3]. Malgré l'amélioration de l'appariement HLA des donneurs avec les receveurs, la GvHD reste la cause majeure de mortalité et de morbidité au cours des greffes de MO.

La nécessité d'une compatibilité HLA presque parfaite lors d'une greffe de MO apporte donc l'inconvénient de limiter les donneurs potentiels et d'occasionner des difficultés logistiques quant à la sélection et à la distribution des greffons, c'est-à-dire à l'appariement entre donneurs et receveurs. Ensuite, l'opération consistant à prélever les cellules souches et progénitrices de la MO du donneur nécessite une anesthésie du patient, ce qui comporte un risque pour le donneur.

### 1.1.3 Greffe de sang de cordon ombilical



La première transplantation à partir de cellules de SCO réussie fut effectuée en 1989, sur un jeune garçon souffrant d'anémie aplasique [7]. Sept ans plus tard, une transplantation chez un adulte fut accomplie [8]. Le contenu enrichi en cellules souches et progénitrices hématopoïétiques du SCO est connu depuis 1983 [4].

Le sang d'un seul cordon ombilical, représentant entre 80 à 120 ml de sang, contient autant de cellules souches hématopoïétiques (CSH) que 800 à 1200 ml de MO. Le SCO utilisé en transplantation ne requiert pas une compatibilité HLA parfaite entre

donneur et receveur. Ceci permet alors un plus grand nombre de greffes. Cette marge de manœuvre est très importante, puisqu'environ 30 % des patients décèdent avant même l'identification d'un donneur potentiel HLA-compatible, et seulement 20 % des patients ont un donneur compatible dans la famille [9]. Le nombre de transplantations à partir de SCO entre donneurs non apparentés réalisées à travers le monde entre les années 1993 à 2006 est estimé à 8000 [4]. À l'hôpital Sainte-Justine, il s'agit désormais de la source première de CSH pour des transplantations allogéniques non apparentées [9]. De plus, les cellules du greffon sont moins sujettes à attaquer l'hôte, donc à causer des réactions GvH [4], puisque le SCO contient peu de cellules matures et de lymphocytes T activés.

Un avantage additionnel est que les cellules provenant du SCO peuvent être cryopréservées et récupérées sur demande par la suite [4]. Les cellules peuvent être conservées congelées durant vingt ans dans l'azote liquide [9]. Ceci permet une excellente disponibilité de cellules mises en banque, et ainsi la rapidité de traitement requise, évitant ainsi les pertes de vie dues à l'attente d'un donneur potentiel.

Cependant, cette source de cellules souches ne comporte pas que des avantages. En effet, le nombre de cellules disponibles par SCO est limité et inférieur à la MO. Toutefois, les cellules en provenance de la MO ont une concentration plus faible en cellules souches et progénitrices hématopoïétiques que celles provenant d'un SCO. Bien qu'il soit possible d'y palier en extrayant plus de MO, ceci n'est pas une option pour le SCO dont le volume est déterminé. Jusqu'à trois à cinq pourcents du volume total de moelle osseuse contenu dans le corps humain peut être prélevé, ce qui représente deux fois le volume prélevé lors d'un don de sang total. Ainsi, la quantité de cellules extraites d'un SCO rend souvent la greffe sur un patient adulte impossible [9], puisque le taux de succès est déterminé par le nombre de cellules injectées en fonction du poids du patient. Pour un patient de 50kg cela représente la totalité du sang de cordon ou un litre de moelle osseuse.

	<b>Moelle osseuse</b>	<b>Sang de cordon</b>
<b>Mode de prélèvement</b>	La moelle est prélevée dans la crête iliaque d'un donneur sain sous anesthésie. Le prélèvement représente un <u>danger pour le donneur</u> .	Le sang est prélevé après la naissance de l'enfant à l'intérieur du cordon ombilical une fois qu'il a été sectionné. Le prélèvement ne représente <u>aucun danger pour la mère et l'enfant</u> .
<b>Pour qui</b>	<u>Tout le monde</u> , il n'y a pas de restrictions.	Seuls les patients pesant <u>moins de 50 kilos</u> sont des candidats à ce type de greffe. (Compte tenu de la petite quantité prélevée).
<b>Quantité requise/disponibilité</b>	800 à 1200 ml, pour des transplantations équivalentes au sang de cordon; pour la transplantation d'un adulte jusqu'à 3 à 5 % du volume total de moelle osseuse peut être prélevé.	80 à 120 ml de sang.
<b>Compatibilité</b>	<u>Haut degré requis</u> de compatibilité HLA.	Flexibilité immunologique diminuant le degré de compatibilité HLA requis.
<b>Risques de rejet</b>	Incidence <u>élevée</u> de GvHD.	<u>Faible</u> incidence de GVHD.
<b>Accessibilité</b>	Grand nombre requis de volontaires.	Accès <u>illimité</u> , Cryopréservation prolongée possible.

**Tableau 2. Tableau comparatif entre greffe de SCO et greffe de MO.**

Principales caractéristiques des greffes de moelle osseuse et de sang de cordon. [9]

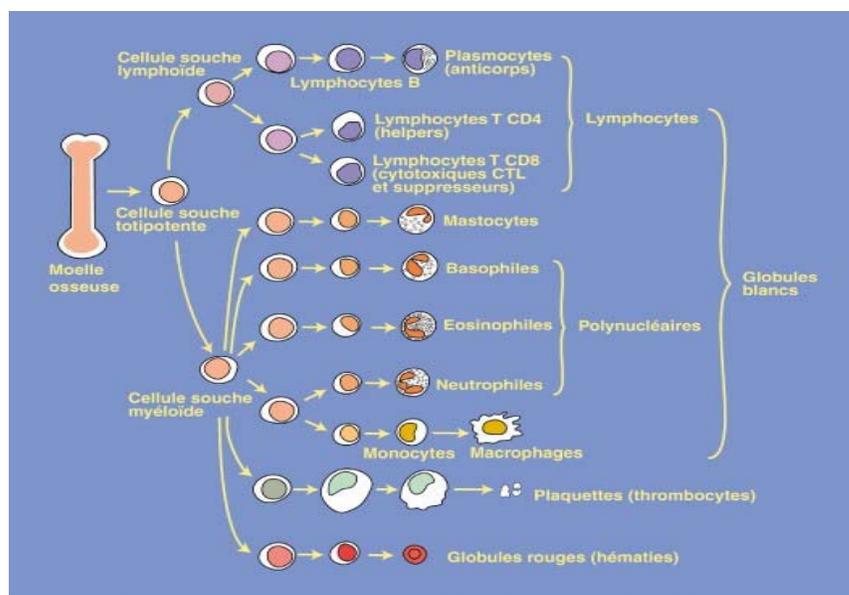
En résumé (tableau 2), la greffe à partir de SCO comporte plusieurs avantages sur la greffe de MO : il requiert une compatibilité HLA moindre, peut être congelé et donc disponible sur demande, et entraîne moins de réactions GvH. Toutefois, la taille limitée du greffon SCO est présentement la raison de son utilisation préférentielle en transplantation pédiatrique.

## 1.2 Les CSH et leur domiciliation dans la MO

Les CSH, précurseurs de tous les types de cellules sanguines, résident préférentiellement dans la MO. Elles ont la capacité d'autorenouvellement, afin de maintenir leur nombre constant, et de différenciation en lignées lymphoïde, myéloïde, et érythrocytaire [10]. Ce sont elles qui assurent le succès d'une greffe en vue d'une reconstitution immunitaire.

Les CSH ont la propriété de pouvoir se diviser de façon asymétrique et symétrique. La division asymétrique qui donne lieu à une cellule mère CSH, et une cellule fille plus différenciée, permet d'assurer le remplacement continu des cellules sanguines qui ont une durée de vie limitée. Par exemple, un globule rouge a une durée de vie d'environ 120 jours, les plaquettes sept jours et les granulocytes polynucléaires d'environ trois jours. Les CSH, pour garder un nombre suffisant et constant de ces cellules dans le sang, produisent quotidiennement  $200 \times 10^9$  globules rouges,  $150 \times 10^9$  plaquettes et  $50 \times 10^9$  globules blancs. En revanche, la division symétrique, donnant lieu à deux cellules filles CSH, permet de conserver un nombre de CSH suffisant (autorenouvellement).

Au sein de la MO, les CSH résident dans un endroit spécifique, appelé la niche. Dans cet endroit, les CSH trouvent le support physique de l'os, mais aussi le support physique et physiologique des cellules stromales de la MO. Les CSH sont instruites par leur contact avec les tissus voisins, les ostéoblastes et les cellules stromales [11]. Le phénomène de migration et de rétention des CSH dans la MO est appelé domiciliation. Le processus de reconstitution du système immunitaire est nommé hématopoïèse (figure 1).



**Figure 1. Hématopoïèse.** L'hématopoïèse s'effectue dans la MO. C'est le processus de reconstitution du système immunitaire pouvant être engendré par une seule CSH. [12]

### 1.2.1 Les cellules CD34<sup>+</sup>

Les CD (*cluster of differentiation*) désignent des marqueurs antigéniques de différenciation qui apparaissent ou disparaissent de la membrane cellulaire selon le type de cellule et son stade de maturation. Il existe environ 300 CD répertoriés jusqu'à présent. Par exemple, le CD19 désigne que la cellule est un lymphocyte B, alors que les cellules qui expriment le CD34 (désignées CD34<sup>+</sup>) sont des cellules souches et précurseurs hématopoïétiques. La molécule CD34 est une glycoprotéine de surface qui est impliquée dans les contacts intercellulaires. Cette molécule d'adhésion permet l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire de la MO et aux cellules stromales. La molécule CD34 est présente seulement dans les cellules humaines, mais pas sur les cellules murines. Les cellules CD34<sup>+</sup>, qui n'expriment pas le marqueur CD38 (CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>) sont considérées comme des CSH pluripotentes.

Toutes les cellules CD34<sup>+</sup> peuvent assurer la reconstitution à long terme de l'hématopoïèse, mais seulement une petite fraction parmi elles est capable d'autorenouvellement [13]. Il n'y a pas de marqueur CD identifiant cette sous-

population. Toutefois, l'autorenouvellement n'est pas indispensable pour le succès de la greffe, et son absence ne devient apparente qu'après des transplantations successives (par exemple en modèle animal, voir ci-dessous). Les études réalisées sur le SCO, la nôtre incluse, traitent des cellules CD34<sup>+</sup> [14].

### **1.3 Les chimiokines**

Le processus de domiciliation des CSH dans la MO requiert la migration dirigée des cellules [15, 16]. Ce processus intervient également dans la réponse inflammatoire. Dans les deux cas, les cellules doivent se déplacer dans les vaisseaux sanguins et traverser la barrière endothéliale. Les chimiokines orientent la migration des cellules vers les sites cibles [16]. Les chimiokines sont de petites protéines sécrétées, qui sont divisées en deux sous-familles basées sur la disposition de deux résidus cystéines (C) conservées, soit CC ou CXC (CC si les deux résidus cystéines sont adjacents, CXC s'ils sont séparés par un acide aminé quelconque).

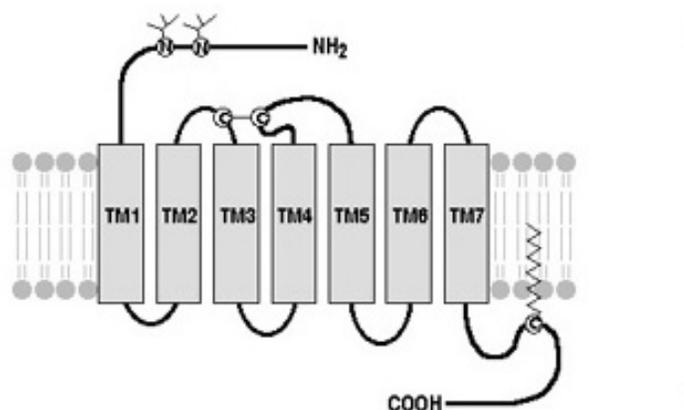
#### **1.3.1 La chimiokine SDF-1**

La chimiokine SDF-1 (*stromal cell derived factor 1*), aussi connu sous le nom CXCL12, a d'abord été identifié en tant que facteur favorisant la croissance des lymphocytes de type pré B [17]. SDF-1 a des rôles dans la migration, la survie, la prolifération et l'activation de différents types cellulaires hématopoïétiques et immunitaires [17, 18]. Cette chimiokine est produite de façon constitutive dans plusieurs tissus, tels que le foie et la MO, où son expression est régulée de façon positive par le milieu hypoxique [19].

### **1.4 Les récepteurs de chimiokines**

Les récepteurs de chimiokines font parti de la famille des RCPG (récepteurs couplés aux protéines G), qui possèdent sept domaines transmembranaires. Les RCPG

sont des protéines membranaires responsables de la transduction de signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Ils sont composés d'hélices  $\alpha$  reliées par des boucles intra et extra cellulaires (figure 2). Ces sept hélices  $\alpha$  délimitent une cavité où les ligands se fixent, activant le récepteur qui se lie à une petite protéine G sur la face cytoplasmique de la membrane. Les ligands peuvent aussi se lier au niveau des boucles extracellulaires.



**Figure 2. Représentation d'un RCPG.** RCPG constitué de ses sept domaines transmembranaires. [20]

Les RCPG peuvent former autant des homodimères que des hétérodimères avec d'autres RCPG. Ceci est le cas des récepteurs de chimiokine CXCR4, CCR2 et CCR5, par exemple [21-24]. Ces différentes combinaisons entre les récepteurs permet une diversification de la signalisation subséquente [22, 25-30]. Par exemple, l'hétérodimérisation entre CCR2 et CCR5 permet à ces récepteurs d'être 10 à 100 fois plus sensibles à leurs chimiokines respectives (MCP1 et RANTES) que lorsqu'ils sont sous forme d'homodimères [24].

Les RCPG sont impliqués dans de très nombreuses fonctions physiologiques comme la vision, l'olfaction, la régulation hormonale, la croissance et l'adhésion cellulaire. Ces fonctions les font intervenir dans de multiples pathologies; par conséquent, ils représentent le plus important groupe de cibles pharmacologiques [31].

### **1.4.1 CXCR4**

Les récepteurs de chimiokines sont des RCPG désignés CXCR1 à 7 et CCR1 à 11. CXCR4 est le récepteur de SDF-1 [32]. Il fut identifié en 1996 pour son rôle dans l'infection au VIH (virus de l'immunodéficience humaine), en tant que corécepteur pour l'entrée du virus [33, 34]. CXCR4 est exprimé très tôt durant le développement embryonnaire où il tient un rôle dans la migration des précurseurs pendant l'embryogenèse. L'ablation génétique du gène de CXCR4 dans un modèle murin mène à la mort périnatale des souriceaux avec de multiples défauts d'organogenèse au niveau cérébral, cardiaque, vasculaire et immunitaire [35-37]. CXCR4 est retrouvé sur tous les leucocytes (plaquettes incluses), mais également sur les cellules épithéliales, endothéliales et les neurones [38].

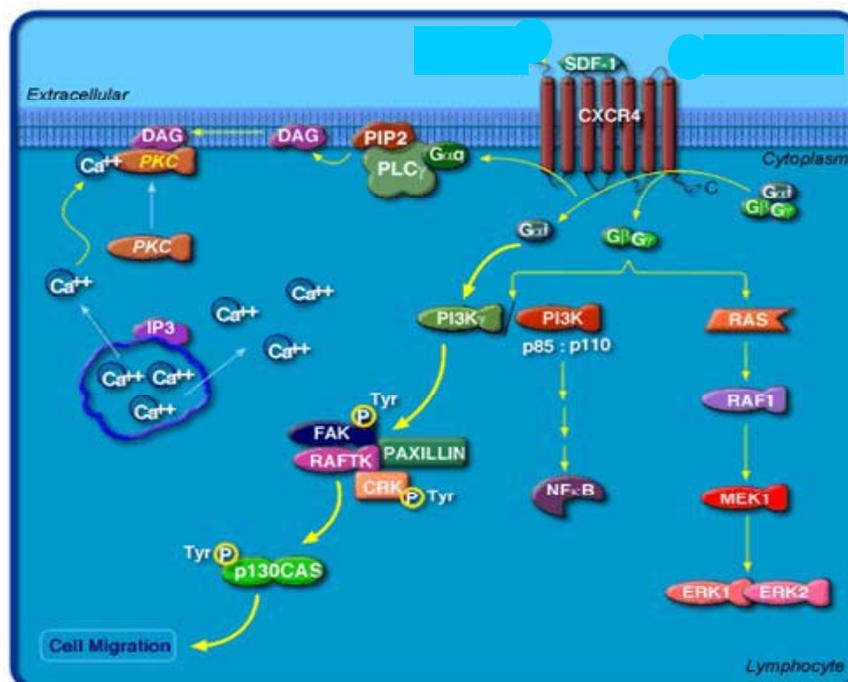
### **1.4.2 CXCR4 et la migration**

L'expression de CXCR4 sur des cellules cancéreuses mène à leur migration à des sites distants de la tumeur primaire, où ils forment des métastases qui sont responsables de la plupart des décès dus au cancer [38]. De plus, l'inhibition pharmacologique de CXCR4 dans des modèles de maladies inflammatoires, tels que l'asthme [39] et l'arthrite rhumatoïde [40], mène à une amélioration symptomatique, suggérant son implication dans la migration des leucocytes effecteurs comme les neutrophiles et les cellules T au site affecté [31].

De plus, plusieurs études portées sur le processus de migration dans la leucémie désignent l'importance de l'implication de la chimiokine SDF-1 et du récepteur CXCR4 [41]. Par exemple, la migration et la domiciliation des cellules leucémiques de type pré B à la MO sont dépendantes de CXCR4 et de SDF-1 [42]. La formation de métastases a lieu principalement dans la MO, les poumons, et le foie, qui sont les sites les plus importants de production du SDF-1 [39]. Lorsque les cellules leucémiques sont préincubées avec l'antagoniste T140, du récepteur CXCR4, la migration des cellules leucémiques vers SDF-1 est complètement inhibée [42].

### 1.4.3 Effets de SDF-1 sur CXCR4

CXCR4 peut donc activer différentes cascades de signalisation menant à la migration cellulaire (figure 3). Notamment, la signalisation intracellulaire induite par la fixation de son ligand, le SDF-1, engendre l'activation de la protéine G. Cette dernière, en combinaison avec les phospholipases C, va permettre la formation de l'IP3 (inositols-1,4,5-triphosphates) et de DAG (diacylglycerol). L'IP3 entraîne une augmentation du niveau de calcium intracellulaire important pour le chimiotactisme, puisqu'il assure la réversibilité des interactions entre les molécules d'adhésion et la surface sur laquelle la cellule se déplace [43]. De même, cette protéine G active la PI3K (inositoltriphosphate kinase) et les kinases MEK/ERK dans plusieurs types cellulaires, ce qui contribue à activer une réponse migratoire chez la cellule. [44-46]. La protéine G activée stimule aussi la signalisation des petites GTPase (Rho, Rac et cdc42) via les kinases de la famille Src, qui sont importantes pour les réarrangements cytosquelettiques des cellules lors du chimiotactisme [47].



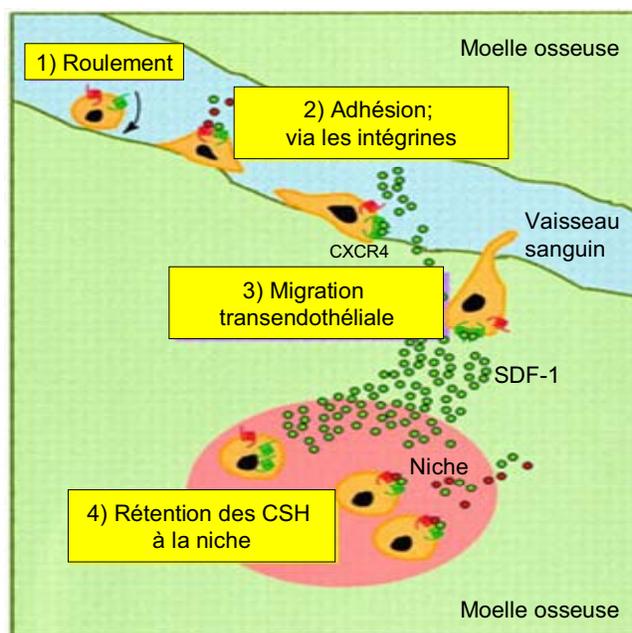
**Figure 3. Signalisation intracellulaire de CXCR4/SDF-1.** Schéma représentant la signalisation intracellulaire engendrée par CXCR4/SDF-1 menant à une réponse migratoire. Suite à la liaison de SDF-1 sur CXCR4, les sous-unités de la protéine G activent différentes voie de signalisation; notamment la voie calcique et la voie des MAP kinases. [48]

### 1.5 Rôles de CXCR4/SDF-1 dans la domiciliation (figure 4)

La prise de greffe des cellules CD34<sup>+</sup> chez les souris NOD/SCID (voir ci-dessous) a permis de révéler que ce processus était dépendant de l'expression de la chimiokine SDF-1 et de son récepteur, CXCR4 [49]. De plus, un modèle murin génétiquement dépourvu de SDF-1 a révélé une absence de la prise de greffe et de la reconstitution immunitaire [50], de même, une ablation génétique de CXCR4, son récepteur, engendre aussi ce phénotype. Le SDF-1 est la seule chimiokine qui induit la migration dirigée des cellules humaines CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, ainsi que des cellules murines Sca1<sup>+</sup>/ckit<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup> équivalentes [49, 51]. La molécule SDF-1 humaine et murine ne diffèrent que par un seul acide aminé [52].

Le SDF-1 régule l'interaction entre les cellules CD34<sup>+</sup> et le microenvironnement de la MO; le SDF-1 étant d'ailleurs produit par les cellules endothéliales, les cellules stromales et les ostéoblastes de la MO [19, 53]. Il a été démontré que la niche, dans laquelle résident les CSH au sein de la MO, est une région hypoxique de la MO où il y a davantage de SDF-1 produit, ce qui permet la rétention des CSH dans cette niche [19]. Évidemment, le blocage de CXCR4 donne aussi lieu à la mobilisation des CSH de la MO, qui émigrent alors dans le sang circulant [54].

Chez les cellules CD34<sup>+</sup>, la présence de SDF-1 induit la sécrétion des métalloprotéinases (MMP) [42, 55]. Les MMP sont des enzymes protéolytiques sécrétées, ils jouent un rôle crucial dans la motilité et l'invasion à travers la matrice extracellulaire [56]. La chimiokine SDF-1 active les intégrines LFA-1, VLA-4 et VLA-5 présents à la surface des cellules CD34<sup>+</sup>. Les intégrines sont des protéines de surface, servant à l'adhésion cellulaire. Ils jouent un rôle très important dans la migration, la différenciation et la survie des cellules. Chez les souris NOD/SCID (section 1.7.2), il a été démontré que ces intégrines ont un rôle important dans la migration transendothéliale et dans la prise de greffe des CSH. En effet, le traitement par un anticorps contre les VLA empêche la prise de greffe de ces cellules, alors que, lorsque le traitement est dirigé contre les LFA, c'est une diminution significative de la prise de greffe qui survient [57].



**Figure 4. Domiciliation dépendante de CXCR4/ SDF-1.** Schéma illustrant les différentes étapes de la domiciliation cellulaire des CSH : 1) le roulement sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins conduit à 2) l'adhésion à la barrière endothéliale via les intégrines menant à 3) la migration transendothéliale. Les CSH migrent dans la MO jusqu'à la niche 4) où elles sont retenues pour engendrer la repopulation de la MO. Ce processus de domiciliation est régité et dépendant de CXCR4/SDF-1 [24].

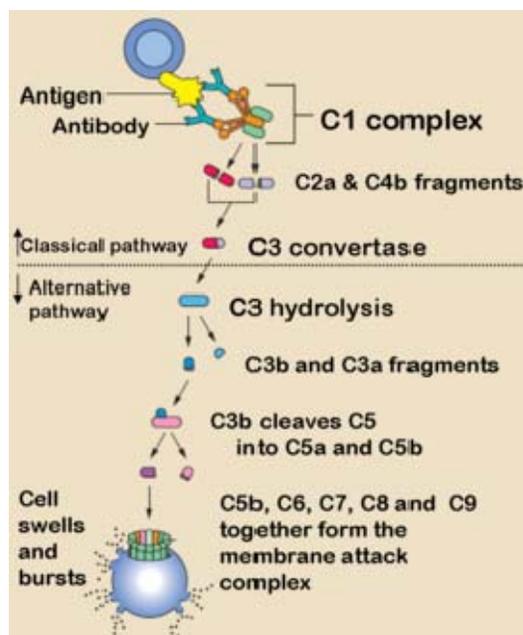
Les souris déficientes en SDF-1, ou qui n'expriment pas CXCR4, ont de graves problèmes hématopoïétiques autant myéloïde que lymphoïde, et ce, dès leur état fœtal [58, 59]. Effectivement, l'absence d'expression de CXCR4 dans le modèle murin a révélé qu'il est essentiel à l'hématopoïèse, au développement et à l'organisation du système immunitaire [49, 54, 60, 61].

## 1.6 Molécules qui favorisent la migration dirigée dépendante de CXCR4/SDF-1

### 1.6.1 Le système du complément (C) (figure 5)

Des molécules biologiques peuvent induire la migration dirigée des cellules hématopoïétiques; c'est le cas des constituants du système du complément, qui attire les leucocytes vers le site de l'inflammation. Le système du complément a un rôle majeur

dans l'immunité humorale. Il est impliqué dans des activités qui sont à la fois antimicrobiennes, chimiotactiques, inflammatoires et activatrices de l'immunité. L'activation de ce système repose sur une activation en cascade (figure 5) où chaque composant a une durée de vie active extrêmement courte. En effet, certains des composés activés redeviennent rapidement inactifs s'ils n'entrent pas en contact avec la composante suivante de la cascade. Cette cascade hautement régulée débute par une activité enzymatique protéolytique. Les principaux facteurs du complément sont les molécules désignées C1 à C9. La synthèse des facteurs du C s'effectue principalement par les hépatocytes du foie. Des petits fragments peptidiques résultant du clivage de ces molécules, C2a à C5a, possèdent de fortes activités anaphylatoxiques et chimiotactiques. L'initiation de la voie classique débute par le C1 lorsqu'il se retrouve en présence de complexes antigène-anticorps. La voie classique implique les facteurs C2, C4, C5, C6, C7 et C8. Le C3 effectue, quant à lui, l'initiation de la voie alterne par fixation non spécifique à des structures microbiennes [62]. Contrairement à la voie classique, la voie alterne n'a pas besoin de la présence d'un anticorps pour être initiée. Par ce fait, la voie alterne est un constituant du système immunitaire naturel inné.



**Figure 5. Système du complément.** La voie du complément est impliquée dans l'immunité humorale. Il s'agit d'un processus d'activation protéolytique en cascade hautement régulé, pouvant mener à la lyse de cellules, bactéries ou virus, à la phagocytose des antigènes particulières, à la sécrétion de molécules immunorégulatrices et à l'élimination des complexes immuns de la circulation. [63].

### 1.6.1.1 La composante C3

Dans la voie classique, le C3 est clivé en C3a et C3b par l'activité enzymatique de la C3 convertase, tandis que, dans la voie alterne, le C3 sérique, qui possède une liaison thioester instable, subit plutôt une lente hydrolyse spontanée résultant en C3a et C3b. Le peptide C3a (figure 6) est un des médiateurs majeurs du processus inflammatoire. C'est le petit peptide terminal de huit acides aminés (70-77) du C3a qui constitue la partie active de cette molécule lors d'une réponse inflammatoire. L'arginine terminale est, quant à elle responsable de l'effet anaphylatoxique du C3a. [3]



**Figure 6. La molécule C3a du complément.**

Représentation de l'aspect moléculaire du C3a, produit du complément. Le peptide actif de cette molécule, les acides aminés 70 à 77, sont situés dans la partie amovible de ce composé (en bas sur ce dessin). L'arginine responsable de la fonction anaphylatoxique de cette molécule se retrouve à l'extrémité (en bas) [1].

#### 1.6.1.2 Le C3a et l'axe CXCR4/SDF-1

La composante C3 de ce système du complément possède de grandes propriétés chimiotactiques. En effet, en cas d'inflammation ce dernier peut favoriser l'adhésion et la migration dirigée et transendothéliale des leucocytes afin que ceux-ci puissent atteindre le site d'activation du complément dans les tissus [64, 65]. Il est également reconnu que le C3a augmente la migration des cellules CD34<sup>+</sup> contenues dans la MO de l'humain, ainsi que des cellules B et T de la souris, vers le SDF-1 [66]. Le récepteur de cette molécule connu est le C3aR, et plus récemment le C5L2 tous deux des RCPG. Mise à part cette activité chimiotactique, le C3a augmente aussi la migration de cellules vers des chimiokines, tel le SDF-1, cependant, il a été démontré dans plusieurs études que cet effet est indépendant de ses deux récepteurs, le C3aR et le C5L2 [66, 67]. Le C3a<sub>desarg</sub> est un produit de dégradation naturel du C3a. Son contact avec une carboxypeptidase le prive son arginine terminale, ainsi que de l'effet anaphylatoxique du C3a. Ce produit a aussi le potentiel de stimuler le chimiotactisme induit par le SDF-1 des cellules souches et précurseurs de la MO murine et humaine, ainsi que de la lignée B [66]. De plus, il a été démontré que la présence de ces deux molécules, C3a et C3a<sub>desarg</sub>, rendait les cellules REH (lignée de cellules leucémiques provenant d'un patient atteint d'une leucémie lymphoblastiques aiguë de type pré B) plus sensible à SDF-1 *in vitro*.

### 1.6.2 Facteurs lipidiques favorisant la migration

Une autre molécule est reconnue pour favoriser la migration de cellules exprimant le CXCR4 vers le SDF-1, le sphingosine-1-phosphate (S1P), un glycolipide dont le récepteur est un RCPG. Il existe cinq récepteurs au S1P décrit, S1P1 à S1P5. S1P1 est exprimé en grande quantité à la surface des lymphocytes T circulants. Cette expression régule la prolifération, le chimiotactisme et la distribution tissulaire des cellules T suite à son activation par le S1P [68]. Le S1P est biologiquement un médiateur lipidique. Il régule l'angiogenèse, la stabilité vasculaire et la perméabilité. Au sein du système immunitaire, un gradient de S1P entraîne la circulation des cellules T et B. L'interaction entre le S1P et son récepteur est requise pour la mobilisation des cellules immunitaires hors des organes lymphoïdes [69].

De plus, un prétraitement des souris NOD/SCID avec un agoniste de S1P1, le FTY720, entraîne une domiciliation et translocation des CSH à la MO et à la rate [70]. Des études faites à partir de cet analogue du S1P ont démontré qu'il favorisait la migration transendothéliale ainsi que la domiciliation des cellules CD34<sup>+</sup> [70]. Le FTY720 provient d'une herbe chinoise, *Iscaria sinicalarii*, et d'ailleurs utilisé beaucoup en médecine chinoise. Il améliore la survie de l'allogreffe chez l'humain autant que chez les modèles animaux [71]. D'ailleurs, le FTY720 est documenté pour son efficacité sur des modèles de néoplasie [72], d'athérosclérose [73], d'ischémie rénale [74-76], de douleur [77], d'angiogenèse [78] et des maladies pulmonaires [79]. Cependant, puisque cette molécule est peu sélective, c'est-à-dire qu'elle se lie aussi au S1P3, S1P4 et S1P5, elle occasionne des effets secondaires comme la bradycardie [80]. Il serait donc intéressant de trouver une molécule plus sélective.



### 1.7 L'utilisation du modèle murin

Pour des considérations éthiques et pratiques, les chercheurs étudient souvent les maladies en utilisant la culture cellulaire. Il est évident qu'un modèle *in vitro* ne reflète

pas la réalité d'un organisme complet. C'est pourquoi le modèle murin est un système de choix. En effet, plus de 80 % des modèles animaux utilisés sont de types murins.

### **1.7.1 Les avantages**

Pourquoi utiliser la souris comme modèle? D'abord pour sa similitude génétique avec l'humain; 99 % des gènes de la souris ont leur homologue chez l'humain [81]. Grâce à cette homologie, il est facile d'étudier le fonctionnement des gènes chez les souris et de découvrir leurs rôles sur la santé humaine par la suite. De plus, le séquençage du génome offre un atout considérable quant à la création de modèles d'études par modifications génétiques. Les souris génétiquement modifiées permettent une analyse spécifique d'une maladie ou d'un traitement puisqu'elles peuvent tenir compte des facteurs génétiques, de l'environnement et d'autres facteurs qui peuvent interagir avec les organismes vivants à travers la durée de leur cycle de vie.

Cependant, ce modèle a sa limite; les mutations chez la souris n'engendrent pas toujours les mêmes conséquences que les mutations correspondantes chez l'humain.

### **1.7.2 Les différents fonds génétiques**

Plusieurs modèles murins à différents fonds génétiques sont disponibles sur le marché. Certains modèles sont plus appropriés à l'étude de certaines maladies que d'autres. Notons d'abord le modèle des souris NOD (*nonobese diabetic*). Elles sont nommées ainsi car elles sont portées à développer un diabète de Type 1, c'est-à-dire auto-immun engendré par les cellules T qui s'attaquent aux cellules bêta du pancréas, sécrétant l'insuline [5, 82, 83]. Toutefois, ces souris ne sont pas obèses comme c'est souvent le cas chez un humain atteint de ce type de diabète. Ce modèle est caractérisé par un déficit fonctionnel chez les cellules NK (*natural killer*) [84, 85], par une absence des molécules du complément circulant (voir section 1.7.1) [86] et un défaut dans la fonction et la différenciation des cellules présentatrices d'antigènes causé par un déficit de sécrétion d'IL-1 [83, 84, 87].

Par la suite, après plusieurs croisements en série pour la mutation SCID sur des souris à fond NOD, les souris NOD/SCID sont obtenues. Ce modèle apporte plusieurs avantages, notamment pour les études sur les déficits immunitaires ou encore pour la différenciation des cellules hématopoïétiques humaines. Tout d'abord, ces souris ne développeront pas de diabète, contrairement aux souris NOD [88]. De plus, ce modèle est homozygote pour la mutation SCID ce qui rend ses cellules NK et T non fonctionnelles d'un point de vue immunitaire. Le système du complément ainsi que les lymphocytes B sont également non fonctionnels chez ces souris. Les souris NOD/SCID sont souvent utilisées pour des transplantations de cellules souches [89-91].

La mutation SCID, chez l'homme, est une déficience hématologique liée au chromosome X est caractérisée par un arrêt de la différenciation des lymphocytes T et des cellules NK à un stade primitif. Ce blocage est causé par une mutation dans le gène codant le  $\gamma_c$ , une sous-unité partagée par les récepteurs de cytokine pour les interleukines 2, 4, 7, 9 et 15. Ce récepteur est essentiel pour les progéniteurs lymphoïdes, puisqu'il permet la transmission des signaux intracellulaires pour leur croissance, leur survie et leur différenciation [92].

Dernièrement, un nouveau modèle est arrivé sur le marché, les souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup> [93]. Ce modèle, déficient pour la chaîne  $\gamma_c$  (décrite ci-dessus) apporte l'avantage d'être dépourvu de cellules NK matures par l'ablation du récepteur à l'IL-2, en plus de la déficience en cellule B et T que procure les fonds génétiques murins NOD et SCID. Les souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup> sont le modèle murin le plus immunodéficient disponible présentement.

## **1.8 Conclusion, synthèse**

La prise de greffe est composée de plusieurs étapes : d'abord la domiciliation de la CSH dans la MO, suivi de sa rétention à l'intérieur de la niche, puis de la repopulation de la MO et de la reconstitution immunitaire. La domiciliation des cellules souches dans la MO et sa repopulation est un phénomène encore mal compris, cependant, l'interaction entre le récepteur CXCR4 et la chimiokine SDF-1  $\gamma$  joue un rôle essentiel. En effet, les

cellules exprimant le CXCR4, les CSH et les précurseurs hématopoïétiques, dont les cellules CD34<sup>+</sup>, vont migrer vers le site de production du SDF-1, la MO.

Comme source de CSH ou de précurseurs hématopoïétiques dans un but de transplantation, le SCO est une des plus prometteuses, cependant trop d'échecs à la prise de la greffe surviennent dus à la quantité limitée par greffon. Nous pensons que le problème dans la prise de greffe ne réside pas dans la quantité de cellules contenue dans un SCO, mais est plutôt dû au fait que celles-ci ne parviennent pas à la MO. L'optimisation de l'étape de la domiciliation cellulaire pourrait pallier au problème d'insuffisance cellulaire.

## 1.9 But de l'étude

L'objectif de mon projet de recherche visait à **comprendre le mécanisme de la migration cellulaire dépendant de l'interaction CXCR4/SDF-1** dans le but d'améliorer le succès des prises de greffe à partir de SCO.

Pour réaliser notre objectif, il fallait:

- 1- Décrire l'effet moléculaire sur CXCR4 de composés qui modulent positivement la réponse migratoire vers SDF-1 (C3a et ses dérivés ainsi que le FTY720 et le SEW-2871).
- 2- Déterminer si ces composés interagissent directement avec CXCR4.
- 3- Vérifier si un problème de prise de greffe ne serait pas intrinsèque au cordon utilisé, et s'il est possible de prédéterminer les capacités du greffon à cet effet.
- 4- Caractériser l'importance de l'expression de CXCR4 sur les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO lors de leur domiciliation dans la MO.

En premier lieu, la réponse migratoire induite par des composés dérivés du complément C3a (C3a<sub>desarg</sub> et C3a<sub>70-77</sub>) ou bien du facteur lipidique S1P (SEW-2871) sur la migration cellulaire a été observée. Les essais de migration ont été réalisés *in vitro* à partir de cellules CD34<sup>+</sup> purifiées de SCO et de lignées de cellules B et T, les cellules REH et les cellules CEM. Nous avons vérifié si ces composés avaient un effet agoniste

propre sur ces lignées cellulaires et/ou s'ils modulaient la réponse de ces cellules vers SDF-1. Ces informations aideront à concevoir des mimétiques pharmacologiques dans la perspective d'un prétraitement du greffon pour la potentialisation de la prise de la greffe après transplantation de SCO. En effet, le C3a<sub>70-77</sub> est utilisé dans la perspective de développer un prétraitement pharmacologique du greffon avec la plus petite molécule active possible. De même, que l'utilisation du C3a<sub>desarg</sub>, l'arginine terminale en moins, ce produit adopte une conformation beaucoup plus stable, et perd sa propriété anaphylatoxique. En vue d'une utilisation clinique, l'effet anaphylatoxique est à éviter et la stabilité moléculaire à souhaiter. Pour ce qui est de l'utilisation du SEW-2871, nous pensions que cette molécule pouvait avoir des effets pharmacologiques intéressants, puisque son analogue le FTY720 est connu pour favoriser la migration transendothéliale ainsi que la domiciliation des cellules CD34<sup>+</sup> [70]. Par contre, contrairement au FTY720, la molécule SEW-2871 est beaucoup plus sélective pour S1P1. Cela pourrait éviter les effets indésirables apparaissant suite à l'utilisation du FTY720 occasionnés par la non-sélectivité de ce dernier.

En second lieu, la liaison directe sur CXCR4 des composés utilisés a été étudiée en utilisant la méthode du BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) ainsi que la cytométrie en flux. Nous pensions que la modulation favorable de la réponse migratoire engendrée suite à leur utilisation était dépendante de CXCR4, et qu'une liaison directe sur CXCR4, conjointe ou non avec le SDF-1 serait à l'origine de cette réponse.

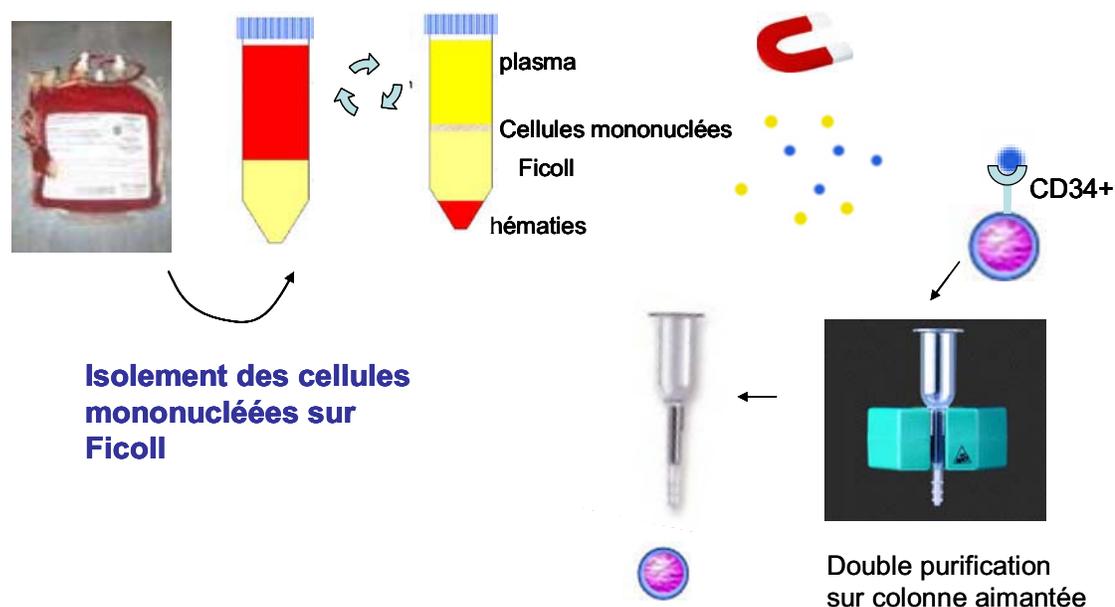
Ensuite, pour l'évaluation de la prise de greffe *in vivo*, un modèle murin a été utilisé, des souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup>. Ce modèle a servi à l'évaluation des propriétés intrinsèques des différents cordons sur la prise de greffe autant qu'à l'évaluation de l'expression de CXCR4 sur des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO lors de leur domiciliation à la MO. Nous supposons que la prise de greffe était intrinsèque au cordon utilisé. La corrélation de celle-ci avec les migrations *in vitro* ainsi qu'avec la quantification du nombre de CXCR4 exprimé a été évaluée en vue d'une prédétermination qualitative du greffon. En effet, si un cordon qui migre peu n'occasionnait pas une prise de sa greffe, et que ceci corrélait avec un faible niveau d'expression du récepteur CXCR4 en surface des cellules CD34<sup>+</sup> de ce SCO, cela permettrait aux cliniciens de choisir les cordons dont il résulterait une transplantation réussie.

Pour l'évaluation de l'importance du niveau d'expression de CXCR4 lors de la domiciliation à la MO, une méthode de cytométrie en flux quantitative a été employée. La quantification du nombre de récepteurs a été effectuée tout au long de la reconstitution immunitaire de souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup>, suite à une transplantation de cellules CD34<sup>+</sup> de SCO. Bien que le rôle de CXCR4 soit essentiel dans le processus de prise de greffe, ces expériences ont permis d'analyser l'impact de la quantité de CXCR4 exprimé en surface des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO lors de leur domiciliation.

## **2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **Purification des cellules CD34<sup>+</sup> de cordon ombilical**

Le consentement de la mère est requis pour l'utilisation du sang de cordon que ce soit pour la recherche ou une transplantation. Le sang après extraction du cordon ombilical est conservé dans une poche stérile avec héparine. Nous recevons les poches de sang de la banque de sang de l'hôpital Sainte-Justine, un ou deux jours suivant l'accouchement. Les poches de sang peuvent être conservées à température pièce ou à 4°C jusqu'à la purification des cellules CD34<sup>+</sup>. Pour la purification des cellules CD34<sup>+</sup>, le sang est d'abord dilué 1/3 dans une solution de PBS-héparine 0,6 % (Sigma). Ensuite, il est déposé sur une solution de Ficoll (GE) et centrifugé durant 30 minutes à température pièce, sans frein à 1800 rpm (rotation par minute). La couche de cellules nucléées est récupérée, diluée dans la solution PBS-héparine 0,6 % et centrifugée à 1800 rpm à température pièce, quatorze minutes avec frein. Le culot à concentration cellulaire de  $1 \times 10^8$  cellules/300µl est resuspendu dans une solution de PBS-Héparine 0,6 %-BSA 0,5 % dégazéifiée. Les cellules resuspendues sont incubées trente minutes à 8 °C avec des billes magnétiques couplées à des anticorps anti-CD34, 100µl/ $1 \times 10^8$  cellules (Miltenyi Biotec). La suspension est centrifugée cinq minutes à 4 g, pour enlever le surplus de billes (le surnageant). Le culot est resuspendu dans une solution de PBS-Héparine 0,6 %-BSA 0,5 % dégazéifié. Les cellules sont par la suite filtrées dans une colonne aimantée (Miltenyi Biotec). Les cellules portant l'antigène CD34 sont aimantées à la colonne. Une double purification est effectuée (colonnes 25MS et 25LS, Miltenyi Biotec) (figure 7). Les cellules CD34<sup>+</sup> purifiées sont comptées sur un hémacytomètre et congelées dans l'azote liquide dans une solution de SVF 50% DMSO.



**Figure 7. Purification des cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon ombilical.** Schéma illustrant l'isolation des cellules CD34<sup>+</sup> provenant d'un SCO. Les cellules nucléées sont d'abord isolées sur Ficoll, puis récupérées et incubées 30 minutes à huit degrés Celcius avec des billes magnétiques couplées à un anticorps anti-CD34. Les cellules subissent ensuite une double purification sur colonne aimantée. Les cellules CD34<sup>+</sup> sont ensuite récupérées lorsque la colonne est retirée de l'aimant.

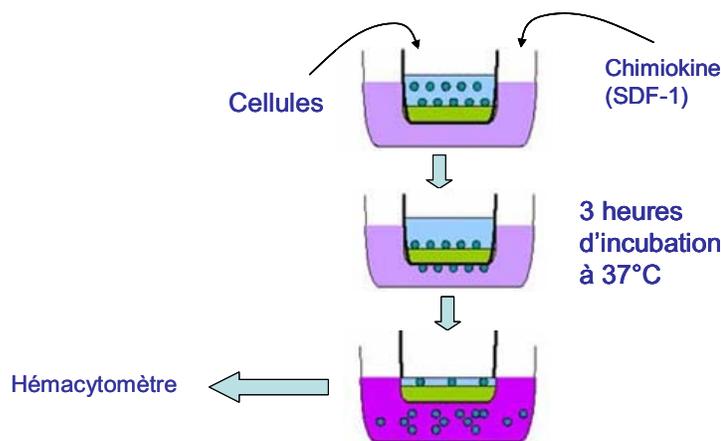


**Figure 8. Plaque de migration.** Plaque Chemotx de Neuroprobe utilisée pour la migration cellulaire.

### Migration cellulaire

Les essais de migration cellulaire *in vitro* ont été réalisés à l'aide de plaques de 96 puits (Chemotx, NeuroPobe Inc., Gaithersburg, MD, USA) (figure 8). Le milieu de migration utilisé est une solution de RPMI 1640 + 0,2 % de BSA (Sigma Aldrich). Dans les puits inférieurs, les concentrations respectives de *stromal cell derived factor-1* (SDF-1) (R&D systems) ont été déposées dans un volume total de 29µl. Une membrane constituée de pores de cinq microns sépare les cellules du chimioattractant. Les cellules y sont déposées à raison de  $2,5 \times 10^4$  cellules/puits de 25µl. La migration s'est effectuée durant trois heures dans un incubateur à 37 °C + 5 % CO<sub>2</sub>. Ensuite, les cellules qui ont

passées la membrane et se sont retrouvées dans le puits inférieurs sont comptées sur un hémacytomètre (figure 9). Chacune des migrations a été effectuée en triplicata.

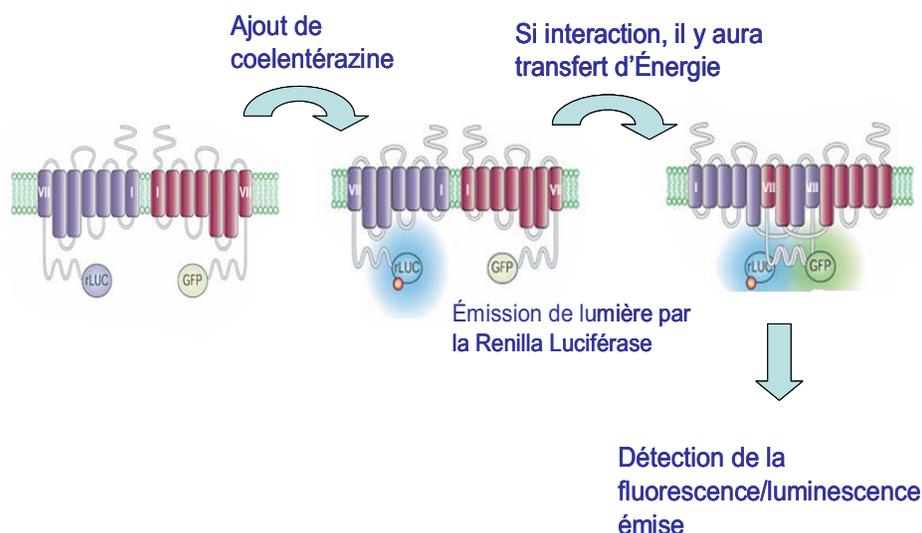


**Figure 9. Expérience de migration cellulaire.** Schéma illustrant la méthode de la migration cellulaire sur les plaques chemotx (neuroprobe). Les cellules sont déposées sur une membrane aux pores de 5 microns. La chimiochine est déposée dans les puits inférieurs. Suite à une incubation de trois heures à 37°C les cellules ayant traversées la membrane sont comptées sur un hémacytomètre.

### **Méthode de BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*)**

Pour effectuer cette technique, il faut fusionner la partie C-terminale d'un RCPG à la Rénilla luciférase (Rluc) et l'autre partenaire d'interaction à la YFP et co-exprimer les protéines de fusion dans des cellules vivantes. Nous utilisons des cellules HEK293T transfectées de façon transitoire avec des constructions permettant l'expression de CXCR4 fusionnée à la YFP (HA-Flag-CXCR4-YFP) et à la luciférase (HA-Flag-CXCR4-RLuc) par la méthode de polyéthylèneimine [94]. Ceci permet l'expression d'un dimère CXCR4 couplé à l'une et à l'autre de ces molécules. Les cellules transfectées sont déposées à confluence de 80% dans une plaque de 96 puits au fond translucide préalablement traitées à la poly-D-lysine. Les cellules sont stimulées avec différents ligands durant cinq minutes à 37°C, puis le substrat de la luciférase, la coelenterazine à concentration de 5µM est ajouté. Suite à l'ajout de la coelentérazine H, l'énergie produite suivant son oxydation par la Rluc est transférée à l'accepteur YFP qui émettra

alors de la fluorescence (figure 10). Un signal de BRET est mesuré si les protéines fusionnées au donneur et à l'accepteur interagissent si la distance entre eux est réduite à 100Å ou moins. Le signal de BRET est déterminé par le ratio d'émission YFP/LUC. Les valeurs sont corrigées par la soustraction du bruit de fond correspondant à l'émission seul du récepteur couplé à la luciférase. Chaque condition est effectuée en triplicata.



**Figure 10. Principe de la méthode de BRET.** Deux protéines (ou récepteurs) sont fusionnées respectivement à une molécule de YFP et une molécule de Rluc. Suite à l'ajout de la coelentérazine, la molécule de luciférase émet de la luminescence. Si les deux protéines sont à moins de 100Å, l'énergie produite est transférée à la YFP qui émettra alors de la fluorescence. Le signal de BRET correspond au ratio fluorescence/luminescence émise. [95]

### Méthodes d'injection

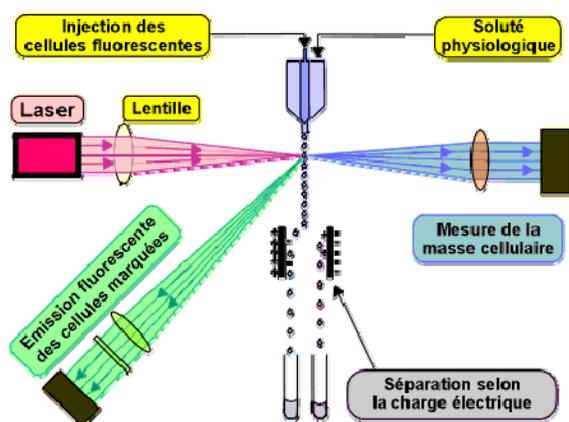
Pour toutes études faites sur des animaux, un protocole doit être dûment rempli et présenté au comité CIBPAR, qui veille aux bonnes pratiques sur les animaux de laboratoire ainsi qu'aux considérations éthiques du projet. Si au cours de l'expérience, les souris démontrent un quelconque signe de souffrance, nous devons les sacrifier. Pour la greffe, nous avons utilisé des souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup> irradiées à trois Grays six à douze heures avant l'injection. (L'irradiation cause un dommage cellulaire qui entraîne la relâche de SDF-1 favorisant la prise de la greffe [13, 96]). Nous avons injecté en

intraveineux  $1 \times 10^5$  cellules CD34<sup>+</sup> purifiées provenant de sang de cordon ombilical préalablement incubées cinq heures à 37 °C + 5 % CO<sub>2</sub> avec les facteurs hématopoïétiques suivants : 50 ng/ml SCF (*stem cell factor*), 10 ng/ml IL-3 (interleukine-3), 50 ng/ml Flt3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) et 25 ng/ml TPO (thrombopoïétine).

L'injection intra-osseuse s'effectue dans les fémurs. Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isofurane. Nous perçons d'abord un trou dans le fémur au niveau du genou avec une aiguille 25G5/8. Ensuite, nous retirons cette aiguille et y déposons les composés ou le PBS (contrôle) à l'aide d'une aiguille à insuline.

### Cytométrie en flux

La cytométrie en flux consiste principalement à distinguer les différents types cellulaires présents dans un échantillon donné. Les cellules sont séparées selon leur masse, leur fluorescence et leur charge électrique. Pour isoler les cellules désirées, il suffit de placer dans notre échantillon un anticorps spécifique des antigènes qu'elles présentent (figure 11). Cet anticorps doit être couplé à un fluorochrome qui, suite au passage devant le faisceau laser, sera détecté par la machine.



**Figure 11. Cytométrie en flux.** Figure illustrant la séparation cellulaire effectuée par la méthode de cytométrie en flux. La séparation se fait selon la taille et la fluorescence émise provenant de la cellule et des anticorps utilisés.

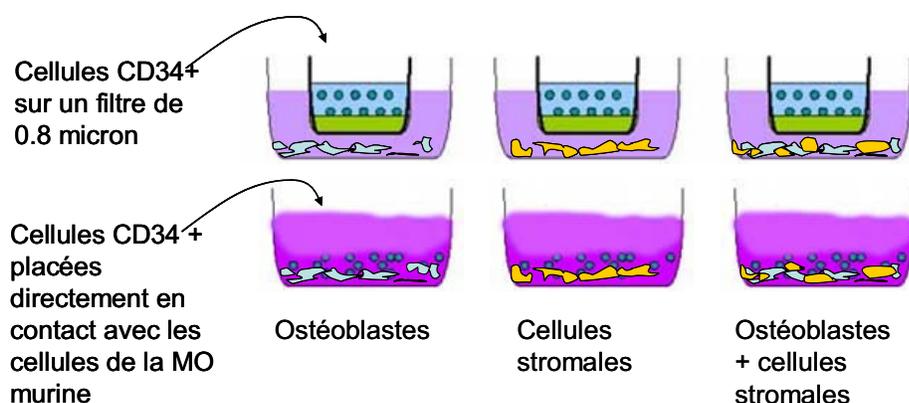
Les cellules analysées ont préalablement été incubées trente minutes à 4 °C en présence de l'anticorps désiré dans une solution de PBS-FBS 2 %. Chaque marquage a été accompagné d'un marquage au 7-AAD (7-Amino-actinomycin D), qui permet d'éliminer les cellules mortes lors de notre analyse. Pour les marquages intracellulaires, nous avons fixé les cellules à l'aide de formaldéhyde 3,7 %, avant leur perméabilisation avec une solution de PBS-triton X-100 0,1 %, suivi par le marquage. La quantification du nombre de récepteurs CXCR4 a nécessité l'anticorps anti-CXCR4-PE (clone 12G5, BD Biosciences) utilisé à une concentration saturante de 20µl/1x10<sup>6</sup> cellules, et l'utilisation du *Phycoerythrin Fluorescence Quantification Kit* (QuantiBRITE™, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada).

### **Isolement et culture des cellules de moelle osseuse de souris**

Les cellules provenant des fémurs de souris C57BL/6 sont récupérées par élution avec une solution de D-PBS froid. Les cellules extraites sont passées au travers une membrane de nylon de 40 microns (BD Bioscience, Bedford, MA) et comptées avec 3 % d'acide acétique (lyse des globules rouges), 0,025 % de solution cristal violet (identifie les cellules mortes). Les cellules sont ensuite mises en culture à confluence de 4X10<sup>6</sup> cells/ml dans un milieu de  $\alpha$ -MEM 15 % sérum de veau fœtal (SVF) contenant 100 U/ml de pénicilline/streptomycine. Le milieu est changé aux sept jours. Les cellules stromales mésenchymateuses recherchées adhèrent au plastique du puits après quatorze jours. Elles sont par la suite remises en culture à grande confluence pour expansion. Les cellules stromales doivent être utilisées avant d'avoir atteint la 10<sup>e</sup> génération. Pour la récupération d'ostéoblastes, les os sont coupés dans le sens de la longueur et mis dans des plaques de culture de 100 mm de diamètre dans un milieu de D-MEM 10 % SVF 100 U/ml pénicilline/streptomycine. Les ostéoblastes sont obtenus après dix jours de culture.

### **Coculture entre les cellules CD34<sup>+</sup> et les cellules de moelle murine (figure 12)**

Les cellules stromales mésenchymateuses de souris sont mises en culture de façon à atteindre une confluence de 100 % deux jours plus tard. Les cellules CD34<sup>+</sup> de sang de cordon ombilical sont incubées cinq heures avant la mise en coculture à 37 °C + 5 % CO<sub>2</sub> avec les facteurs hématopoïétiques suivants : 50 ng/ml SCF (*stem cell factor*), 10 ng/ml IL-3 (interleukine-3), 50 ng/ml Flt3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) et 25 ng/ml TPO (thrombopoïétine). Pour la coculture, les cellules CD34<sup>+</sup> sont resuspendues dans un milieu de D-MEM 10 % SVF 100 U/ml pénicilline/streptomycine et mises en contact avec les cellules de stroma murin.



**Figure 12. Méthode de coculture entre les cellules CD34<sup>+</sup> et les cellules de la MO murine.** Des cellules CD34<sup>+</sup> issues de SCO sont mises en coculture avec des ostéoblastes et/ou des cellules stromales provenant de la MO de souris C57BL6. Les cellules CD34<sup>+</sup> sont soit mises directement en contact avec les cellules de la MO murine, soit séparées de celle-ci par une membrane de 0,8 micron.

### **3. RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### 3.1 Modulation par le C3a et ses dérivés

Le C3a, composante de la cascade du complément, agit en tant que chemoattractant sur les neutrophiles en dirigeant leur migration vers les sites d'inflammation [64, 65]. Cette composante, telles que les chimiokines, lie des RCPG (appelés C3aR et C5L2) [66, 67]. Il a aussi été démontré que cette petite molécule (ainsi que son produit de dégradation, le C3a<sub>desarg</sub>) avait la propriété d'accroître la proportion des cellules B, ainsi que des cellules CD34<sup>+</sup> répondant au chimiotactisme induit par SDF-1 [66]. Le C3a<sub>desarg</sub> est un produit de dégradation naturel du C3a, dépourvu de son arginine terminale, ainsi que de l'effet anaphylatoxique du C3a.

L'effet agoniste du C3a sur les neutrophiles lors d'une réponse inflammatoire est bien documenté, toutefois, son action modulateur sur la migration vers SDF-1 l'est beaucoup moins. Nous souhaitons élucider le mécanisme moléculaire à l'origine de cet effet. Pour ce faire, nous observerons de quelle façon le C3a et ses dérivés modulent la réponse migratoire dépendante de CXCR4/SDF-1. En effet, il y a deux façons de moduler une réponse migratoire, soit en variant la sensibilité à la chimiokine, soit en modifiant la proportion de cellules répondant au stimulus. Dans un premier temps, nous vérifierons si le C3a et ses dérivés ont un effet agoniste sur les leucocytes.

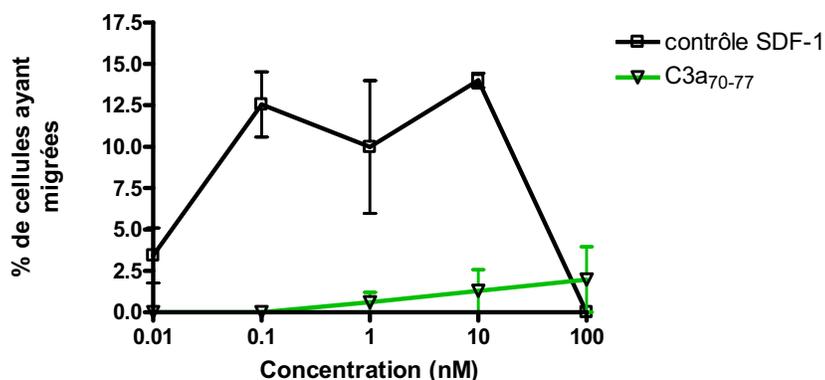
L'effet du C3a et de ses dérivés, le C3a<sub>desarg</sub> et le C3a<sub>70-77</sub>, a été observé sur la migration *in vitro* de lignées hématopoïétiques. Les expériences de migrations sont effectuées à l'aide de plaques Chemotx (BD bioscience). Le peptide C3a<sub>70-77</sub>, représentant les huit derniers acides aminés du C3a, est la partie active de la molécule du C3a interagissant avec le récepteur C3aR [1]. Les lignées hématopoïétiques employées pour les essais de migrations sont les suivantes; les cellules CEM (lignée de cellules leucémiques LLA de type T), les cellules REH (lignée de cellules leucémiques LLA de type pré B) et les cellules CD34<sup>+</sup> issues de sang de cordon ombilical (SCO). L'utilisation des lignées est requise, car les cellules de SCO sont très précieuses, la quantité de SCO disponible pour la recherche étant limitée. Le choix de ces lignées particulières est justifié car elles ont déjà été employées pour ce genre d'étude. En effet, les cellules REH ont été utilisées précédemment pour des essais de migration *in vitro* [66], quant aux cellules CEM, elles ont aussi déjà été employées pour des essais de chimiotactisme

dépendant de CXCR4. [97]. De plus, puisque nous utilisons une lignée T et une lignée B, nous pouvons observer l'effet des composés sur différentes lignées lymphocytaires.

### 3.1.1 Effet agoniste du C3a et de ses dérivés seuls sur les trois types cellulaires

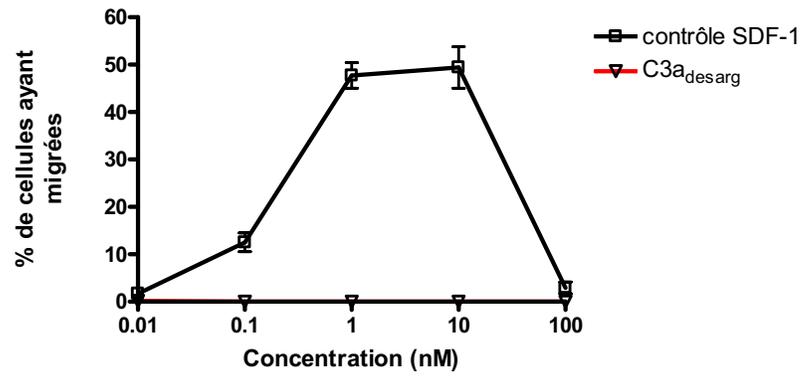
Tout d'abord, nous avons vérifié si le C3a et ses dérivés pouvaient à eux seuls (en tant qu'agonistes) entraîner la migration dirigée de nos différentes lignées cellulaires hématopoïétiques. Ainsi, nous pourrions déterminer si l'effet modulateur du C3a sur la migration cellulaire vers SDF-1 est réellement dépendant de CXCR4, ou si le C3a et ses dérivés possèdent une activité propre sur ces types cellulaires.

Les figures 13 à 15 illustrent l'effet agoniste qu'exercent le C3a et ses dérivés ( $C3a_{\text{desarg}}$  et  $C3a_{70-77}$ ) sur les cellules CEM, REH et  $CD34^+$  de SCO. Nous constatons que, seules, les différentes molécules dérivées de la composante du complément C3a n'ont pas d'effet agoniste sur la migration des lignées hématopoïétiques employées.

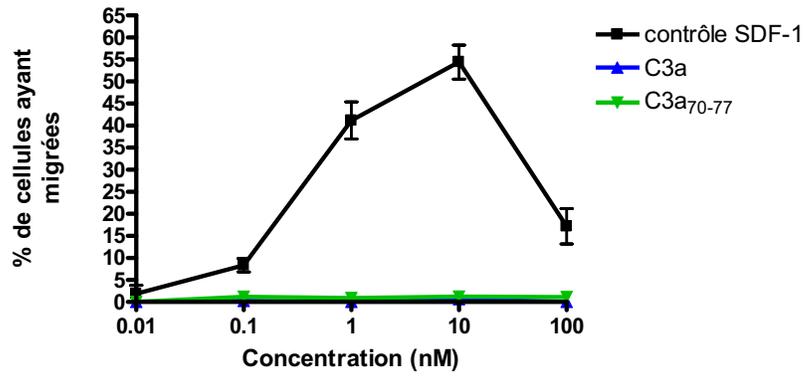


**Figure 13. Effet agoniste du  $C3a_{70-77}$  sur les cellules CEM.** Migration de cellules CEM vers un gradient de SDF-1 ou vers un gradient de  $C3a_{70-77}$  selon les doses indiquées. (n=1)

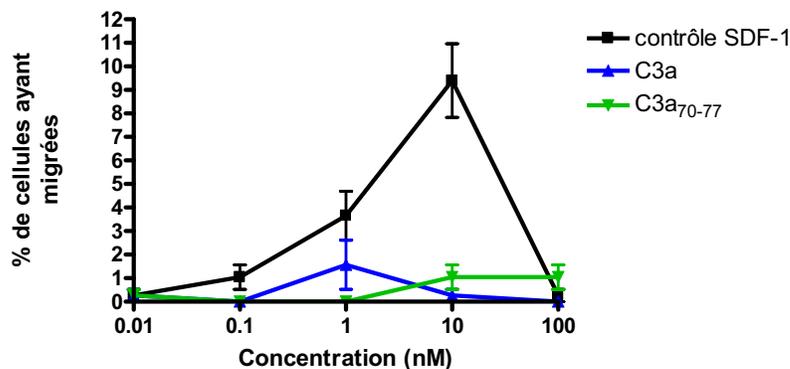
A



B



**Figure 14. Effet agoniste des différentes molécules dérivées du complément C3a sur les cellules REH.** Migration de cellules REH vers un gradient de SDF-1, C3a, C3a<sub>desarg</sub> ou C3a<sub>70-77</sub> selon les concentrations indiquées. (n=1)



**Figure 15. Effet agoniste du complément C3a et C3a<sub>70-77</sub> sur les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO.** Migration de cellules CD34<sup>+</sup> issues d'un même SCO vers un gradient de SDF-1, C3a ou C3a<sub>70-77</sub> selon les concentrations indiquées. (n=1)

L'effet agoniste possible du C3a et du C3a<sub>desarg</sub> sur les cellules CEM, ainsi que celui du C3a<sub>desarg</sub> sur les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO devra aussi être vérifié. Cependant, suivant la tendance des résultats présentés ci-dessus, nous pensons que les expériences de migrations qui n'ont pas encore été effectuées ne révéleront pas d'effet agoniste de ces composés sur ces types cellulaires (voir discussion ci-dessous).

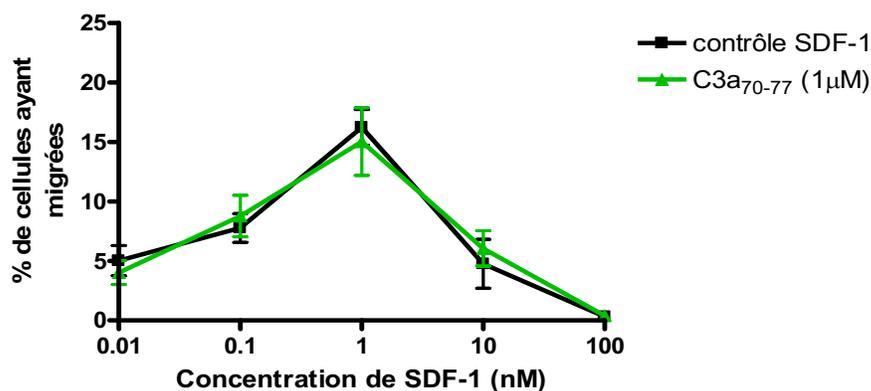
### 3.1.2 Effet du C3a et de ses dérivés sur la migration des trois types cellulaires vers SDF-1

Puisque le C3a et ses dérivés n'avaient pas d'effet agoniste sur ces trois types cellulaires, nous avons observé si ceux-ci modifiaient la réponse migratoire des mêmes lignées (CEM, REH et CD34<sup>+</sup> de SCO) vers SDF-1. Nous pensons que ces composés, C3a, C3a<sub>desarg</sub> et C3a<sub>70-77</sub>, amélioreront la sensibilité des cellules au SDF-1 et/ou accroîtront la proportion de cellules mobilisées. L'augmentation de la sensibilité serait démontrée par un déplacement vers la gauche de la courbe dose-réponse de SDF-1.

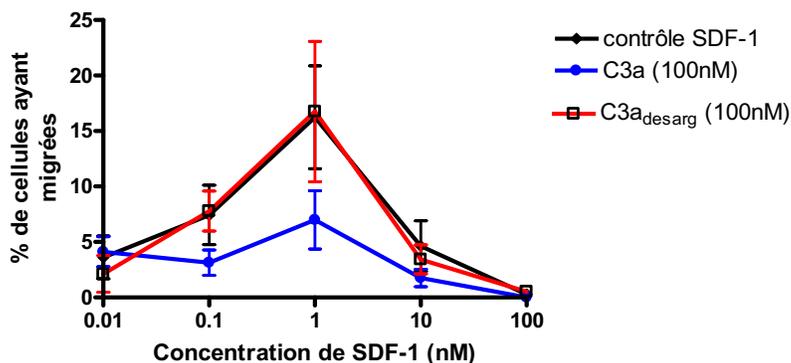
### 3.1.2.1 Effet du C3a et de ses dérivés sur la migration de cellules CEM vers SDF-1

En premier lieu, nous avons observé l'effet modulateur sur la migration des cellules T. La figure 16 montre des expériences de migrations de cellules CEM vers SDF-1 en présence du C3a<sub>70-77</sub> (1 $\mu$ M), du C3a<sub>desarg</sub>, ou du C3a (100nM).

A



B



**Figure 16. Expérience de migrations des cellules CEM en présence de molécules dérivées du complément C3a.** A) Migrations de cellules CEM vers un gradient de SDF-1 en présence ou absence de 1 $\mu$ M C3a<sub>70-77</sub>. (n=2) B) Migrations de cellules CEM vers un gradient de SDF-1 en présence ou absence de 100nM C3a ou C3a<sub>desarg</sub>. (n=2) La tendance de 100nM C3a à diminuer le pourcentage de cellules mobilisées vers 1nM SDF-1 est statistiquement non significative.

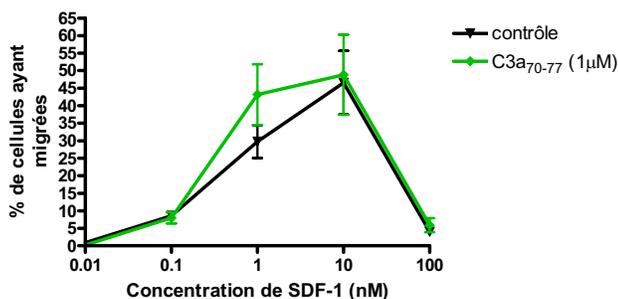
Pour ces expériences de migrations, nous avons utilisé des concentrations élevées afin de s'assurer de détecter un éventuel effet. Le 100nM utilisé pour le C3a et le C3a<sub>desarg</sub>, correspond à une dose de chimiokine pouvant déclencher des réponses maximales. Pour le peptide, nous avons utilisé des concentrations plus fortes, car les fragments peptidiques des ligands protéiques ont des activités à ces concentrations [98].

Ces expériences montrent que les cellules CEM migrent à un maximum de 20% vers SDF-1, lorsque ce dernier est à 1nM (figure 16). Ce pourcentage est suffisant pour observer les effets recherchés, c'est-à-dire une augmentation de la sensibilité et/ou une hausse du pourcentage de cellules mobilisées. Un taux de migration trop important lors des conditions contrôles masquerait l'augmentation qu'un dérivé du C3a pourrait apporter sur cette réponse migratoire, de même qu'inversement, une migration trop faible vers SDF-1 masquerait la diminution que pourrait apporter le C3a ou ses dérivés. Toutefois, aucun effet significatif sur la migration des cellules CEM vers SDF-1, n'est constaté par l'ajout du C3a et de ses dérivés, C3a<sub>desarg</sub> et C3a<sub>70-77</sub>, comparé à la migration contrôle. Cependant, la proportion de cellules CEM migrant vers 1nM SDF-1 tend à diminuer en présence de C3a. Il faudra refaire cette expérience pour confirmer cette tendance.

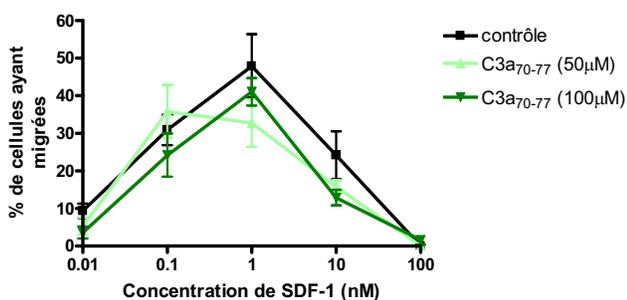
### **3.1.2.2 Effet du C3a<sub>70-77</sub> sur la migration des cellules REH**

Ensuite, nous avons étudié l'impact de la présence du C3a<sub>70-77</sub> sur la migration des cellules de la lignée LLA pré B vers SDF-1 (figure 17). Nous devons effectuer les expériences de migrations des cellules REH en présence du C3a et du C3a<sub>desarg</sub> vers SDF-1. Cependant, ces dernières ont été réalisées par l'équipe du Dr. Silberstein (voir section discussion).

A



B



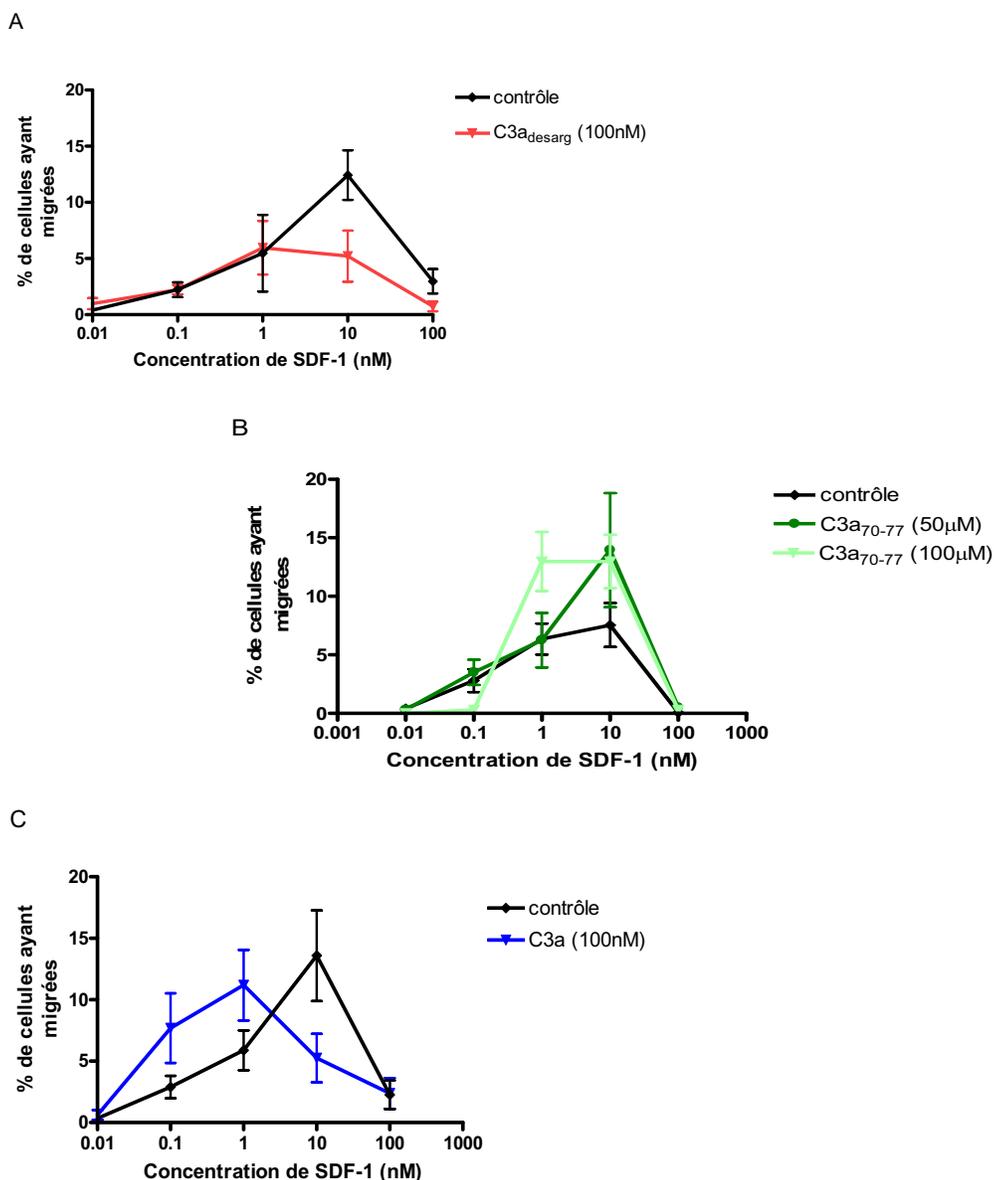
**Figure 17. Expérience de migrations des cellules REH en présence de C3a<sub>70-77</sub>.** **A)** Migrations de cellules REH vers un gradient de SDF-1 en présence ou absence de 1 μM C3a<sub>70-77</sub>. (n=3) **B)** Migrations de cellules REH vers un gradient de SDF-1 en présence ou absence de 50 ou 100 μM C3a<sub>70-77</sub>. (n=2)

La figure 17A montre que le C3a<sub>70-77</sub> ne modifie pas la migration des cellules B vers SDF-1. Nous avons alors augmenté les concentrations de C3a<sub>70-77</sub> à 50 et 100 μM, pour vérifier si l'absence d'effet pourrait être due à une dose de peptide insuffisante (figure 17B). Le C3a<sub>70-77</sub> concentré à 1, 50 ou 100 μM, ne modifie pas de façon considérable la migration dirigée des cellules B vers SDF-1 comparer aux migrations contrôles (figure 17A et B).

### 3.1.2.3 Effet du C3a et de ses dérivés sur la migration des cellules CD34<sup>+</sup>

Finalement, nous avons étudié l'impact de la présence du C3a et de ses dérivés sur la migration des cellules CD34<sup>+</sup> issues de SCO vers SDF-1. Chacune des expériences indépendantes suivantes a été réalisée à partir de cellules issues du même SCO.

La figure 18 montre des expériences de migrations avec du C3a et du C3a<sub>desarg</sub> à 100nM et du C3a<sub>70-77</sub> à des concentrations de 50 et 100μM sur les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO.



**Figure 18. Expérience de migrations des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO en présence de molécules dérivées du complément C3a.** A) Migration de cellules CD34<sup>+</sup> vers un gradient de SDF-1 en présence ou absence de 100nM C3a<sub>desarg</sub> (n=1) B) Migrations de cellules CD34<sup>+</sup> vers un gradient de SDF-1 en présence ou absence de 50 (n=2) et 100µM C3a<sub>70-77</sub> (n=1) C) Migrations de cellules CD34<sup>+</sup> vers un gradient de SDF-1 en présence ou absence de 100nM C3a. (n=2)

Pour les expériences de migrations effectuées avec les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO, le point culminant de migration se retrouve à 10nM de SDF-1, ce qui diffère des deux autres lignées cellulaires utilisées (REH et CEM), qui eux montraient un maximum de migration à 1nM. Les différentes lignées cellulaires ont donc différents niveaux de sensibilité au SDF-1. La présence de C3a<sub>desarg</sub> montre une tendance à diminuer la réponse migratoire des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO vers le SDF-1 (figure 18A). Cette tendance est non-significative, car cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. La présence du C3a, en revanche, rend les cellules beaucoup plus sensibles au SDF-1 (figure 18C). Cette hausse de sensibilité est observée par un déplacement vers la gauche de la courbe dose-réponse. Toutefois, les cellules CD34<sup>+</sup> sont moins sensibles au SDF-1 que les lignées lymphoblastiques. La hausse de leur sensibilité, due au C3a, ne les rend pas plus sensibles au SDF-1 que les autres lignées cellulaires étudiées, c'est-à-dire que le plus fort pourcentage de cellules ayant migrées est vers 1nM SDF-1.

Composés / Cellules	C3a	C3a <sub>desarg</sub>	C3a <sub>70-77</sub>
CEM (lignée de cellules T)	↓ la proportion	↔	↔
REH (lignée de cellules B)	∅	∅	↔
CD34 <sup>+</sup> de SCO	↑ la sensibilité	↓ la proportion	∅

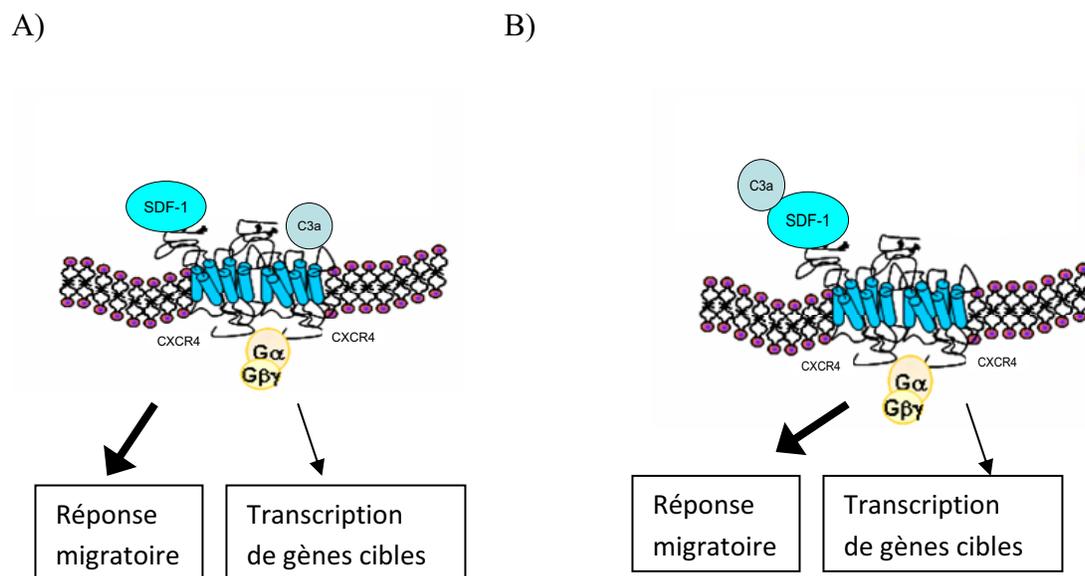
**Tableau 3. Tableau comparatif de l'effet du C3a et de ses dérivés sur trois types cellulaires.** Tableau comparatif de la présence de C3a, C3a<sub>desarg</sub> ou C3a<sub>70-77</sub> sur la proportion de cellules mobilisées et la sensibilité vers SDF-1 des cellules T (CEM), des cellules B (REH) et des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO. ↑ = augmente, ↓ = diminue, ∅ = n'a pas été effectuée, ↔ = aucun effet.

Nos résultats sur l'étude de la modulation de la migration vers SDF-1 via CXCR4 démontrent que les modulations par les dérivés du C3a observées, dépendent de la lignée cellulaire employée. De plus, la proportion moyenne des cellules mobilisées dépend aussi de la lignée cellulaire utilisée. Par exemple, l'expérience de migration en présence de C3a<sub>desarg</sub> tend à démontrer une baisse de la réponse à SDF-1 chez les cellules CD34<sup>+</sup>, mais n'a pas d'effet sur la migration des cellules CEM. En présence de C3a, les cellules CEM migrent à plus grande proportion vers SDF-1, mais les cellules CD34<sup>+</sup> en présence de cette composante du complément deviennent plus sensibles à cette chimiokine. Quant au C3a<sub>70-77</sub>, il n'a aucun effet marquant sur l'ensemble des lignées que nous avons étudiées.

### 3.1.3 Liaison directe du C3a sur le CXCR4

Nos expériences de migrations ont démontré que le C3a et ses dérivés ne peuvent induire une migration des cellules exprimant CXCR4 s'ils ne sont pas combinés au

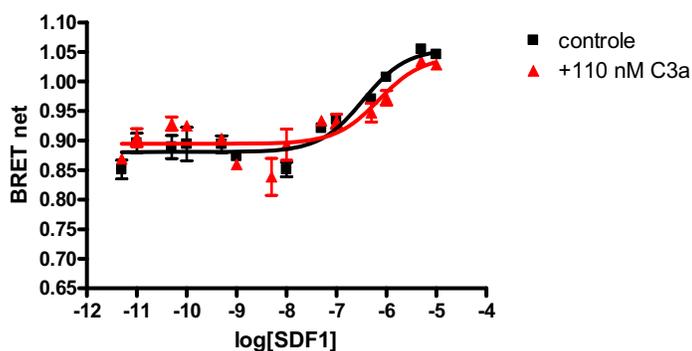
SDF-1. Cela suggère que le C3a pourrait intervenir directement sur la liaison entre le CXCR4 et le SDF-1. Par exemple, le C3a pourrait se lier simultanément avec SDF-1 sur CXCR4, ce qui changerait la conformation du récepteur de manière à favoriser davantage la réponse migratoire (figure 19).



**Figure 19. Hypothèses de liaison du C3a sur CXCR4.** A) Le C3a lie un monomère du dimère CXCR4, alors que SDF-1 lie l'autre, ce qui change la conformation du dimère et augmente la réponse migratoire. B) Le C3a lie SDF-1 qui lui, lie CXCR4, ce qui change la conformation du dimère et augmente la réponse migratoire.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé deux méthodes différentes, le BRET et la cytométrie en flux. Le BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) est un phénomène naturel chez les animaux marins tel que la *Renilla reniformis* [99]. Il s'agit d'une méthode biophysique de transfert d'énergie par résonance. L'efficacité du transfert d'énergie par résonance dépend de l'orientation et de la distance qui sépare les partenaires [100]. Cette méthode est un excellent outil pour l'étude de la dimérisation ou l'observation des changements conformationnels des RCPG dans des cellules vivantes [101].

Nous avons effectué le BRET avec des cellules HEK transfectées de façon transitoire pour exprimer un récepteur CXCR4 fusionné à Rluc et un CXCR4 fusionné à la YFP. Puisque CXCR4 forme un homodimère constitutif, les molécules de Rluc et de YFP se retrouveront à proximité. Le BRET net est déterminé par le ratio fluorescence/luminescence. Un changement conformationnel, menant à un changement de BRET, témoigne souvent de la liaison d'un ligand. La figure 20 représente le BRET émis par l'homodimère CXCR4, en fonction de la concentration de SDF-1. La courbe contrôle, en noir, montre le BRET net obtenu lorsque l'homodimère CXCR4 se retrouve en présence de SDF-1. La courbe en rouge diffère de celle en noir par l'ajout du C3a (110nM). Cette expérience de BRET nous permet de vérifier si le C3a augmente la sensibilité du récepteur au SDF-1, et si le C3a seul se lie à CXCR4. Si cela était le cas, nous devrions observer un déplacement de la courbe en rouge vers la gauche par rapport à la courbe en noir, ou bien détecter des signaux de base altérés.



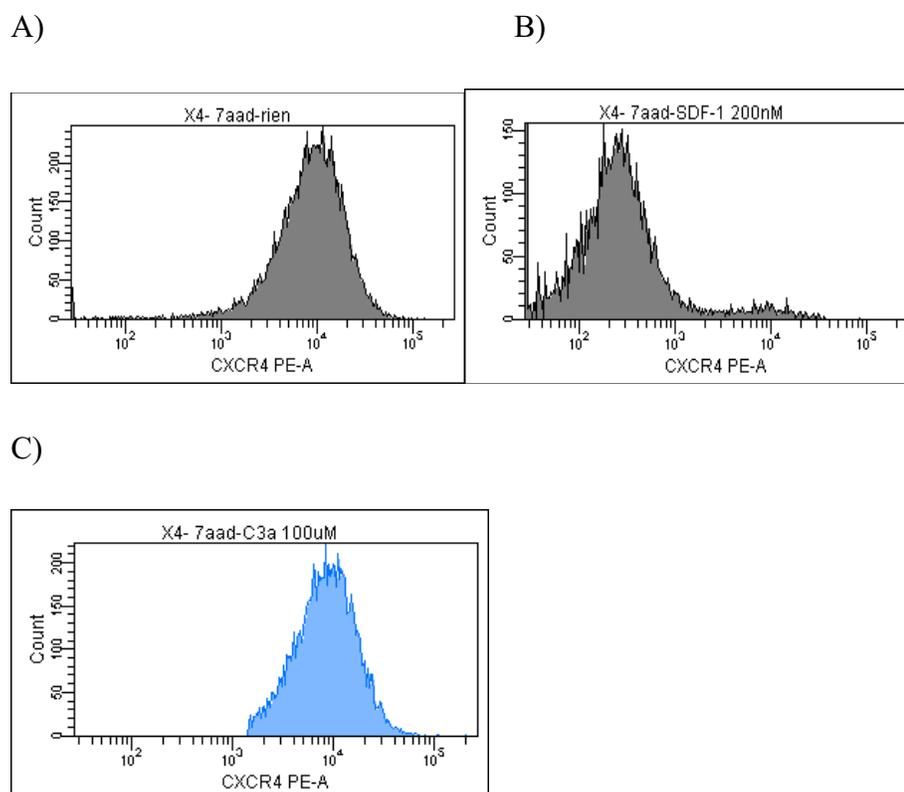
**Figure 20. Expérience de BRET en réponse à différentes doses de SDF-1 sur l'homodimère CXCR4 en présence ou absence de C3a.** BRET émis par l'homodimère CXCR4, en fonction de la concentration de SDF avec ou sans la présence de 110nM C3a.

La figure 20 montre qu'avec ou sans C3a, le même signal est émis (courbe identique dans les deux cas), ce qui indique qu'il n'y a pas de changement de

sensibilité détectable du récepteur au SDF-1, à la suite de l'ajout du C3a. Pour compléter ces observations par une autre technique, nous avons effectué un test de liaison compétitive pour CXCR4 afin de déterminer si le C3a pouvait lier directement CXCR4.

L'expérience de cytométrie en flux ci-dessous a été effectuée sur des cellules REH qui expriment CXCR4. Bien que nous n'ayons pas effectué d'expériences migratoires du C3a sur les cellules REH, d'autres équipes l'avait réalisée et ont démontré une hausse de la proportion de cellules mobilisées [66]. Le choix de cette lignée cellulaire est aussi justifié par son abondance et sa facilité de culture. Nous avons incubé les cellules avec des concentrations saturantes de SDF-1 (200nM) ou de C3a (100µM). Ensuite, un anticorps anti-CXCR4 (clone 12G5) couplé au fluorochrome PE (phycoerythrine) a été ajouté. Par compétition la présence de SDF-1 devrait bloquer la liaison de l'anticorps anti-CXCR4. De même, si le C3a se lie directement au CXCR4, celui-ci devrait aussi bloquer la liaison de l'anti-CXCR4.

La figure 21A montre le résultat obtenu lorsque les cellules sont incubées avec l'anti-CXCR4 (contrôle). À la figure 21B les cellules REH sont incubées avec le SDF-1, et mises en présence de l'anti-CXCR4. Tel que présumé, la liaison du SDF-1 sur CXCR4 empêche la liaison de l'anticorps. À la figure 21C, les cellules sont d'abord incubées avec du C3a avant d'être mises en présence de l'anti-CXCR4. Puisque la détection en présence de C3a (figure 21C) est semblable au résultat contrôle (figure 21A), nous concluons que le C3a ne lie pas CXCR4. Il serait par contre important de refaire cette expérience à partir de cellules CEM et CD34<sup>+</sup> qui ont démontré une réponse migratoire altérée en présence du C3a (tableau 3). Par contre, il demeure possible que le C3a lie directement CXCR4, mais de façon à permettre aussi la liaison de l'anticorps. Cependant, puisque le C3a est une molécule de grande taille (9000 Da), cela est peu probable. Pour confirmer que le C3a ne lie pas directement le CXCR4, nous pourrions refaire cette expérience en utilisant un anti-CXCR4 reconnaissant un autre épitope que la deuxième boucle extracellulaire de CXCR4 reconnu par le clone 12G5 [102].



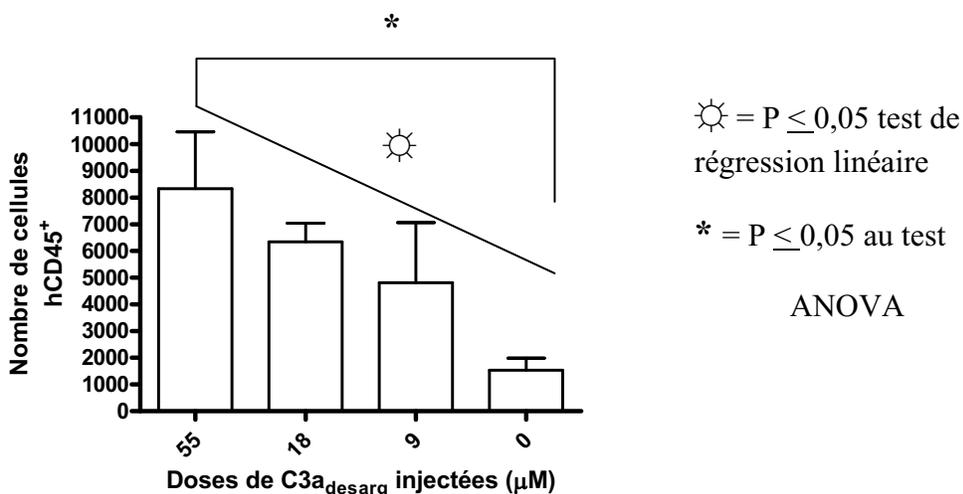
**Figure 21. Expérience de cytométrie en flux avec l'anticorps CXCR4 sur des cellules REH préincubées avec du SDF-1 ou du C3a.** **A)** Des cellules REH sont incubées avec l'anticorps anti-CXCR4 (12G5). **B)** Des cellules REH ont été préincubées avec du SDF-1 à concentration saturante de 200nM, et ensuite avec l'anticorps anti-CXCR4. **C)** Des cellules REH sont incubées avec du C3a à 100 $\mu$ M, et ensuite avec l'anticorps anti-CXCR4.

Notre hypothèse n'étant pas supportée par nos résultats, un autre mécanisme que la liaison directe au CXCR4 pourrait être à l'origine de la stimulation migratoire dépendante de CXCR4/SDF-1 par le C3a. Nous pensons alors à une hétérodimérisation entre le CXCR4 et un récepteur du C3a, tel que le C3aR ou le C5L2.

### 3.1.4 Effet *in vivo* du C3a<sub>desarg</sub> sur les cellules CD34<sup>+</sup>

En parallèle aux essais de migrations *in vitro*, nous avons analysé les effets *in vivo* sur la prise de greffe du C3a. La prise de greffe est le processus conduisant à la repopulation de la MO et à la reconstitution immunitaire complète. Ce processus nécessite la domiciliation et la rétention des CSH dans la MO. Nous avons utilisé le C3a<sub>desarg</sub> pour nos expérimentations *in vivo*, dû à son absence d'effet anaphylatoxique.

Nous avons utilisé des souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup> préirradiées à trois Grays. L'irradiation a pour effet d'éliminer toutes traces résiduelles du système immunitaire chez l'hôte et donc de favoriser la prise de la greffe [13, 96]. De plus, l'irradiation entraîne un dommage à l'ADN des cellules endothéliales, des ostéoblastes et autres cellules de la MO qui occasionne une augmentation de la production de SDF-1 et donc améliore la prise de la greffe [53]. Les souris ont été injectées avec du C3a<sub>desarg</sub> à différentes doses dans les fémurs. Une heure après l'injection du C3a<sub>desarg</sub>, nous avons injecté IV (intraveineuse) des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO purifiées, pour simuler une transplantation. Après une semaine, les souris ont été sacrifiées et les cellules exprimant le marqueur CD45 humain retrouvées dans la MO des pattes arrière des souris ont été comptées. Le CD45 est un antigène présent sur tous les leucocytes. Nous avons analysés les cellules qui étaient CD45<sup>+</sup> plutôt que les cellules CD34<sup>+</sup>, car après une semaine les cellules ont amorcé leur différenciation (ce qui mène à la perte de l'expression de CD34, mais à l'expression de CD45). Nous avons donc observé la prise de la greffe, plutôt que la domiciliation, puisque la reconstitution immunitaire était déjà amorcée. Nous avons sacrifié trois souris pour chacune des doses. La figure 22 ci-dessous montre les résultats obtenus suite à cette expérience.

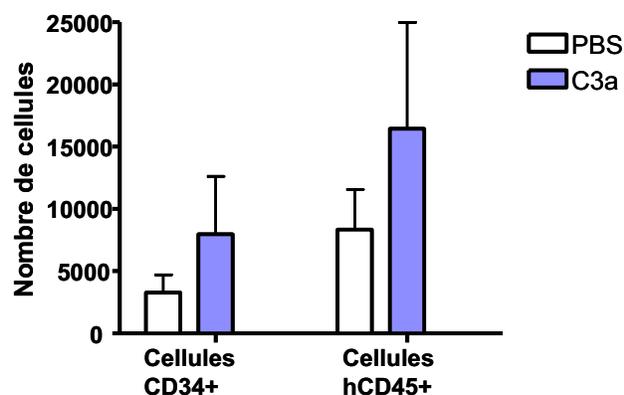


**Figure 22. Injection IO de C3a<sub>desarg</sub> dans des souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup>.** Des souris préirradiées à trois Grays ont été injectées avec du C3a<sub>desarg</sub> à différentes doses dans les fémurs et injectées de façon intraveineuse avec  $1 \times 10^5$  cellules CD34<sup>+</sup> de SCO. Les souris ont été sacrifiées une semaine plus tard et les hCD45<sup>+</sup> retrouvées dans la MO des pattes ont été comptées. Une régression linéaire est significative entre les différentes concentrations de cellules hCD45<sup>+</sup> retrouvées pour chacune des doses de C3a<sub>desarg</sub> injectées ( $P \leq 0,05$ ). Un test ANOVA (Dunnett) entre les nombres de cellules hCD45<sup>+</sup> retrouvées aux différentes doses révèle une valeur significative entre la dose 0 et 55μM ( $P \leq 0,05$ ).

La prise de greffe est favorisée par la présence de C3a<sub>desarg</sub> dans l'os de manière dose-dépendante (figure 22). En effet, une analyse de la régression linéaire a révélé une valeur de P significative à 0,023. Un test statistique ANOVA a aussi été effectué entre les différentes doses et a révélé une différence significative entre la dose 0 et la dose de 55μM pour un  $P=0,013$ . Le C3a<sub>desarg</sub> a donc un effet systémique sur la prise de greffe.

Nous avons alors voulu vérifier si la présence locale du C3a<sub>desarg</sub> pouvait avoir un effet marqué sur la prise de greffe. Nous avons alors répété l'expérience ci-dessus, mais en injectant seulement trois souris avec 10μl de C3a<sub>desarg</sub> dans un fémur et 10μl de PBS dans la patte controlatérale. La patte controlatérale a été injectée avec le PBS, en tant que contrôle, par souci que le dommage à l'os occasionné par l'injection n'augmente la

production du SDF-1, et par ce fait, augmente la prise de la greffe. Nous avons sacrifié les souris après une semaine et avons mesuré, par cytométrie en flux, le nombre de cellules CD34<sup>+</sup> et CD45<sup>+</sup> humaines retrouvées séparément dans chacune des pattes. Si l'effet du C3a<sub>desarg</sub> était locale, nous devrions retrouver davantage de cellules humaines dans la patte injectée avec du C3a<sub>desarg</sub> que dans la patte injectée avec le PBS.



**Figure 23. Injection IO de C3a<sub>desarg</sub> dans un fémur de souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup>.**

Injection de trois souris préirradiées à trois Gray avec 10µl de C3a<sub>desarg</sub> à 55µM dans un fémur comparé au même volume de PBS injecté dans la patte controlatérale. Puis 1x10<sup>5</sup> cellules CD34<sup>+</sup> de SCO ont été injectées de façon intraveineuse. Les souris ont été sacrifiées une semaine plus tard. Les cellules hCD45<sup>+</sup> et CD34<sup>+</sup> retrouvées dans chacun des fémurs ont été dénombrées par cytométrie en flux.

La figure 23 montre une différence, statistiquement non-significative, du nombre de cellules humaines retrouvées entre les deux pattes des trois animaux. Ces derniers résultats démontrent que le C3a<sub>desarg</sub> a un effet *in vivo* systémique et une tendance locale à favoriser la domiciliation des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO dans la MO. Pour confirmer cette tendance à un effet local, il faudra refaire cette expérience.

### 3.1.5 DISCUSSION

Notre premier objectif était de vérifier la modulation de l'activité de CXCR4 par le C3a et ses dérivés. En premier lieu, nous avons évalué l'effet agoniste de ces composés seuls sur la migration de différentes lignées cellulaires exprimant CXCR4. Ensuite, nous avons observé la modulation de la migration vers SDF-1 de ces mêmes lignées par ces composés. En second lieu, nous voulions tester notre hypothèse de liaison directe du C3a sur le dimère CXCR4. Finalement, nous avons mesuré *in vivo* l'impact sur la prise de greffe de la présence du C3a<sub>desarg</sub>.

Les premiers résultats d'expériences de migration montrent une courbe dose-réponse classique de chimiotaxie en forme de cloche avec un point culminant spécifique de la lignée cellulaire et de la chimiokine utilisées.

Nos résultats ont démontré que chaque lignée cellulaire agissait différemment en présence des mêmes stimuli. Cependant, les expériences de migrations *in vitro* ont permis de constater que la présence seule du C3a ou de ses dérivés n'est pas suffisante à engendrer la migration cellulaire, peu importe la lignée utilisée. Toutefois, certaines expériences de migrations n'ont pas encore été effectuées, notamment l'observation de l'effet agoniste du C3a et du C3a<sub>desarg</sub> sur les cellules CEM, ainsi que celui du C3a<sub>desarg</sub> sur les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO. Cependant, l'équipe du Dr. Silberstein a réalisé le même type d'expérience à partir de ces deux composés vers un gradient allant de 0,1 à 230 nM sur les cellules CD34<sup>+</sup> de MO et n'ont pas observé d'effet [66].

De plus, cette équipe a réalisé des essais de migrations avec 100nM de ces composés (C3a et C3a<sub>desarg</sub>) combinés à 1nM SDF-1 sur des cellules CD34<sup>+</sup> de MO et des cellules B à différents stades de différenciation. Leurs résultats démontrent une hausse de la proportion de cellules qui migrent. Vers 1nM SDF-1, nos résultats démontrent plutôt une tendance à diminuer la proportion de cellules mobilisées; à savoir les cellules T (CEM) en présence de C3a, de même que les cellules CD34<sup>+</sup> en présence de C3a<sub>desarg</sub>.

L'équipe du Dr. Silberstein a aussi effectué une courbe dose-réponse vers SDF-1 en présence de 100nM C3a sur les cellules REH, et démontré le même déplacement de

la courbe vers la gauche (donc la même augmentation de sensibilité au SDF-1) que nous observons sur les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO. Cependant, à 1nM SDF-1, nous n'observons pas d'effet significatif du C3a sur la migration de ces cellules, contrairement à leurs résultats sur les cellules CD34<sup>+</sup> de MO. Il aurait été intéressant que l'équipe du Dr. Silberstein effectue aussi une expérience de migration dose-réponse avec les cellules CD34<sup>+</sup> de MO en présence de C3a afin de vérifier s'ils observent la même hausse de sensibilité au SDF-1 que nous.

Aucun dérivé du C3a n'a donc d'effet agoniste sur la migration de cellules exprimant CXCR4. Le C3a doit se retrouver en présence de SDF-1 pour accentuer la sensibilité à cette chimiokine ou pour augmenter la proportion de cellules mobilisées. L'équipe du Dr. Silberstein a démontré que l'affinité de liaison du SDF-1 pour CXCR4 était supérieure lorsqu'une préincubation des cellules avec le C3a avait été effectuée plutôt qu'une combinaison simultanément [66]. Ceci supporte une hypothèse de conditionnement cellulaire, en ce sens que la cellule doit être prédisposée à migrer et à lier le SDF-1. L'hypothèse avancée par cette équipe est plutôt que les anaphylatoxines agiraient en protégeant le SDF-1 du clivage par les peptidases ou le rendrait plus actif en formant un agrégat avec ce dernier.

Il a été démontré que l'effet engendré par le C3a était indépendant de ses deux récepteurs habituels, soit le C5L2 et le C3aR, suite à des expériences avec des souris dépourvues de ces récepteurs, ainsi que des expériences de compétition avec des inhibiteurs de ces récepteurs [66]. De plus, le C3aR de même que le C5L2 ne sont pas présents sur les cellules CD34<sup>+</sup> de la MO humaine ni murine, pas plus que sur les cellules de lignée B d'ailleurs [66]. Il serait surprenant qu'ils soient présents sur les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO, mais cela reste à confirmer. L'indépendance supposée de la présence du C3aR et du C5L2 dans l'effet migratoire engendré par le C3a combinée à l'observation que l'effet modulateur du C3a sur les cellules CD34<sup>+</sup> nécessite la présence de SDF-1, nous a amené à émettre l'hypothèse que le C3a modifie directement ou indirectement la conformation de CXCR4 de façon à augmenter son affinité pour le SDF-1. Toutefois, nos expériences de BRET et de cytométrie en flux n'ont pu supporter l'hypothèse de liaison directe. Quant à l'hypothèse de liaison indirecte, elle sera aussi vérifiable par la méthode de BRET. En effet, nous pensons

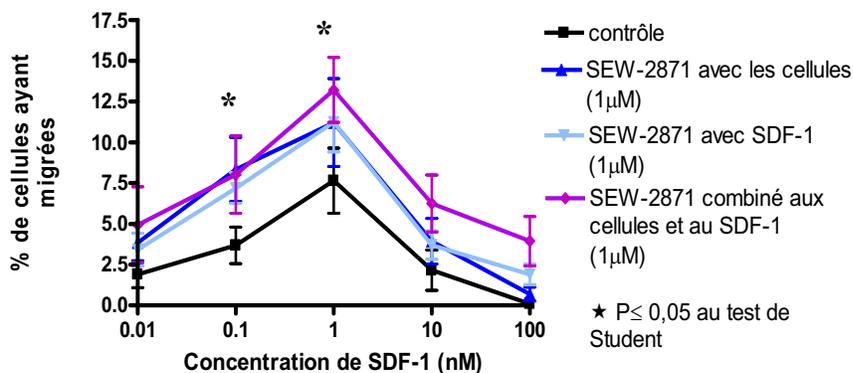
que le récepteur C3aR ou C5L2, s'ils sont présents sur les CD34<sup>+</sup> de SCO, pourrait former un hétérodimère avec CXCR4. Cette hypothèse s'appuie sur la démonstration que l'hétérodimérisation entre RCPG modifie leurs effets pharmacologiques.

Parallèlement à ces essais *in vitro*, nous avons procédé à des expériences *in vivo* avec le C3a<sub>desarg</sub>. Bien que plusieurs chercheurs auparavant aient démontré l'effet *in vitro* du C3a et de ses dérivés, personne n'avait encore réalisé les expériences correspondantes *in vivo*, pas plus qu'avec le C3a<sub>desarg</sub>. Le raisonnement pour l'utilisation du C3a<sub>desarg</sub> (plutôt que du C3a) était que ce composé n'est pas anaphylatoxique et pourrait alors représenter une piste à poursuivre pour de futures recherches aux visées cliniques. Nos résultats ont démontré un effet systémique sur la prise de greffe qui est dépendant de la dose de C3a<sub>desarg</sub> injectée. Cependant, ce résultat *in vivo* ne concorde pas avec nos essais *in vitro*, qui démontraient que le C3a<sub>desarg</sub> n'avait aucun effet sur la migration des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO. Ce résultat apporte un doute sur l'utilisation de la migration *in vitro* en tant que paramètre de prédiction à la prise de greffe *in vivo*. Effectivement, il est envisageable qu'une autre fonction de CXCR4/SDF-1 soit à l'origine de leur rôle primordial dans la greffe hématopoïétique. À titre d'exemple, l'adhésion via les intégrines ou encore la transmigration à travers la barrière endothéliale grâce à l'activation de protéases, sont des activités engendrées par CXCR4/SDF-1 qui pourraient être essentielles pour la domiciliation, voir le succès de la greffe. Il sera important de vérifier cette hypothèse, car elle impliquerait que la migration *in vitro* ne serait pas un paramètre approprié pour l'évaluation 1) de la qualité des greffons et 2) de composés candidats à augmenter le succès de la greffe.

### 3.2 Modulation par des facteurs lipidiques

Nous avons effectué les mêmes expériences de migration dirigée vers SDF-1 avec la molécule SEW-2871, un analogue de la molécule naturelle S1P, et par conséquent du FTY720. Cette molécule est un agoniste sélectif du S1P1, un RCPG. Le FTY720 a été utilisé dans plusieurs modèles de maladies humaines pour ses effets bénéfiques. De plus, il favorise la domiciliation *in vivo* des cellules T dépendamment de CXCR4 [71]. Nous croyons que le SEW-2871 pourrait donc avoir, lui aussi, la propriété de stimuler la migration de notre lignée lymphocytaire T.

L'effet du SEW-2871 a été observé sur les cellules CEM vers un gradient de SDF-1. Nous avons placé le SEW-2871 soit en présence des cellules (dans les puits du dessus, voir matériel et méthode), soit en présence du SDF-1 (dans les puits du dessous, voir matériel et méthode), ou en présence des deux simultanément (figure 24). De cette façon, nous pouvions vérifier si le SEW-2871 apportait une modulation préalable du récepteur CXCR4 ou s'il agissait de façon combinatoire au SDF-1.



**Figure 24. Expérience de migrations des cellules CEM en présence de SEW-2871 combiné au SDF-1.** Migrations de cellules CEM vers un gradient de SDF-1 en présence ou absence de 1 $\mu$ M SEW-2871 placé soit en présence des cellules (n=3), soit en présence du SDF-1 (n=3), ou en présence des deux simultanément (n=2). La comparaison entre les pourcentages de migrations obtenus en présence de SDF-1 seul ou additionné de SEW-2871, est significative au test de Student pour une concentration de 0,1 et 1nM SDF-1 ( $P \leq 0,05$ ).

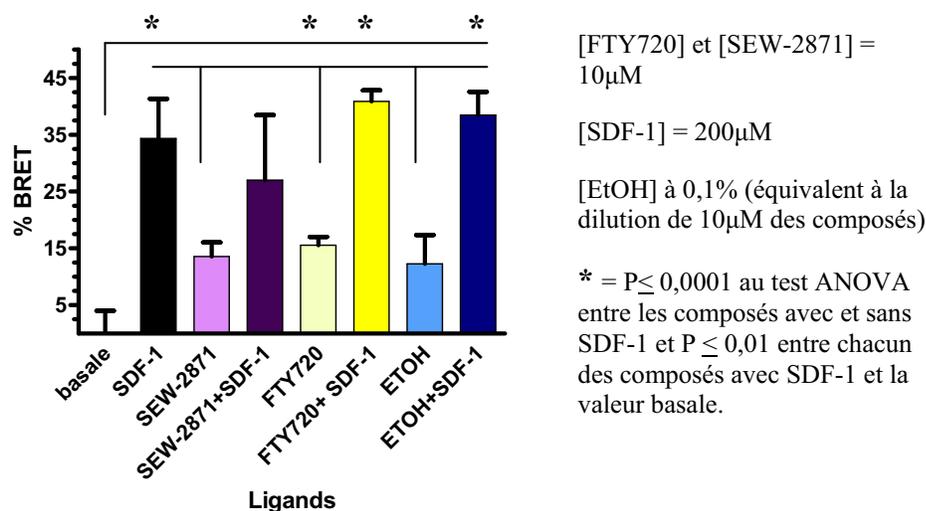
Le SEW-2871 a un effet stimulateur sur la migration, car la courbe subit un déplacement significatif vers le haut, lorsqu'il y a présence de SEW-2871 comparé à la migration contrôle (figure 24). En effet, une valeur de P significative, inférieure à 0,05, au test de Student est obtenue pour les concentrations de SDF-1 de 0,1 (P=0,045) et 1nM (P=0,033). Par contre, que le SEW-2871 se trouve en présence des cellules, du SDF-1 ou des deux simultanément, cela ne change en rien le résultat.

En conclusion, le SEW-2871 augmente le pourcentage de cellules mobilisées vers SDF-1, tel que nous le supposions. Cependant, il n'entraîne pas une meilleure sensibilité de ces cellules T au SDF-1.

### **3.2.1 Effet sur l'homodimère CXCR4; aspect fonctionnel**

Puisque l'augmentation du nombre de cellules mobilisées en présence du S1P, FTY720 ou SEW-2871 était dépendante de CXCR4/SDF-1, nous pensons que les molécules dérivées du S1P, peuvent lier directement le CXCR4. Pour vérifier notre hypothèse nous avons réalisé une expérience de BRET.

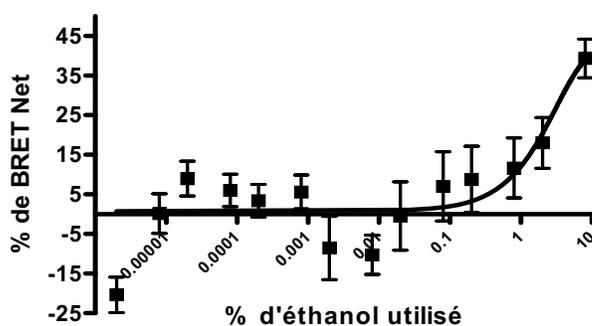
L'expérience de BRET a été réalisée sur des cellules HEK transfectées de façon transitoire pour exprimer un récepteur CXCR4 couplé à une Rluc et un CXCR4 couplé à la YFP. Les composés, FTY720 et SEW-2871 (10 $\mu$ M) ont été utilisés, soit seuls sur le dimère CXCR4, soit combinés au SDF-1 (200nM). Puisque les composés sont conservés dans l'EtOH, nous avons aussi vérifié son influence sur la conformation de CXCR4. Le graphique à la figure 25 représente le BRET émis par l'homodimère CXCR4 en présence des différents composés.



**Figure 25. Expérience de BRET sur le dimère CXCR4 en fonction de différents ligands.** Évaluation du changement de transfert d'énergie entre les deux récepteurs du dimère CXCR4 suite à l'ajout des ligands potentiels indiqués. L'expérience est effectuée sur des cellules HEK transfectées de façon transitoire. L'Éthanol sert de contrôle, puisqu'il s'agit du solvant des composés utilisés. Nous avons utilisé le SDF-1 à 200 $\mu$ M pour qu'il soit à condition saturante, de même pour les composés qui eux se trouvent à 10 $\mu$ M. La concentration d'éthanol utilisée est à 0,1% ce qui correspond à la dilution des composés. Un test ANOVA a été effectué entre ces valeurs et révèle une différence significative de changement de BRET pour tous les composés avec SDF-1 comparer au niveau basal ( $P \leq 0,01$ ). De même, que la différence entre les pourcentages de BRET observés entre les valeurs obtenues avec et sans la présence du SDF-1 ( $P \leq 0,0001$ ).

Un changement de BRET est remarqué pour tous les composés utilisés, ce qui indique une modification conformationnelle du dimère CXCR4 (figure 25). Le pourcentage similaire de BRET détecté indique que la conformation adoptée par le récepteur est similaire lorsque les composés (et le solvant) sont utilisés seuls. La conformation du récepteur est aussi similaire lorsque les composés et l'EtOH sont utilisés en combinaison au SDF-1 (ou le SDF-1 seul). Cependant, la conformation des récepteurs lorsque le SDF-1 est présent (SDF-1, SEW-2871 + SDF-1, FTY720 + SDF-1 et EtOH + SDF-1) diffère de celle où il est absent. D'ailleurs, un test ANOVA a été effectué entre ces valeurs et il est significatif ( $P \leq 0,0001$ ). De plus, un test ANOVA

(Dunnett) a aussi été effectué pour comparer chacune des valeurs de BRET mesurées à la valeur basal. Ce dernier révèle une valeur significative pour chacune des valeurs obtenues en présence de SDF-1 ( $P \leq 0,01$ ). Ce résultat signifie que les composés SEW-2871 et FTY720 entraînent une modulation du récepteur homodimérique CXCR4. Cependant, l'éthanol modifie aussi la conformation du dimère. L'effet observé pourrait donc être attribué à l'éthanol plutôt qu'au SEW-2871 ou au FTY720. Pour vérifier à quelle dose il serait préférable d'utiliser l'EtOH pour conserver nos ligands sans avoir un effet du solvant, nous avons effectué une dose-réponse. La dose-réponse démontre que nous devrions utiliser l'EtOH à un pourcentage inférieur à 0,1 (figure 26).



**Figure 26. Expérience de dose-réponse d'EtOH sur le dimère CXCR4 effectuée par BRET.** Évaluation du changement de transfert d'énergie entre les deux récepteurs du dimère CXCR4 suite à l'ajout de différentes doses d'EtOH. L'expérience est effectuée sur des cellules HEK transfectées de façon transitoire.

Toutefois, la présence de l'EtOH peut ne pas être nuisible. En effet, il se peut que l'éthanol ait une action additive sur la migration cellulaire lorsqu'il est combiné à des molécules stimulatrices telles que le SEW-2871 ou le FTY720. Pour le vérifier, il faudra refaire l'expérience parallèlement avec du SEW-2871 conservé dans un autre solvant, tel le DMSO (diméthyl sulfoxyde), et vérifier si la stimulation migratrice est la même.

### 3.2.2 DISCUSSION

Notre premier objectif était de mieux décrire l'effet moléculaire sur CXCR4 de composés qui modulent positivement la réponse migratoire vers SDF-1. Nous avons donc vérifié ici la modulation du FTY720 et du SEW-2871 sur CXCR4. En premier lieu, nous avons évalué l'effet modulateur du SEW-2871 sur la migration vers SDF-1 des cellules CEM. En second lieu, nous voulions confirmer notre hypothèse de liaison directe des composés FTY720 et SEW-2871 sur le dimère CXCR4.

Nos résultats ont démontré que le SEW-2871, analogue du S1P, a un effet significatif sur la stimulation de la migration des cellules T. Le FTY720 qui est aussi un analogue du S1P a aussi démontré une augmentation de la domiciliation dépendante de CXCR4 chez les CSH [70]. Étant donné que la stimulation migratrice est dépendante de la présence de CXCR4, nous pensions que le mécanisme en cause pourrait être une liaison directe de ces molécules sur le récepteur CXCR4. Les résultats obtenus à partir de la méthode de BRET pour vérifier cette hypothèse n'ont pu être analysés convenablement dû à un effet du solvant (EtOH) seul sur la conformation de CXCR4. Il faudra donc diminuer la concentration des composés utilisés afin de minimiser l'effet de l'EtOH ou bien trouver un autre solvant pour conserver nos composés, qui n'aurait aucune influence sur la conformation des RCPG, tel que le DMSO. Il n'avait jamais été rapporté que l'éthanol pouvait lier des RCPG, toutefois son action sur des récepteurs canoniques, tel que le GABA, est très connu [103, 104]. De plus, il est concevable que l'éthanol modifie la conformation de CXCR4 de façon non spécifique, en agissant sur les lipides de la membrane plasmique de la cellule.

Le récepteur S1P1 est présent sur les CSH et les lymphocytes [105]. La présence du S1P et ses analogues accroît le nombre de cellules mobilisées vers SDF-1. Puisque le CXCR4, tout comme le S1P1, sont des RCPG et qu'il a été démontré à plusieurs reprises que les RCPG forment des hétérodimères et que cela modifie leur pharmacologie [106], nous pensons que s'il s'avère que le FTY720 et/ou le SEW-2871 ne lient pas directement le CXCR4, le mécanisme à l'origine de leur effet sur CXCR4 pourrait être une hétérodimérisation entre S1P1 et CXCR4.

### **3.3 Observation de la prise de greffe dépendante de CXCR4.**

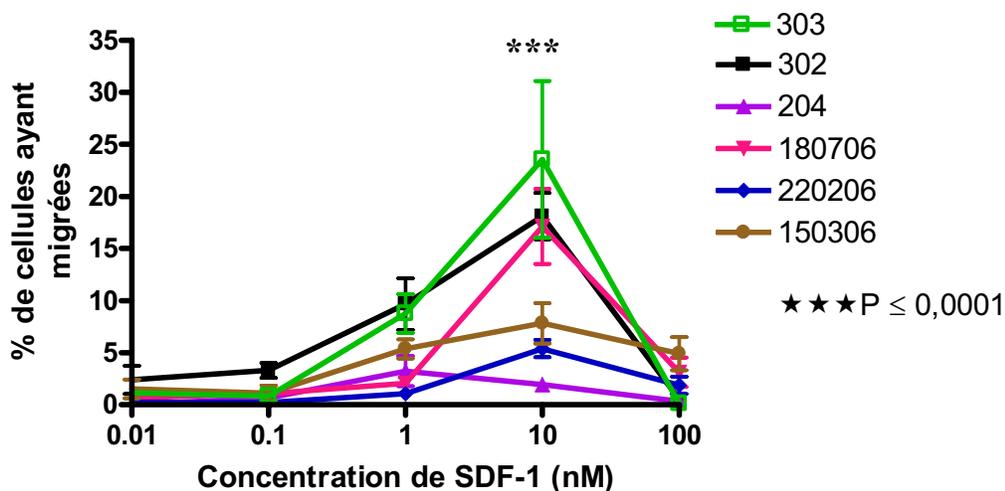
Les transplantations à partir de SCO comportent beaucoup d'avantages sur les transplantations à partir d'autres sources telles que la MO ou le sang périphérique. Cependant, les greffes ne sont pas toujours un succès et, comme les tentatives de greffes sont souvent accompagnées de traitement de chimiothérapie, il s'agit d'un processus très affaiblissant pour le patient. Si après deux essais de transplantation, la greffe n'a pas réussi, le traitement est abandonné. Nous pensons que le problème de la prise pourrait être intrinsèquement lié au cordon utilisé. Pour tester cette hypothèse, nous comparerons la capacité migratoire et l'expression de CXCR4 en surface avec la prise de greffe de différents SCO. S'il s'avère que les cellules provenant de différents cordons n'aient pas la même capacité d'assurer le succès d'une transplantation, il faudrait concentrer les efforts de recherches futures sur une présélection des cordons efficaces.

#### **3.3.1 Comparaison des propriétés de différents cordons**

Pour effectuer les expériences suivantes, nous avons purifié les cellules CD34<sup>+</sup> de six cordons différents. Nous avons ensuite séparées les cellules purifiées en différents échantillons que nous avons congelés dans l'azote liquide. Chacun des aspects (capacité migratoire, nombre de récepteurs CXCR4 et capacité à engendrer une prise de greffe) a été mesurés à partir de ces différents échantillons de mêmes cordons.

##### **3.3.1.1 Capacités migratoires**

Nous avons procédé à des essais de migration *in vitro* pour vérifier si les cellules provenant de SCO différents possédaient des différences majeures entre leurs capacités migratoires. Une migration vers un gradient de différentes concentrations de SDF-1 a été réalisée avec différents échantillons de cellules CD34<sup>+</sup> purifiées provenant de six différents SCO.



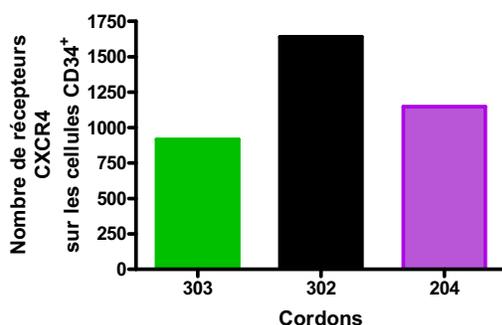
**Figure 27. Capacité migratoire intrinsèque de différents SCO.** Migrations de cellules CD34<sup>+</sup> provenant de six différents cordons ombilicaux vers un gradient de SDF-1. Un test de Student significatif ( $P \leq 0,0001$ ) distingue les cellules des cordons migrant à 5% de celles migrant à 20% pour une concentration de 10nM SDF-1. Un test ANOVA comparant tous les cordons entres-eux révèle une différence significative entre les cordons 303 et 204 ( $P \leq 0,05$ ) et entre les cordons 302 et 204 ( $P \leq 0,01$ ).

Chaque expérience de migration a été réalisée à trois reprises, à différents jours avec différents échantillons de cellules CD34<sup>+</sup> du même cordon qui étaient conservés dans l'azote liquide. Nos résultats sont très reproductibles, tel qu'illustré par les petits écart-types (figure 27). Les différences observées entre les cordons ne sont alors pas attribuables aux variations d'une expérience à l'autre, mais représentent des propriétés intrinsèques de chacun des cordons. De plus, tel qu'observé précédemment, la migration optimale des cellules CD34<sup>+</sup> s'effectue vers une concentration de 10nM SDF-1. Nous voyons deux grandes tendances migratrices significatives ( $P < 0,0001$ ) apparaître; soit 5% des cellules de SCO migrent, soit elles migrent aux alentours de 20 % (figure 27). Les différences de manipulations de ces cordons par la banque de sang, tel que le temps écoulé depuis la naissance, la température à laquelle les SCO sont conservés ou l'état de santé de la mère, pourraient expliquer cette observation. Cependant, nous ne pouvons

comparer ces différents paramètres, puisque les données relatives à ces facteurs nous sont inconnues.

### 3.3.1.2 Quantité de récepteurs

Nous avons voulu déterminer si les différentes capacités migratoires observées *in vitro*, corrélaient avec le niveau d'expression en surface de CXCR4. Une expérience quantitative de cytométrie en flux (QuantiBrite, BD bioscience) fut effectuée pour quantifier l'expression du récepteur CXCR4 en surface des cellules CD34<sup>+</sup> issues de trois cordons utilisées pour l'expérience de migration (figure 28). Seuls les cellules provenant des cordons 303, 302 et 204 ont été utilisées, dû à une quantité restreinte d'échantillons. Cette méthode quantitative est basée sur une standardisation, à partir de billes d'étalonnage, de la fluorescence détectée en cytométrie en flux (le ratio fluorochrome/anticorps étant connu).



**Figure 28. Expression quantitative du récepteur CXCR4 sur des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO différents.** La quantification du nombre de récepteurs s'est effectuée par détection d'anticorps en cytométrie en flux par la méthode de QuantiBrite de BD bioscience sur des cellules CD34<sup>+</sup> provenant de trois différents SCO qui démontraient des capacités migratoires intrinsèques différentes (figure 27).

L'analyse des trois SCO étudiés (figure 28) a démontré qu'effectivement, ils présentaient des différences dans l'expression du nombre de récepteurs exprimés à leur

surface, par exemple 800 récepteurs pour le cordon 303, alors que le cordon 302 en présente le double. Cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois, par conséquent, aucun test statistique n'a pu déterminer si cette différence était significative. Cependant, nous avons effectué la même expérience de quantification du récepteur CXCR4 en surface des cellules REH à différents moments. Nous avons constaté que le nombre de récepteurs restait constant à  $\pm 10\%$ . Nous supposons que ce pourcentage de variations est moins élevé chez les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO, puisqu'elles sont décongelées avant chaque expérience et subissent donc le même traitement avant chaque utilisation, alors que les cellules REH sont gardées en culture et ainsi sujettes à des variations (phase de croissance, changement de milieu).

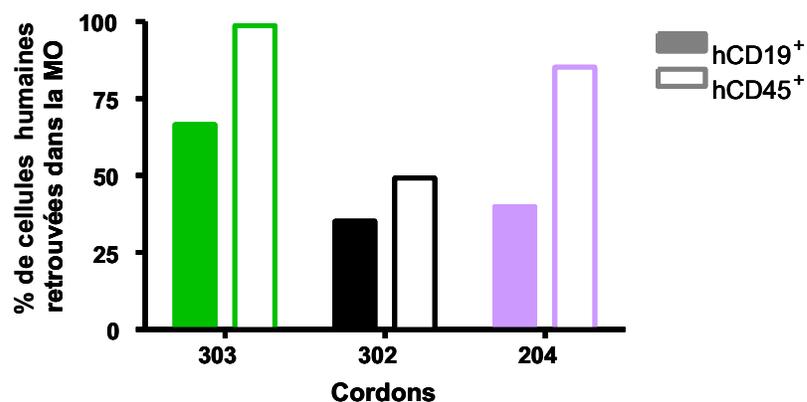
En somme, nos résultats indiquent qu'il n'y a pas de corrélation entre le nombre de récepteurs CXCR4 en surface et la capacité migratoire intrinsèque des cellules CD34<sup>+</sup> issues d'un même SCO. Par exemple, le cordon 303 qui démontre la plus forte réponse migratrice vers un gradient de SDF-1 est celui qui exprime le moins de CXCR4 à sa surface (figure 27-28).

### **3.3.1.3 La prise de greffe**

Nous voulions alors étudier la prise de greffe de ces cordons (302, 303 et 204), afin de déterminer les liens entre les prises de greffes de chacun des cordons avec leur capacité migratoire et leur expression de CXCR4. En regard de nos résultats, section 3.1, nous croyions à une absence de corrélation entre la migration et la prise de la greffe.

Nous avons procédé à des transplantations, toujours à partir d'échantillons congelés des cellules CD34<sup>+</sup> provenant des trois mêmes cordons, soit le 303, le 302 et le 204. Nous avons injecté IV  $1 \times 10^5$  cellules à des souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup> (trois souris/cordon) préirradiées à trois Grays six à douze heures auparavant. Toutefois, une seule souris pour chacun des SCO différents injectés a à la fois survécu et/ou démontré une prise de la greffe. Nous avons sacrifié ces souris une semaine plus tard et nous avons regardé la prise de leur greffe, c'est-à-dire le nombre de cellules humaines par rapport aux cellules murines retrouvées dans leurs MO. Nous avons utilisé les marqueurs CD19

et CD45 humains afin de comparer la prise des greffes entre les différents cordons. La molécule CD19 est présente sur les lymphocytes B, qui sont les premiers à apparaître lors de la reconstitution immunitaire, alors que le CD45 est présent sur tous les leucocytes.



**Figure 29. Prise de greffe des cellules CD34<sup>+</sup> provenant de trois différents SCO.** Injection IV de cellules CD34<sup>+</sup> provenant de trois différents SCO à des souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup> irradiées six heures auparavant à trois Grays. Les souris ont été sacrifiées une semaine après l'injection. Trois souris injectées pour chacun des cordons, mais une seule pour chacun a à la fois survécu et démontré une prise, d'où l'absence d'écart-type sur ce graphique et, par conséquent, de statistiques sur cette figure. Une analyse de cytométrie en flux avec les marqueurs humains CD19 et CD45 sur les cellules retrouvées dans les MO (pattes arrière), révèle la prise de greffe.

La figure 29 montre que la prise de greffe des différents cordons est différente entre chacun d'eux.

Aspect \ Cordons	303	302	204
<b>Capacité migratoire</b> (% de cellules ayant migrées)	24	18	2
<b>Quantification de CXCR4</b> (nombre de récepteurs)	917	1642	1148
<b>Prise de la greffe</b> (% de cellules hCD45 <sup>+</sup> retrouvées dans la MO)	99	49	85

**Tableau 4. Tableau comparant les propriétés de différents SCO.** Comparaison entre la capacité migratoire, le nombre de récepteurs CXCR4 en surface et la prise de greffe entre les cellules CD34<sup>+</sup> issues de trois différents SCO.

Le tableau 2 montre que la prise de la greffe ne peut être corrélée avec le taux d'expression de CXCR4, pas plus que l'expression du récepteur en surface ne favorisent une plus forte migration *in vitro* dirigée vers SDF-1. Ce résultat concorde avec celui de la section 3.1, à savoir que la migration n'est pas un paramètre approprié pour pouvoir prédire la prise de la greffe. De plus, nous montrons ici que la quantité de CXCR4 exprimée en surface du greffon n'est pas non plus un facteur de prédilection au succès de la prise de greffe.

### 3.3.2 DISCUSSION

Notre troisième objectif était de vérifier si un problème de prise de greffe suite à une transplantation de SCO, ne serait pas intrinsèque au cordon utilisé. Cet aspect a été étudié dans l'optique d'identifier des paramètres qui permettraient le choix du greffon,

afin d'optimiser la prise de greffe. Pour tester notre hypothèse, nous avons comparé la capacité migratoire et l'expression de CXCR4 en surface avec la prise de greffe de différents SCO. La comparaison de trois différents cordons a démontré qu'ils ont, effectivement, des capacités intrinsèques, mais qu'il n'y avait aucune corrélation possible entre la capacité migratoire, le nombre de récepteurs CXCR4 en surface et la prise de greffe des cellules CD34<sup>+</sup>. Aucun paramètre pour évaluer *in vitro* la qualité des cordons pour la greffe n'a donc pu être identifié.

Plusieurs études dans la littérature considèrent que la migration *in vitro* est le reflet d'une prise de greffe *in vivo* [66, 71]. Toutefois, nos expériences ont démontré, à deux reprises, que la migration n'était pas un bon paramètre pour prédire une prise de greffe. D'abord, lors des expériences avec le C3a<sub>desarg</sub> (section 3.1), ensuite lors des expériences de comparaison entre différents SCO (section 3.3.1). Un autre paramètre, tel que la capacité à produire des MMP efficaces, ou bien le nombre de protéines d'adhésion pourrait peut-être prédire de façon plus adéquate le succès d'une prise de greffe subséquente [107].

La quantité de récepteurs en surface ne corrélant pas avec une meilleure migration ou avec une meilleure prise de greffe pourrait être expliquée par les différentes fonctions de CXCR4. En effet, le récepteur CXCR4 joue plusieurs rôles, que ce soit dans la prise de greffe ou dans tout l'organisme, c'est pourquoi il est aussi présent sur les neurones et les cellules endothéliales [38]. CXCR4 peut aussi être impliqué dans de toutes autres fonctions via l'hétérodimérisation avec d'autres RCPG [22, 25-30]. De plus, les récepteurs présents à la surface des leucocytes ne sont pas tous destinés à favoriser la migration vers SDF-1, certains peuvent mener aussi à l'activation de gènes cibles. Certains doivent intervenir dans la prise de greffe à d'autres égards, tel que le réarrangement du cytosquelette ou l'adhésion cellulaire. En résumé, la sélectivité fonctionnelle peut expliquer l'absence de corrélation entre le nombre de récepteurs et la réponse migratoire, puisqu'un récepteur peut engendrer une panoplie de réponses différentes.

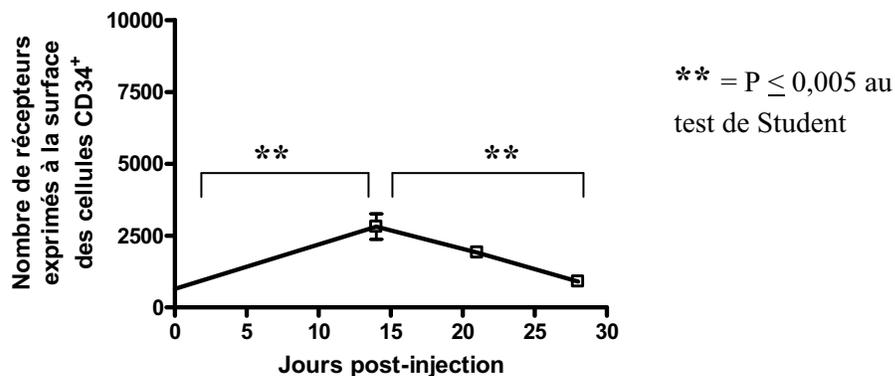
Le très faible taux d'expression de CXCR4 en surface des cellules CD34<sup>+</sup> est un autre fait surprenant dans cette étude de quantification. En effet, le nombre de récepteurs

CXCR4 en surface d'autres types cellulaires, par exemple les lymphocytes, est normalement autour de 30 000 à 40 000 et non près de 1000. Ce fait est d'autant plus surprenant puisque qu'il est reconnu que l'expression de ce récepteur est essentielle pour assurer le succès de la reconstitution immunitaire. Cependant, la petite taille de ces cellules pourrait expliquer cette faible expression, car l'espace en surface est réduite. En effet, les cellules CD34<sup>+</sup> ont un rayon environ 3 fois plus petit que les cellules REH, ce qui occasionne une superficie 9 fois plus petite sur les cellules CD34<sup>+</sup> par rapport aux cellules lymphocytaires REH.

### **3.3.3 Quantité de CXCR4 en surface lors de la domiciliation**

La prise de greffe est un phénomène encore très mal compris, cependant il est dépendant de CXCR4/SDF-1. Nous nous sommes donc demandé si l'expression de CXCR4 en surface des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO pourrait être modulée pendant la prise de greffe (après la transplantation).

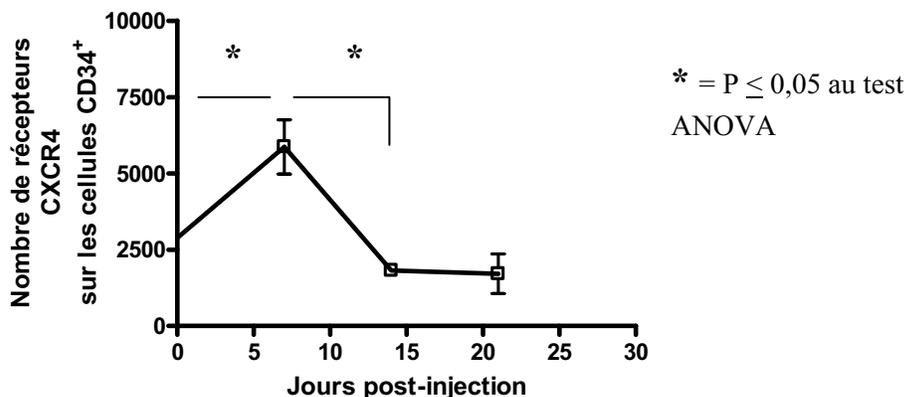
Afin d'avoir une meilleure compréhension de l'impact de la quantité de CXCR4 exprimé durant la prise de la greffe, nous avons étudié son expression en surface des cellules CD34<sup>+</sup> au cours de la domiciliation et de la reconstitution immunitaire. Pour la greffe,  $1 \times 10^5$  cellules CD34<sup>+</sup> de SCO ont été injectées IV à des souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup> préirradiées. Toutes les cellules injectées à des souris proviennent du même SCO. Pour ce premier essai, dû au nombre de souris disponibles et à la quantité de cellules contenue dans le SCO utilisé, nous devons choisir de suivre la greffe à trois moments différents dans le temps. Nous avons suivi l'évolution quantitative de l'expression du CXCR4 en surface des cellules CD34<sup>+</sup> retrouvées dans la MO durant un mois, soit après deux, trois et quatre semaines suivant la greffe, par cytométrie en flux (figure 30). Nous avons sacrifié trois souris à chaque semaine. Pour quantifier les récepteurs, nous avons utilisé la méthode QuantiBrite (BD bioscience). Le temps 0 représente le nombre de récepteurs sur les cellules CD34<sup>+</sup> du SCO quantifié avant la transplantation.



**Figure 30. Expression quantitative de CXCR4 sur les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO.** Injection IV de cellules CD34<sup>+</sup> de SCO à des souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup> irradiées six heures auparavant à trois Grays. Les souris ont été sacrifiées à différents jours suivant l'injection (trois souris pour chacun des jours). CXCR4 a été quantifié (QuantiBrite, BD bioscience) à la surface des cellules CD34<sup>+</sup> de la MO (pattes arrière) par cytométrie en flux. Un test de Student est significatif entre les valeurs du temps 0 et de la deuxième semaine, ainsi qu'entre la deuxième et la quatrième semaine (P≤0,005).

La figure 30 montre qu'il y a une hausse transitoire de l'expression de CXCR4 en surface des cellules CD34<sup>+</sup> retrouvées dans la MO des souris deux semaines après la transplantation. Cette hausse transitoire est significative au test de Student entre la semaine 0 et 2 (P= 0,0025) et entre la semaine 2 et 4 (P=0,0002).

Par la suite, nous voulions d'une part, confirmer ce résultat, et d'autre part déterminer ce qu'il advenait de l'expression de CXCR4 dans la MO à une semaine suivant la greffe. Nous avons donc répété l'expérience en sacrifiant des souris après une semaine plutôt que quatre semaines. Cette expérience fut effectuée avec des cellules CD34<sup>+</sup> provenant d'un SCO différent.



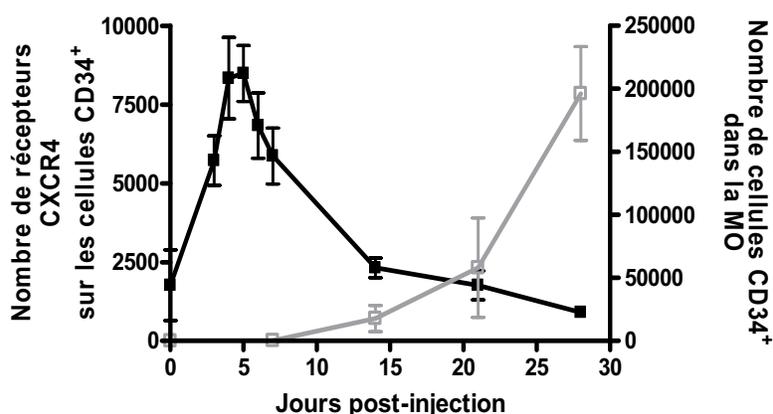
**Figure 31. Expression quantitative de CXCR4 sur les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO.**

Injection IV de cellules CD34<sup>+</sup> de SCO à des souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup> irradiées six heures auparavant à trois Grays. Les souris ont été sacrifiées à différents jours suivant l'injection (trois souris pour chacun des jours). CXCR4 a été quantifié (QuantiBrite, BD bioscience) à la surface des cellules CD34<sup>+</sup> de la MO (pattes arrière) par cytométrie en flux. Un test ANOVA qui compare l'expression obtenue pour chacun des jours post-injection est significatif entre la valeur avant injection et la valeur après sept jours ( $P \leq 0,05$ ), de même qu'entre la valeur après sept jours et la valeur après quatorze jours ( $P \leq 0,01$ ).

La figure 31 démontre qu'il y a une forte augmentation de l'expression de CXCR4 au début de la prise de greffe. En effet, une semaine après la transplantation, les cellules CD34<sup>+</sup> transplantées qui sont retrouvées dans la MO exposent deux fois plus de CXCR4 à leur surface. Toutefois, le niveau de CXCR4 retrouve le même niveau basal d'expression qu'avant la greffe, après trois semaines passées dans la MO. Cette hausse transitoire de CXCR4 après domiciliation dans la MO fut observée à la suite de deux transplantations avec des cellules CD34<sup>+</sup> provenant de cordons différents. Cette hausse transitoire est statistiquement significative dans les deux cas, bien qu'à différents temps (après une semaine dans le deuxième cas (figure 31), et après deux semaines dans la première expérience (figure 30). Cette hausse d'expression transitoire pourrait servir à la rétention des cellules CD34<sup>+</sup> dans la MO durant l'auto-renouvellement de celles-ci (voir introduction). En effet, nous pensons que les cellules qui prolifèrent doivent être plus particulièrement retenues dans la MO, afin que ce processus s'y effectue précisément, et ce, via une surexpression de CXCR4. Lorsque le nombre de cellules

CD34<sup>+</sup> est suffisant et que la reconstitution immunitaire est enclenchée, le niveau d'expression de CXCR4 peut alors s'abaisser, ce qui permet aux cellules CD34<sup>+</sup> de circuler dans les vaisseaux sanguins.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons suivi l'évolution de la prolifération des cellules humaines CD34<sup>+</sup> retrouvées dans les pattes des souris, dans une troisième expérience du même type. Parallèlement, nous avons déterminé le jour précis où cette hausse d'expression de CXCR4 se produisait. Nous avons alors regardé plus précisément entre le quatrième et le septième jour suivant l'injection.

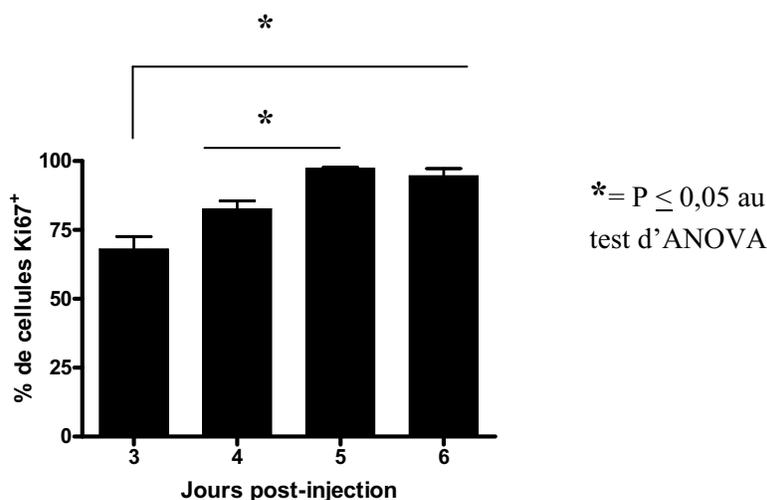


**Figure 32. Quantification des cellules CD34<sup>+</sup> dans la MO et du récepteur CXCR4 à leur surface.** Injection IV de cellules CD34<sup>+</sup> de SCO à des souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup> irradiées six heures auparavant à trois Grays. Les souris ont été sacrifiées à différents jours suivant l'injection (trois souris pour chacun des jours). Le CXCR4 a été quantifié (QuantiBrite, BD bioscience) à la surface des cellules CD34<sup>+</sup> de la MO (pattes arrière) par cytométrie en flux de même que le nombre de cellules CD34<sup>+</sup> retrouvées dans la MO au même moment. Les trois derniers résultats sont compilés dans cette figure (ceux des figures 30 et 31).

La figure 32 représente la compilation de toutes nos expériences de quantification de CXCR4 sur les cellules CD34<sup>+</sup> retrouvées dans la MO. Nous avons compilé ces

résultats, bien qu'il s'agisse d'expériences faites à partir de SCO différents, car nous observons le même phénotype. En effet, la figure 32 démontre que même s'il s'agit de trois SCO différents, la compilation conserve des écart-types minimes et la tendance est la même.

L'évaluation du nombre de récepteurs entre les jours 3 et 6 suivant la greffe montre le point culminant d'expression de CXCR4, à cinq jours suivant une transplantation de cellules CD34<sup>+</sup> issues de SCO. À ce moment, l'expression de CXCR4 a même quadruplée par rapport à son niveau basal d'expression (avant l'injection). De plus, l'expression de CXCR4 diminue à mesure que la MO se repeuple jusqu'à retrouver son niveau d'expression initiale après quatre semaines. Cette hausse d'expression transitoire de l'expression de CXCR4 coïncide avec la repopulation de la MO. Pour le confirmer, nous avons vérifié à l'aide du Ki67, l'état prolifératif des cellules humaines retrouvées dans la MO. L'antigène Ki67 est présent sur une protéine nucléaire dans les cellules en prolifération.

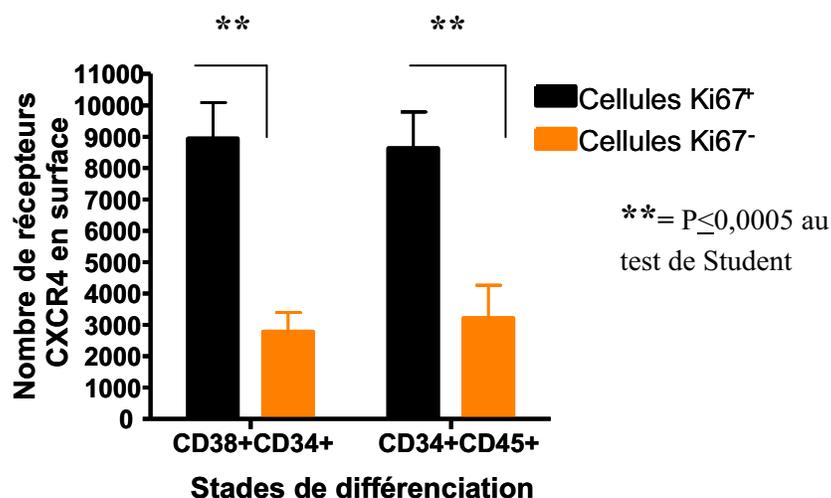


**Figure 33. Analyse de l'état prolifératif des cellules CD34<sup>+</sup> retrouvées dans la MO.** Injection IV de cellules CD34<sup>+</sup> de SCO à des souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup> irradiées six heures auparavant à trois Grays. Les souris ont été sacrifiées à trois, quatre, cinq et six jours suivant l'injection (trois souris par jour). Les cellules détectées Ki67<sup>+</sup> par la cytométrie en flux sont celles qui sont dans un état prolifératif. La différence de pourcentage de cellules Ki67<sup>+</sup> est significative à un test d'ANOVA entre les jours 3 et 4 ( $P \leq 0,05$ ), 3 et 5 ( $P \leq 0,001$ ), 3 et 6 ( $P \leq 0,01$ ) et 4 et 5 ( $P \leq 0,05$ ).

La figure 33 montre que durant les jours suivant la transplantation, les cellules CD34<sup>+</sup> retrouvées dans la MO sont dans un état prolifératif. Une comparaison entre chacun des pourcentages de cellules en état prolifératif à chacun des jours a été effectuée à l'aide d'un test statistique ANOVA. Il a révélé une différence significative entre les valeurs de la troisième journée et toutes les autres (quatrième, cinquième et sixième), de même qu'entre la quatrième et la cinquième journée ( $P \leq 0,05$ ). Le plus fort taux de prolifération coïncide effectivement avec le point culminant d'expression de CXCR4 en surface, c'est-à-dire cinq jours après la transplantation. La hausse d'expression transitoire de CXCR4 en surface se produirait donc simultanément avec la repopulation de la MO. Toutefois, ne n'avons malheureusement pas vérifié l'état prolifératif des cellules provenant de ce SCO avant l'injection, de même que quatre semaines après l'injection. Ceci reste alors à vérifier.

Par la suite, nous avons analysé plus précisément quelles cellules étaient dans un état prolifératif. Nous avons utilisé les marqueurs CD38 et CD45, pour différencier les cellules CD34<sup>+</sup> à différents stades de leur différenciation vers la reconstitution du système immunitaire. Les cellules qui expriment le CD38 sont plus immatures que celles qui expriment le CD45.

La figure 34 représente la quantification du nombre de CXCR4 exprimé en surface des cellules CD34<sup>+</sup> retrouvées dans les MO des souris entre le quatrième et le sixième jour suivant la transplantation. Nous avons compilé les résultats des cellules CD34<sup>+</sup> à différents stades de leur différenciation selon l'expression du CD38 et du CD45. Les cellules CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> ont elles aussi été vérifiées, mais elles n'étaient pas assez nombreuses à ce stade de la greffe. Ensuite, nous avons séparé les cellules qui étaient positives pour le Ki67 de celles qui ne l'étaient pas et nous avons comparé la quantité de récepteurs CXCR4 qu'elles exprimaient.



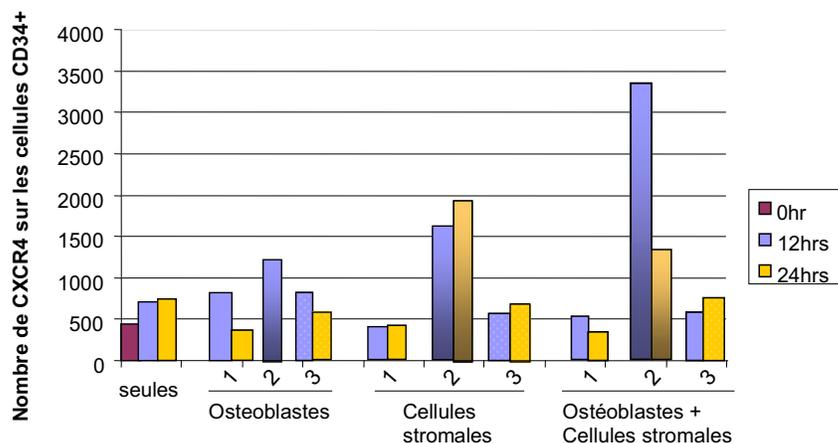
**Figure 34. Quantification de CXCR4 corrélée avec l'état prolifératif des cellules CD34<sup>+</sup> à différents stades de différenciation.** Analyse de cytométrie en flux sur les cellules CD34<sup>+</sup> retrouvées dans les MO (pattes arrière) des souris, quatre à six jours après la transplantation. Elles sont séparées selon les marqueurs humains CD38, CD45 et CD34 et Ki67. Un test de Student révèle une différence d'expression significative de CXCR4 pour les cellules dans état prolifératif vs celles qui ne prolifèrent pas ( $P=0,0004$ ).

La figure 34 confirme que les cellules CD34<sup>+</sup> qui sont dans un état prolifératif, peu importe leur stade de différenciation, sont celles qui démontrent une surexpression du récepteur CXCR4 en surface. En effet, la différence d'expression de CXCR4 entre les cellules qui sont en prolifération et celles qui ne le sont pas est significative au test de Student ( $P=0,0004$ ). En d'autres mots, nos résultats suggèrent que la non-prolifération corrèle avec une baisse de l'expression de CXCR4, suggérant ainsi que ce soient surtout des cellules non-proliférantes qui émigrent de la moelle.

### 3.3.3.1. Exploration du mécanisme

À la suite des résultats précédents, nous souhaitons découvrir quel mécanisme était responsable de cette hausse de l'expression transitoire de CXCR4 en surface des cellules CD34<sup>+</sup>, lorsque celles-ci se retrouvaient dans la MO. Est-ce un facteur soluble ou une molécule de la surface cellulaire faisant contact avec la cellule CD34<sup>+</sup>?

Afin d'identifier la molécule responsable de cette hausse d'expression transitoire, nous avons procédé à une coculture *in vitro* entre les cellules de la MO murine et les cellules CD34<sup>+</sup>. Nous avons utilisé des cellules stromales de souris, ainsi que des ostéoblastes. Nous avons ensuite ajouté les cellules CD34<sup>+</sup>. Pour évaluer si c'est le contact direct entre les cellules ou la sécrétion de cytokines qui est responsable du phénotype observé, nous avons séparé les deux types cellulaires par une membrane constituée de pores de 0,8 micron. La coculture a été effectuée durant douze et vingt-quatre heures. Après ces délais, nous avons mesuré l'expression de CXCR4 en surface des cellules CD34<sup>+</sup>. Pour les cellules CD34<sup>+</sup> directement en contact avec les cellules de la MO murine, nous avons comparé celles qui avaient formé des agrégats avec les cellules de la MO de celles qui restaient en suspension dans le milieu.



**Figure 35. Coculture entre les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO et les cellules de la MO murine.** Coculture des cellules stromales et des ostéoblastes provenant de la MO de souris avec des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO durant douze et vingt-quatre heures. 1) cellules CD34<sup>+</sup> retrouvées en suspension dans le milieu ; 2) cellules CD34<sup>+</sup> agrégées aux cellules murines ; 3) cellules CD34<sup>+</sup> séparées des cellules murines par une membrane de 0,8 micron. (n=1)

Uniquement les cellules CD34<sup>+</sup> qui ont été en contact direct avec les cellules stromales de la MO de souris ont démontré une hausse flagrante de l'expression de CXCR4 en surface (figure 35). Toutefois, l'analyse statistique des données relatives à cette figure n'a pu être réalisée, car nous n'avons effectué cette expérience qu'une seule fois. Il faudra refaire cette expérience de coculture afin d'obtenir des valeurs significatives.

Le responsable potentiel de cette hausse d'expression de CXCR4 serait donc le contact direct avec les cellules stromales. Toutefois, nous ne pouvons pas encore affirmer qu'elles sont les seules responsables de ce phénomène, puisque nous n'avons observé que l'impact des ostéoblastes et des cellules stromales ainsi que de leurs sécrétions sur l'expression de CXCR4. De plus, cette coculture a été effectuée à partir de cellules provenant de la MO de souris, en accord avec les observations précédentes

sur la hausse transitoire de l'expression de CXCR4 en surface des cellules CD34<sup>+</sup> (section 3.3.3) après transplantation dans la souris. Il serait intéressant de réaliser une coculture entre les cellules stromales humaines et les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO pour confirmer que le même phénomène se produit aussi chez l'homme.

Les expériences précédentes ont révélé que le contact avec les cellules stromales de souris était à l'origine de la hausse d'expression de CXCR4 sur les cellules CD34<sup>+</sup> et que cette hausse corrélait avec un état prolifératif. Il est donc envisageable que ce soit également le contact entre les cellules CD34<sup>+</sup> et celles de la MO qui entraîne la prolifération de ces cellules.

### 3.3.4 DISCUSSION

Notre dernier objectif était de caractériser l'importance de l'expression de CXCR4 sur les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO lors de leur domiciliation dans la MO. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons simulé la transplantation, en injectant des cellules CD34<sup>+</sup> issues de SCO à des souris immunodéficientes.

Suite à une transplantation de cellules CD34<sup>+</sup> chez les souris NOD/SCIDyC<sup>-</sup>, ces cellules démontrent une hausse de l'expression du récepteur CXCR4 exprimé à la membrane. Nos résultats nous ont cependant démontré que cette hausse d'expression est transitoire et survient quatre à six jours après la greffe, c'est-à-dire lorsque les cellules se sont domiciliées dans la MO. Cette hausse de l'expression transitoire coïncide avec la repopulation de la MO en cellules CD34<sup>+</sup>. De plus, une forte expression de CXCR4 corréle avec un état cellulaire prolifératif. Ces constatations portent à croire que cette hausse d'expression de CXCR4 pourrait servir à la rétention des cellules CD34<sup>+</sup> dans la MO durant la repopulation de celle-ci. À ce sujet, il a été démontré qu'il y avait corrélation entre la densité membranaire en CXCR4 et la mobilisation des cellules CD34<sup>+</sup> dans le sang périphérique [108]. En effet, les cellules retrouvées dans le sang périphérique avaient une densité membranaire en CXCR4 plus faible que celles retrouvées dans la MO. Toutefois, une étude réalisée à partir de souris dont l'expression cellulaire du gène CXCR4 était inductible, a démontré que même après la perte de

CXCR4 chez des CSH domiciliées dans la MO, ceux-ci restaient dans la MO et étaient aptes à engendrer la reconstitution immunitaire, autant myéloïde que lymphoïde [50]. La hausse de l'expression en surface du CXCR4 en surface des cellules CD34<sup>+</sup>, ne serait alors pas essentielle pour la division asymétrique (permettant leurs différenciations), mais probablement pour leur auto-renouvellement. Tout comme nos résultats l'indiquent, la hausse de l'expression de CXCR4 précède la multiplication de cellules CD34<sup>+</sup> retrouvées dans la MO (figure 25). En effet, d'autres études témoignent aussi qu'une délétion du récepteur CXCR4 cause une réduction du nombre total de CSH, ce qui leur cause de la difficulté à engendrer des cellules à des stades de maturité plus avancés [109]. De plus, si la hausse d'expression est nécessaire à l'auto-renouvellement, cela expliquerait également pourquoi cette hausse est transitoire. En effet, une surprolifération entraînerait des problèmes graves, tel le développement d'une leucémie.

Notre expérience de coculture entre des cellules de la MO murine et les cellules CD34<sup>+</sup> issues de SCO a révélé que le contact direct avec les cellules stromales serait à l'origine de cette hausse d'expression de CXCR4. Ce constat n'est pas très surprenant, vu que les cellules stromales produisent du SDF-1 et que l'adhésion des cellules CD34<sup>+</sup> aux cellules stromales de la MO est facilitée par l'interaction entre CXCR4 et SDF-1 [110, 111]. Toutefois, bien que la hausse d'expression de CXCR4 en surface des cellules soit très importante lors du processus de la prise de greffe, cette hausse n'est que transitoire. Il y a donc un facteur qui doit induire cette baisse d'expression. Nous savons qu'une grande concentration de SDF-1 (57,5nM) entraîne la diminution de l'expression de CXCR4 en surface, de même que l'arrêt de la prolifération cellulaire, notamment des cellules CD34<sup>+</sup> issues de SCO [49, 50]. En effet, une concentration extrême de SDF-1 cause une augmentation de l'expression de p57kip2, un inhibiteur du cycle cellulaire [50]. Cette surproduction de SDF-1 pourrait provenir des cellules stromales. Il se pourrait que le contact entre les cellules stromales et de multiple cellules CD34<sup>+</sup> provoquent une surproduction de SDF-1. Ce message pourrait être transmis via les protéines d'adhésion, lorsque les cellules CD34<sup>+</sup> se retrouvent assez nombreuses. Il faudrait doser la quantité de SDF-1 présent dans la MO durant la prise de la greffe, et durant la coculture de façon à vérifier si la concentration de cette chimiokine pourrait être en cause de cette baisse d'expression de CXCR4.

#### **4. CONCLUSION**

L'objectif de mon projet de recherche visait à comprendre le mécanisme de la migration cellulaire dépendant de CXCR4/SDF-1 dans le but de contribuer au développement de nouvelles stratégies de traitement basées sur l'optimisation de la domiciliation à la MO lors de la transplantation de SCO.

Pour atteindre ce but, nous voulions, tout d'abord, décrire l'effet des composés qui modulent positivement la réponse migratoire vers SDF-1 de cellules exprimant le CXCR4 et évaluer si ces composés (C3a et ses dérivés, SEW-2871) agissent dépendamment de CXCR4/SDF-1. Nos expériences ont démontré que ces composés ont effectivement une action dépendante de CXCR4/SDF-1 et ne possèdent pas d'effet agoniste propre sur les lignées utilisées (cellules T CEM, cellules B REH et cellules CD34<sup>+</sup> de SCO). De plus, chaque lignée cellulaire, que ce soient les lignées T, B ou bien les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO, migrait différemment en présence des mêmes stimuli. Toutefois, nous n'avons pas pu démontrer que ces molécules liaient directement le récepteur CXCR4 en tant que modulateurs allostériques. Cependant, nos expériences *in vivo* ont révélé que le composé dérivé du complément C3a dépourvu de son arginine terminale, le C3a<sub>desarg</sub> semble être un bon candidat pour favoriser la prise de greffe des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO. Toutefois, il n'a montré aucune influence positive sur la migration *in vitro* de ces cellules. Cette dernière observation a amené des doutes quant à la pertinence de ce paramètre *in vitro* en prédiction de la prise de greffe.

Nous avons également évalué les propriétés intrinsèques de différents SCO afin de trouver un paramètre qui permettrait de prédire la réussite de la prise de greffe subséquente. Nous avons remarqué qu'il était impossible de corréler la prise de la greffe avec la migration cellulaire dirigée *in vitro* ou le niveau d'expression de CXCR4 en surface. Encore une fois, nos résultats démontraient qu'il était impossible de corréler migration et prise de greffe. Contrairement à ce que nous pouvions penser, et ce qui est couramment inféré dans les travaux publiés, la migration cellulaire *in vitro* n'est pas le bon paramètre de prédilection à une prise de greffe.

Puis, afin de bien comprendre le mécanisme de la domiciliation *in vivo*, nous voulions examiner l'impact de l'expression de CXCR4 sur les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO

lors de leur domiciliation dans la MO. Nous avons constaté qu'à la suite d'une transplantation, les cellules CD34<sup>+</sup> de SCO subissent une hausse d'expression transitoire de leur CXCR4 à environ cinq jours suivant la greffe. De plus, les cellules CD34<sup>+</sup> qui sont dans un état prolifératif, peu importe leur stade de différenciation, sont celles qui démontrent une surexpression du récepteur CXCR4 en surface. Nous pensons que cette hausse d'expression transitoire pourrait être liée à la repopulation de la MO. Quant à savoir quel facteur engendre cette hausse d'expression, nos données suggèrent que le contact direct avec les cellules stromales de la MO soit responsable de cette hausse d'expression de CXCR4.

En conclusion, l'augmentation du nombre de CXCR4 corrèle avec un état cellulaire prolifératif et le contact avec les cellules stromales entraîne une hausse de l'expression de CXCR4. Il serait intéressant de vérifier si le contact direct des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO avec les cellules stromales murines entraîne aussi une hausse de leur prolifération.

Ensuite, le C3a<sub>desarg</sub> augmente la prise de greffe ainsi que la domiciliation à la MO des cellules CD34<sup>+</sup> chez la souris. De plus, la domiciliation dans la MO est caractérisée par une hausse de l'expression transitoire de CXCR4 en surface des cellules CD34<sup>+</sup> de SCO. Il serait donc intéressant de vérifier si le C3a<sub>desarg</sub> cause une surexpression de CXCR4. D'autant plus, qu'une étude récente a démontré que l'acide valproïque qui induit une hausse de la migration, de la domiciliation et de la prise de greffe des CSH causait aussi une hausse du nombre de CXCR4 en surface des CD34<sup>+</sup> de SCO [112].

## **5. BIBLIOGRAPHIE**

1. Wetsel, R.A. *Molecular Genetics, Structure, and Transgenic Studies of Chemoattractant Receptors*. 2000 [cited; <http://www.uth.tmc.edu/bmb/faculty/Wetsel/Wetsel.html>].
2. Nordentoft, I. and P. Jorgensen, *The acetyltransferase 60 kDa trans-acting regulatory protein of HIV type 1-interacting protein (Tip60) interacts with the translocation E26 transforming-specific leukaemia gene (TEL) and functions as a transcriptional co-repressor*. *Biochem J*, 2003. **374**(Pt 1): p. 165-73.
3. Richard A. Goldsby, T.J.K., Barbara A. Osborne, *Immunologie*. 4 ed. 2000, Paris: Dunod. 660.
4. Rubinstein, P., *Why cord blood?* *Hum Immunol*, 2006. **67**(6): p. 398-404.
5. Morin, D.Y., *Larousse Médical*, Larousse, Editor. 2002: Paris.
6. *typage HLA, première étape vers la greffe apparentée*. 2006 [cited 2008 1/12/08]; programme-clientèle d'oncologie]. Available from: [http://biblio.hmr.qc.ca/Publications\\_pdf/T/typage\\_hla\\_onc011.pdf](http://biblio.hmr.qc.ca/Publications_pdf/T/typage_hla_onc011.pdf).
7. Gluckman E, B.H., Auerbach AD, et al, *Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling*. *N Engl J Med*, 1989. **321**.
8. Cohen, Y. and A. Nagler, *Cord blood biology and transplantation*. *Isr Med Assoc J*, 2004. **6**(1): p. 39-46.
9. Champagne, M., Duval, M. et Wagner E., *La transplantation de sang de cordon au Québec*. *Ann Biol Clin Qué*, 2006: p. 3-10.
10. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 157-68.
11. Kopp, H.G., et al., *The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization*. *Physiology (Bethesda)*, 2005. **20**: p. 349-56.
12. Berthou, P.C. *Hématopoïèse et son exploration, La moelle osseuse: organe de l'hématopoïèse*. 2004 [cited; Available from: [www.leucemie-espoir.org/spip/article1.html](http://www.leucemie-espoir.org/spip/article1.html)].
13. Greiner, D.L., R.A. Hesselton, and L.D. Shultz, *SCID mouse models of human stem cell engraftment*. *Stem Cells*, 1998. **16**(3): p. 166-77.
14. Jo, D.Y., et al., *Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(1): p. 101-11.
15. Butcher, E.C. and L.J. Picker, *Lymphocyte homing and homeostasis*. *Science*, 1996. **272**(5258): p. 60-6.
16. Premack, B.A. and T.J. Schall, *Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection*. *Nat Med*, 1996. **2**(11): p. 1174-8.
17. Lataillade, J.J., et al., *Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival*. *Blood*, 2000. **95**(3): p. 756-68.
18. Burger, J.A., et al., *Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1*. *Blood*, 2000. **96**(8): p. 2655-63.
19. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. *Nat Med*, 2004. **10**(8): p. 858-64.
20. *Introduction à l'étude des Récepteurs Couplés aux Protéines-G*. 2000 [cited; Available from: [www.chez.com/rcpg/images/intro.jpg](http://www.chez.com/rcpg/images/intro.jpg)].

21. Percherancier, Y., et al., *Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers*. J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 9895-903.
22. El-Asmar, L., et al., *Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(2): p. 460-9.
23. Mellado, M., et al., *Chemokine control of HIV-1 infection*. Nature, 1999. **400**(6746): p. 723-4.
24. Mellado, M., et al., *Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways*. EMBO J, 2001. **20**(10): p. 2497-507.
25. Benkirane, M., et al., *Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 30603-6.
26. Rodriguez-Frade, J.M., et al., *The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3628-33.
27. Issafras, H., et al., *Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 34666-73.
28. Hernanz-Falcon, P., et al., *Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization*. Nat Immunol, 2004. **5**(2): p. 216-23.
29. Lapham, C.K., et al., *Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5*. Nat Med, 1999. **5**(3): p. 303-8.
30. Babcock, G.J., M. Farzan, and J. Sodroski, *Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 3378-85.
31. Desjardins, S.F., et al., *[Multiple talents of the chemokine receptor-CXCR4]*. Med Sci (Paris), 2007. **23**(11): p. 980-4.
32. Oberlin, E., et al., *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 833-5.
33. Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 829-33.
34. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. **272**(5263): p. 872-7.
35. Balabanian, K., et al., *The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35760-6.
36. Murdoch, C., *CXCR4: chemokine receptor extraordinaire*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 175-84.
37. Gulino, A.V., et al., *Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome*. Blood, 2004. **104**(2): p. 444-52.
38. Murphy, P.M., *Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis*. N Engl J Med, 2001. **345**(11): p. 833-5.
39. Lukacs, N.W., *Role of chemokines in the pathogenesis of asthma*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 108-16.

40. Matthys, P., et al., *AMD3100, a potent and specific antagonist of the stromal cell-derived factor-1 chemokine receptor CXCR4, inhibits autoimmune joint inflammation in IFN-gamma receptor-deficient mice.* J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4686-92.
41. Mowafi, F., et al., *Chemokine CXCL12 enhances proliferation in pre-B-ALL via STAT5 activation.* Pediatr Blood Cancer, 2008. **50**(4): p. 812-7.
42. Spiegel, A., et al., *Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling.* Blood, 2004. **103**(8): p. 2900-7.
43. Thelen, M., *Dancing to the tune of chemokines.* Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 129-34.
44. Li, Z., et al., *Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction.* Science, 2000. **287**(5455): p. 1046-9.
45. Wang, J.F., I.W. Park, and J.E. Grooman, *Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C.* Blood, 2000. **95**(8): p. 2505-13.
46. Davis CB, D.I., Unutmaz D, et al, *Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5.* J Exp Med, 1997. **186**.
47. Vicente-Manzanares, M., et al., *A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha-induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis.* J Immunol, 2002. **168**(1): p. 400-10.
48. Shih, D.M. *CXCR4 Signaling Pathway* [cited 1/12/08]; Available from: [www.biocarta.com/pathfiles/cxcr4Pathway.asp](http://www.biocarta.com/pathfiles/cxcr4Pathway.asp).
49. Peled, A., et al., *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4.* Science, 1999. **283**(5403): p. 845-8.
50. Nie, Y., Y.C. Han, and Y.R. Zou, *CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells.* J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 777-83.
51. Wright, D.E., et al., *Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines.* J Exp Med, 2002. **195**(9): p. 1145-54.
52. Shirozu, M., et al., *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene.* Genomics, 1995. **28**(3): p. 495-500.
53. Ponomaryov, T., et al., *Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function.* J Clin Invest, 2000. **106**(11): p. 1331-9.
54. Broxmeyer, H.E., et al., *Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist.* J Exp Med, 2005. **201**(8): p. 1307-18.
55. Janowska-Wieczorek, A., et al., *Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines.* Exp Hematol, 2000. **28**(11): p. 1274-85.
56. Sternlicht MD, W.Z., *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**.

57. Peled, A., et al., *The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice.* Blood, 2000. **95**(11): p. 3289-96.
58. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development.* Nature, 1998. **393**(6685): p. 595-9.
59. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1.* Nature, 1996. **382**(6592): p. 635-8.
60. Heissig, B., et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand.* Cell, 2002. **109**(5): p. 625-37.
61. Foudi, A., et al., *Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4-/- chimeric mice.* Blood, 2006. **107**(6): p. 2243-51.
62. Tosi, M.F., *Innate immune responses to infection.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(2): p. 241-9; quiz 250.
63. libre, W.L.e. *Système du complément.* [cited 1/12/08]; Available from: [http://fr.wikipedia.org/wiki/Syst%C3%A8me\\_du\\_compl%C3%A9ment](http://fr.wikipedia.org/wiki/Syst%C3%A8me_du_compl%C3%A9ment).
64. Daffern, P.J., et al., *C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation.* J Exp Med, 1995. **181**(6): p. 2119-27.
65. Hartmann, K., et al., *C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells.* Blood, 1997. **89**(8): p. 2863-70.
66. Honczarenko, M., et al., *Complement C3a enhances CXCL12 (SDF-1)-mediated chemotaxis of bone marrow hematopoietic cells independently of C3a receptor.* J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3698-706.
67. Honczarenko, M., et al., *C5L2 receptor is not involved in C3a / C3a-desArg-mediated enhancement of bone marrow hematopoietic cell migration to CXCL12.* Leukemia, 2005. **19**(9): p. 1682-3; author reply 1684-5.
68. Dorsam, G., et al., *Transduction of multiple effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) on T cell functions by the S1P1 G protein-coupled receptor.* J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3500-7.
69. Lee, M.J., et al., *Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1.* Science, 1998. **279**(5356): p. 1552-5.
70. Kimura, T., et al., *The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34+ progenitor cells.* Blood, 2004. **103**(12): p. 4478-86.
71. Yopp, A.C., et al., *FTY720-enhanced T cell homing is dependent on CCR2, CCR5, CCR7, and CXCR4: evidence for distinct chemokine compartments.* J Immunol, 2004. **173**(2): p. 855-65.
72. LaMontagne, K., et al., *Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization.* Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 221-31.
73. Nofer, J.R., et al *FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptordeficient mice.* Cell Mol. Immunol., 2006: p. 429–437.

74. Awad, A.S., et al., *Selective sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in mouse kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(6): p. F1516-24.
75. Lien, Y.H., et al., *SIP(1)-selective agonist, SEW2871, ameliorates ischemic acute renal failure*. Kidney Int, 2006. **69**(9): p. 1601-8.
76. Delbridge, M.S., et al., *Reduction of ischemia-reperfusion injury in the rat kidney by FTY720, a synthetic derivative of sphingosine*. Transplantation, 2007. **84**(2): p. 187-95.
77. Coste, O., et al., *Antinociceptive activity of the SIP-receptor agonist FTY720*. J Cell Mol Med, 2007.
78. Schmid, G., et al., *The immunosuppressant FTY720 inhibits tumor angiogenesis via the sphingosine 1-phosphate receptor 1*. J Cell Biochem, 2007. **101**(1): p. 259-70.
79. Peng, X., et al., *Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **169**(11): p. 1245-51.
80. Lynch, K.R. and T.L. Macdonald, *Sphingosine 1-phosphate chemical biology*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1781**(9): p. 508-12.
81. Check, E., *Draft mouse genome makes public debut*. Nature, 2002. **417**(6885): p. 106.
82. Christianson, S.W., L.D. Shultz, and E.H. Leiter, *Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors*. Diabetes, 1993. **42**(1): p. 44-55.
83. Leiter, E.H., *The nonobese diabetic mouse: a model for analyzing the interplay between heredity and environment in development of autoimmune disease*. ILAR News, 1993. **35**.
84. Serreze, D.V. and E.H. Leiter, *Defective activation of T suppressor cell function in nonobese diabetic mice. Potential relation to cytokine deficiencies*. J Immunol, 1988. **140**(11): p. 3801-7.
85. Kataoka, S., et al., *Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity*. Diabetes, 1983. **32**(3): p. 247-53.
86. Baxter, A.G. and A. Cooke, *Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice*. Diabetes, 1993. **42**(11): p. 1574-8.
87. Jacob, C.O., et al., *Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(3): p. 968-72.
88. Shultz, L.D., et al., *Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice*. J Immunol, 1995. **154**(1): p. 180-91.
89. Lapidot, T., et al., *Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice*. Science, 1992. **255**(5048): p. 1137-41.
90. Conneally, E., et al., *Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9836-41.

91. Dao, M.A., et al., *Engraftment and retroviral marking of CD34+ and CD34+CD38- human hematopoietic progenitors assessed in immune-deficient mice*. Blood, 1998. **91**(4): p. 1243-55.
92. Cavazzana-Calvo, M., et al., *Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease*. Science, 2000. **288**(5466): p. 669-72.
93. Ito, M., et al., *NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells*. Blood, 2002. **100**(9): p. 3175-82.
94. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
95. Bouvier, M., *Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(4): p. 274-86.
96. Lin, C., et al., *Evaluation of TCR Vbeta subfamily T cell expansion in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood hematopoietic stem cells*. Hematology, 2007. **12**(4): p. 325-30.
97. Sachpatzidis, A., et al., *Identification of allosteric peptide agonists of CXCR4*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 896-907.
98. Heveker, N., et al., *Dissociation of the signalling and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides*. Curr Biol, 1998. **8**(7): p. 369-76.
99. Xu, Y., D.W. Piston, and C.H. Johnson, *A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 151-6.
100. Milligan, G. and M. Bouvier, *Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors*. FEBS J, 2005. **272**(12): p. 2914-25.
101. Boute, N., R. Jockers, and T. Issad, *The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(8): p. 351-4.
102. BreLOT, A., et al., *Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity*. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4744-51.
103. Gonzales, R.A. and P.L. Hoffman, *Receptor-gated ion channels may be selective CNS targets for ethanol*. Trends Pharmacol Sci, 1991. **12**(1): p. 1-3.
104. Harris, R.A., J.R. Trudell, and S.J. Mihic, *Ethanol's molecular targets*. Sci Signal, 2008. **1**(28): p. re7.
105. Seitz, G., et al., *The role of sphingosine 1-phosphate receptors in the trafficking of hematopoietic progenitor cells*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1044**: p. 84-9.
106. Terrillon, S. and M. Bouvier, *Roles of G-protein-coupled receptor dimerization*. EMBO Rep, 2004. **5**(1): p. 30-4.
107. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 463-516.
108. Dlubek, D., D. Drabczak-Skrzypek, and A. Lange, *Low CXCR4 membrane expression on CD34(+) cells characterizes cells mobilized to blood*. Bone Marrow Transplant, 2006. **37**(1): p. 19-23.
109. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 977-88.

110. Aiuti, A., et al., *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood.* J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 111-20.
111. Durig, J., N.G. Testa, and C.M. Heyworth, *Distinct biological effects of macrophage inflammatory protein-1alpha and stroma-derived factor-1alpha on CD34+ hemopoietic cells.* Stem Cells, 1999. **17**(2): p. 62-71.
112. Gul, H., et al., *Valproic Acid Increases CXCR4 Expression in Hematopoietic Stem/Progenitor Cells by Chromatin Remodelling.* Stem Cells Dev, 2008.