

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**MANIPULATION *EX VIVO* DE GREFFONS POUR ÉLIMINER LES CELLULES
MALIGNES ET FAVORISER L'EXPANSION DE CELLULES SOUCHES
HÉMATOPOIÉTIQUES NORMALES**

PAR

NADINE BEAUGER

FACULTÉ DE MÉDECINE

**THÈSE PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES
EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
PHILOSOPHÆ DOCTOR (PH.D.)
EN SCIENCES BIOMÉDICALES
OPTION HÉMATOLOGIE**

AOÛT, 2001

© NADINE BEAUGER, 2001



UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES

CETTE THÈSE INTITULÉE :

MANIPULATION *EX VIVO* DE GREFFONS POUR ÉLIMINER LES CELLULES
MALIGNES ET FAVORISER L'EXPANSION DE CELLULES SOUCHES
HÉMATOPOIÉTIQUES NORMALES

PRÉSENTÉE PAR :

NADINE BEAUGER

A ÉTÉ ÉVALUÉE PAR UN JURY COMPOSÉ DES PERSONNES SUIVANTES :

Bussque Lambert PRÉSIDENT DU JURY
Boy Denis - Claude DIRECTEUR DE RECHERCHE
Kouassi Edouard MEMBRE DU JURY
Lanauville Pierre EXAMINATEUR EXTERNE
Manjmath Guttaswamy REPRÉSENTANT DU DOYEN

THÈSE ACCEPTÉE LE :

14 février 2002

SOMMAIRE

L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), option thérapeutique prometteuse pour plusieurs patients atteints de néoplasies hématologiques, est une approche thérapeutique limitée en raison d'une possibilité de contamination du greffon par des cellules malignes. De plus, une purge *ex vivo* de ces dernières élimine une majorité de progéniteurs hématopoïétiques normaux, ce qui pourrait compromettre la prise du greffon. Aussi, devenait-il important de concevoir une stratégie à deux volets principaux qui visait, à la fois, l'élimination des cellules malignes résiduelles et l'expansion des cellules souches et progénitrices normales.

Pour parvenir à cette fin, nous avons évalué différentes approches thérapeutiques: la thérapie photodynamique de cellules de patients atteints de lymphome non-Hodgkinien (LNH) et l'expansion *ex vivo* de cellules normales provenant d'individus normaux et de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC). En premier lieu, la thérapie photodynamique a été réalisée à l'aide de l'agent photosensibilisateur BPD-MA (dérivé de benzoporphyrine monoacide bague A) puisqu'il pouvait être utilisé en clinique.

Nos résultats ont démontré que l'index thérapeutique du BPD-MA, atteint à des doses de 20 à 30 ng/ml, a induit des déplétions de 2 à 4 logs de cellules lymphomateuses de haut et de bas grade, tout en évitant un effet toxique important sur les progéniteurs hématopoïétiques normaux du sang. Les colonies hématopoïétiques normales ont été maintenues dans une proportion de 60 à 80%.

Afin de favoriser l'expansion des progéniteurs résiduels normaux, présents dans le contexte de la LMC, nous avons ensuite évalué l'effet de combinaisons de cytokines approuvées en clinique. Ces dernières agissent sur la prolifération et/ou la différenciation à différents niveaux de maturation hématopoïétique: celui des CSH (Flt3-ligand ou FL), des CSH et des progéniteurs (Pixykine321, protéine de fusion GM-CSF/IL-3, ou P) ou à partir du stade des CSH à celui des granulocytes (G-CSF ou G).

Une culture *ex vivo* de douze jours, sans stroma médullaire et sans sérum, a favorisé l'expansion des cellules normales (*bcr-abl*⁻) aux dépens des leucémiques (*bcr-abl*⁺), aux stades hématopoïétiques tant matures qu'immatures.

Par ailleurs, le suivi de prolifération par marquage cellulaire au CFSE a indiqué que cette expansion préférentielle des cellules normales pourrait être due à une augmentation du taux de prolifération des cellules progénitrices normales ainsi qu'à une induction accrue d'apoptose parmi les cellules progénitrices leucémiques.

L'approche de culture *ex vivo* a également permis d'induire l'expansion de cellules progénitrices normales des voies mégakaryocytaires et érythroïdes au terme de deux jours d'expansion avec un cocktail de facteurs extraits de plaquettes matures. Ces données suggèrent que les plaquettes, quoique matures, peuvent produire des cytokines essentielles au développement de lignées cellulaires pouvant prévenir l'abolition de la thrombocytopénie et de l'anémie, les deux effets secondaires les plus importants lors de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

L'ensemble de nos résultats démontre que la manipulation *ex vivo* de cellules de néoplasies hématologiques est indispensable à l'optimisation de la transplantation autologue de cellules souches et progénitrices. La combinaison de purges efficaces des cellules malignes et un rétablissement de l'équilibre hématopoïétique normal, dans les conditions établies dans ce projet, permettront de débiter rapidement une étude clinique de Phase I.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xii
INTRODUCTION	2
CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
1.1 HÉMATOPOIÈSE.....	5
1.2 LES CYTOKINES ET LEURS RÉCEPTEURS	10
1.3 LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE	24
1.4 MANIPULATION ET TRAITEMENT <i>EX VIVO</i> DE CELLULES PROGÉNITRICES HÉMATOPOIÉTIQUES	36
CHAPITRE 2. PURGE DE CELLULES SOUCHES PÉRIPHÉRIQUES DE PATIENTS ATTEINTS DE LYMPHOME PAR UN AGENT PHOTOSENSIBILISATEUR: POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE EN TRANSPLANTATION AUTOLOGUE.....	40
2.1 LYMPHOMES ET TRAITEMENT PHOTODYNAMIQUE	40
2.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	45
2.2.1 <i>Cellules souches périphériques (CSP)</i>	45
2.2.2 <i>Lignées cellulaires lymphomateuses</i>	46
2.2.3 <i>Le dérivé benzoporphyrine-monoacide A (BPD-MA), un agent photosensibilisateur</i>	46
2.2.4 <i>Traitement des cellules</i>	46
2.2.5 <i>Essais de dilution limite</i>	47
2.2.6 <i>Essais clonogéniques de progéniteurs hématopoiétiques</i>	47
2.3 RÉSULTATS	48

2.3.1	<i>Effet dose-réponse du BPD-MA sur la déplétion de cellules lymphomateuses</i>	48
2.3.2	<i>Effet du BPD-MA sur les cellules progénitrices hématopoiétiques normales</i>	49
2.4	DISCUSSION	56
2.5	CONCLUSION	57

CHAPITRE 3. EXPANSION EX VIVO DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOIÉTIQUES NORMALES DE PATIENTS ATTEINTS DE LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE: ACCROISSEMENT DU POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE EN AUTOGREFFE..... 60

3.1	ALTERNATIVES DE TRAITEMENT DE LA LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE (LMC).....	60
3.2	MATÉRIEL ET MÉTHODES	62
3.2.1	<i>Échantillons cliniques</i>	62
3.2.2	<i>Cytokines recombinantes humaines</i>	64
3.2.3	<i>Conditions de culture cellulaire</i>	65
3.2.4	<i>Analyse de bcr-abl par Hybridation in situ en fluorescence (FISH)</i>	65
3.2.5	<i>Essais clonogéniques de progéniteurs à court terme («colony forming cells» ou CFC)</i>	66
3.2.6	<i>Couches stromales nourricières</i>	66
3.2.7	<i>Essais de «long term culture initiating cells» (LTC-IC): évaluation de l'expansion des LTC-IC par essai en dilution limite (LDA)</i>	66
3.2.8	<i>Réaction en chaîne de transcriptase reverse-polymérase (RT-PCR)</i>	67
3.2.9	<i>Analyse statistique</i>	68
3.3	RÉSULTATS.....	69

3.3.1	<i>Expansion de cellules CD34⁺ sélectionnées de patients atteints de LMC: rôle différentiel des facteurs de croissance</i>	69
3.3.2	<i>L'effet des cytokines sur les progéniteurs CFU-GM et BFU-E</i>	73
3.3.3	<i>Expansion de progéniteurs normaux et leucémiques myéloïdes et érythroïdes</i>	75
3.3.4	<i>Prolifération des LTC-IC normaux et leucémiques</i>	78
3.3.5	<i>Impact de la mobilisation in vivo sur l'expansion in vitro</i>	80
3.4	DISCUSSION.....	83

CHAPITRE 4. PROFIL DE DIVISION DES PROGÉNITEURS HÉMATOPOIÉTIQUES, UNE EXPLICATION À LA PROLIFÉRATION PRÉFÉRENTIELLE DES CELLULES NORMALES PAR RAPPORT AUX LEUCÉMIQUES EN EXPANSION EX VIVO		90
4.1	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	91
4.1.1	<i>Patients et échantillons cliniques</i>	91
4.1.2	<i>Cytokines recombinantes humaines</i>	92
4.1.3	<i>Marquage au CFSE</i>	93
4.1.4	<i>Conditions de culture cellulaire</i>	93
4.1.5	<i>Anticorps</i>	94
4.1.6	<i>Évaluation in vitro d'apoptose</i>	94
4.1.7	<i>Analyse par cytométrie en flux</i>	94
4.1.8	<i>Analyse par hybridation in situ en fluorescence (FISH)</i>	95
4.1.9	<i>Essais clonogéniques de progéniteurs</i>	95
4.1.10	<i>Réaction en chaîne de transcriptase réverse-polymérase (RT-PCR)</i>	96
4.1.11	<i>Analyse des résultats</i>	97
4.2	RÉSULTATS.....	97

4.2.1	<i>Expansion ex vivo des cellules normales et leucémiques</i>	97
4.2.2	<i>Mort cellulaire programmée ou apoptose</i>	106
4.2.3	<i>Profil de division des cellules normales et leucémiques</i>	112
4.2.4	<i>Enrichissement du potentiel clonogénique avec la culture cellulaire</i>	119
4.3	DISCUSSION	122
4.4	CONCLUSION	128
CHAPITRE 5. EFFET DE SYNERGIE DE CYTOKINES DÉRIVÉES DE PLAQUETTES MATURES SUR LES CELLULES HÉMATOPOIÉTIQUES NORMALES		
130		
5.1	MATÉRIEL ET MÉTHODES	131
5.1.1	<i>Échantillons cliniques</i>	131
5.1.2	<i>Facteurs de croissance</i>	131
5.1.3	<i>Cultures en suspension liquide</i>	131
5.1.4	<i>Quantification des progéniteurs clonogéniques par essais clonogéniques de progéniteurs</i>	132
5.2	RÉSULTATS ET DISCUSSION	133
5.2.1	<i>Effet dose-réponse de l'extrait de facteurs dérivé de plaquettes (PDFM) sur la «fold expansion» des cellules totales</i>	133
5.2.2	<i>Expansion ex vivo des progéniteurs mégakaryocytaires en réponse à l'extrait de facteurs dérivés de plaquettes (PDFM)</i>	134
5.2.3	<i>Expansion ex vivo des progéniteurs myéloïdes en réponse à l'extrait de facteurs dérivés de plaquettes (PDFM)</i>	134
CONCLUSION GÉNÉRALE		140
REFERENCES.....		144
ANNEXES		189

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I.	Caractéristiques des patients et de la maladie.....	64
TABLEAU II.	Impact de la mobilisation des cellules souches et de la phase de la maladie sur l'expansion des fractions de cellules normales et leucémiques.....	82
TABLEAU III.	Hypothèses de réponse des cellules leucémiques à l'expansion <i>ex vivo</i> dans des conditions sans sérum et sans stroma médullaire.....	90
TABLEAU IV.	Données cliniques des échantillons de leucémie myéloïde chronique utilisés.....	92
TABLEAU V.	«Fold Expansion» (FE) du potentiel clonogénique des CFCs d'échantillons N et L au terme de six jours de culture en présence de P seul, P+FL ou P+FL+G.....	119
TABLEAU VI.	«Fold Expansion» (FE) du nombre absolu de CFCs d'échantillons N et L au terme de six jours de culture en présence de P seul, P+FL ou P+FL+G.....	120

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma d'hématopoïèse	6
Figure 2. Famille des récepteurs de cytokines.....	12
Figure 3. Activation de la voie Jak/Stat par les récepteurs de cytokines et son contrôle par les membres de la famille CIS et les phosphatases de tyrosine.....	16
Figure 4. Modèle d'activation du récepteur de GM-CSF, IL-3 ou IL-5.....	19
Figure 5. Modèle des voies de signalisation stimulées par la liaison de GM-CSF, IL-3 ou IL-5.....	20
Figure 6. Sites de bris des gènes <i>ABL</i> et <i>BCR</i> , et structure des ARNm chimères dérivés de ces bris.....	25
Figure 7. Voies de signalisation activées dans les cellules <i>bcr-abl</i> positives.....	26
Figure 8. Structure du dérivé benzoporphyrine-monoacide A (BPD-MA).....	43
Figure 9. Effet du BPD-MA sur la déplétion de cellules DHL-16 dans des essais de dilution limite.....	51
Figure 10. Effet du BPD-MA sur la déplétion de cellules Daudi dans des essais de dilution limite.....	52
Figure 11. Effet du BPD-MA sur la déplétion de cellules Namalwa dans des essais de dilution limite.....	53
Figure 12. Évaluation de la toxicité du BPD-MA sur les progéniteurs hématopoïétiques normaux de patients atteints de LNH.....	54
Figure 13. Évaluation de la toxicité du BPD-MA sur les progéniteurs hématopoïétiques normaux de patients atteints de LNH.....	55
Figure 14. Expansion <i>ex vivo</i> de cellules CD34 ⁺ de patients atteints de LMC dans un système de culture sans stroma et sans sérum.....	70
Figure 15. Expansion des cellules normales (Ph ⁻) par rapport aux leucémiques (Ph ⁺) au terme de la période de culture des cellules CD34 ⁺ sélectionnées de patients atteints de LMC, en conditions sans sérum.....	72
Figure 16. Effet des cytokines sur les cellules progénitrices myéloïdes et érythroïdes de cellules CD34 ⁺ sélectionnées.....	74
Figure 17. Proportions des CFC <i>bcr-abl</i> ⁻ avant et après 12 jours de culture en présence de P, P+FL et P+FL+G.....	77

Figure 18. Impact de la culture sur les 3 combinaisons comprenant P sur la croissance des LTC-ICs.	79
Figure 19. Expansion des LTC-ICs normales et leucémiques au cours de 12 jours de culture.	81
Figure 20. Expansion <i>ex vivo</i> des cellules d'échantillons normaux (N), et d'échantillons leucémiques (cellules Ph ⁻ ou LN, et Ph ⁺ ou LL).	99
Figure 21. Cinétique de prolifération des cellules CD34/CD38 au cours de six jours de culture dans un milieu sans sérum et sans stroma.	101
Figure 22. Expansion <i>ex vivo</i> des cellules normales et leucémiques des compartiments de progéniteurs totaux (CD34 ⁺), matures (CD34 ⁺ CD38 ⁺) et immatures (CD34 ⁺ CD38 ⁻).	102
Figure 23. Comparaison entre les phénotypes CD34 ⁺ CD38 ⁻ et CD90 ⁺ CD38 ⁻ des cellules leucémiques produites en six jours de culture <i>ex vivo</i>	104
Figure 24. Induction d'apoptose des cellules totales d'échantillons normaux et leucémiques suite à la culture <i>ex vivo</i>	108
Figure 25. Induction d'apoptose des cellules progénitrices CD34 ⁺ d'échantillons normaux et leucémiques suite à la culture <i>ex vivo</i>	109
Figure 26. Induction d'apoptose des cellules progénitrices matures CD34 ⁺ CD38 ⁺ et immatures CD34 ⁺ CD38 ⁻ d'échantillons normaux et leucémiques suite aux six jours de culture <i>ex vivo</i>	111
Figure 27. Profil de marquage en CFSE des cellules progénitrices matures (CD34 ⁺ CD38 ⁺) et immatures (CD34 ⁺ CD38 ⁻).	114
Figure 28. Profils de division des cellules progénitrices viables CD34 ⁺ , matures (CD34 ⁺ CD38 ⁺) et immatures (CD34 ⁺ CD38 ⁻)	117
Figure 29. Profil de division des cellules normales et leucémiques en voie de mort cellulaire au terme de six jours de culture <i>ex vivo</i>	118
Figure 30. Potentiel clonogénique des cellules progénitrices CD34 ⁺ CD38 ⁻ triées à la fin de la période de culture selon leur position dans le profil de CFSE.	121
Figure 31. Courbes dose-réponse de la «fold expansion» des cellules totales suite à l'incubation avec le mix de facteurs dérivés de plaquettes (PDFM).	136
Figure 32. Effet dose-réponse du PDFM sur l'expansion des colonies CFU-Mk, Non Mk et Mk mixtes suite à 2 jours de culture <i>ex vivo</i>	137
Figure 33. Effet dose-réponse du PDFM sur l'expansion des colonies CFU-GM, BFU-E et CFU-GEMM suite à 2 jours de culture <i>ex vivo</i>	138

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

- a.a.: acides aminés
abl: Abelson
ATP: adenosine triphosphate
bcr: breakpoint cluster region
BFU-E: blast forming unit erythroid
BPD-MA: dérivé de benzoporphyrine monoacide bague A
CAFC: cobblestone area forming cell
Cellules LL: cellules leucémiques d'échantillons de LMC
Cellules LN: cellules normales d'échantillons de LMC
CFC: colony forming cell
CFSE: [5-(et -6)- carboxyfluoresceine diacétate succinimidyl ester]
CFU-GEMM: colony forming unit-granulocyte erythroid monocyte megakaryocyte
CFU-GM: colony forming unit-granulocyte monocyte
CFU-Mk: colony forming unit-megakaryocyte
CFU-S: colony forming unit spleen
CIS: cytokine induced SH2 protéines
CSH: cellules souches hématopoïétiques
CSPM: cellules mononucléées de sang périphérique
D-FISH: hybridation *in situ* en double fluorescence
DFS: disease-free survival
Epo: érythropoïétine
FITC: fluorescein isothiocyanate
FL: Flt3 ligand
G: G-CSF ou granulocyte colony stimulating factor
GDP: guanosine diphosphate
GM-CSF: granulocyte monocyte colony stimulating factor
GTP: guanosine triphosphate
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution Ca^{2+} Mg^{2+} free
Ig: immunoglobuline
IL: interleukine

JAK: *Janus* activated kinase
kDa: kilo Dalton
LMC: leucémie myéloïde chronique
LNH: lymphome non-Hodgkinien
LTC-CFC: long term culture-colony forming cell
LTC-IC: long term culture initiating cell
mAc: anticorps monoclonal
MAPK: mitogen activated protein kinase
MEK: mitogen activated/extracellular signal regulated kinase
min: minutes
MO: moëlle osseuse
P: Pixykine321
PDFM: platelet derived factor mix
PDGF: platelet derived growth factor
PE: phycoérythrine
PECy5: phycoérythrine-cytochrome 5
Ph: chromosome de Philadelphie
RT-PCR: réaction de transcription inverse suivie d'une réaction de polymérase en chaîne
SCF: stem cell factor
SCID: severe combined immunodeficient
sec: secondes
SH: Src homology domain
SOS: Son of Sevenless
SP: sang périphérique
SPM: sang périphérique mobilisé
STAT: signal transducers and activators of transcription
SVF: sérum de veau fœtal
t°p: température de la pièce
t(14;18): translocation entre les chromosomes 14 et 18
Tpo: thrombopoïétine

*À mes piliers de vie,
mes parents, Marielle et Dieujuste
et mon frère, Patrick*

REMERCIEMENTS

Je désire exprimer toute ma gratitude à mon directeur, le Dr. Denis-Claude Roy qui, par son savoir scientifique, ses qualités pédagogiques exceptionnelles et ses nombreux encouragements, m'a permis de parvenir à la fin de ce projet.

Je veux également remercier le Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) et la compagnie Thératechnologies Inc., pour leurs subventions octroyées en vue de l'accomplissement de ce projet.

Mes sincères remerciements vont aussi à Mme C. Le Houillier, pour son excellent support tant moral que technique. Mes remerciements et mon bon souvenir à chaque membre du laboratoire d'Ingénierie de greffons de cellules souches hématopoïétiques (ou «Purging»).

J'adresse également de chaleureux remerciements à tous les collègues du laboratoire de recherche expérimentale du Dr. Denis-Claude Roy qui m'ont beaucoup supportée et avec lesquels j'ai eu la chance de partager des intérêts scientifiques et des liens amicaux.

Je désire que tous les membres des laboratoires suivants retrouvent ici l'expression de ma reconnaissance pour leur support technique et leur collaboration inconditionnelle: Immunofluorescence du Centre de Recherche Guy Bernier, Cytogénétique, Immunologie, Hématologie.

Je remercie aussi tous les autres membres du Centre de Recherche Guy Bernier de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont pour leurs nombreux conseils et leur intérêt à mon égard.

INTRODUCTION

Introduction

L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) constitue une option thérapeutique prometteuse pour plusieurs patients atteints de néoplasies hématologiques. Toutefois, cette approche thérapeutique a ses limites à cause d'une possibilité de contamination du greffon par des cellules malignes. Par ailleurs, la purge *ex vivo* conçue pour l'élimination de ces dernières élimine également une majorité de progéniteurs hématopoïétiques normaux compromettant ainsi la prise du greffon. Il fallait donc élaborer une stratégie qui vise, à la fois, l'élimination des cellules malignes résiduelles et l'expansion des cellules souches et progénitrices normales, responsables de la reconstitution hématopoïétique à moyen et à long terme.

Nous avons donc entrepris d'optimiser les techniques de purge *ex vivo* dans le contexte de néoplasies hématologiques, par la thérapie photodynamique et l'expansion *ex vivo* de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques.

Notre thèse se divise en 5 chapitres. Nous présenterons, tout d'abord, le contexte expérimental et clinique de la manipulation *ex vivo* de cellules hématopoïétiques, contexte dans lequel s'est inscrite notre recherche. Cette description permettra de familiariser le lecteur à la problématique de l'autogreffe.

Le deuxième chapitre visera à démontrer le potentiel thérapeutique de l'agent photosensibilisateur BPD-MA dans le traitement des cellules souches périphériques de patients atteints de lymphome.

La nécessité d'augmenter les faibles nombres de cellules souches normales résiduelles et d'optimiser l'étape de purge émergera, ce qui nécessitera le développement de conditions d'expansion *ex vivo*. Cette optimisation du potentiel thérapeutique en autogreffe fera l'objet du troisième chapitre.

Au quatrième chapitre, nous présenterons les mécanismes qui peuvent expliquer la réaction des cellules à la culture *ex vivo*.

Nous consacrerons le chapitre cinquième à l'exploitation de l'expansion *ex vivo* pour pallier les risques d'infection parfois présents en autogreffe.

Nous finirons par une conclusion générale.

CHAPITRE 1

Le Projet

Chapitre 1. Revue de littérature

Ce premier chapitre est divisé en quatre sections. Nous débuterons par la description du processus hématopoiétique, pour poursuivre avec l'analyse des cytokines et leurs récepteurs. Nous aborderons ensuite les principales caractéristiques de la leucémie myéloïde chronique, pour enfin terminer par une description de la manipulation *ex vivo* des cellules souches hématopoiétiques.

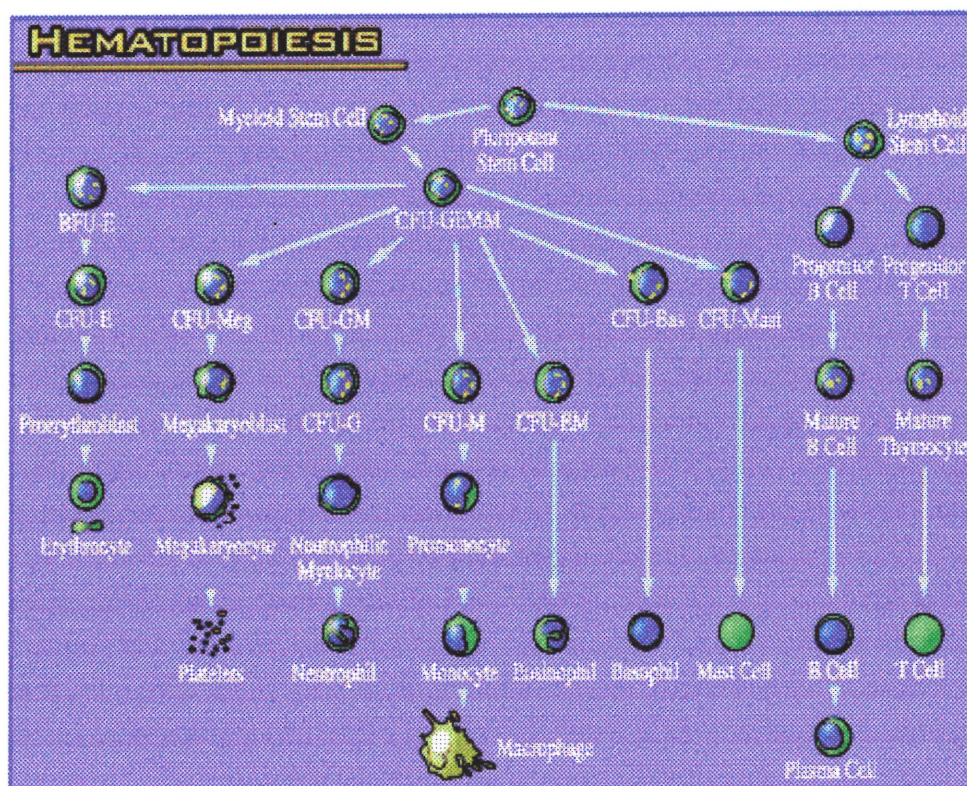
1.1 Hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus hiérarchique très rigoureusement contrôlé. Il implique séquentiellement l'auto-renouvellement des cellules souches, l'expansion des populations de progéniteurs engagés vers une voie de différenciation et la maturation en éléments hématopoiétiques matures.^{1,2}(Figure 1) On note que les cellules souches pluripotentielles et leurs cellules-filles prolifèrent et se différencient en cellules matures de 10 types cellulaires différents, dans le sang périphérique. Les cellules souches hématopoiétiques (CSH) parviennent à s'auto-renouveler et à produire des cellules de deux lignées principales, lymphoïde et myéloïde. De plus, elles ont un potentiel hiérarchique de différenciation en plusieurs lignées grâce à leur capacité clonale.

Le maintien du phénotype de cellule souche ou son auto-renouvellement constitue le début de la hiérarchie hématopoiétique. Cette étape est suivie de la différenciation et prolifération des cellules plus matures. A cet effet, deux hypothèses complètement opposées ont été émises. L'hypothèse stochastique, proposée dès 1964 par Till, McCulloch et collègues, suggère que la décision d'auto-renouvellement ou de différenciation de la cellule souche est un processus stochastique, uniquement régi par les lois du hasard.¹ Leur modèle est basé sur l'utilisation de colonies blastiques murines (CFU-S) à fort potentiel clonogénique.³ Les cellules-filles dérivées de chacune de ces cellules-mères blastiques sont engagées vers différentes lignées.⁴ Selon la fréquence de colonies secondaires produites, les auteurs ont suggéré

Figure 1. Schéma d'hématopoïèse

Tiré de Human Hematopoietic Stem Cell Biology, Searle



que le processus d'engagement vers la différenciation ne serait pas contrôlé pour des cellules individuelles mais pour la population totale.³ Par ailleurs, une hypothèse inductive du processus hématopoïétique a également été émise.^{5,6} Dans ce cas, les facteurs de croissance exerceraient un rôle direct sur la différenciation cellulaire; le sort cellulaire serait donc déterminé par le type de facteur de croissance agissant sur la cellule.

L'élément qui émerge de plusieurs études est qu'une multitude de signaux positifs et négatifs régissent le maintien du système hématopoïétique, grâce au recrutement périodique de cellules souches hématopoïétiques, initialement quiescentes et induites à la prolifération et la différenciation en cellules matures transitoires.

La hiérarchie hématopoïétique est un concept basé, entre autres, sur plusieurs modèles de transplantation dans le système murin où les CSHs sont en mesure d'établir la reconstitution hématopoïétique à court et à long terme une fois injectées dans un microenvironnement physiologique semblable au leur. La compréhension complète du contrôle de l'hématopoïèse ne peut vraiment s'effectuer que dans des modèles se rapprochant le plus des situations physiologiques, les modèles *in vivo*. C'est ainsi que plusieurs modèles murins ont été développés afin de recréer l'hématopoïèse à long terme à partir de cellules souches humaines. Plus particulièrement, ces systèmes impliquent l'injection de cellules hématopoïétiques humaines à des souris irradiées à des niveaux sub-léthaux,⁷ parfois suivie de traitement aux facteurs de croissance⁸ avec ou sans co-transplantation de cellules accessoires CD34⁻.⁹ La prise de greffon de cellules humaines a également été testée à l'aide de souris SCID (severe combined immunodeficient) transgéniques exprimant les gènes humains d'IL-3, GM-CSF et SCF, des cytokines agissant sur les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques.¹⁰ D'un autre côté, le microenvironnement humain a été recréé chez la souris grâce à l'implantation de foie fœtal humain, de thymus,¹¹ avec ou sans implantation de fragments osseux humains.¹²

L'identification et l'évaluation des CSHs primitives et des cellules progénitrices ont été facilitées par l'évolution de la cytométrie en flux et le développement d'anticorps monoclonaux. Plus particulièrement, l'expression de l'antigène CD34 à la surface des cellules progénitrices hématopoïétiques est un précieux outil dans la caractérisation de ces cellules. Le CD34 est une protéine transmembranaire de type I, de 115 kD, hautement glycosylée et membre de la famille des sialomucines. Il est exprimé à la surface de 1 à 3% des cellules de la MO, en forte densité à la surface des CSHs primitives (LTC-IC) et diminuant en expression jusqu'au stade des cellules progénitrices plus matures et engagées à des lignées spécifiques¹³.

En plus du CD34, le CD90 (Thy-1) est un marqueur de CSHs puisque des anticorps monoclonaux spécifiques à chaque marqueur permettent d'enrichir des échantillons murins, de primates et d'humains en CSHs. Les cellules CD34⁺Thy-1⁺ provenant de MO et de sang périphérique humains expriment fortement le CD59;¹⁴ elles expriment faiblement ou sont négatives pour CD38, CD71, CD45RA, HLA-DR, CD135 (Flt3) et CD117 (c-kit) ainsi que pour les marqueurs de lignées tels que CD2, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20 et glycophorine A.¹⁵ En plus de ces molécules «traditionnelles», les cellules CD34⁺ sont également caractérisées par des antigènes de surface découverts tout récemment. La molécule HCA (hematopoietic cell antigen) est exprimée à la surface de 40 à 70% de cellules CD34⁺Thy-1⁺CD38^{lo/-}Rhod 123^{lo} de MO et de SP mobilisé.¹⁶ HCA, membre de la superfamille des immunoglobulines pouvant induire l'adhésion homophile, est aussi exprimé à la surface des progéniteurs myéloïdes, mais disparaît de la surface des cellules progénitrices CD34⁺CD19⁺ engagées vers la lignée lymphoïde.

La liste de marqueurs de surface cellulaire de CSHs s'allonge avec la découverte de l'anticorps monoclonal AC133.¹⁷ AC133, découvert par des expériences d'immunisation et de criblage, reconnaît une molécule transmembranaire à cinq passages dont l'expression est restreinte aux populations cellulaires CD34^{bright}CD38⁻ de MO et de SP. De plus, AC133 présente l'avantage de ne réagir

qu'avec deux types de populations cellulaires; une population hématopoïétique immature et une population progénitrice engagée à la lignée granulomonocytaire. Étonnement, bien que les progéniteurs $CD34^{bright}AC133^{+}$ aient un potentiel de repopulation hématopoïétique *in vivo*, la majorité de la population de CFU-GEMM (population de progéniteurs immatures) est présente dans la fraction $CD34^{dim}AC133^{-}$. De plus, les cellules $CD34^{dim}$ seules sont en mesure de reconstituer des souris irradiées suggérant alors que la «vraie» cellule souche pourrait être $CD34^{-}$ ou $CD34^{dim}$. Il n'en demeure pas moins que $CD34$ et $AC133$ restent des marqueurs efficaces d'identification de cellules capables de soutenir la reconstitution hématopoïétique à long terme.

La transplantation de cellules de sang de cordon non fractionnées, de cellules $CD34^{+}$ purifiées, et de cellules immatures $CD34^{+}CD38^{-}$ dans les souris SCID à macrophages déplétés, a conduit à la production des lymphocytes B, monocytes, granulocytes, cellules érythroïdes, cellules NK, plaquettes, cellules $CD34^{+}$ ainsi que $CD34^{+}CD38^{-}$.¹⁸ Ainsi, les cellules immatures $CD34^{+}CD38^{-}$ de sang de cordon peuvent survivre et proliférer lorsque transplantées dans des souris immunodéficientes. Par contre, les souris injectées avec des greffons $CD34^{+}CD38^{-}$ produisent 10 fois moins de cellules $CD34^{+}$ en absence du sous-type $CD34^{+}CD38^{-}$ que les souris transplantées avec un nombre équivalent de cellules non fractionnées ou purifiées en $CD34$.¹⁸ Ceci suggère alors que le niveau d'expansion de la sous-famille $CD34^{+}CD38^{-}$ dans la MO de la souris chimère dépend de cellules accessoires présentes dans la fraction $CD34^{+}CD38^{+}$. Les cellules accessoires incluses dans la famille des cellules $CD34^{+}$ produisent certains facteurs nécessaires au maintien et à l'expansion de populations cellulaires immatures *in vivo*. En effet, les cellules $CD34^{+}$ et leurs progéniteurs immédiats du sang de cordon produisent les facteurs de croissance IL-3, G-CSF, GM-CSF qui stimulent la formation de colonies *in vitro* de façon autocrine ou paracrine.¹⁹ De plus, le cocktail composé d'Epo, SCF, IL-3 et GM-CSF, injecté à des souris NOD/SCID, permet également de supporter l'expansion

et le maintien de cellules humaines transplantées à ces souris 10 semaines et plus après la transplantation.⁸

Malgré ces caractérisations physiques et fonctionnelles des cellules souches hématopoïétiques, leurs mécanismes moléculaires sont encore peu connus. D'ailleurs, une étude récente a été menée afin de déterminer le profil génétique des cellules souches hématopoïétiques et ainsi, mieux comprendre les mécanismes de contrôle qui les régissent.²⁰ La soustraction d'ADNc de cellules souches, provenant de foie fœtal murin, révèle l'expression d'une pléthore de molécules très certainement impliquées dans le contrôle de croissance et de différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Notons l'expression de facteurs de transcription de molécules de surface (Flt3 et CD34 notamment) de molécules sécrétées ainsi que de molécules de signalisation. Les molécules auxquelles répondent les CSH sont nombreuses; les cytokines en constituent la majeure partie.

1.2 Les cytokines et leurs récepteurs

Le destin des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dépend de leur interaction avec des cellules accessoires présentes dans le microenvironnement médullaire, de la présence ou la concentration de cytokines spécifiques, de l'expression de récepteurs de surface, et de l'intégrité de leurs voies de signalisation intracellulaire. Les cytokines constituent ainsi une pierre angulaire dans le contrôle de prolifération et de survie cellulaires au cours du processus hématopoïétique.²¹ De plus, les progéniteurs hématopoïétiques et les cytokines peuvent se lier de façon spécifique à des ligands présents à la surface de cellules et à la matrice extracellulaire de la MO permettant ainsi la colocalisation des progéniteurs avec un ensemble de cytokines spécifiques.^{22,23}

Le contrôle du processus hématopoïétique s'effectue par des facteurs impliqués dans l'activation des progéniteurs en dormance (SCF, FL),^{24,25} la prolifération de progéniteurs précoces (IL-3, GM-CSF, Tpo),²⁶⁻²⁹ non spécifiques à une lignée particulière et agissant aux étapes intermédiaires de l'hématopoïèse (IL-6, IL-11, IL-12)³⁰ ou spécifiques à une lignée et agissant tardivement dans

l'hématopoïèse (IL-5).³¹ Il faut également considérer que plusieurs de ces facteurs n'agissent pas nécessairement à une seule étape de l'hématopoïèse. C'est notamment le cas du G-CSF qui agit tant sur les cellules matures que sur les progéniteurs précoces.^{1,21}

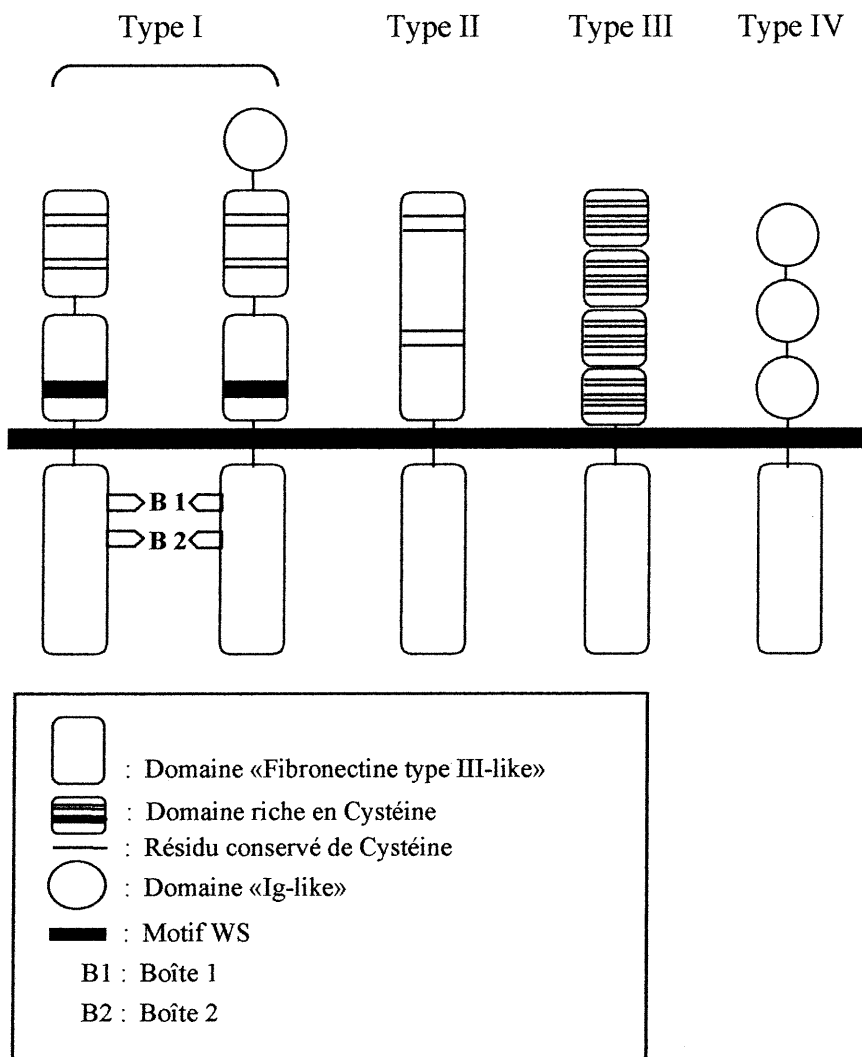
Les cytokines représentent un ensemble de médiateurs majoritairement solubles qui assurent la communication intercellulaire leur permettant d'agir sur la prolifération, la différenciation et les activités fonctionnelles de l'immunité, l'hématopoïèse et l'inflammation. Les cytokines sont des protéines, le plus souvent glycosylées, qui exercent des effets pléiotropiques en se liant à des récepteurs spécifiques solubles ou situés à la surface de cellules. Les cytokines comprennent les interleukines, les lymphokines, les interférons, les facteurs stimulant les colonies (CSF), les facteurs de nécrose de tumeurs (TNF α et β), les facteurs transformants de croissance (TGF α et β), les facteurs de croissance de divers types cellulaires et les chimiokines. Ces cytokines se lient à leurs récepteurs spécifiques.

Les cytokines sont également composées de facteurs de croissance hématopoïétique. Ces facteurs comprennent c-kit ligand (ou Stem Cell Factor ou Steel Factor), macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) et flk2/flt3 ligand et se lient à leurs récepteurs correspondants soit c-kit, c-fms, Flt3 faisant partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase de type III (Figure 2). Par leur structure, ces récepteurs font partie de la superfamille des immunoglobulines. Ils sont constitués d'un domaine extracellulaire avec cinq motifs Ig, un court domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique avec activité tyrosine kinase. Le domaine kinase cytoplasmique est interrompu dans sa séquence par une région de liaison d'ATP et une de phosphotransférase.

Figure 2. Famille des récepteurs de cytokines.

Chaque type de récepteur est décrit dans le texte.

Adapté de Science, vol. 268, p. 252. 1995.



La plupart des récepteurs de cytokines sont des glycoprotéines membranaires de type I, contenant un seul domaine transmembranaire dont l'extrémité NH₂ terminale est située à l'extérieur de la membrane plasmique. De plus, ces récepteurs se présentent comme des complexes oligomériques de 2 à 4 chaînes semblables ou non; ils peuvent être divisés en 4 sous-types selon les motifs structuraux caractéristiques de leur domaine extracellulaire de liaison au ligand.

La superfamille des récepteurs de cytokines comprend, entre autres, les récepteurs d'IL-2 à IL-7,³²⁻³⁵ IL-9,³⁶ IL-11,³⁷ IL-12,³⁸ GM-CSF, G-CSF,³⁹ Erythropoïétine (Epo),⁴⁰ Thrombopoïétine (Tpo).⁴¹ Les membres de cette superfamille possèdent une région extracellulaire caractéristique, la «cytokine receptor homologous region» ou CRH de 4 cystéines conservées et un motif WSXWS (W: tryptophane, S: sérine, X: acide aminé non conservé).

Les récepteurs de cytokines de type I sont caractérisés par plusieurs domaines similaires au domaine de fibronectine type III qui contiennent des portions conservées de cystéine ainsi qu'une séquence conservée WSXWS. Il peut également y avoir un domaine semblable à celui des immunoglobulines à l'extrémité NH₂. Du côté intracellulaire, deux motifs conservés dans la région proximale à la membrane sont retrouvés dans ces récepteurs de type I.⁴² Parmi ces récepteurs, notons, IL-2R β et γ c, IL-3R α et β c, IL-4R α , IL-5R α , GM-CSFR α , IL-7R α , IL-9R α , EpoR, IL-6R α et β (gp130), IL-12R β et G-CSFR.

Les récepteurs de cytokines de type II sont caractérisés par un domaine similaire à celui de la fibronectine type III contenant des cystéines conservées. Ce type de récepteurs comprend les récepteurs d'IFN et l'IL-10R.

Les récepteurs de cytokines de type III sont des protéines transmembranaires comprenant 2 sous-unités identiques. Leur domaine extracellulaire est caractérisé par 3 à 6 domaines riches en cystéine avec des domaines cytoplasmiques intracellulaires plus variables que les extracellulaires. Cette famille de récepteurs comprend les TNFR de types I et II, NGFR (CD30), Fas (Apo-1) (CD95) et CD40.

Les récepteurs de cytokines de type IV contiennent 3 domaines semblables à ceux des immunoglobulines; ces domaines sont homologues aux régions constantes d'Ig et du TCR quant aux longueurs des séquences; mais possèdent des patrons de séquence ressemblant au domaine variable en branches β E et F. L'IL-1R de type I et II fait partie de ce type de récepteur.

Bien que la majorité des récepteurs de cytokines soient présents sous forme membranaire, certains d'entre eux sont également sécrétés sous forme soluble. Ces formes de récepteurs sont produites par clivage protéolytique d'un récepteur membranaire exprimé ou par épissage alternatif d'un ARNm codant directement pour le récepteur soluble. On constate que la forme soluble du récepteur du SCF, c-kit, est produite par les deux mécanismes, ci-haut mentionnés.^{43,44} Les récepteurs solubles de cytokines modifient l'ampleur des signaux transmis par leurs formes membranaires correspondantes.

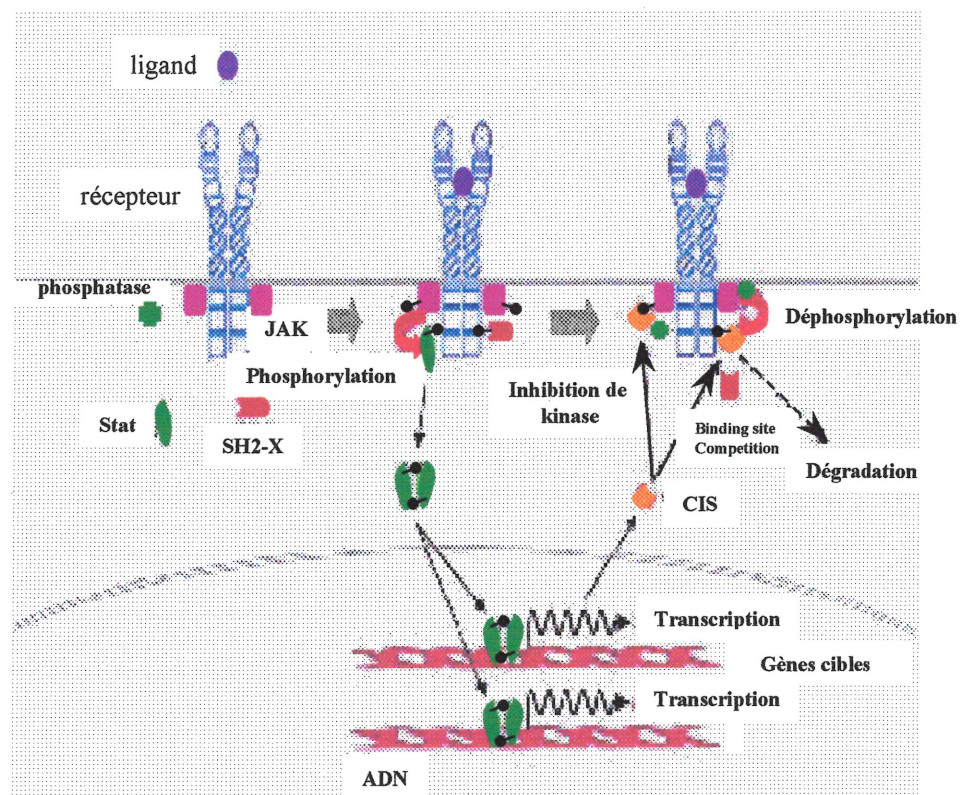
La liaison des cytokines à leur récepteur spécifique induit l'agrégation ou oligomérisation du récepteur, son activation et la transmission de signaux intracellulaires. La dimérisation ou l'oligomérisation des récepteurs de cytokines induite par la liaison de la cytokine est une étape commune aux membres de la superfamille des récepteurs de cytokines.⁴⁵(Figure 3)

L'étape de dimérisation ou d'oligomérisation, commune à tous les récepteurs de cytokines, est suivie par des mécanismes de transmission de signaux plus spécifiques à différentes catégories de récepteurs.⁴⁶ Les PTKs de la famille Src étaient les premiers médiateurs de transmission de signaux précoces par phosphorylation de tyrosine à partir de récepteurs de cytokines. Les tyrosine kinases Fes, Lck, Hck, Lyn, Fyn et Syk sont toutes activées ou phosphorylées en réponse à des cytokines.⁴⁷ Dans le système IL-2R, il a été démontré que plusieurs des réponses d'IL-2, telle que la fonction mitogénique, ne nécessitent pas les membres de la famille Src.⁴⁸ C'est ainsi que les motifs conservés des boîtes 1 et 2 ont été proposés comme intermédiaires dans la transmission de signaux, à partir de récepteurs de cytokines.

La découverte de l'implication de ces boîtes intermédiaires dans la transmission de signaux a précédé une multitude d'études démontrant que les membres activés de la superfamille des récepteurs induisent la phosphorylation et l'activation d'un ou de plusieurs membres de la famille *Janus* kinase (JAK).⁴⁹(Figure 3) La famille JAK est composée de 4 membres soit JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2.⁵⁰ La plupart des études ont été effectuées par l'analyse des signaux transmis par les récepteurs d'IFN α , β et γ en particulier. Selon des expériences de complémentation génétique dans des lignées mutantes pour l'IFN, la transmission de signaux anormale peut être rétablie par la transfection d'ADN génomique codant pour des membres spécifiques de la famille JAK.⁵¹

Figure 3. Activation de la voie Jak/Stat par les récepteurs de cytokines et son contrôle par les membres de la famille CIS et les phosphatases de tyrosine.

Tiré de Blood, vol. 95, no.1, p.21. 2000.



L'association des JAKs aux récepteurs peut adopter différents types de patrons selon la structure du récepteur. En effet, la transmission de signaux intracellulaires dépend de 3 caractéristiques essentielles des récepteurs. Tout d'abord, l'extrémité C terminale des récepteurs ne possède aucun motif indiquant une activité catalytique de protéine tyrosine kinase (PTK), le pilier de plusieurs récepteurs de facteurs de croissance.⁵² Deux motifs conservés et proximaux à la membrane sont plutôt présents chez certains récepteurs (boîte 1 et boîte 2).⁵³ Ensuite, plusieurs récepteurs de cytokines possèdent plus que 2 sous-unités. Finalement, différents complexes de récepteurs de cytokines peuvent partager une même sous-unité. Par exemple, IL-2R est constitué de 3 sous-unités, α , β et γ ⁵⁴ où IL-2R β est également une sous-unité d'IL-15R et IL-2R γ est une des sous-unités d'IL-4R, IL-7R et IL-9R.⁵⁵

Ces paramètres prouvent donc que la transmission de signal par la majorité des récepteurs de cytokines dépend vraiment des associations physiques et fonctionnelles entre les domaines cytoplasmiques des récepteurs et des membres spécifiques des membres de la famille JAK. De manière particulière, les boîtes 1 et 2 des récepteurs semblent être des sites essentiels à la liaison et l'activation des JAKs.⁵⁶

Chaque récepteur s'associe spécifiquement à un ou plusieurs membres de la famille JAK selon la structure du récepteur. Les récepteurs de cytokines à une branche tels que EPOR, TPOR, GHR et PRLR, se lient surtout à Jak2 et parfois à Jak1, par leur domaine conservé proximal à la membrane.^{57,58} La dimérisation des récepteurs induit l'agrégation de Jak2, permettant la transphosphorylation d'un site spécifique de la kinase. Jak2 ainsi activé peut s'autophosphoryler, phosphoryler le récepteur et induire le recrutement de substrats cellulaires au site du complexe de récepteur. Ceci a été prouvé par des études où l'agrégation constante du récepteur conduit à une activation constitutive de Jak2.⁵⁹

Le deuxième patron d'association des JAKs est caractéristique de la famille des récepteurs d'IL-3. La famille des IL-3R comprend les récepteurs d'IL-3, IL-5 et GM-CSF caractérisés par deux sous-unités, α et β où la première est spécifique à chaque ligand et la seconde est commune aux trois récepteurs (β c).⁶⁰ Le récepteur du

GM-CSF est présent à la surface de la majorité des progéniteurs myéloïdes et des cellules plus matures telles que les monocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les cellules dendritiques. Des études de mutation et de structure ont suggéré que le complexe actif de récepteur serait formé, suite à la dimérisation de deux complexes de haute affinité, dans un rapport 1:1:1 de GM-CSF:GMR α : β_c , afin de constituer un récepteur activé formé d'un complexe 2:2:2.^{61,62}(Figure 4) L'IL-3R est observé à la surface des cellules progénitrices hématopoiétiques précoces et de certains progéniteurs myéloïdes engagés. Il s'ensuit que GM-CSF et IL-3 peuvent stimuler la prolifération des cellules myélomonocytaires immatures et induire la différenciation des populations de granulocytes et de macrophages. Dans cette famille de récepteurs, l'activation de Jak1 est essentielle à la transmission de signaux et dépend de la présence de Jak2 ou Tyk2.⁶³(Figure 5) Quant à G-CSFR, des études de transfection dans divers modèles cellulaires indiquent qu'une fois activé, ce récepteur se lie aux kinases spécifiques Jak1, Jak2 et Tyk2.⁶⁴

Ces études indiquent alors que, dans tous les cas, la fonction première du ligand est d'induire l'agrégation de son récepteur accompagnée de l'agrégation homo- ou hétérotypique des JAKs. Il semble également que Jak2 soit en mesure d'agir seul tandis que les autres membres aient besoin d'être associés les uns aux autres pour une transactivation optimale.⁶⁵ En effet, des études de délétions ou mutations affectant la famille JAK directement ou indirectement conduisent à l'immunodéficiência murine et humaine.⁶⁶

Figure 4. Modèle d'activation du récepteur de GM-CSF, IL-3 ou IL-5.

Le modèle est décrit dans le texte.

Tiré de Stem Cells, vol. 16, p.303. 1998.

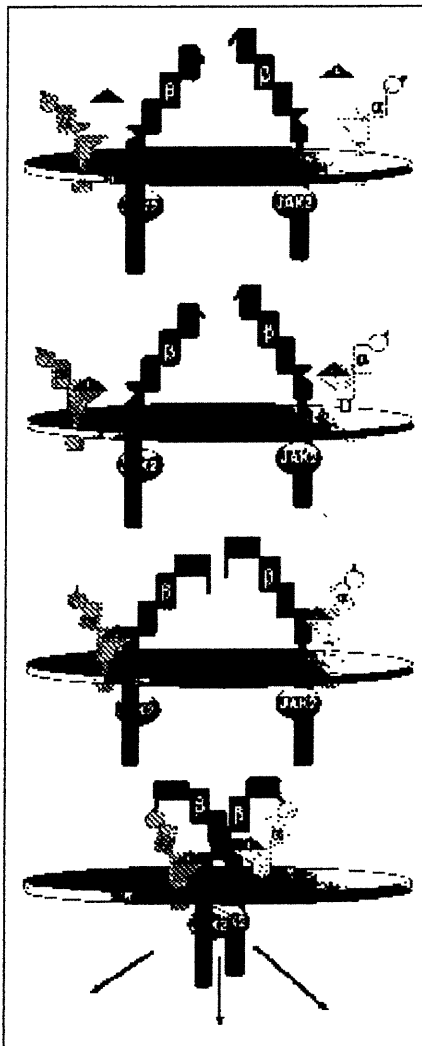
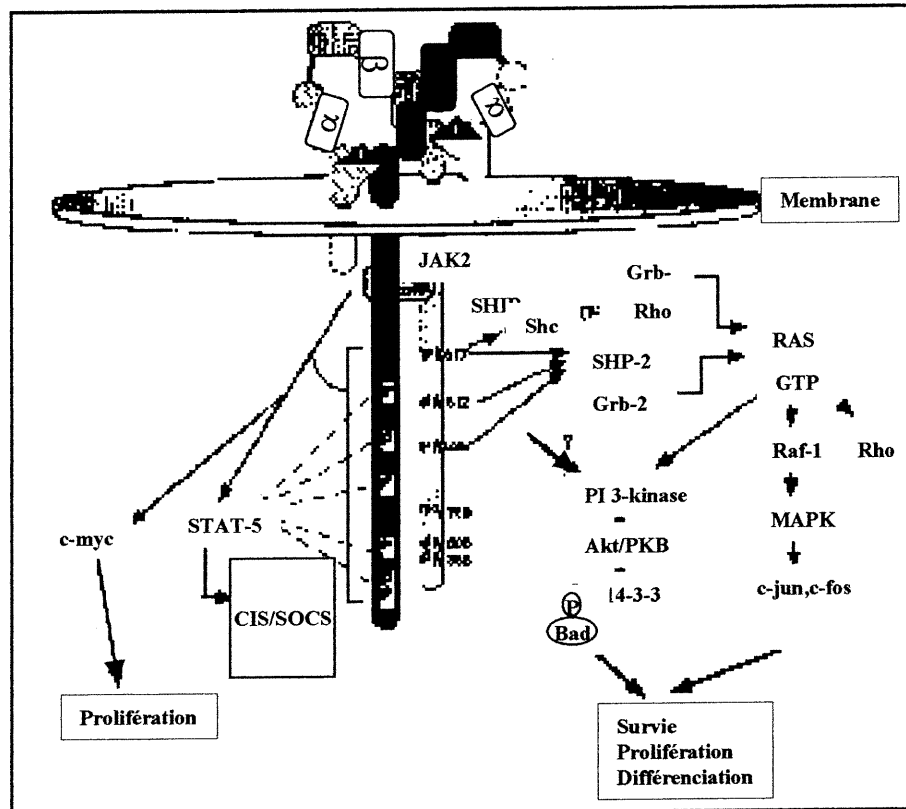


Figure 5. Modèle des voies de signalisation stimulées par la liaison de GM-CSF, IL-3 ou IL-5.



La dimérisation et l'activation des récepteurs conduisent à l'initiation de plusieurs cascades de signaux: A) voie JAK/STAT et B) voie Ras/MAP kinase et voie PI 3-kinase. La phosphorylation de tyrosines sur bC (P) permet le recrutement et l'activation d'une multitude de protéines avec domaines SH2.

Tiré de Stem Cells, vol. 16, p. 306. 1998.

En plus de la voie de signalisation par JAK, initiée par l'interaction entre les cytokines et leurs récepteurs, la voie Ras peut également être induite par plusieurs facteurs de croissance hématopoïétiques tels que IL-2, IL-3, GM-CSF, SCF et Epo.^{67,68} Cette voie intermédiaire implique la conversion de Ras-GDP à sa forme active, Ras-GTP et nécessite l'action de plusieurs protéines de signalisation intracellulaires.⁶⁹ Les protéines adaptatrices Grb2 et Shc semblent être impliquées dans le processus. Plus particulièrement, l'autophosphorylation du domaine cytoplasmique du récepteur, suite à la liaison avec son ligand, crée un site pouvant loger le domaine SH2 de la protéine adaptatrice Grb2. Le domaine SH3 de Grb2 se lie à la protéine SOS (Son of Sevenless), le facteur d'échange de Ras guanine nucléotide.⁷⁰ Shc, activée par phosphorylation de tyrosine, sert de pont entre le complexe de récepteur activé (domaine distal à la membrane)⁷¹ et la paire Grb2-SOS cytoplasmique. Cette dernière est ensuite transloquée du cytoplasme à la membrane plasmique pour catalyser la conversion de Ras-GDP (inactif) à sa forme active, Ras-GTP.⁷² L'activation de Ras induit l'amplification du signal par l'activation de la sérine/thréonine kinase Raf-1, suivie de la phosphorylation de l'activateur de tyrosine/thréonine MAP kinase, MEK (mitogen-activated/extracellular signal regulated kinase), et celle des MAP (mitogen-activated protein) kinases.⁷³ Les MAPKs activées véhiculent le signal au noyau où des facteurs spécifiques induisent la transcription immédiate de gènes précoces.

L'interaction entre les voies de signalisation JAK et Ras peut s'effectuer par un membre de la famille Src qui se lierait, à l'extrémité distale, à la membrane de la portion cytoplasmique du récepteur de cytokine.^{74,75}

En plus des voies de signalisation impliquant JAK et Ras, les cytokines peuvent également agir directement sur le contrôle des gènes, par l'intermédiaire de la famille de facteurs de transcription STATs (signal transducers and activators of transcription). Les STATs étant des protéines cytoplasmiques qui possèdent des domaines SH2, SH3 et une portion intermédiaire pouvant se lier à l'ADN.⁷⁶ La stimulation des récepteurs de cytokines induit rapidement la phosphorylation de tyrosine d'une ou de plusieurs STATs, suivie de l'homo- ou l'hétérodimérisation des

STATs via les domaines SH2. Ceci conduit à la translocation nucléaire du complexe STAT et à sa liaison à l'AND.⁷⁷ La famille des STATs comprend 6 membres, STAT1 à STAT6.⁷⁸⁻⁸⁰ Les différences de mécanismes de transduction de signaux induits par les récepteurs de cytokines peuvent provenir des protéines STATs. En effet, les types de STATs phosphorylés et activés par chaque cytokine dépendent de leur présence dans la cellule cible et de leur affinité avec les complexes activés récepteur-JAK. De plus, les différents récepteurs de cytokines peuvent être différenciés par les types de JAK recrutés, les types de STATs activés et donc, le contrôle d'expression de gènes spécifiques.

Les voies de signalisation, ci-haut décrites, permettent aux différentes cytokines d'exercer leurs actions spécifiques sur des populations cellulaires cibles. Nous décrivons brièvement les effets cellulaires de FL, IL-3, GM-CSF et G-CSF.

Le FL agit seul dans le maintien des CSP *in vitro* et agit de concert avec des cytokines précoces (IL-3, Tpo, SCF) dans la promotion de croissance des CSP primitives, en les recrutant de leur état quiescent vers leur entrée active en cycle.⁸¹⁻⁸³ En plus de ses effets *in vitro*, FL exerce aussi des effets hématopoiétiques *in vivo*. D'ailleurs, l'injection *in vivo* de FL induit une augmentation des globules blancs, des CFU-GM, BFU-E et CFU-GEMM.^{84,85} FL agit aussi en synergie avec G-CSF et GM-CSF pour augmenter le potentiel de mobilisation de ces derniers.⁸⁶ Finalement, FL agit de concert avec des cytokines actives à divers stades de l'hématopoïèse et induit l'expansion des progéniteurs myéloïdes tout en maintenant ou en augmentant le nombre de cellules souches.⁸²

L'IL-3 et le GM-CSF, utilisés seuls ou en combinaison *in vivo*, induisent la stimulation de croissance myélopoïétique et thrombopoïétique.⁸⁷ La protéine de fusion de ces deux cytokines, Pixykin321 (P), stimule la prolifération des progéniteurs myéloïdes et mégakaryocytaires, tout en induisant la production de neutrophiles et de plaquettes chez les primates.⁸⁸ D'ailleurs, l'injection *in vivo* de P lors d'un essai clinique de Phase I, a induit une réduction de la période de neutropénie après chimiothérapie (hautes doses de carboplatine).⁸⁹ La combinaison de P à FL parvient à augmenter les nombres cellulaires de près de cinq fois au niveau des

cellules totales et des CFU-GM immatures après 7 jours de culture de cellules CD34⁺CD38⁻.²⁴ Par ailleurs, lorsque P est combiné à FL et Epo, il induit aussi l'expansion des cellules nucléées totales (env. 4x), des CFU-GM, des LTC-IC et des cellules immatures CD34⁺Lin⁻ en 12 jours de culture.⁹⁰ Quand la protéine de fusion agit en synergie avec FL et SCF, une expansion variant de 5 à 10 fois est observée au niveau des cellules totales, des progéniteurs multipotentiels et engagés; les LTC-IC sont amplifiées de 17 fois au terme des 12 jours de culture.⁹¹

Le G-CSF a particulièrement été utilisé *in vivo* pour réduire la neutropénie après chimiothérapie et pour mobiliser des nombres accrus de progéniteurs à la périphérie. Cette cytokine compte des cibles cellulaires tout au long de la voie de maturation granulocytaire, du stade de CFU-GM à celui des neutrophiles.⁹²

L'exploration de l'effet de la grande famille des cytokines ne s'est pas arrêtée aux cytokines déjà décrites. Les effets directs de cytokines additionnelles ont été démontrés.⁹³ Une étude récente effectuée avec des cellules CD34⁺ de sang de cordon a démontré que la simple combinaison de deux facteurs de croissance (FL et Tpo) peut induire l'expansion et le maintien de progéniteurs hématopoïétiques immatures et plus matures pendant près de 6 mois en culture liquide sans stroma.⁹⁴ La combinaison des 3 facteurs SCF, IL-6 et Epo, sans stroma, parvient également à maintenir ces cellules à fort potentiel de reconstitution hématopoïétique à long terme.⁹⁵

Par contre, bien que ces résultats prouvent qu'il soit possible d'expandre des cellules à potentiel clonogénique *ex vivo*, certaines études ont démontré que les cellules progénitrices perdent presque complètement leur potentiel de reconstitution hématopoïétique, après expansion suite à leur réinfusion.⁹⁶ L'expansion en culture liquide de cellules CD34⁺ mobilisées, en présence de combinaisons de cytokines (IL-3, SCF, IL-6, FL et Tpo) et de l'anticorps spécifique au facteur inhibiteur TGFβ1 mène à une expansion des cellules souches et progénitrices (CAFCs après 6 semaines). Toutefois, la qualité de ces dernières (LTC-CFC après 6 semaines) diminue considérablement au cours de l'expansion.⁹⁷ Par contre, cette diminution est

palliée par le contact avec des cellules stromales telles que celles de la lignée FBMD-1.⁹⁷ Dans ce système, les cellules FBMD-1 produisent le facteur inhibiteur de prolifération des cellules souches TGF β 1; mais l'ajout d'un anticorps neutralisant et de divers facteurs de croissance pourrait éliminer le blocage de prolifération observé lors du contact stromal.⁹⁸

En somme, bien que les cytokines ne constituent qu'une seule famille, il est clair qu'elles exercent des actions très diverses par l'entremise de leurs récepteurs spécifiques. Leurs systèmes de transduction de signaux impressionnent par leurs différents mécanismes d'action. Aussi, faut-il rappeler que nous ne sommes qu'à l'orée de la compréhension de ces mécanismes. Cette complexité du système hématopoïétique normal laisse entrevoir la possibilité que toute perturbation par des agents intrinsèques ou extrinsèques au système peut conduire à un déséquilibre hématopoïétique. C'est le cas, entre autres, de la leucémie myéloïde chronique ou LMC décrite ci-après.

1.3 Leucémie myéloïde chronique

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie provenant de l'expansion clonale d'une cellule souche hématopoïétique pluripotentielle pouvant être identifiée par la présence du chromosome de Philadelphie (Ph). Ce chromosome est caractérisé par la présence du gène de fusion *bcr-abl* provenant de la translocation réciproque entre les bras longs du chromosome 22 (*bcr*) et du chromosome 9 (*abl*) (Figure 6). Cette translocation t(9;22) génère, entre autres, la protéine de fusion p210^{BCR-ABL} présente chez près de 95% des patients atteints de LMC. De plus, la p210^{BCR-ABL} serait la cause de la maladie puisqu'elle est en mesure d'induire la LMC dans des modèles murins.⁹⁹

Figure 6. Sites de bris des gènes *ABL* et *BCR*, et structure des ARNm chimères dérivés de ces bris.

Tiré de N Engl J Med, vol. 341, no. 3, p. 166. 1999.

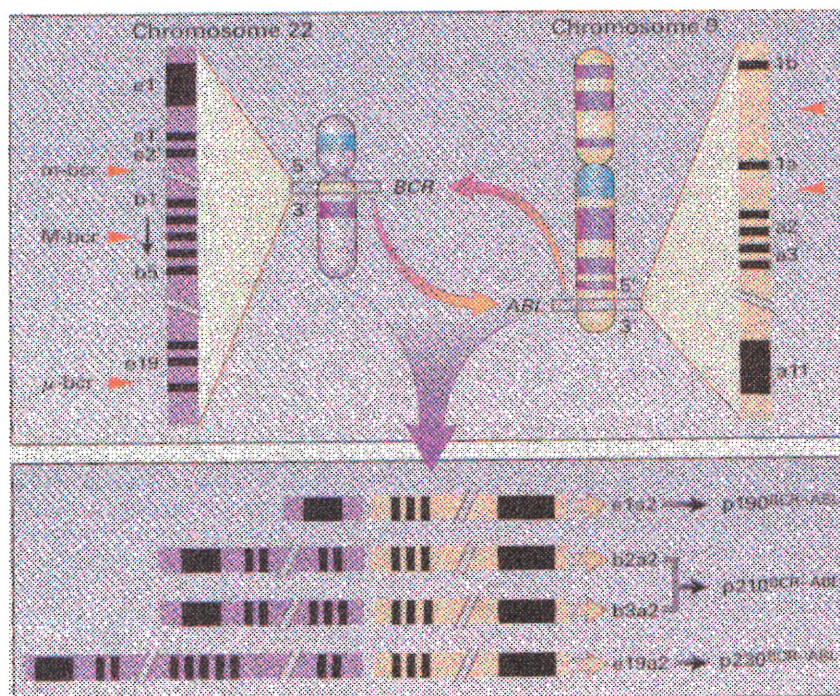
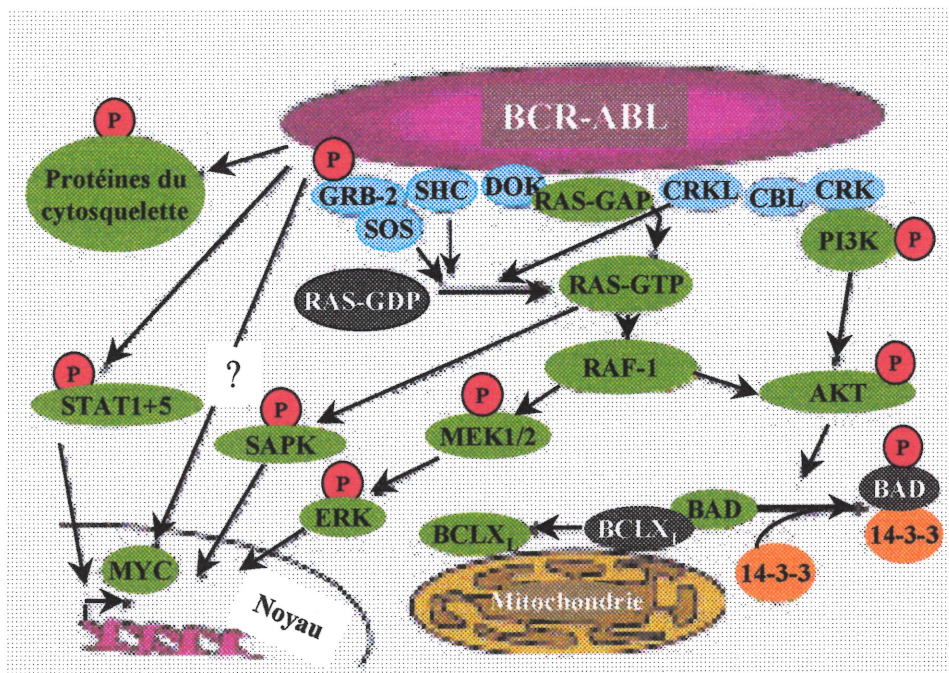


Figure 7. Voies de signalisation activées dans les cellules *bcr-abl* positives.

Tiré de Blood, vol. 96, no. 10, p.3343. 2000.



Au cours de la LMC, le nombre de CFCs (colony-forming cells) des lignées myéloïdes et mégakaryocytaires augmente dans la moëlle osseuse (MO) et dans le sang périphérique (SP) tandis que les cellules progénitrices immatures, évaluées par culture à long terme, augmentent de façon exponentielle dans le SP, mais diminuent en nombre dans la MO en comparaison aux individus normaux.¹⁰⁰

L'expansion clonale d'éléments de la lignée granulocytaire, en particulier au cours de la LMC, est un phénomène encore sous observation. Différentes méthodes sont utilisées pour élucider les mécanismes de progression de la maladie. La cinétique de production de progéniteurs granulocytaires et monocytaires (CFU-GM) peut être évaluée par l'essai «delta» dont les résultats ont indiqué que l'expansion myéloïde en LMC est attribuable à une augmentation du nombre de cellules hématopoiétiques primitives plutôt qu'à une expansion des cellules en prolifération plus matures.¹⁰¹

Cette expansion a été démontrée par plusieurs modèles cellulaires. Parmi ces modèles, notons tout d'abord, le très récent développement de la lignée cellulaire KT-1.¹⁰² Cette lignée KT-1, dérivée du sang périphérique d'un patient en crise blastique de LMC, possède les caractéristiques phénotypiques et morphologiques de la lignée myéloïde. Les cellules leucémiques initiales ont été positives pour le CD33 (marqueur myéloïde) à 89.4% et les cellules KT-1, à 69.2%. De plus, les cellules KT-1 présentent une morphologie indifférenciée avec un haut rapport noyau/cytoplasme sans granules cytoplasmiques et avec des réactions positives pour la myéloperoxydase intracellulaire. Ainsi, les cellules ayant le potentiel de maintenir le phénotype leucémique à long terme (18 mois) présentent majoritairement des caractéristiques myéloïdes, preuve de l'expansion clonale d'éléments de la lignée granulocytaire.

En plus des lignées cellulaires exprimant constitutivement *bcr-abl*, certaines lignées ont également été transformées avec l'ADNc du gène de fusion. Parmi ces lignées cellulaires, notons les lignées myéloïdes telles que la lignée mégakaryocytaire

humaine Mo7E, la lignée murine 32D ainsi que des lignées lymphoïdes telles que les cellules murines pro-B Ba/F3.

Dans le modèle des cellules mégakaryocytaires Mo7E, la protéine p210bcr-abl induit la sécrétion de GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) et une autonomie de croissance par un mécanisme autocrin.¹⁰³ La transformation de cette lignée avec un vecteur exprimant p210bcr-abl conduit à la croissance massive de cellules devenues indépendantes aux facteurs de croissance.¹⁰³ Suite à la transfection, de hauts niveaux d'activité de la protéine p210 sont décelés dans les clones de cellules indépendantes aux facteurs de croissance répondant tout de même aux facteurs de croissance exogènes. Ces cellules clonales sécrètent également du GM-CSF qui, si neutralisé par des anticorps neutralisants, conduit à l'inhibition de prolifération de 60% à 90% des clones sensibles aux facteurs.

La protéine p210bcr-abl induit une indépendance aux facteurs de croissance par son interaction avec le récepteur tyrosine kinase c-kit dans la sous-lignée myéloïde Mo7p210,¹⁰⁴ tandis que dans des lignées de cellules B transformées par EBV et dérivées de patients atteints de LMC, les transcrits de bcr-abl disparaissent avec le temps en culture.¹⁰⁵ Ceci semble indiquer que la présence du gène chimère bcr-abl ne confère pas d'avantage de survie aux cultures lymphoïdes contrairement aux cellules myéloïdes.

Dans les cellules Mo7p210 (exprimant constitutivement c-kit), le ligand de c-kit ne semble pas être produit de façon autocrine puisque la préincubation des cellules Mo7p210, avec un anticorps monoclonal bloquant le site de liaison de SF sur c-kit, n'affecte pas la croissance des cellules transfectées.¹⁰⁴ L'activité Abl kinase est nécessaire à l'activation de c-kit puisque des essais de complexes immuns de kinase ont indiqué que l'activité kinase de c-kit est significativement plus élevée dans les cellules Mo7p210 que dans les cellules parentales Mo7. Cette activation de c-kit semble être effectuée par la formation du complexe intracellulaire c-kit/p210bcr-abl; p210bcr-abl active c-kit dans les cellules Mo7p210 par un mécanisme dépendant de l'Abl kinase.

La lignée myéloïde 32D cl3(G) dépendante d'IL-3 est un modèle cellulaire qui démontre bien l'expansion clonale caractéristique de la LMC. L'introduction du gène *bcr-abl* dans cette lignée cellulaire a permis d'évaluer l'effet de la p210*bcr-abl* sur les cellules myéloïdes de LMC.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

L'expression de p210*bcr-abl* peut substituer la fonction d'IL-3 à cause de l'activation constitutive de protéines impliquées dans la transduction de signal initiée par l'IL-3. En effet, l'expression de p210*bcr-abl* dans les cellules 32D cl3(G) induit l'élimination de dépendance à l'IL-3 de façon non-autocrine ainsi que l'expression de marqueurs des macrophages/monocytes dès les premières générations cellulaires en culture.¹⁰⁶ De plus, IL-3 et p210*bcr-abl* induisent toutes deux la phosphorylation des 4 mêmes protéines cytoplasmiques. Par ailleurs, l'introduction d'une p210*bcr-abl* mutante, devenue sensible à la température pour l'activité tyrosine kinase de v-src dans les cellules 32Dcl3, indique qu'à la température permissive, les cibles de p210*bcr-abl* sont particulièrement phosphorylées.¹⁰⁹ La protéine de signalisation RasGAP et ses protéines associées p190 et p62 sont spécifiquement phosphorylées dans ce processus. Il est donc suggéré qu'elles sont impliquées dans la transmission du signal conduisant à la prolifération extraordinaire des cellules transfectées.

En plus des substrats mentionnés ci-haut, il a été démontré, dans les lignées 32D et 32Dp210, que les intermédiaires de signaux Src sont impliqués dans la transmission de signaux dans les cellules myéloïdes qui produisent un effet sur la prolifération cellulaire.¹¹⁰ Deux kinases de la famille Src, p53/56lyn et p59hck présentent des niveaux d'activité phosphokinase significativement plus élevés dans les cellules transfectées 32Dp210 que dans la lignée parentale 32D. Des expériences de co-immunoprécipitation avec les anticorps anti-Lyn, anti-Hck et anti-abl indiquent que la protéine p210*bcr-abl* est associée aux protéines p53/56lyn et p59hck.

Finalement, l'expression de p210*bcr-abl* peut éliminer la transduction de signal apoptotique; ceci pourrait contribuer au développement de l'hyperplasie myéloïde, caractéristique de la phase chronique de la LMC.¹⁰⁸ En effet, lorsque la lignée murine myéloïde, 32Dcl3(G), dépendante de l'IL-3 et un sous-clone (LG7) indépendant à IL-3 par transduction de *bcr-abl* sont mis en présence d'IL-3 et

d'inhibiteurs de tyrosine kinase, les courbes de dose-prolifération cellulaire sont semblables entre la lignée parentale et son sous-clone.¹⁰⁸ Par contre, après 24 heures, la majorité des inhibiteurs de tyrosine kinase induisent l'apparition de l'échelle d'ADN nucléosomal de 200 paires de bases, caractéristique de l'apoptose dans les cellules parentales 32D cl3(G)⁺ IL-3. Ces effets, semblables à ceux produits par le retrait d'IL-3, ne sont pas observés dans les cellules LG7, également en arrêt de croissance où une nécrose (fragmentation d'ADN) apparaît plutôt.

Les expériences effectuées dans les modèles cellulaires indiquent la complexité des mécanismes régulateurs impliqués dans le développement et la progression de la LMC. Ces mécanismes altérés chez les patients atteints de LMC peuvent conférer un avantage compétitif aux précurseurs de cellules myéloïdes par rapport aux précurseurs normaux.

Les précurseurs de cellules myéloïdes présentent certaines caractéristiques pouvant expliquer les mécanismes régulateurs qui leur confèrent un avantage compétitif par rapport aux précurseurs normaux. Dans l'hématopoïèse normale, la coordination entre les interactions cytokines/récepteurs des cytokines et les interactions adhésives mène au développement du système hématopoïétique par la survie, la prolifération, l'engagement à une lignée spécifique, et la différenciation des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques. Par contre, dans les cas de LMC, l'hématopoïèse dérégulée mène à l'expansion anormale du clone tumoral. Comme dans toute situation physiologique, cette expansion accrue est due à une augmentation de prolifération cellulaire avec ou sans diminution de mort cellulaire.

La capacité de prolifération accrue des cellules *bcr-abl*⁺ est due au potentiel mitogénique de ce gène de fusion car, dans les modèles cellulaires, les lignées, dépendantes des facteurs de croissance et transfectées avec des vecteurs contenant *bcr-abl*, deviennent indépendantes aux facteurs de croissance et prolifèrent de façon incontrôlée.¹⁰³ Les mécanismes régulateurs régissant ce potentiel de *bcr-abl* ont été analysés par l'introduction de formes dominantes négatives de certains gènes, par

complémentation génétique et par utilisation d'oligonucléotides anti-sens spécifiques à *bcr-abl* ou à un de ses gènes cibles.

Tout d'abord, l'introduction d'une forme dominante négative de Ras ou de Myc dans des cellules exprimant *bcr-abl* inhibe le potentiel de transformation de *bcr-abl*.¹¹¹ En effet, plusieurs domaines de la protéine de fusion p210*bcr-abl*, tels que le domaine tyrosine kinase SH1 (d'*abl*), le domaine SH2 (d'*abl*) et la tyrosine 177 (de *bcr*) interagissent avec la voie de signalisation Ras/Raf pour transformer des cellules dépendantes aux facteurs de croissance en cellules indépendantes (Figure 7, p.26).¹¹² C'est ainsi que l'introduction de formes dominantes négatives de Ras ou de Myc, un des gènes dont l'expression est augmentée par Ras activé, inhibe le potentiel de transformation de cellules exprimant pourtant p210*bcr-abl*. L'effet de Myc dans l'activité mitogénique de *bcr-abl* est également observé dans des études de complémentation génétique où l'indépendance aux facteurs de croissance peut être rétablie par surexpression de Myc.¹¹³ Enfin, l'incubation de cellules *bcr-abl*⁺ avec des oligonucléotides anti-sens spécifiques à l'ARNm de Ras ou Raf élimine l'indépendance aux facteurs de croissance induite par *bcr-abl*.¹¹⁴

De plus, puisque la p210*bcr-abl* des cellules transfectées avec *bcr-abl* ou des cellules blastiques de LMC stimule la synthèse de GM-CSF et IL-3,^{115,116} des essais ELISA ont été faits avec les surnageants de cellules CD34⁺ prélevées de patients atteints de LMC ou d'individus normaux, et privées de facteurs de croissance pendant 3 jours, afin d'explorer la possibilité d'une production autocrine de facteurs de croissance dans les cellules de LMC contrairement aux cellules normales.¹¹⁷ Des niveaux comparables des cytokines TNF α , IL-1 α , IL-1RA, IL-6 et IL-3 ont été observés dans les surnageants des cellules de LMC et des cellules normales. Par contre, GM-CSF n'a été produit que dans le surnageant des cellules de LMC, ce qui confirme en partie les observations mentionnées ci-haut, puisque l'IL-3 ne semble pas être produite par les cellules primaires de LMC.¹¹⁷ Ces résultats concordent avec l'étude où une forme mutante de *bcr-abl* (sans le domaine SH2 mais avec l'activité tyrosine kinase), a été en mesure d'induire l'indépendance aux facteurs de croissance en l'absence d'induction de synthèse de facteurs de croissance par ces cellules.¹¹⁵

Ensuite, le potentiel mitogénique de *bcr-abl* peut être expliqué par une perte de contrôle du cycle cellulaire puisque, entre autres, *bcr-abl* peut activer les complexes cycline-D impliqués dans le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire.¹¹⁸ La même situation semble prévaloir *in vivo* parce que, contrairement aux précurseurs normaux, les précurseurs myéloïdes CD34⁺ de patients en phase chronique ainsi que les cellules plus différenciées CD34⁻ continuent à entrer en phase S du cycle cellulaire, après le retrait de facteurs de croissance.¹¹⁷ Cette anomalie des précurseurs immatures dans les échantillons de LMC avait déjà été observée dans des cultures sur stroma, avec de faibles quantités de facteurs de croissance.¹¹⁹ Des cellules CD34⁺ purifiées du sang périphérique (SP) de patients en phase chronique et d'individus normaux ont été mises en culture en présence de G-CSF et de SCF pendant 48 heures.¹¹⁷ Après le retrait des facteurs de croissance, les analyses de cycle cellulaire ont été faites par évaluation du contenu en ADN par marquage à l'iodure de propidium parallèlement au marquage en CD34 pour distinguer les fractions CD34⁺ des CD34⁻.

Ce potentiel mitogénique accru de *bcr-abl* conduisant à l'indépendance aux facteurs de croissance et à la prolifération cellulaire accrue est caractéristique des lignées cellulaires, mais ne s'applique pas aux cellules primaires de LMC prélevées de patients en phase chronique car, ces cellules dépendent des facteurs de croissance et ne sont pas plus sensibles aux cytokines que leurs cellules normales correspondantes.^{120,121} Pourtant, lorsqu'on les compare aux progéniteurs normaux (chez les individus normaux), plus de progéniteurs leucémiques sont dans la phase proliférative.¹¹⁹

L'analyse du contexte physiologique dans lequel évoluent les cellules de LMC permettrait d'approfondir la recherche des mécanismes régulateurs contribuant à conférer un avantage compétitif aux précurseurs leucémiques par rapport aux normaux. Tel que mentionné plus haut,¹¹⁷ les cellules primaires de LMC ne produisent pas des quantités accrues de facteurs de croissance susceptibles d'expliquer le haut taux de prolifération de ces cellules. De plus, les facteurs promoteurs de croissance (G-CSF, IL-6, SCF, GM-CSF, IL-1 β) et inhibiteurs de

croissance (TGF- β , MIP-1 α et TNF- α) sont produits en quantités similaires par les cellules du microenvironnement médullaire de LMC, en phase chronique que normal.^{122,123} D'ailleurs, les LTC-IC normales croissent aussi bien dans des cultures stromales sans contact, provenant de patients atteints de LMC que dans celles d'individus normaux, ce qui prouve que la production de facteurs diffusibles provenant des cellules stromales n'est pas modifiée dans les cas de LMC.¹²³

Finalement, puisque les interactions d'adhésion entre les cellules progénitrices et les cellules du stroma permettent de contrôler, entre autres, la croissance des cellules progénitrices; la prolifération continue des progéniteurs de LMC conduisant à leur expansion pourrait être expliquée par des interactions défectueuses avec leur microenvironnement.¹²⁴⁻¹²⁶ D'ailleurs, la LMC est caractérisée par la circulation périphérique prématurée de progéniteurs granulocytaires immatures et par une hématopoïèse extramédullaire surtout dans la rate.¹²⁷

Au cours de l'hématopoïèse normale, l'intégrine $\beta 1$ en particulier semble être importante dans les interactions entre les progéniteurs hématopoïétiques et les éléments stromaux pour agir sur la prolifération et/ou la différenciation de ces cellules progénitrices.^{125,126,128,129} Ensuite, selon des études récentes, il a été suggéré que p210*bcr-abl* interagit avec plusieurs protéines du cytosquelette impliquées dans les voies de signalisation qui incluent l'intégrine $\beta 1$. Notons parmi ces protéines, F-actine, FAK, Crkl et paxilline.¹³⁰⁻¹³³ De plus, contrairement aux progéniteurs normaux, les progéniteurs (CFC et LTC-IC) Ph⁺ de patients atteints de LMC en phase chronique présentent une adhésion déficiente aux éléments du microenvironnement tels que la fibronectine.^{134,135} En effet, le contact direct entre les domaines de liaison des intégrines $\beta 1$ à la fibronectine ou l'activation des intégrines par incubation avec des anticorps bloquants anti-intégrine, n'inhibe pas la prolifération des progéniteurs de LMC.¹²⁶ Les progéniteurs de LMC diffèrent encore des progéniteurs normaux quant à leur réaction moléculaire suite à leur incubation avec des anticorps anti-intégrines. Ce traitement induit l'association latérale des intégrines à la surface des

cellules CD34⁺ normales tandis que les intégrines à la surface des cellules CD34⁺ de LMC demeurent dispersées à la surface, sans former de site focal d'adhésion.¹³⁶

Les intégrines de surface des progéniteurs de LMC sont présentes en quantités normales à la surface des cellules de LMC, avec une structure normale, mais elles sont fonctionnellement anormales. Les cellules CD34⁺ de LMC expriment un nombre normal d'intégrines $\beta 1$ à leur surface puisque le prétraitement de ces cellules avec l'IFN α , puis leur culture avec la fibronectine, mènent à la restauration de l'adhésion dépendante de l'intégrine, de la signalisation inhibitrice de prolifération des progéniteurs et de l'association latérale des intégrines à la surface cellulaire.^{125,137} En plus des quantités normales de molécules d'intégrines $\beta 1$ à la surface des cellules de LMC, ces dernières présentent des intégrines de structure normale puisque la neutralisation de *bcr-abl* par la préincubation des progéniteurs leucémiques avec des oligonucléotides spécifiques à *bcr-abl*¹³⁸ ou avec des inhibiteurs de tyrosine kinase spécifiques à la portion *abl* dans la protéine *p210bcr-abl* mène à la restauration de l'adhésion dépendante des intégrines.

Une fois activées avec des anticorps anti-intégrines par exemple, les intégrines des cellules de LMC n'interagissent plus normalement avec le cytosquelette, étape primordiale à la transmission de signaux inhibiteurs de prolifération des progéniteurs.^{136,139} D'ailleurs, les protéines du cytosquelette associées à l'adhésion focale (FAK, vinculine, taline et tensine) sont constitutivement phosphorylées dans les lignées transfectées avec *bcr-abl*.^{133,140} Selon de récentes études, la fonction normale des intégrines serait modifiée par la formation de complexes *p210bcr-abl*/protéines adaptrices Crkl et Cbl dans les cellules primaires de LMC¹³² qui se lie à la paxilline et à la sous-unité régulatrice de la kinase PI-3.¹⁴¹ Finalement, la protéine *p60^{v-src}* induit la prolifération indépendante de l'adhésion des fibroblastes en phosphorylant le domaine intracellulaire des intégrines $\beta 1$,¹⁴² empêchant ainsi la localisation des intégrines aux sites de contacts focaux.¹⁴³

Les modifications de molécules d'adhésion et de leurs récepteurs sont suivies des modifications dans les signaux de mort cellulaire dans le contexte des LMC. En

effet, il a été démontré que l'activité tyrosine kinase de *bcr-abl* protège les cellules contre l'apoptose induite par divers stimuli tels que le retrait de cytokines du milieu de culture,^{120,144} par le contrôle d'expression du gène anti-apoptotique *bcl-2*.¹⁴⁵ Les progéniteurs de LMC, mis en culture et soumis à l'abolition d'activité de *bcr-abl*, par incubation avec des oligos anti-sens *bcr-abl*¹⁴⁴ ou des inhibiteurs de tyrosine kinase, deviennent sensibles à l'apoptose après retrait des facteurs de croissance du milieu de culture.

La protection contre l'apoptose dans les cellules *bcr-abl*⁺ peut également être effectuée par l'entremise de la voie de signalisation Ras et du gène anti-apoptotique *bcl-2*. Une étude sur la lignée cellulaire myéloïde 32Dcl3 exprimant la protéine *bcr-abl* mutante p185 Δ bcr a démontré que l'expression exogène de Raf, l'effecteur de Ras, a rétabli la résistance à l'apoptose induite par retrait de facteur de croissance.¹⁴⁶ L'expression de *bcl-2* et de *bcl-X_L* augmente rapidement, suite à l'activation de Ras et l'homodimérisation finale de *bcl-2*, induit un signal anti-apoptotique via son association intermédiaire avec Raf-1.¹⁴⁷ Ainsi, une voie dépendante de *bcr-abl* pourrait conduire à l'expression d'une forme active de Raf et promouvoir l'effet anti-apoptotique de *bcr-abl*.¹⁴⁶

En conclusion, la poursuite des expériences en vue de comprendre les mécanismes régulateurs critiques altérés dans les cellules leucémiques de LMC nous permettra de concevoir des modes de traitement dirigés vers, non seulement le gène de fusion *bcr-abl* et sa protéine chimère mais également, vers les substrats cibles de cette dernière. Ces optimisations de traitement de la LMC permettront d'obtenir des résultats encore plus prometteurs dans le contexte clinique des transplantations autologues en particulier.

1.4 Manipulation et traitement *ex vivo* de cellules progénitrices hématopoïétiques

La transplantation de cellules progénitrices autologues dépend de l'administration de hautes doses de chimiothérapie accompagnée ou non de radiation pour éliminer les cellules tumorales des patients. Ces fortes concentrations d'agents toxiques détruisent simultanément les cellules normales et les tumorales. Ainsi, la survie des patients dépend-elle de la capacité des cellules souches hématopoïétiques, prélevées avant cette thérapie intensive, à reconstituer les fonctions hématologiques et immunologiques.

Les stratégies conçues pour induire le mouvement de ces cellules souches vers le sang périphérique (SP) ont augmenté l'accessibilité des cellules souches et diminué la douleur et autres complications associées au prélèvement de moëlle osseuse (MO). Cette extraordinaire percée, associée aux récentes découvertes sur la nature de la cellule souche hématopoïétique, a déclenché un foisonnement du domaine de la transplantation et, particulièrement, de la manipulation des cellules souches. Les améliorations importantes dans l'identification, la caractérisation et l'entreposage des cellules progénitrices hématopoïétiques ont rendu les techniques conventionnelles de prélèvement de cellules progénitrices presque désuètes.

Il devenait alors essentiel de produire des greffons de haute qualité, exempts de contamination par des cellules tumorales et contenant suffisamment de cellules progénitrices normales en mesure de reconstituer le système hématopoïétique de l'hôte. Des populations cellulaires individuellement sélectionnées peuvent être manipulées en vue de modifier leur prolifération, leur différenciation, ou autres caractéristiques afin d'induire les rôles hématologiques ou immunologiques désirés. Le traitement de cellules progénitrices implique principalement le prélèvement de ces cellules et leur manipulation *ex vivo*. L'intérêt sera porté ici sur les stratégies d'élimination des cellules tumorales de greffons visant la sélection de cellules progénitrices normales et l'amélioration de leur potentiel de reconstitution hématopoïétique.

Les cellules à potentiel de reconstitution hématopoïétique caractérisées, entre autres, par leur expression de l'antigène de surface CD34, peuvent être obtenues de la moelle osseuse et/ou du sang périphérique. Par contre, lorsque comparé à la moelle osseuse, le nombre de cellules souches normalement présent en circulation périphérique est relativement faible.¹⁴⁸ Celui-ci peut être augmenté par l'administration d'une seule forte dose de cyclophosphamide^{149,150} ou de cytokines tels G-CSF, GM-CSF, PIXY321, IL-3 et IL-6.¹⁵¹ De plus, lorsque la chimiothérapie intensive est suivie de l'administration de cytokines, le rendement en cellules CD34⁺ est accru. Il peut atteindre des décomptes jusqu'à 100 fois plus élevés et permettre le prélèvement de cellules CD34⁺ en nombres suffisants pour une prise de greffon stable après un seul prélèvement.¹⁵²

Dans la plupart des maladies hématologiques et plusieurs tumeurs solides, les cellules tumorales infiltrent la MO et peuvent aussi être détectées dans le SP. Cependant, après le traitement des patients et leur rémission complète, certains rechutent. La cause de cette rechute n'est pas claire. Serait-elle due à des cellules néoplasiques résiduelles dans les greffons de progéniteurs hématopoïétiques? Des éléments de réponse ont été obtenus en insérant le gène de résistance *neo*, par un vecteur rétroviral, dans une portion de cellules de greffons médullaires. Ces dernières ont été administrées à des patients atteints de leucémie myéloïde aigüe (LMA), de neuroblastome ou de leucémie myéloïde chronique.^{153,154} Ces études ont démontré que les cellules d'individus en rechute portaient le gène marqueur *neo*, indiquant clairement que les cellules malignes résiduelles du greffon infusé pouvaient contribuer à la rechute.

Ces résultats ont corroboré ceux des études cliniques précédentes ayant montré que des patients atteints de LMA,¹⁵⁵ transfusés avec des greffons de MO purgés de leurs cellules malignes, présentent un meilleur taux de survie que les patients transfusés avec des cellules non manipulées *ex vivo*. Par contre, toutes les études cliniques n'aboutissent pas aux mêmes conclusions.¹⁵⁶ Ceci prouve la nécessité de développer des méthodes de purge efficaces et standardisées. Cette disparité apparente est possiblement due aux pré-requis spécifiques des méthodes de sélection

qui doivent, en premier lieu, être hautement efficaces pour éliminer les cellules tumorales puis, préserver les cellules progénitrices hématopoiétiques normales et finalement, impliquer des méthodologies applicables à grande échelle.

Les stratégies de purge datent de près de 20 ans. Elles ont pris un énorme essor ces dernières années grâce au développement de stratégies hautement efficaces et non invasives de prélèvement de progéniteurs hématopoiétiques et d'agents de purge facilement accessibles. Parmi les stratégies de purge, notons que des agents tels que la 4-hydroxycyclophosphamide ou mafosfamide ont été les premiers à être utilisés à grande échelle et à avoir généré des résultats prometteurs.^{157,158} Les autres classes d'agents de purge comprennent le cortivazol, un stéroïde particulier avec une activité spécifique aux cellules tumorales lymphoïdes,¹⁵⁹ et les agents photosensibilisateurs.¹⁶⁰⁻¹⁶²

À la lumière de cet exposé sur la problématique en manipulation *ex vivo* dans le contexte des autogreffes, nous avons entrepris de viser à éliminer les cellules malignes et favoriser l'expansion de cellules souches hématopoiétiques normales dans les cas de néoplasies hématologiques.

CHAPITRE 2

Purge de cellules souches périphériques de patients atteints de
lymphome par un agent photosensibilisateur: potentiel
thérapeutique en transplantation autologue

Chapitre 2. Purge de cellules souches périphériques de patients atteints de lymphome par un agent photosensibilisateur: potentiel thérapeutique en transplantation autologue

Le succès de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) autologues dépend de trois éléments principaux: la purge *in vivo* efficace des cellules malignes de l'hôte, la production de greffons autologues de haute qualité et la conservation d'un nombre suffisant de cellules normales résiduelles capables d'initier une reprise hématopoïétique normale.

A la lumière de la problématique soulevée dans le chapitre précédent, nous consacrerons le présent chapitre à l'évaluation de la thérapie photodynamique comme moyen d'optimisation de la purge *ex vivo*. Nous débuterons par un état de la situation dans les cas de lymphome. Nous poursuivrons avec les approches choisies pour répondre à notre question initiale. Dans la troisième partie, nous exposerons nos résultats. Finalement, nous pourrons analyser ces données à la lumière de la littérature existante de façon à mieux comprendre leur impact dans le domaine de l'autogreffe de lymphomes.

2.1 Lymphomes et traitement photodynamique

L'élimination efficace des cellules malignes, présentes chez le patient, se fait par administration de fortes doses de chimiothérapie avec ou sans radiation en parallèle. Malheureusement, dans le cas du lymphome non-Hodgkinien (LNH), entre autres, des cellules résiduelles peuvent malgré tout persister chez l'hôte. Grâce à une technique quantitative de détection des cellules réarrangées (bcl-2/IgH), développée dans notre laboratoire, il a été démontré que les régimes *in vivo* de mobilisation de cellules progénitrices, suite à la chimiothérapie et l'administration de facteurs de croissance, ne constituent pas une stratégie efficace de purge. La MO et le SP mobilisé présentent des proportions similaires de cellules réarrangées (bcl-2/IgH),¹⁶³ des résultats corroborés par Kanteti et al.¹⁶⁴

Il faut également considérer la production de greffons de haute qualité, exempts de contamination par des cellules tumorales et contenant suffisamment de cellules progénitrices normales capables de reconstituer le système hématopoïétique de l'hôte. À cet effet, différentes approches de purge *ex vivo* ont été développées pour les néoplasies hématologiques et pour les LNH, en particulier.

Selon la biologie du LNH, les cellules tumorales présentent des antigènes de surface, caractéristiques d'un immunophénotype mature. Ainsi, des anticorps reconnaissant ces antigènes tels que l'anti-CD10, CD20(B1), CD19 (B4), B5 ou CD22, en association avec des compléments, des billes immunomagnétiques ou des toxines, ont permis de reconnaître et d'éliminer jusqu'à cinq logs de cellules clonogéniques lymphomateuses, sous le seuil de détection des essais de dilution limite.^{165,166} La sélection positive de cellules progénitrices exprimant l'antigène de surface CD34 a aussi été utilisée dans le contexte clinique comme méthode efficace de purge des cellules lymphomateuses, plus matures que les CD34⁺.^{167,168}

Afin d'évaluer l'efficacité physiologique de ces diverses techniques de purge, des études cliniques ont été initiées avec des greffons traités *ex vivo* au Dana Farber Cancer Institute, Harvard University, Boston, MA,¹⁶⁵ à notre département d'hématologie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Canada,¹⁶⁹ ainsi qu'au Stanford University Medical Center, Stanford, CA.^{170,171} Ces études ont montré que la déplétion de plusieurs logs de cellules malignes est possible mais que des cellules malignes résiduelles dans les greffons traités puis infusés, peuvent contribuer à la réapparition *in vivo* de cellules réarrangées (bcl-2/IgH). De plus, la purge élimine également des cellules normales. Il fallait donc optimiser l'étape de purge de cellules lymphomateuses avant la transplantation autologue.

Nous nous sommes donc tournés vers la thérapie photodynamique comme technique de purge *ex vivo*. Son principe est le suivant. Suite à l'incubation d'un agent photoactif avec la suspension cellulaire ciblée et l'incorporation de cet agent dans les cellules sensibles, la suspension cellulaire est exposée à une lumière de

longueur d'onde spécifique. Cette procédure a pour effet d'induire l'activation de l'agent et la destruction des cellules dans lesquelles il se sera incorporé.

Les principaux agents photosensibilisateurs sont la mérocyanine 540 (MC540) et les dérivés de porphyrine. Dans une étude pionnière, le MC540 en association avec la lumière a été initialement utilisé comme agent potentiel de purge de MO.¹⁷² Toutefois, dans cette partie du projet, nous avons privilégié le dérivé de porphyrine, le BPD-MA, dérivé de benzoporphyrine monoacide bague A (ou Verteporfine) (Figure 8), à cause de la possibilité de l'utiliser en clinique.

Le traitement de cellules sensibles au BPD-MA suivi de leur exposition à une lumière de longueur d'onde spécifique (690 nm) induit la relâche rapide de cytochrome *c* dans le cytoplasme puis l'activation de caspase. La relâche de singlets d'oxygène se produit en parallèle. De plus, le BPD-MA est particulièrement pratique pour des échantillons contenant des érythrocytes puisque la lumière, à cette longueur d'onde, n'est pas absorbée par l'hémoglobine.¹⁷³

Selon des études *ex vivo*, le BPD-MA induit des déplétions de trois à quatre logs de cellules tumorales de myélome multiple,¹⁷⁴ de lymphome à grandes cellules (75 ng/ml)¹⁷⁵ et de leucémie myéloïde chronique (LMC) (100 ng/ml).¹⁶¹ Cet agent parvient à induire la diminution de charge tumorale dans un modèle murin de leucémie sans affecter la reconstitution hématopoiétique,¹⁷⁶ préservant ainsi la viabilité des cellules progénitrices normales.¹⁷⁷ La même situation prévaut pour des lignées cellulaires dérivées d'échantillons de patients atteints de leucémie myéloïde aigüe (LMA) où le BPD-MA (50 ng/ml) élimine plus de trois logs de cellules «colony forming unit-leukemia» ou CFU-L.¹⁷⁵ De plus, lorsque le BPD-MA est injecté chez des souris avec tumeurs intraoculaires, il induit également une régression tumorale irréversible.¹⁷⁸

Malgré tous ces avantages, l'effet du BPD-MA comme agent de purge du LNH n'avait pas encore été étudié dans le contexte de la transplantation de cellules souches périphériques. Aussi, avons-nous décidé de lui porter un intérêt particulier dans notre étude.

Les patients atteints de lymphome non-Hodgkinien (LNH), de grade intermédiaire ou élevé, qui rechutent après la chimiothérapie conventionnelle ont habituellement un mauvais pronostic lorsqu'ils sont traités par chimiothérapie conventionnelle uniquement.¹⁷⁹ La transplantation autologue de cellules souches chez ces patients à haut risque conduit à des taux de survie sans maladie élevés variant de 30 à 59%.¹⁸⁰ Ces impressionnants résultats ont été confirmés par une étude randomisée sur la transplantation autologue de cellules souches en comparaison à la

présenté un taux de DFS de 46% à 5 ans contrairement au groupe contrôle (chimiothérapie seule) où un taux de 12% a été observé ($p=0.001$). De meilleurs résultats ont également été notés en terme de survie globale.

Le but de notre étude était donc de déterminer le potentiel cytotoxique du BPD-MA sur les cellules résiduelles de lymphome présentes dans les greffons de cellules souches périphériques et d'évaluer l'application potentielle du BPD-MA dans le contexte de transplantation autologue chez les patients atteints de lymphome. Pour ce faire, nous avons mesuré l'effet de différentes concentrations de BPD-MA sur l'élimination de cellules de LNH de greffons autologues. Nous avons aussi évalué la toxicité de cette procédure sur les cellules souches hématopoïétiques normales présentes dans les greffons de SP mobilisé. Ces résultats permettront de débiter une étude clinique de Phase I utilisant cet agent pour la purge de cellules souches de sujets atteints de lymphome.

2.2 Matériel et Méthodes

2.2.1 Cellules souches périphériques (CSP)

Suite au consentement informé, sous protocoles approuvés par le Comité de Protection de sujets humains de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, les cellules souches périphériques (CSP) ont été prélevées de donneurs (normaux). Les cellules mononucléées de SP (CSPM) ont été isolées avec le gradient de densité Ficoll-Hypaque par centrifugation et soumises à une radiation de 25 Gy à 4.0 Gy/min (^{137}Cs , Gamma Cell, Atomic Energy of Canada) avant d'être ajoutées à des cellules lymphomateuses pour les expériences de purge.

Le traitement a aussi été fait sur des CSPM prélevées de patients atteints de LNH après mobilisation par chimiothérapie et facteurs de croissance. Ce régime de mobilisation consistait en de la cyclophosphamide 1.5 g/m² au jour 0, puis de 10 µg/kg/jour de G-CSF des jours 1 à 11. Les CSP ont été prélevées par leucophérèse lorsque les décomptes en globules blancs étaient plus élevés que 8 x 10⁹/L (aux jours 9 à 11). Les cellules ainsi prélevées ont été soumises au traitement photodynamique

et les cellules traitées, évaluées dans des essais clonogéniques de progéniteurs hématopoiétiques.

2.2.2 Lignées cellulaires lymphomateuses

Les lignées cellulaires Daudi (CCL-213) et Namalwa (CRL-1432) sont des lignées humaines de cellules B de lymphome de Burkitt, qui expriment J5 (CD10), B1 (CD20) et B4 (CD19). Ces lignées proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). DHL-16 est une lignée de lymphome folliculaire de bas grade, gracieusement donnée par Dr JG Gribben (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA).

Les cellules ont été maintenues en culture dans le milieu RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Grand Island, NY) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Hyclone Lab, Logan, UT), 2% L-glutamine, 1% pyruvate de sodium et 1% de pénicilline/streptomycine. Elles ont toutes été prélevées en phase exponentielle de leur courbe de croissance.

2.2.3 Le dérivé benzoporphyrine-monoacide A (BPD-MA), un agent photosensibilisateur

Le BPD-MA a été fourni par Quadra Logic Technologies Inc. (Vancouver, B.C., Canada). Cet agent photosensibilisateur, initialement lyophilisé, a été reconstitué avec de l'eau stérile à une concentration de 2 mg/ml et dilué en série avec une solution à 5% dextrose/eau stérile jusqu'à la concentration finale de 2.5 µg/ml.

2.2.4 Traitement des cellules

Des études préliminaires nous ont permis de faire les expériences dans les conditions optimales de période d'incubation et de longueur d'onde de la lumière d'exposition.

Brièvement, nous avons utilisé deux types de suspensions cellulaires afin d'atteindre nos objectifs de travail. Premièrement, 5% de cellules de lignées lymphomateuses ont été mélangées à 95% de cellules mononucléées irradiées de SP normal pour recréer la situation physiologique des patients après les régimes de chimiothérapie.

Deuxièmement, nous avons utilisé des CSP de patients atteints de LNH et traités *in vivo*.

Ces deux types d'échantillons ont été dilués à 2×10^7 cellules/ml et incubés à la noirceur pendant 60 minutes à 27 °C avec le BPD-MA, à des concentrations variant de 0 à 80 ng/ml, afin d'établir la courbe dose-réponse du BPD-MA dans le cadre des LNH.

Suite à l'exposition à une lumière rouge fluorescente (690nm) à 15 J/cm², les cellules ont été lavées dans du Plasmalyte A (Baxter Corporation, Ontario, Canada) sans sérum, centrifugées et diluées dans une solution contenant 10% de plasma autologue diluée dans le Plasmalyte A. Deux types d'évaluation ont ensuite été faites: des essais clonogéniques en dilutions limites avec les suspensions de lignées cellulaires et des essais clonogéniques de progéniteurs hématopoïétiques normaux avec les CSP de patients.

2.2.5 Essais de dilution limite

Après le traitement au BPD-MA, les cellules ont été lavées à trois reprises et mises en plaques pour des essais de dilution limite (LDA) tel que décrit auparavant.¹⁶⁶ Brièvement, chaque échantillon traité a été dilué en série de 5×10^5 à 0.5 cellules par 100 µl d'une solution de RPMI 1640/10% SVF. A chaque dilution, 24 aliquots ont été distribués sur plaques de microculture (96 puits) à fond plat (Nunclon, Nunc, Danemark). Les cellules ont été nourries chaque quatre jours et incubées à 37 °C pendant douze jours. Pour chaque dilution, la croissance cellulaire a été évaluée de façon «tout ou rien», positif ou négatif, à l'aide d'un microscope en phase inversée (Leitz, Labovert FS). La fréquence de pousse des cellules clonogéniques dans la population d'intérêt a été estimée par le test du chi-carré.

2.2.6 Essais clonogéniques de progéniteurs hématopoïétiques

Les CSP de patients atteints de LNH ont été traitées avec le BPD-MA. Les CFU-GM ont été évaluées dans un milieu d'IMDM (Iscove's Modified Dulbecco Medium, GIBCO BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) additionné de

méthylcellulose 0.9%, SVF 30%, albumine bovine sérique 0.9%, 2-mercaptoéthanol 2×10^{-4} M et le milieu conditionné de la lignée cellulaire Mo (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA). Les cellules ont été mises en plaques à 10^5 cellules/ml dans des puits stériles de 35 mm (Lux, InterMed, Naperville, IL) et incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% en CO₂. Après 7 et 14 jours de culture, les CFU-GM ont été évaluées. Les agrégats de plus de 40 cellules étaient catégorisés comme colonies et ceux de 8 à 40 cellules, comme «clusters». Les colonies érythroïdes ont été cultivées dans le milieu de méthylcellulose ci-haut décrit additionné d'érythropoïétine à deux unités/ml (Amgen Biologicals, Thousand Oaks, CA). Les CFU-E ont été évaluées après 7 jours d'incubation tandis que les «bursts» multicentriques hémoglobinisés, plus immatures, l'ont été après 14 jours.

2.3 Résultats

2.3.1 *Effet dose-réponse du BPD-MA sur la déplétion de cellules lymphomateuses*

Afin de déterminer l'efficacité du BPD-MA sur la déplétion de cellules de LNH de lignée B, nous avons utilisé les lignées cellulaires Namalwa, Daudi et DHL-16 comme cible. Puis, pour simuler le contexte de greffons de CSP, ces cellules ont été mélangées à une quantité vingt fois plus élevée de CSPM normales irradiées. Ces mélanges cellulaires ont été traités avec des concentrations de BPD-MA variant de 0 à 80 ng/ml et mises en plaques pour des essais de dilution limite. Les cellules contrôles ont été exposées à la lumière avec le milieu seul, sans BPD-MA.

Les expériences faites avec les cellules DHL-16 et Daudi ont induit l'élimination de 2 à 4 logs de cellules lymphomateuses à des concentrations de BPD-MA égales ou supérieures à 30 ng/ml (Figures 9 et 10). Avec les cellules Namalwa comme cibles, plus de 3 à 4 logs de cellules lymphomateuses ont été éliminées à des concentrations de BPD-MA égales ou supérieures à 40 ng/ml (Figure 11). Les expériences contrôles faites avec ces trois lignées cellulaires, exposées à la lumière sans BPD-MA, ont présenté une légère diminution de leur fraction du nombre total de cellules mises en plaques initialement (Figures 9, 10 et 11).

Ainsi, tant pour les cellules lymphomateuses de haut grade (Daudi et Namalwa) que pour celles de bas grade (DHL-16), nous avons observé une augmentation de l'efficacité de purge par exposition à la lumière en présence de concentrations croissantes de BPD-MA. Mais, qu'est-il advenu des progéniteurs normaux dans ces conditions de traitement? Cette interrogation nous a incitée à explorer l'effet toxique du BPD-MA sur les cellules progénitrices hématopoiétiques normales.

2.3.2 Effet du BPD-MA sur les cellules progénitrices hématopoiétiques normales

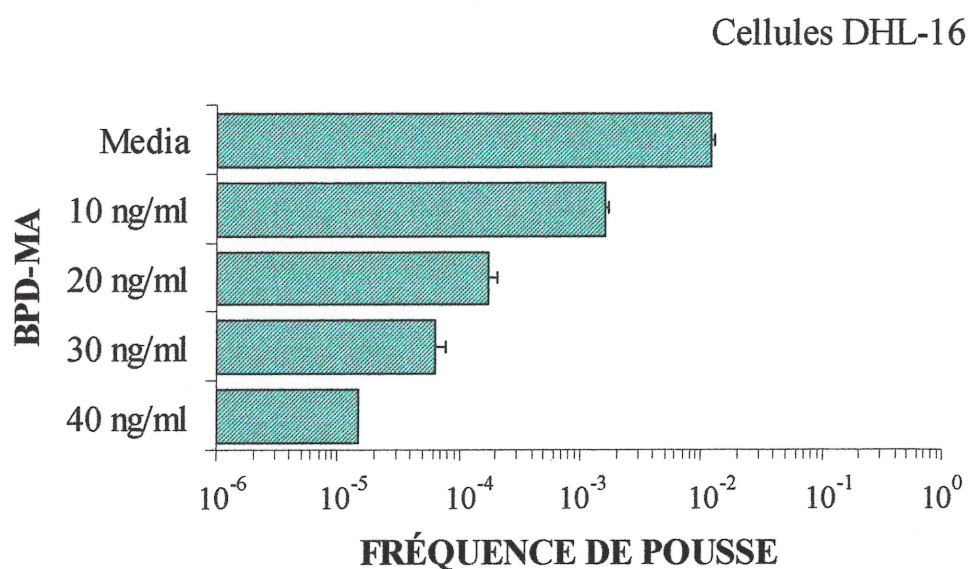
L'agent photosensibilisateur optimal pour la purge *in vitro* de CSP devrait, théoriquement, éliminer des quantités maximales de cellules tumorales tout en préservant un maximum de cellules progénitrices normales. Afin d'évaluer cette situation, des CSP prélevées de patients atteints de lymphome ont été incubées avec le BPD-MA à des concentrations variant de 0 à 80 ng/ml. La toxicité de l'agent envers les progéniteurs myéloïdes et érythroïdes a été évaluée et exprimée en terme de nombres résiduels de CFU-GM matures et immatures, de CFU-E, BFU-E et de colonies endogènes.

La toxicité du BPD-MA sur les cellules clonogéniques normales mobilisées en circulation périphérique de patients atteints de LNH était dose-dépendante, mais à plus faible niveau que sur les cellules tumorales testées précédemment. Plus précisément, avec les concentrations de BPD-MA ayant induit l'élimination de 2 à 4 logs de cellules lymphomateuses, soit 20-30 ng/ml, seulement 30% des CFU-GM immatures, 43% des CFU-GM matures, 24% des BFU-E et 40% des colonies endogènes ont été éliminés (Figures 12 et 13). Au-delà de 30 ng/ml de BPD-MA, aucune colonie progénitrice normale n'a subsisté.

En somme, nos résultats démontrent que l'index thérapeutique du BPD-MA a été atteint à des doses de 20 à 30 ng/ml, induisant des déplétions de deux à quatre logs de cellules lymphomateuses, de haut et de bas grade, tout en évitant un effet toxique important sur les progéniteurs hématopoiétiques normaux du sang puisque 60

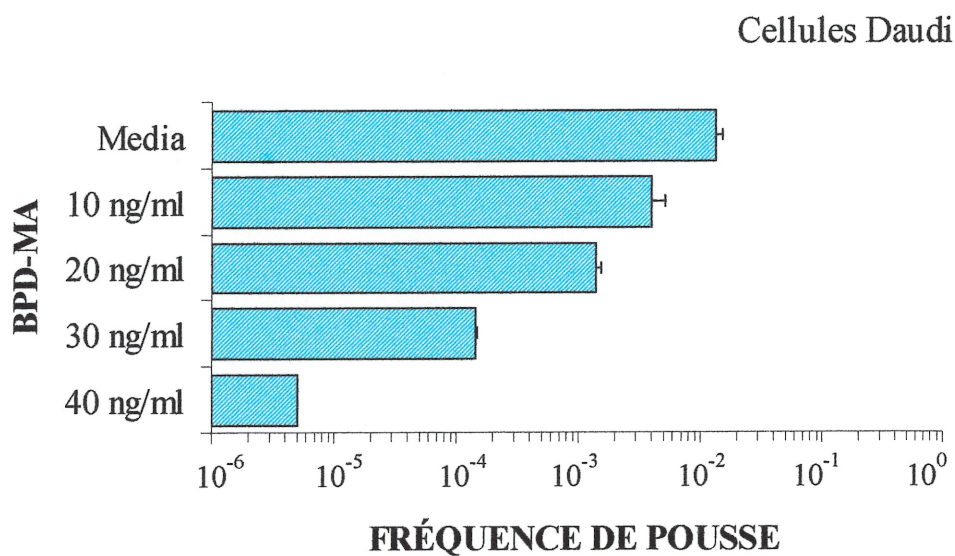
à 80% de colonies hématopoiétiques normales ont été préservés. Ces résultats permettront d'initier une étude clinique de Phase I utilisant cet agent pour la purge de CSP de sujets atteints de lymphome.

Figure 9. Effet du BPD-MA sur la déplétion de cellules DHL-16 dans des essais de dilution limite.



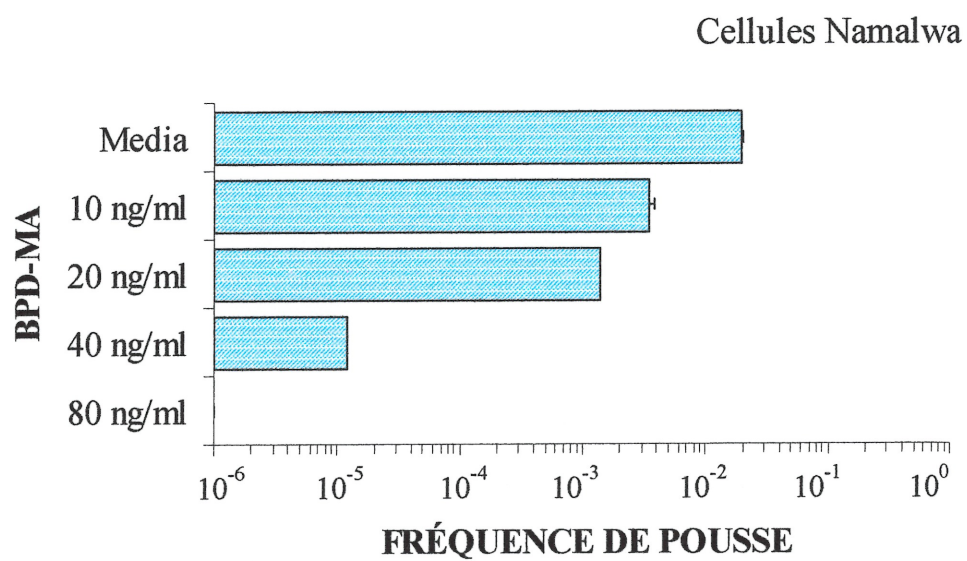
Les cellules DHL-16/CSPM normales irradiées (1/20) ont été incubées dans le milieu seul ou avec le BPD-MA à des concentrations variant entre 10 et 40 ng/ml. Le nombre de cellules clonogéniques post-traitement est exprimé en terme de fraction du nombre total de cellules mises en plaques (cellules tumorales + CSPM normales) (n=3). Valeurs moyennes de fréquence de pousse \pm SEM.

Figure 10. Effet du BPD-MA sur la déplétion de cellules Daudi dans des essais de dilution limite.



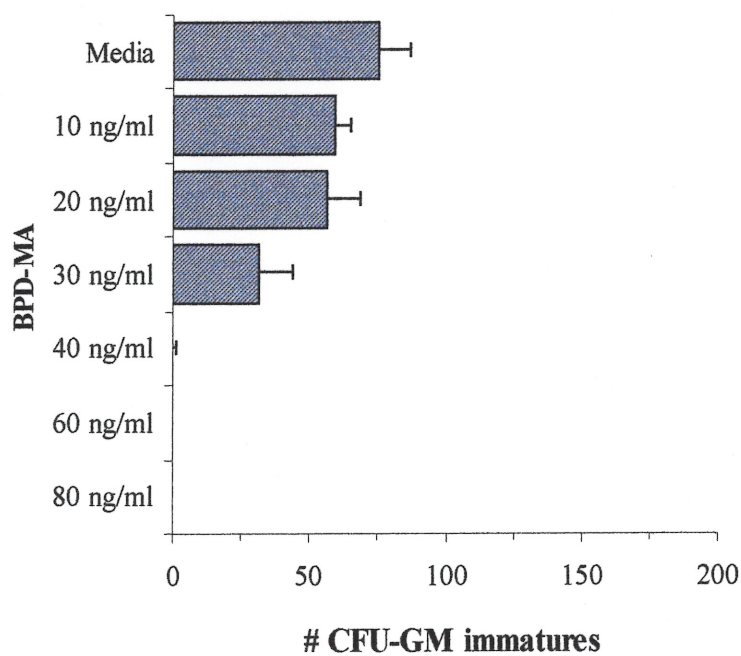
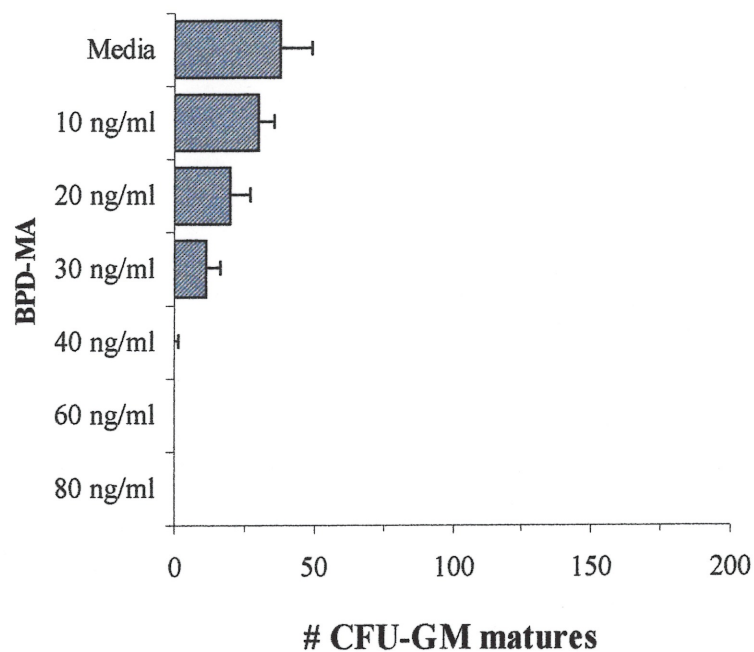
Les cellules Daudi/CSPM normales irradiées (1/20) ont été incubées dans le milieu seul ou avec le BPD-MA à des concentrations variant entre 10 et 40 ng/ml. Le nombre de cellules clonogéniques post-traitement est exprimé en terme de fraction du nombre total de cellules mises en plaques (cellules tumorales + CSPM normales) (n=3). Valeurs moyennes de fréquence de pousse \pm SEM.

Figure 11. Effet du BPD-MA sur la déplétion de cellules Namalwa dans des essais de dilution limite.



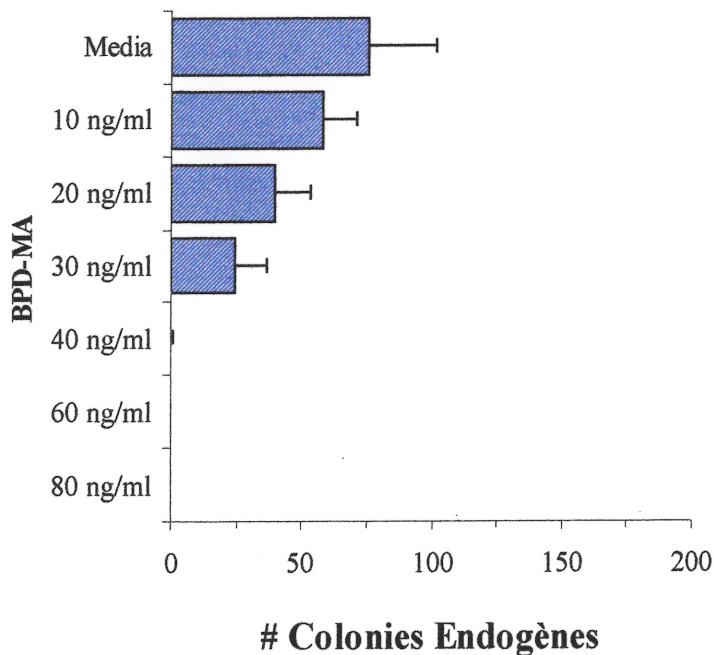
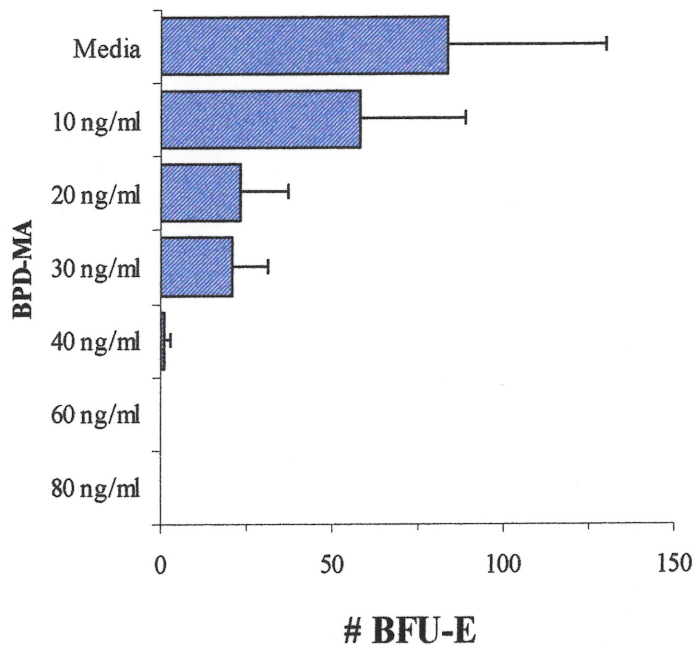
Les cellules Namalwa/CSPM normales irradiées (1/20) ont été incubées dans le milieu seul ou avec le BPD-MA à des concentrations variant entre 10 et 80 ng/ml. Le nombre de cellules clonogéniques post-traitement est exprimé en terme de fraction du nombre total de cellules mises en plaques (cellules tumorales + CSPM normales) (n=2). Valeurs moyennes de fréquence de pousse \pm SEM.

Figure 12. Évaluation de la toxicité du BPD-MA sur les progéniteurs hématopoïétiques normaux de patients atteints de LNH.



Les nombres de CFU-GM matures et immatures (colonies + clusters) ont été évalués (progéniteurs hématopoïétiques/ 2×10^5 cellules). (n=4)

Figure 13. Évaluation de la toxicité du BPD-MA sur les progéniteurs hématopoïétiques normaux de patients atteints de LNH.



Les nombres de BFU-E et de colonies endogènes (colonies + clusters) ont été évalués (progéniteurs hématopoïétiques/ 2×10^5 cellules). (n=4)

2.4 Discussion

L'autogreffe implique malheureusement la possibilité de contamination des greffons par des cellules malignes résiduelles tel que démontré dans des études de marquage génétique.^{90,153,154} C'est le cas du LNH en particulier, où des cellules malignes résiduelles persistent dans les greffons malgré des régimes de chimiothérapie intensive. Des études cliniques menées sur la transplantation de greffons purgés par diverses techniques (anticorps monoclonaux et complément, immunotoxines, ...) ont d'ailleurs prouvé l'avantage de survie de ces patients par rapport à ceux qui ont été traités avec des greffons autologues non manipulés.^{165,169-171}

Puisque les cellules malignes résiduelles, tant chez l'hôte que dans le greffon à infuser, peuvent influencer les taux de réussite des autogreffes, il s'agissait de trouver et d'évaluer l'utilité de la purge chez les patients atteints de LNH. Nos résultats ont mis en évidence la nécessité d'analyser chaque maladie individuellement quant à l'effet du BPD-MA. La fenêtre thérapeutique de cet agent semble varier d'une maladie à l'autre. La concentration de 30 ng/ml que nous avons évalué optimale pour détruire les cellules de LNH est plus élevée que celle des LMA ou LLA (20 ng/ml). Ces données sur les LMA et les LLA nous ont permis d'initier une étude clinique dans notre laboratoire. A cette concentration, le BPD-MA parvient à détruire plusieurs logs de cellules malignes tout en préservant un nombre optimal de progéniteurs hématopoiétiques normaux, source d'une reconstitution hématopoiétique efficace.

Ces résultats indiquent la possibilité d'un mécanisme d'action du BPD-MA différent dans les cellules lymphomateuses par rapport aux autres cellules tumorales, étant donnée la dose plus élevée requise dans ce type cellulaire. En effet, il a été récemment publié que la surexpression de Bcl-X_L ou de Bcl-2, dans les cellules de leucémie promyélocytaire HL60, bloque l'induction de caspase-3, le clivage de la polymérase poly(ADP-ribose) (PARP) et l'activation du «DNA Fragmentation Factor» (DFF), tous des événements tributaires de l'effet du BPD-MA sur les

cellules.^{181,182} Il est donc possible que la surexpression des membres de la famille bcl-2, caractéristique des cellules de LNH, rende ces cellules particulièrement résistantes aux effets d'agents photodynamiques.

Enfin, des études *in vivo* suggèrent que le BPD-MA pourrait également exercer son effet par l'activation de protéines de stress spécifiques (SAPK, p38 HOG1), suite à la production de singlets d'oxygène.¹⁸³ Des protéines de stress seraient ainsi spécifiquement activées dans les cellules de LNH.

2.5 Conclusion

Les résultats présentés ici suggèrent clairement que le BPD-MA présente une fenêtre thérapeutique pour les cellules de LNH, un des pré-requis de qualité des greffons autologues. Suite à cette étape, il s'agissait de trouver un moyen pour pallier la destruction des progéniteurs normaux post-purge. Ces derniers revêtent une grande importance en autogreffe puisque le temps de reconstitution hématopoïétique dépend principalement de trois facteurs soit, la quantité de progéniteurs engagés infusés, le temps requis par ces cellules pour produire les cellules plus matures et le nombre de cellules myéloïdes réinfusées en maturation ou au stade de post-progéniteurs.

Suite à la purge d'une majorité de cellules malignes, les nombres de progéniteurs normaux résiduels sont limités. Un traitement *ex vivo* de ces derniers, en présence de facteurs de croissance qui peuvent amplifier leur nombre et, si possible, exercer une purge tumorale additionnelle est une voie de thérapie à envisager. En effet, la culture de cellules CD34⁺ sélectionnées du SP mobilisé de patients atteints de LNH avec un cocktail défini de cytokine (SCF+IL-1beta+IL-3+IL-6), pendant 14 jours, a permis d'éliminer les cellules porteuses de la t(14;18).¹⁸⁴

Il faut noter que la purge tumorale par expansion *ex vivo* a aussi été démontrée dans un autre type de néoplasie hématologique, la leucémie myéloïde chronique ou LMC par le groupe de Vancouver. Mises en condition de culture à long terme, les cellules de LMC ne prolifèrent pas contrairement aux cellules résiduelles normales.¹⁸⁵ À cette étape du projet, notre intérêt s'est dirigé vers le traitement de la LMC à cause

des résultats prometteurs de manipulation *ex vivo* de ces cellules. De plus, un nouvel agent photosensibilisateur, le TH9402 (Theratechnologies Inc., Montréal, QC, Canada), moins toxique que le BPD-MA pour les progéniteurs normaux, était en plein développement pour les échantillons de LMC.

CHAPITRE 3

Expansion *ex vivo* des cellules souches hématopoïétiques
normales de patients atteints de leucémie myéloïde chronique:
accroissement du potentiel thérapeutique en autogreffe

Chapitre 3. Expansion *ex vivo* des cellules souches hématopoïétiques normales de patients atteints de leucémie myéloïde chronique: accroissement du potentiel thérapeutique en autogreffe

Ce troisième chapitre vise l'exploration de la manipulation *ex vivo* dans le contexte d'un autre type de néoplasie hématologique, la leucémie myéloïde chronique (LMC). Nous l'avons divisé en quatre sections principales. Nous débuterons par une mise en situation de la question afin de mieux comprendre l'impact de la manipulation *ex vivo* dans le traitement de la LMC. Nous poursuivrons avec la description de notre approche expérimentale. Dans la troisième section, nous décrirons nos résultats et finalement, la dernière section sera dédiée à l'interprétation de ces résultats et à l'exposition des questions qu'ils soulèvent.

3.1 Alternatives de traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC)

La leucémie myéloïde chronique (LMC) provient de l'expansion clonale d'une cellule souche hématopoïétique pluripotentielle possédant une translocation réciproque entre le «breakpoint cluster region» (*bcr*) et le gène cellulaire Abelson (*c-abl*). Le gène de fusion ainsi formé, code pour des protéines de fusion caractérisées par des propriétés différentes du produit protéique de *c-abl* (p145^{abl}), telles que leur localisation cytoplasmique plutôt que nucléaire et une activité tyrosine kinase accrue.^{186,187} Ces cellules primitives de LMC présentent des modifications dans leur contrôle de prolifération,^{188,189} dans leur probabilité d'auto-renouvellement,¹⁹⁰ dans leur réponse à des conditions induisant l'apoptose de leurs homologues normaux,^{191,192} dans leur expression accrue de récepteurs d'érythropoïétine¹⁹³ et de CD44,^{194,195} et dans leurs propriétés d'adhésion.¹⁹⁶ Ces caractéristiques anormales des progéniteurs de LMC sont associées à une capacité réduite de maintenir la croissance *ex vivo* dans des conditions de culture à long terme sur des cellules stromales hématopoïétiques. De plus, une faible proportion de cellules hématopoïétiques normales (Ph⁻), très primitives, parvient à persister chez les patients atteints de LMC

tant *in vitro* qu'*in vivo*.^{197,198} Un groupe de chercheurs de Vancouver a été pionnier dans l'utilisation de la culture à long terme avec support cellulaire stromal pour tirer profit de ces caractéristiques fonctionnelles des progéniteurs de LMC.^{185,199} Ils ont effectué des transplantations de greffons autologues de cellules progénitrices Ph⁻ et ont observé des périodes de survie prolongée, sans maladie, chez leurs patients. La principale difficulté de ces études était d'obtenir des quantités suffisantes de cellules hématopoiétiques normales lorsque les greffons étaient fortement infiltrés par des cellules malignes, une situation commune à plusieurs patients, puisque cette condition pouvait conduire à un retard ou une absence de reconstitution hématopoiétique.

Pour remédier à ce problème, plusieurs efforts ont été récemment faits quant à l'utilisation de cytokines dans un environnement sans stroma, afin d'amorcer la croissance des cellules hématopoiétiques des greffons et les faire proliférer, facilitant ainsi la prise du greffon. Différentes combinaisons de cytokines peuvent induire l'expansion du pool de cellules progénitrices hématopoiétiques normales.²⁰⁰⁻²⁰² Quelques études cliniques suggèrent que cette approche permet une prise de greffon avec un nombre de cellules initiales bien en-deçà des limites habituellement établies.^{26,203,204} De plus, l'exposition *in vitro* à des facteurs de croissance peut être particulièrement bénéfique, car elle diminuerait le temps de prise du greffon.^{205,206} La plupart des études ayant évalué l'expansion *ex vivo* de progéniteurs a été faite chez des patients qui présentent des tumeurs solides,²⁰⁴⁻²⁰⁶ en partie par crainte de l'expansion des cellules progénitrices malignes que pourraient promouvoir les facteurs de croissance hématopoiétiques.

Bien qu'il soit possible d'améliorer les caractéristiques de prise de greffon en faisant une splénectomie, cette approche envahissante est associée à une morbidité significative, et même la mortalité. De récents efforts ont été dirigés vers l'utilisation de facteurs de croissance pour activer les cellules hématopoiétiques normales de greffon *ex vivo* et induire leur expansion en vue de faciliter la reprise hématopoiétique. Plusieurs études indiquent la possibilité d'utiliser cette stratégie pour pallier la transplantation de quantités limitées de cellules. De plus, cette

approche permettrait aux patients transplantés de bénéficier d'une reprise hématopoïétique dans de plus courts délais.

Dans l'étude actuelle, nous avons défini des conditions de culture *ex vivo* pour des cellules CD34 sélectionnées de patients atteints de LMC afin d'induire l'expansion du faible nombre de cellules progénitrices normales présentes initialement en LMC et, parallèlement, la diminution de la charge tumorale de prélèvements autologues. Nous avons concentré nos efforts sur l'évaluation de cytokines possédant deux caractéristiques principales: action aux stades précoces, intermédiaires et tardifs de la différenciation, et disponibilité actuelle pour des essais cliniques. Afin de déterminer les implications des diverses cytokines sur la prolifération et la maturation cellulaires, l'expansion globale, les caractéristiques morphologiques et les propriétés clonogéniques des fractions cellulaires normales et leucémiques ont été mesurées. Finalement, l'impact de l'administration successive *in vivo* et *ex vivo* de facteurs de croissance a été évalué pour déterminer son effet sur le profil d'expansion différentiel des populations cellulaires normales et leucémiques.

3.2 Matériel et Méthodes

3.2.1 Échantillons cliniques

Les cellules de sang périphérique (SP) ont été prélevées de patients atteints de LMC et de donneurs sains volontaires, après avoir obtenu leur consentement informé, sous les protocoles approuvés par le Comité de Protection des Sujets Humains de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les caractéristiques des patients sont décrites au Tableau I: la médiane d'âge des patients LMC (n=10) était de 50.5 ans (échelle 25-67), avec six patients en phase chronique (PC), 2 en phase accélérée (PA) et 2 en phase blastique (PB). Pour les patients en phase chronique, la médiane de temps depuis le diagnostique était de 35.5 mois (échelle 10-96). Tous les patients avaient été traités à l'hydroxyurée et 5 d'entre eux, à l'interféron- α . Des échantillons de SP ont été prélevés de 6 patients et les cellules de SP des 4 autres ont été mobilisées par injection d'idarubicine, de cytosine arabinoside et d'étoposide (mini-ICE).²⁰⁷ Les cellules ont été anti-coagulées avec de l'héparine sans préservatifs puis soumises à la

sélection immunomagnétique des cellules CD34 positives (CD34⁺). Brièvement, les cellules ont été incubées avec des billes magnétiques recouvertes de l'anticorps monoclonal (mAc) 561 spécifique aux épitopes de classe III du CD34. Les cellules «rosetées» ont ensuite été isolées selon les instructions du manufacturier (Dyna, Oslo, Norway). Les billes immunomagnétiques ont été séparées de la surface cellulaire à l'aide d'anticorps polyclonaux qui reconnaissent la portion Fab du mAc 561 (DetachaBead CD34, Dynal). La pureté et l'efficacité de la sélection CD34 ont été évaluées par cytométrie de flux après le marquage des cellules avec un anticorps anti-CD34 directement couplé à la phycoérythrine (PE; clone 581; Beckman Coulter, Fullerton, CA). La proportion de cellules CD34⁺ des fractions isolées a varié entre 70 et 98% ($82 \pm 4\%$, moyenne \pm SEM) de la population cellulaire totale.

TABLEAU I. Caractéristiques des patients et de la maladie

No. Pt	Age	Sexe	Éch.	Mois post-Dx	Phase	% Ph+ pré-mob	Mob	%Ph+ pré-sél. CD34	%Ph+ post-sél. CD34
1	67	M	SP	36	PA		Auc.	90	95
2	52	M	SP	2	PA		Auc.	82	95
3	25	M	SP	18	PA		Auc.	68	94
4	58	M	SP	18	PB		Auc.	79	98
5	48	M	SP	10	PC		Auc.	87	98
6	50	M	SP	35	PC		Auc.	67	73
7	51	M	SPM	36	PC	67	mICE	0.5	6
8	50	M	SPM	31	PC	34	mICE	89	90
9	62	M	SPM	36	PC	85	mICE	83.5	98
10	40	F	SPM	96	PC	70	mICE	0.5	15

No.Pt indique chaque patient; Ech., échantillon; SP, sang périphérique; SPM, sang périphérique mobilisé; Dx, diagnostique; Phase, phase de la maladie; PA, phase accélérée; PB, phase blastique; PC, phase chronique; Ph, chromosome de Philadelphie; mob., mobilisation; Auc., aucune; pré-sél. CD34, pré-sélection des cellules CD34⁺; post-sél. CD34, post-sélection des cellules CD34⁺; mICE, miniIdarubicine/Cytarabine/Etoposide.

3.2.2 Cytokines recombinantes humaines

La Pixykyne321 (P), la protéine de fusion entre l'IL-3 et le «granulocyte-monocyte colony stimulating factor» (GM-CSF), et le ligand recombinant humain du Flt3 (FLrh) nous ont été généreusement donnés par Immunex Corporation (Seattle, WA). Le «granulocyte colony stimulating factor» recombinant humain (G-CSFrh) a été un généreux don de Amgen (Thousand Oaks, CA).

3.2.3 Conditions de culture cellulaire

La culture sans stroma de cellules CD34⁺ sélectionnées a été faite dans le milieu de culture X-Vivo 15 sans sérum (Biowhittaker; Walkersville, MD) additionné de 1% d'albumine humaine et 2% de L-glutamine. Les cellules ont été incubées en présence des cytokines suivantes, seules ou en combinaison: Pixykin321 (100 ng/ml), ligand du Flt3 (200 ng/ml), et G-CSF (100 ng/ml). Les cellules ont été mises en culture à 1 x 10⁵ cellules/ml en flasques (Nunc, Burlington, Canada) pendant 18 jours à 37°C avec 5% CO₂ d'air humidifié. Aux jours 6 et 12, la moitié de suspension cellulaire a été prélevée, puis remplacée par le même volume de milieu de culture frais et les mêmes combinaisons de cytokines déterminées initialement. Les cellules prélevées aux jours 0, 6, 12 et 18 ont été complètement diluées, comptées au Bleu de Trypan et analysées pour leurs caractéristiques clonogéniques, immunologiques et moléculaires.

3.2.4 Analyse de *bcr-abl* par Hybridation in situ en fluorescence (FISH)

Après 0, 6, 12 et 18 jours d'expansion, dans des conditions spécifiques de culture, les cellules ont été prélevées et des lames de cytopspin, préparées. Le gène de fusion *bcr-abl* a été identifié dans des noyaux en interphase par hybridation *in situ* en fluorescence de double fusion (D-FISH). Le D-FISH a été fait avec un mélange de sonde *bcr* directement couplé à la rhodamine et d'une sonde *abl* directement couplée au fluoroisothiocyanate (FITC) (Oncor, Gaithersburg, MD). Ce mélange de sonde produit un signal fluorescent de «fusion» sur les 2 chromosomes (9 et 22) dérivés de la translocation réciproque. Un minimum de 100 cellules a été évalué pour chaque échantillon sous microscope à fluorescence doté d'un filtre triple pour DAPI/FITC/Texas Red. La limite de détection pour les cellules *bcr-abl*⁺ sous ce protocole est de 2%.

3.2.5 Essais clonogéniques de progéniteurs à court terme («colony forming cells» ou CFC)

Les cellules sélectionnées CD34⁺ prélevées, avant ou après 6, 12 et 18 jours de culture, ont été mises en culture dans un milieu de méthylcellulose (MethoCult H4434; StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada) dans des pétris de culture en plastique de 35 mm, selon les instructions du manufacturier. Le nombre de «colony-forming units-granulocyte-monocyte» (CFU-GM) et de «burst-forming units-erythroid» (BFU-E) a été évalué, à l'aide d'un microscope inversé (Leitz, Labovert FS), après 14 jours de culture à 37°C dans une atmosphère entièrement humidifiée à 5% en CO₂

3.2.6 Couches stromales nourricières

Les couches stromales nourricières ont été établies, tel que décrit auparavant, dans un mélange 1:1 de la lignée cellulaire murine de fibroblastes médullaires M2-10B4 génétiquement manipulée pour produire de hautes concentrations de G-CSF humain et d'interleukine-3 (IL-3), combinée à la lignée cellulaire murine de fibroblastes embryonnaires SI/SI également manipulée génétiquement pour produire le «Steel Factor» et l'IL-3.²⁰⁸ Ces lignées cellulaires nous ont généreusement été données par Dr. D. Hogge, Vancouver, Canada. Les cellules stromales ont été mises en culture sur plaques de 96 puits plats enduits de collagène (Nunc Brand Products, Denmark) et irradiées avant les essais de LTC-IC, pour les essais en dilution limite (LDA).

3.2.7 Essais de «long term culture initiating cells» (LTC-IC): évaluation de l'expansion des LTC-IC par essai en dilution limite (LDA)

Au jour 0, de 0 à 1,000 cellules CD34⁺ par puits, ont été mises en plaques en conditions de dilution limite (au moins 12 réplicats pour chaque dilution) sur des couches stromales établies. Aux jours 6, 12 et 18 de culture liquide, les cellules ont été mises en plaques sur les couches de cellules nourricières et les cultures LTC-IC ont été maintenues pendant 5 semaines avec des remplacements hebdomadaires de la moitié du milieu LTC avec du milieu frais. À la fin de cette période, les puits

individuels ont été évalués pour déterminer la présence ou l'absence de «cobblestone area forming cells» (CAFCs) (zones compactes d'environ 15 cellules polygonales poussant sous la couche stromale, et non réfractaires à la lumière). Cette évaluation a été confirmée en couvrant chaque puits décanté avec 100 µl de MethoCult (StemCell Technologies, Inc.). Les puits ont ensuite été évalués quant à la présence ou à l'absence de CFC secondaires après 14 jours d'incubation à 37°C avec 5% CO₂.

3.2.8 Réaction en chaîne de transcriptase réverse-polymérase (RT-PCR)

L'ARN de colonies individuelles a été obtenu par le système d'extraction au Trizol (GIBCO BRL, Grand Island, NY) selon les recommandations du manufacturier. L'ARN extrait a été dissout dans 10 µl d'eau traitée au diethyl pyrocarbonate (DEPC), linéarisé à 65°C pendant 5 minutes, puis rapidement refroidi sur glace durant 2 minutes avant d'être soumis à la synthèse de cDNA. La PCR a été faite à l'aide d'un «Perkin Elmer Gene Amp PCR System» 9600. Pour l'amplification RT-PCR en une étape (SuperScript One-Step RT-PCR System, Gibco-BRL, Grand Island, NY), la synthèse du cDNA a été faite par une incubation de 30 minutes à 55°C suivie de la pré-dénaturation à 94°C pendant 2 minutes. Ces étapes initiales ont été suivies de 35 cycles de première PCR composés de la dénaturation à 94°C pendant 15 sec, de l'«annealing» à 60°C de 30 sec et de l'extension à 72°C de 30 sec.

L'amplification RT-PCR en une étape a été faite avec le cocktail de réaction suivant: 15 µl mélange de réaction 2X, 0.3 µl dithiothreitol (DTT), 0.5 µl chacune des amorces externes (25 pM/µl) (*bcr* 5' amorce sens 5' tacacgttcctgatctcctctgac 3'; *abl* 3' amorce antisens 5' tatcgattctgggcctcgaaaagt 3'; *abl* contrôle 5' amorce sens 5' atcacgccagtaacagtct 3'; *abl* contrôle 3' amorce antisens 5' gcgaaaccccgaacctattac 3'), 0.5 µl mélange SuperScript II RT/*Taq*, et 0.5 µl inhibiteur de RNase. Ce mélange de réactifs a été ajouté à chaque colonie individuelle préalablement diluée dans 8 µl d'eau traitée au DEPC. Cette première étape a été suivie d'une deuxième amplification par PCR nichée. Un quart du produit de première PCR (5 µl) a été ajouté à un mélange de réactifs composé de dNTP 2mM 10X 5 µl, tampon KCl 10X 5 µl, amorces internes 0.5 µl chacune (amorces internes: *bcr* 5' amorce sens 5'

tatgagcgtgcagagtg 3'; *abl* 3' amorce antisens 5' tcacaatagaggtgaccggt 3'; *abl* contrôle 5' amorce sens 5' gcaatgccgctgagtatctg 3'; *abl* contrôle 3' amorce antisens 5' cgggtggcaacttactactac 3'), eau stérile 30.5 µl et Taq DNA polymérase (5U/µl) dans un volume total de 50 µl. Les conditions de thermocycle consistaient en une première incubation à 94°C de 4.5 min, 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 15 sec, «annealing» à 60°C de 15 sec, extension à 72°C pendant 30 sec et une étape finale d'extension à 72°C durant 5 minutes.

Les produits de PCR nichée ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (2%) dans un tampon TAE 1X contenant du bromure d'éthidium 1X, visualisés, et photographiés sous lampe à UV. Le contrôle positif de la PCR était de l'ARN extrait de cellules K562 Ph⁺²⁰⁹ obtenues de l'«American Type Culture Collection» (ATCC) (Rockville, MD) et cultivées dans le milieu RPMI (GIBCO BRL, Grand Island, NY) contenant 10% de SVF. La stratégie ci-haut décrite a permis de contrôler la transcription réverse d'ARN et l'amplification d'ADNc des échantillons *bcr-abl*⁻ par l'amplification simultanée de l'ADNc d'*abl* pour chaque colonie. Les contrôles négatifs des PCRs consistaient en eau stérile traitée au DEPC au lieu de l'ARN.

3.2.9 Analyse statistique

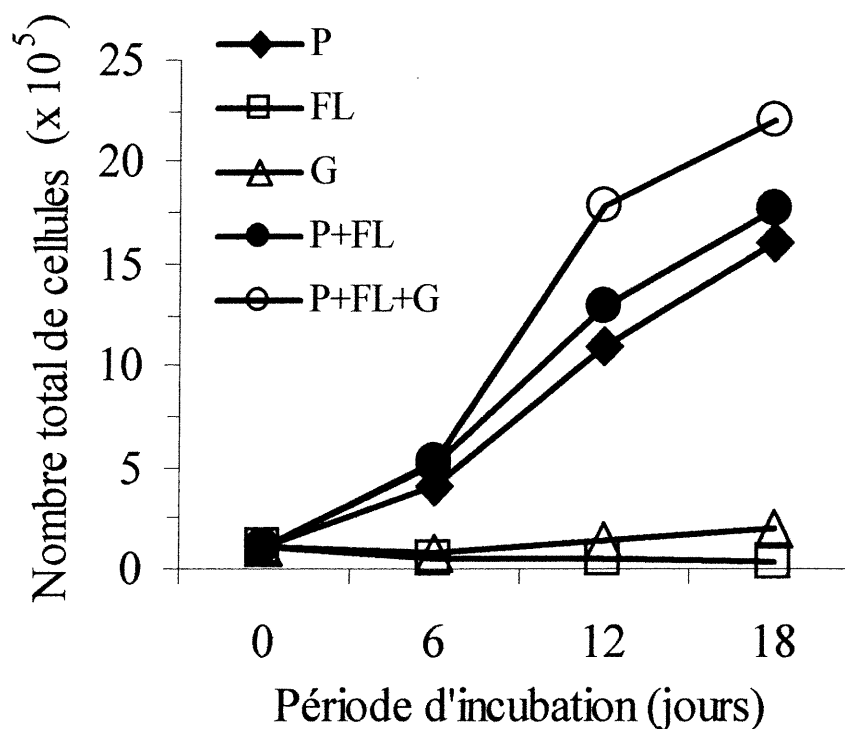
L'analyse statistique a été faite pour les essais de dilution limite en vue de déterminer la fréquence en LTC-IC. Pour ce faire, la minimisation en chi-carré a été utilisée.²¹⁰ Les comparaisons entre conditions de culture ont été effectuées à l'aide du test T de Student. Toutes les analyses ont été considérées comme étant significatives lorsqu'elles atteignaient le niveau alpha de .05.

3.3 Résultats

3.3.1 *Expansion de cellules CD34⁺ sélectionnées de patients atteints de LMC: rôle différentiel des facteurs de croissance*

L'expansion de cellules CD34⁺ de patients atteints de LMC a tout d'abord été évaluée suite à différentes périodes d'incubation avec des facteurs de croissance actifs à diverses étapes du processus de différenciation (Figure 14). Lors d'expériences préliminaires, les concentrations de P (100 ng/ml), de FL (200 ng/ml) et de G (100 ng/ml) avaient induit la prolifération optimale de cellules CD34⁺ de CSPM et de MO de donneurs normaux. Le nombre initial de cellules (10^5) CD34⁺ a été identique pour chaque combinaison de facteur de croissance. Ce nombre de cellules a été relativement maintenu au cours de la période de croissance avec G seul, puisqu'une expansion d'à peine 2 fois a été observée après 18 jours de culture. Lorsque FL a été utilisé seul, les nombres de cellules ont graduellement diminué, avec moins de la moitié du chiffre initial de cellules persistant à 18 jours. Par contre, P seul a induit une croissance cellulaire importante tout au cours de la période d'incubation avec une expansion de 11 fois déjà observée après seulement 12 jours et atteignant 16 fois après 18 jours. La combinaison de P à FL ainsi que P+FL+G a provoqué une amplification de la prolifération cellulaire et à 12 jours, P+FL+G a été plus efficace que P+FL ($p = 0.02$), tandis que cette dernière combinaison a exercé un effet semblable à P seul ($p = 0.29$).

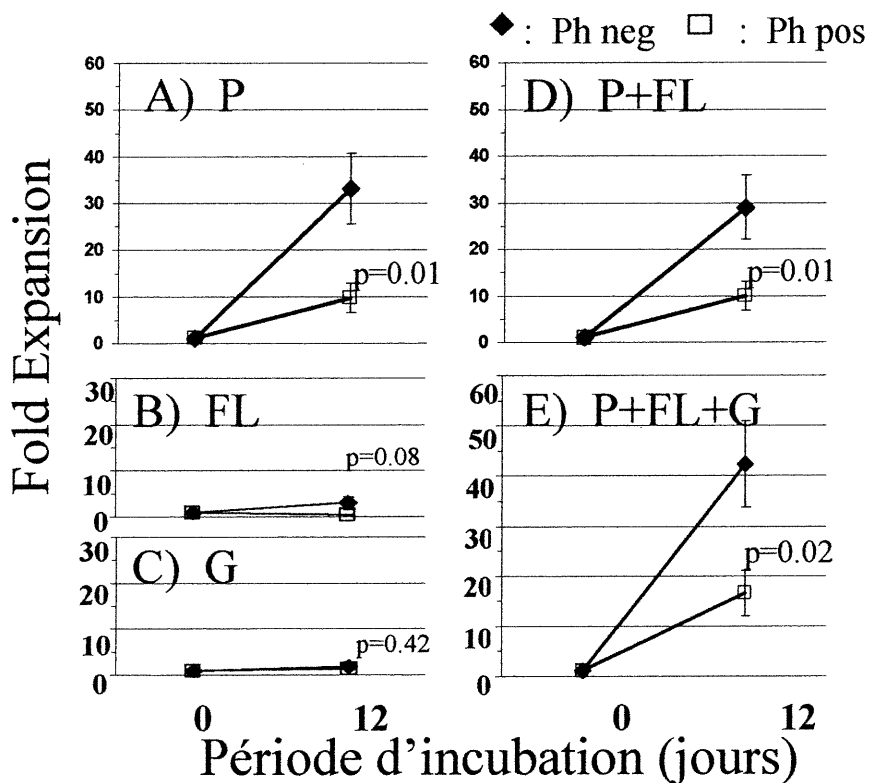
Figure 14. Expansion *ex vivo* de cellules CD34⁺ de patients atteints de LMC dans un système de culture sans stroma et sans sérum.



Les cellules ont été incubées *ex vivo* avec Pixykin321 (P) (100 ng/ml), Flt3-ligand (FL) (200 ng/ml), G-CSF (G) (100 ng/ml) seuls ou en combinaison. Les cultures liquides ont été établies à partir de 1×10^5 cellules. Les cultures ont été maintenues pendant 18 jours à 37°C. Les données sont présentées comme valeurs moyennes de 12 expériences individuelles.

La prolifération chez les patients atteints de LMC pourrait aussi bien impliquer les cellules leucémiques ($bcr-abl^+$) que les normales ($bcr-abl^-$). Afin de discriminer ces 2 populations, nous avons tiré profit de la capacité de sondes moléculaires à s'hybrider *in situ* au réarrangement $bcr-abl$ dans les noyaux en interphase. Après 12 jours de culture, les cellules $bcr-abl^-$ ont présenté un avantage de prolifération sur les cellules $bcr-abl^+$ lorsque P était le seul facteur de croissance utilisé ($p = 0.01$) (Figure 15). Cependant, cette discrimination entre les cellules normales et tumorales n'a pas été possible avec FL ($p = 0.08$) ou G ($p = 0.42$). Pourtant, l'addition de FL ($p = 0.01$) et de FL+G ($p = 0.02$) a amplifié l'expansion des cellules normales induite par P seul. D'ailleurs, la combinaison P+FL+G a induit l'expansion maximale de 33 fois des cellules $bcr-abl^-$. Ainsi, les combinaisons de facteurs de croissance incluant P ont induit l'expansion de plus de 15 fois des cellules de patients atteints de LMC et ont contribué à un profil d'amplification favorisant les cellules normales au détriment des cellules leucémiques.

Figure 15. Expansion des cellules normales (Ph^-) par rapport aux leucémiques (Ph^+) au terme de la période de culture des cellules CD34^+ sélectionnées de patients atteints de LMC, en conditions sans sérum.



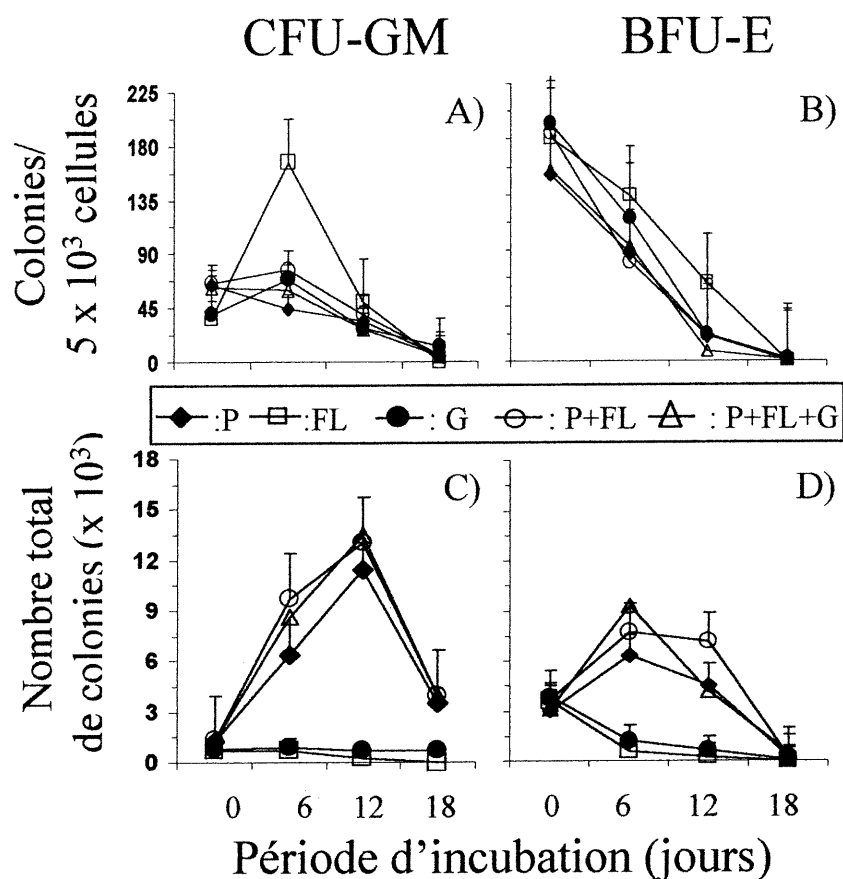
Les nombres relatifs de cellules normales et leucémiques ont été établis par D-FISH (double fluorescence *in situ* hybridization). Les nombres de cellules Ph^+ et négatives ont été comparés à leurs niveaux en pré-culture. A-E, fold expansion des populations de cellules normales et leucémiques prélevées après 12 jours de culture *ex vivo*. Les valeurs de fold expansion ont été significativement plus élevées pour les cellules Ph^- que pour les Ph^+ sous l'effet de P seul (A) ($p=0.01$), P+FL (D) ($p=0.01$) et P+FL+G (E) ($p=0.02$); tandis qu'aucune différence significative n'a été observée avec FL seul (B) ($p=0.08$) ou avec G seul (C) ($p=0.42$). Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm SEM de 12 expériences individuelles.

3.3.2 *L'effet des cytokines sur les progéniteurs CFU-GM et BFU-E*

Afin de déterminer l'effet de ces différentes cytokines sur le compartiment de cellules progénitrices, le potentiel clonogénique des cellules CD34⁺ de patients atteints de LMC a été évalué au départ, ainsi qu'après 6, 12 et 18 jours en culture dans les conditions précédemment définies. Tel que présenté à la Figure 16A, les cultures de 6 à 12 jours en présence de P, FL, P+FL et P+FL+G ont toutes été associées au maintien ou à une légère diminution en proportion des précurseurs clonogéniques myéloïdes. Cependant, la prolongation de la période d'incubation a induit une diminution du nombre de progéniteurs dans ces conditions sans stroma ni sérum. Par contre FL, comme facteur individuel, a induit une augmentation précoce (à 6 jours) du potentiel clonogénique de ces cellules, mais cet avantage de prolifération n'a été qu'éphémère. Le nombre total de progéniteurs CFU-GM produit par P, P+FL, et P+FL+G a rapidement augmenté dans le temps, atteignant une expansion de plus de 11 fois au douzième jour, mais a diminué rapidement par la suite (Figure 16C). Par contre, FL seul a été incapable d'augmenter le nombre total de progéniteurs myéloïdes avec des nombres de colonies diminuant au jour 12 et devenant non décelables au jour 18. Cependant, G seul a préservé un nombre identique de CFU-GM tout au long des 18 jours de culture.

Toutes les cytokines ont induit la diminution graduelle en proportion des progéniteurs érythroïdes au cours des 18 jours de culture (Figure 16B). Bien que l'érythroïpoïétine ou tout autre facteur de croissance de globule rouge n'ait été utilisé, le nombre total de progéniteurs BFU-E a légèrement augmenté dans chacune des 3 combinaisons de facteurs de croissance comprenant P, avec des quantités 2 fois plus élevées qu'initialement après 6 et 12 jours (Figure 16D). Tout comme les progéniteurs myéloïdes, les précurseurs érythroïdes ont considérablement diminué en nombre après 18 jours, à des niveaux presque non décelables dans le dernier cas. Tel qu'observé pour les progéniteurs myéloïdes, FL seul n'a pas su maintenir la croissance des cellules progénitrices érythroïdes.

Figure 16. Effet des cytokines sur les cellules progénitrices myéloïdes et érythroïdes de cellules CD34⁺ sélectionnées.



A) et B) représentent les nombres de cellules progénitrices myéloïdes (CFU-GM) et érythroïdes (BFU-E), respectivement, après 0 à 18 jours en culture liquide avec les cytokines identifiées aux figures précédentes, et ensuite testées en essais clonogéniques à court terme. C) et D) représentent les nombres absolus de cellules progénitrices myéloïdes et érythroïdes calculés en fonction de l'expansion des cellules totales à chaque point dans le temps. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM de 10 expériences différentes.

3.3.3 Expansion de progéniteurs normaux et leucémiques myéloïdes et érythroïdes

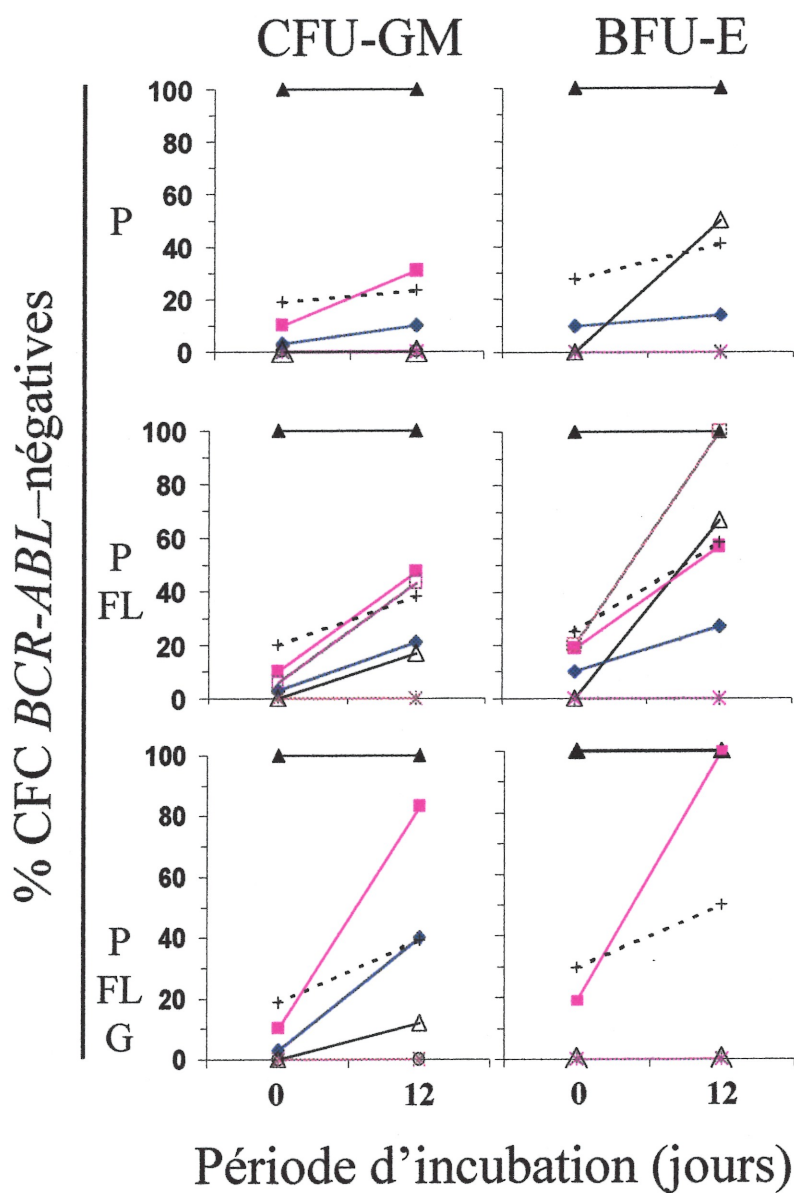
La production de cellules *bcr-abl*⁻ induite par les cytokines pourrait provenir soit d'une accélération de prolifération, soit d'une accélération de différenciation des progéniteurs engagés. Afin d'identifier la nature des progéniteurs après la stimulation aux facteurs de croissance, des colonies individuelles ont été évaluées pour leur expression de *bcr-abl* (Figure 17). Dans la plupart des cas, le nombre initial de colonies *bcr-abl*⁻ était, tel que prévu, très faible. Il constituait moins de 12% de toutes les colonies. Dans certains cas où toutes les colonies étaient *bcr-abl*⁺ avant l'expansion, aucune colonie normale n'a été identifiée post-incubation. Cependant, le patron dominant consistait en une augmentation du pourcentage de CFU-GM *bcr-abl*⁻, suite à la stimulation aux cytokines. De plus, même les échantillons sans progéniteurs myéloïdes normaux décelables en pré-culture ont présenté jusqu'à 16% de progéniteurs *bcr-abl*⁻ après culture. La proportion de progéniteurs *bcr-abl*⁻ a aussi augmenté parallèlement au nombre de cytokines utilisées. Nous avons également noté que, dans les échantillons où seules des colonies *bcr-abl*⁻ étaient détectées initialement, aucune des combinaisons de cytokines utilisées n'a généré de colonies *bcr-abl*⁺. De surcroît, dans tous les cas où une proportion de cellules clonogéniques *bcr-abl*⁺ était identifiable, aucune de ces cytokines n'a induit une augmentation du pourcentage de progéniteurs *bcr-abl*⁺.

En fait, l'expansion de progéniteurs myéloïdes associée au pourcentage accru de précurseurs *bcr-abl*⁻ s'est traduite en une expansion totale des progéniteurs myéloïdes non leucémiques allant d'un maximum de 8 fois avec P seul, jusqu'à 170 fois avec P+FL+G. Dans les mêmes conditions de traitement, l'expansion maximale de progéniteurs leucémiques a atteint seulement 2 fois avec P seul, et 8 fois avec P+FL+G.

L'expansion de progéniteurs érythroïdes normaux et tumoraux a été évaluée tel que pour les progéniteurs myéloïdes (Figure 17). Dans presque tous les cas, la

proportion initiale des colonies érythroïdes *bcr-abl*⁻ était en-deçà de 20%. Malgré tout, le pourcentage de cellules *bcr-abl*⁻ a augmenté après 12 jours de culture en présence des cytokines. Tel qu'observé pour les colonies myéloïdes, dans les circonstances où aucun progéniteur *bcr-abl*⁻ n'était décelable avant incubation, les facteurs de croissance ont induit la prolifération de progéniteurs normaux. Par ailleurs, les cytokines n'ont pas accentué la croissance de progéniteurs *bcr-abl*⁺ dans les échantillons où ils n'étaient pas initialement décelables. Dans le cas de quelques échantillons, il a été possible d'établir une comparaison entre les différentes combinaisons de cytokines, pour le même patient. C'est ainsi que P+FL+G a induit plus de croissance de progéniteurs normaux que P+FL, cette dernière combinaison étant aussi plus active que P seul. En terme d'expansion du nombre total de progéniteurs, la proportion accrue de colonies normales et le nombre légèrement amplifié de progéniteurs érythroïdes a conduit à l'expansion de 4 à 2300 fois le nombre de progéniteurs érythroïdes normaux, tandis que les nombres de progéniteurs leucémiques érythroïdes ont diminué de 1.4 à 12,000 fois. Ainsi, les combinaisons de cytokines comprenant P ont exercé un effet prolifératif sur les progéniteurs hématopoiétiques normaux des sous-groupes myéloïdes et érythroïdes de patients atteints de LMC.

Figure 17. Proportions des CFC *bcr-abl*⁻ avant et après 12 jours de culture en présence de P, P+FL et P+FL+G.

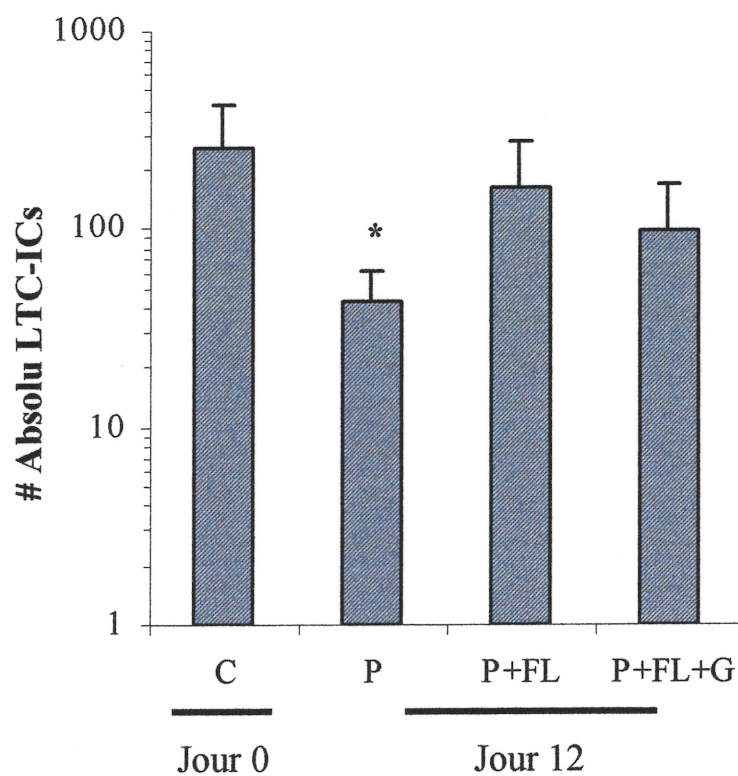


Chaque ligne représente le pourcentage de cellules *bcr-abl*⁻ de chaque patient. Les lignes pointillées (.....) représentent les valeurs moyennes à chaque condition.

3.3.4 Prolifération des LTC-IC normaux et leucémiques

Le potentiel de différenciation des cytokines utilisées pour l'expansion cellulaire aurait pu conduire à un changement dans le profil de maturation des cellules progénitrices, mettant potentiellement en péril la capacité des cellules traitées à reconstituer le système hématopoiétique à long terme. Ainsi, les cytokines ayant présenté un effet prolifératif sur les progéniteurs à court terme ont été évaluées pour leur effet sur les LTC-ICs. Tel que présenté à la Figure 18, une période de culture de 12 jours avec P seul a induit une diminution du nombre absolu de LTC-IC ($p=0.047$), tandis que le nombre de LTC-IC a été maintenu avec l'addition de FL, en présence ou non de G. Lorsque la période de culture a été prolongée à 18 jours, le nombre de LTC-IC a commencé à diminuer. Ces résultats indiquent donc que les combinaisons de cytokines testées avaient seulement une capacité limitée d'expandre les cellules progénitrices, mais pouvaient quand même maintenir leur prolifération jusqu'à 12 jours. De plus, FL a été un facteur déterminant dans la survie de ces progéniteurs primitifs suite au processus d'amplification.

Figure 18. Impact de la culture sur les 3 combinaisons comprenant P sur la croissance des LTC-ICs.



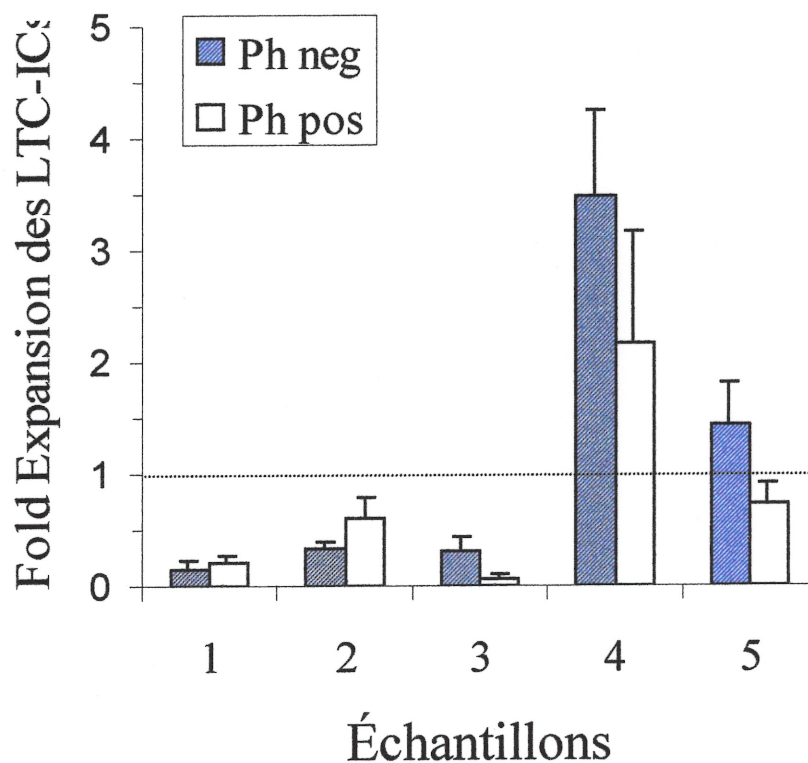
P seul n'a pas su maintenir les nombres initiaux de LTC-ICs (*: $p < 0.05$), mais l'ajout de FL avec ou sans G a rétabli la préservation de ces progéniteurs primitifs. C indique la valeur contrôle du nombre absolu des LTC-ICs au J0. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM.

Par la suite, les LTC-ICs ont été sous-divisées selon leur expression de *bcr-abl* pour déterminer si les progéniteurs non-leucémiques plus primitifs étaient induits à proliférer avec des profils semblables à ceux des progéniteurs plus matures (Figure 19). Le nombre de LTC-ICs normales et leucémiques est demeuré semblable après la période de culture dans les 3 combinaisons de cytokines contenant P. Les résultats individuels ont montré la persistance des LTC-ICs chez tous les patients, et une fréquence de LTC-IC accrue chez certains.

3.3.5 *Impact de la mobilisation in vivo sur l'expansion in vitro*

L'administration *in vivo* de chimiothérapie et de facteurs de croissance pour mobiliser les cellules souches, ainsi que les caractéristiques des patients et de la maladie, ont été évaluées pour déterminer si la réactivité des progéniteurs normaux et leucémiques pouvait être modifiée lors d'une restimulation subséquente avec des cytokines *in vitro*. Aucune différence n'a été observée dans l'expansion selon l'âge ou le sexe des patients, la durée de la maladie ou une thérapie par interféron au préalable. Cependant, les fractions *bcr-abl*⁺ de cellules totales et progénitrices à court terme ont présenté une expansion plus importante parmi les patients dont les CSH ont été mobilisées que parmi ceux où elles ne l'ont pas été (Tableau II). Ces résultats suggèrent que l'exposition cumulative à des facteurs de croissance pourrait induire l'entrée en prolifération des cellules malignes. Cependant, lorsque nous avons évalué l'effet de la mobilisation parmi les patients en phase chronique, la différence précédemment observée avait disparu et la mobilisation, au préalable, semblait plutôt empêcher l'expansion maximale des progéniteurs *bcr-abl*⁻ à court terme. De plus, les patients en phase accélérée ou blastique ont présenté une expansion induite par facteurs de croissance moins importante de leurs cellules *bcr-abl*⁺ que les patients en phase chronique. Par contre, l'expansion des cellules *bcr-abl*⁻ est demeurée identique pour les 2 groupes de patients. Malgré tout, l'expansion des cellules *bcr-abl*⁻ a toujours supplanté celle des cellules *bcr-abl*⁺ dans toutes les conditions testées.

Figure 19. Expansion des LTC-ICs normales et leucémiques au cours de 12 jours de culture.



Les résultats individuels pour les cellules $CD34^+$, de 5 échantillons de patients, exposées aux 3 combinaisons comprenant P indiquent une variabilité inter-patient. Cependant, dans tous les cas, la prolifération des LTC-ICs pourrait être documentée et impliquerait plus fréquemment les populations $bcr-abl^-$.

TABLEAU II. Impact de la mobilisation des cellules souches et de la phase de la maladie sur l'expansion des fractions de cellules normales et leucémiques.

Fold Expansion de:	Cellules Ph ⁺			Cellules Ph ⁻		
	SP	SPM	<i>p</i>	SP	SPM	<i>p</i>
Cellules totales	9.2±9.9	19.2±16.6	0.04*	33.4±24.7	33.0±26.7	0.97
CFU-GM	6.3±5.2	15.7±14	0.08	608.1±869.2	56.7±89.5	0.12
BFU-E	0.5±0.4	47.6±47.4	0.04*	1279.7±1490.3	12.3±6.8	0.06
LTC-IC	0.2±0.1	0.9±0.4	0.35	0.15±0.1	1.4±0.5	0.23
	PC/SP	PC/SPM	<i>p</i>	PC/SP	PC/SPM	<i>p</i>
Cellules totales	12.0±13.9	19.2±16.6	0.33	37.2±13.1	27.0±25.3	0.30
CFU-GM	11.3±5.5	15.7±15.1	0.65	1416.5±910.1	56.7±89.5	0.002*
BFU-E	1.9±1.8	47.6±51.9	0.28	2559.0±340.8	12.3±6.8	0.00001*
LTC-IC	1.19±0.63	0.38±0.14	0.20	1.81±0.82	0.48±0.17	0.11
	PC	PAB	<i>p</i>	PC	PAB	<i>p</i>
Cellules totales	15.6±15.3	7.8±7.3	0.06	36.1±23.0	31.2±29.0	0.57
CFU-GM	14.4±12.1	3.2±2.6	0.01*	358.9±648.9	69.2±88.1	0.50
BFU-E	40.9±46.9	0.4±0.4	0.04*	649.0±1186.0	0.4±0.4	0.48
LTC-IC	0.76±0.31	NF	NE	1.1±0.42	NF	NE

Ph indique chromosome de Philadelphie; CFU-GM, colony forming unit-granulocyte monocyte; BFU-E, blast forming unit-erythroid; LTC-IC, long-term culture initiating cell; SP, sang périphérique; SPM, sang périphérique mobilisé; PC, phase chronique; PAB, phases accélérée et blastique; *, valeurs significativement différentes; NF, non fait; NE, non évaluable

3.4 Discussion

Plusieurs études ont défini certaines conditions *in vitro* et des combinaisons de cytokines requises pour l'expansion des cellules souches hématopoïétiques normales.^{24,211-215} Cependant, la combinaison optimale de facteurs *ex vivo* cliniquement approuvés et capables d'induire l'expansion des cellules souches, progénitrices et matures, demeure encore à déterminer. De plus, la crainte de promouvoir la croissance de cellules malignes par les cytokines hématopoïétiques demeure fondée, surtout dans le cas des leucémies myéloïdes.^{216,217} Le microenvironnement cellulaire et l'exposition aux cytokines représentent des éléments cruciaux qui définissent la capacité des cellules normales et leucémiques à entrer en division et à maturer. La culture à long terme a été utilisée avec succès pour sélectionner les cellules progénitrices hématopoïétiques normales de greffons de cellules souches²¹⁸ et pour repeupler la MO de patients LMC après les traitements myéloablatifs.¹⁸⁵ De telles conditions de culture conduisent à une croissance dramatiquement altérée des progéniteurs leucémiques et un greffon Ph⁻ dans la plupart des cas. Cette capacité des systèmes de cellules stromales à promouvoir la prolifération des clones Ph⁻ a été confirmée et même amplifiée par l'ajout de facteurs de croissance exogènes.^{219,220} En effet, Petzer et al. ont mis en culture des cellules CD34⁺CD38⁻ de patients LMC dans un milieu dépourvu de stroma, avec un cocktail de cytokines composé de FL, SCF, IL-3, IL-6, et G-CSF. L'activité LTC-IC a été entièrement perdue, mais les types plus matures de «colony-forming cells» (CFC) Ph⁺ ont été préservés.

Dans l'étude actuelle, les cellules totales CD34⁺ de patients avec divers niveaux d'infiltration par les progéniteurs de LMC et à des stades avancés de la maladie, ont été mises en culture dans un environnement sans stroma ni sérum afin de déterminer l'expansion différentielle des cellules progénitrices normales par rapport aux malignes et d'évaluer l'application clinique de cette approche. De plus, 5 combinaisons différentes de cytokines, composées du ligand de Flt3 (FL), de la molécule de fusion entre IL-3 et GM-CSF (P), et de G-CSF (G), toutes trois ayant démontré un potentiel d'expansion *ex vivo* significatif lorsque testées sur des cellules

de donneurs «normaux», ont été évaluées pour leur capacité à induire une expansion sélective des cellules hématopoïétiques et des progéniteurs normaux de patients atteints de LMC. Nos résultats ont démontré que les combinaisons de cytokines comprenant P pouvaient induire l'expansion préférentielle des cellules totales Ph^- matures et même des progéniteurs immatures $bcr-abl^-$. De plus, l'expansion des cellules $bcr-abl^-$ a été induite chez des patients en phase avancée de la maladie, peu importe la proportion initiale de cellules normales et leucémiques. Nous pouvons présumer que ces résultats encourageants le seraient encore plus chez des patients en phase moins avancée de la maladie. Ces résultats fournissent aussi d'importantes pistes quant au potentiel de prolifération induit par les cytokines et les cinétiques de croissance compétitive des progéniteurs normaux de greffons composés tant de progéniteurs $bcr-abl^+$ que de progéniteurs $bcr-abl^-$.

Les cytokines FL et G, lorsqu'utilisées seules, n'ont pas démontré d'expansion significative des cellules totales ou progénitrices. De plus, la proportion de cellules normales et leucémiques est restée identique, après culture, en présence de ces cytokines. Bien que FL ait induit une soudaine augmentation précoce (à 6 jours) de la proportion de cellules clonogéniques, ceci a eu lieu dans un contexte de perte cellulaire globale, et a plutôt reflété une survie transitoire des progéniteurs, avec mort des cellules matures au lieu d'une réelle expansion. P a été le facteur seul le plus actif avec un potentiel d'expansion à tous les stades de maturation évalués. Par contre, avec ses 2 fractions IL-3 et GM-CSF, P ne peut pas être vraiment considéré comme un facteur de croissance individuel. Le potentiel de prolifération de P a été précédemment démontré dans les cellules normales où l'expansion de cellules progénitrices humaines des lignées tant myéloïdes que mégakaryocytaires a été observée, chez des primates.^{88,221} Bien que des études sur les cellules hématopoïétiques d'origine murine aient suggéré que IL-1, IL-3 ou l'expansion *ex vivo* elle-même puisse nuire à la capacité de reconstitution hématopoïétique à long terme des cellules souches,²²² leur utilisation chez les humains pour l'expansion *ex vivo* des greffons de SP, possédant moins de 10% du nombre habituel de $CD34^+$, a abouti à une reprise hématopoïétique rapide et maintenue, prouvant ainsi la sécurité

de ces cytokines.^{205,206,223} Dans le contexte des LMC, les progéniteurs leucémiques produisent l'IL-3 de façon endogène,^{224,225} laissant présumer que l'ajout supplémentaire d'IL-3 par le biais de P aux cellules de LMC puisse promouvoir la croissance des cellules leucémiques. Pourtant, nous avons observé l'induction préférentielle d'expansion des progéniteurs hématopoiétiques normaux aux dépens des progéniteurs leucémiques, bien que tous deux aient été exposés aux mêmes concentrations relativement élevées de cytokines. Cette réponse atténuée des cellules de LMC aux concentrations supra-physiologiques d'IL-3/GM-CSF exogène pourrait être expliquée par le contrôle à la baisse de leurs récepteurs ou des mécanismes altérés de signalisation des progéniteurs de LMC. Justement, des cellules Mo7e transfectées avec *bcr-abl* ne contrôlent pas seulement la chaîne commune β du récepteur d'IL-3/GM-CSF à la baisse, mais deviennent également insensibles à toute exposition supplémentaire aux agonistes de ces récepteurs.²²⁶ Les résultats actuels corroborent cette dernière observation en démontrant, pour la première fois, une réponse altérée des cellules primaires humaines de LMC à ces deux cytokines et donnant ainsi une explication possible à l'expansion préférentielle des sous-groupes cellulaires non leucémiques, après culture *in vitro*.

Lorsque la combinaison P+FL a été évaluée chez des donneurs normaux, elle a induit des expansions de cellules nucléées et de CFU-GM immatures en 7 jours de culture ainsi que des LTC-ICs et des cellules immatures $CD34^+Lin^-$.^{24,90} En combinaison avec GM-CSF, FL a aussi positivement affecté la thrombopoïèse.^{87,227} Bien que l'ajout de FL à P ait joué un rôle positif, quoique limité, sur l'expansion des cellules totales et des progéniteurs myéloïdes dans l'étude actuelle, les LTC-ICs ont augmenté de 4 fois comparativement à P seul, permettant ainsi de préserver les cellules progénitrices primitives. L'expression préférentielle de Flt3 sur les cellules souches hématopoiétiques pourrait expliquer cet effet bénéfique.^{209,214,215,228,229} Un avantage supplémentaire pourrait être noté. L'induction de maturation des progéniteurs LMC, par l'activité synergique de FL avec d'autres cytokines agissant aux stades précoces de l'hématopoïèse, augmenterait la croissance des cellules souches et progénitrices par le recrutement de ces cellules de l'état de quiescence à

l'entrée active en cycle.^{83,213,225} Cet effet promotionnel sur le cycle cellulaire des doses pharmacologiques de cytokines rendrait ces cellules plus sensibles à l'élimination par agents thérapeutiques.

Quant au G-CSF, il a eu un effet positif sur toutes les cellules matures, CFU-GM et BFU-E, et a augmenté la prolifération cellulaire de la fraction *bcr-abl*⁻. Par contre, cette cytokine n'a exercé aucun effet sur les cellules primitives LTC-ICs. Bien que cette cytokine ait plusieurs cibles cellulaires, à différents niveaux de la voie de différenciation granulocytaire, elle agit surtout sur les éléments les plus matures.^{230,231}

Les patients atteints de LMC peuvent entrer en rémission cytogénétique avec l'interféron ou des inhibiteurs de tyrosine kinase.²³² Malheureusement, une proportion élevée de patients n'atteindra pas un statut Ph⁻, ou deviendra résistante à la thérapie.²³² La majorité de ces patients n'a pas de donneur compatible. La transplantation allogénique leur devient impossible. La transplantation autologue est ainsi devenue une alternative de choix. Cependant, des études de marquage génétique ont démontré que les cellules malignes présentes dans les greffons autologues contribuent à la rechute après transplantation.¹⁵⁴ Aussi, l'élimination des progéniteurs de LMC des greffons de cellules souches représente-t-elle une tâche titanesque, surtout en raison du niveau très primitif des cellules souches dans lesquelles a lieu le réarrangement *bcr-abl* et la difficulté à séparer ces cellules des progéniteurs résiduels normaux. Par conséquent, des approches de traitement *in vitro* ont été conçues pour éliminer les cellules clonogéniques de LMC. Notons entre autres les agents chimiothérapeutiques tels que la mafosfamide²³³ ou le 5-fluorouracil,²³⁴ l'interféron gamma (IFN- γ),²³⁵ la sélection immunophénotypique,²³⁶⁻²³⁸ les oligonucléotides anti-sens,^{239,240} la culture à long terme^{185,199,241} et les agents photosensibilisateurs.^{162,242,243} Cependant, un des principaux obstacles de la purge *ex vivo* en LMC demeure le très faible nombre de cellules progénitrices normales présentes avant le processus de purge. Dans le contexte de stratégies de purge hautement efficaces et de greffons fortement infiltrés, seuls de faibles nombres de progéniteurs Ph⁻ parviennent à résister au traitement *ex vivo*, même lors de purges

très spécifiques.²⁴³ Le petit nombre de progéniteurs résiduels pourrait conduire à une prise du greffon altérée ou retardée. A cet effet, des études sur modèles murins ont montré que les cellules souches soumises à l'expansion *ex vivo* peuvent accélérer la reprise hématologique de souris, après myéloablation et transplantation de quantités accrues de cellules souches à fort potentiel de reconstitution à long terme.²⁴⁴⁻²⁴⁶ De plus, des études sur patients atteints de cancer du sein indiquent que, malgré un faible contenu en cellules CD34⁺, les greffons de cellules souches de SP, après expansion *ex vivo*, peuvent être infusés sans risque aux humains et conduire à une reprise hématopoïétique rapide et complète.^{205,206,223} Quelques études ont également suggéré que le processus de maturation, induit par les cellules après leur expansion *ex vivo*, peut aussi être bénéfique puisqu'il semble réduire la période d'aplasie.^{28,205}

La constatation que les combinaisons de cytokines comprenant P pouvait promouvoir la prolifération cellulaire des cellules CD34⁺ de patients LMC devrait inciter à développer des stratégies visant la purge de greffons de cellules souches. De plus, le recrutement de progéniteurs Ph⁻, induit par les facteurs de croissance, dans des greffons sans colonies Ph⁻ décelables initialement, rassure quant à la persistance de clones non leucémiques même chez des patients en stades avancés de la maladie.

Dans le futur, il faudra pouvoir déterminer quelle voie permet aux cytokines d'induire l'expansion préférentielle des progéniteurs normaux d'individus atteints de LMC. L'identification du rôle de la liaison stromale et d'autres cytokines deviendra cruciale pour dissocier les effets *in vivo* des effets *in vitro*, puisque l'exposition préalable *in vivo*, à des facteurs de croissance, a semblé altérer les réponses cellulaires *in vitro*.

Le système d'expansion *ex vivo*, décrit ici, n'a contenu ni stroma allogénique ou dérivé d'animaux ni sérum. De plus, il n'a renfermé qu'un nombre limité de facteurs de croissance approuvés cliniquement, facilitant significativement l'application clinique de cette méthodologie et favorisant une reprise hématopoïétique rapide. L'avantage prolifératif des cellules normales par rapport aux leucémiques dans toutes les conditions testées, même chez des patients à des stades avancés de la

maladie, est aussi très prometteur. En effet, la faible réponse des cellules leucémiques de patients en phase accélérée ou en phase blastique aux cytokines semble indiquer que l'activation endogène dépend potentiellement de leur dissociation des effets modulateurs des cytokines. Dans le contexte de la transplantation autologue de cellules progénitrices pour les patients atteints de LMC, où les clones non leucémiques ne représentent qu'une infime fraction cellulaire, une telle exposition à des cytokines sélectionnées devrait être plus qu'utile dans l'implantation de stratégies efficaces de purge et la diminution du temps de reprise hématopoiétique. Il sera également intéressant de mieux définir la capacité des combinaisons de cytokines susceptibles de promouvoir la prolifération des cellules progénitrices normales *in vivo* et de déterminer si cette stratégie peut être utilisée pour augmenter la réponse à d'autres agents thérapeutiques.

CHAPITRE 4

Profil de division des progéniteurs hématopoiétiques, une explication à la prolifération préférentielle des cellules normales par rapport aux leucémiques en expansion *ex vivo*

Chapitre 4. Profil de division des progéniteurs hématopoïétiques, une explication à la prolifération préférentielle des cellules normales par rapport aux leucémiques en expansion *ex vivo*

Fort de l'effet différentiel exercé par les différentes cytokines exogènes sur l'expansion des cellules progénitrices normales et leucémiques, nous pouvons maintenant aborder l'analyse des mécanismes susceptibles d'expliquer pareil phénomène. Les résultats du chapitre précédent ont suggéré que les cytokines GM-CSF/IL-3 (Pixykinine) (P), Flt3L (FL) et G-CSF (G) favorisent l'expansion des cellules normales (*bcr-abl*⁻) totales, des cellules progénitrices matures et immatures aux dépens des cellules leucémiques (*bcr-abl*⁺). À la lumière de ces résultats, nous avons émis les hypothèses suivantes quant aux réponses des cellules leucémiques suite à la culture *ex vivo* (Tableau III).

TABLEAU III. Hypothèses de réponse des cellules leucémiques à l'expansion *ex vivo* dans des conditions sans sérum et sans stroma médullaire.

	PROLIFÉRATION	DIFFÉRENCIATION	MORT CELLULAIRE
1-	√	√	√
2-	√	X	√
3-	X	√	√
4-	X	X	√

Tel qu'indiqué au Tableau III, les cellules leucémiques auraient pu réagir aux conditions de culture *ex vivo* définies au chapitre 3 selon 4 profils suivants: 1- suite à leur prolifération puis leur différenciation, elles pourraient mourir, 2- en proliférant, sans différenciation, elles mourraient finalement, 3- sans proliférer, elles se

différencieraient et mourraient, ou 4- sans prolifération ni différenciation, elles mourraient.

Nous avons donc entrepris de confirmer ou d'infirmier ces hypothèses dans le présent chapitre. Nous débuterons avec la description des échantillons et techniques utilisés, puis procéderons à l'exposition des résultats. Nous terminerons par la signification que revêtent ces derniers.

4.1 Matériel et Méthodes

4.1.1 Patients et échantillons cliniques

Les échantillons de sang périphérique (SP) hépariné ou de produits de phérèse ont été obtenus, après consentement, de patients atteints de LMC et de donneurs. Les protocoles cliniques ont été préalablement approuvés par le Comité de Protection des Sujets Humains de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les caractéristiques cliniques des patients sont présentées au Tableau IV. Tel que décrit au Chapitre 3, les cellules CD34⁺ des différents échantillons ont été sélectionnées par tri immunomagnétique en utilisant des billes couplées à un anticorps anti-CD34, selon les instructions du manufacturier (DynaL, Oslo, Norvège).

Les cellules mononucléées des échantillons de SP diluées dans la « Hank's Balanced Salt Solution Ca²⁺- Mg²⁺-free» (HBSS) (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) ont été isolées par centrifugation à l'aide du gradient de densité Ficoll-Hypaque (Ficoll-Paque; Pharmacia, Piscataway, NJ). Les produits de phérèse ont été soumis à un lavage plaquettaire à 800 x g pendant 5 minutes à la température de la pièce.

TABLEAU IV. Données cliniques des échantillons de leucémie myéloïde chronique utilisés

Exp.	Symb.	Nat.	Tx ant.	Mob.	Stade	J0†	J6†		
							P	P+FL	P+FL+G
L.1	◆	SP	HU	Auc.	PC	73%	72%	70%	79%
L.2	■	SP	HU	Auc.	PC	73%	72%	70%	79%
L.3	▲	SP	HU	Auc.	PA	95%	95%	80%	87%
L.4	×	SPM	HU	mICE	PC	1%	ND	2%	2%
L.7	✱	MO	HU	Auc.	PC	90%	78%	83%	85%
L.8	+	SPM	HU	mICE	PC	1%	1%	1%	2%
L.9	○	SPM	HU	mICE	PC	89%	65%	78%	87%
L.10	●	SP	HU	Auc.	PC	98%	70%	64%	71%

Exp. indique l'expérience; Init., les initiales de chaque patient; Nat., la nature de l'échantillon utilisé; SP, sang périphérique; SPM, sang périphérique mobilisé; MO moëlle osseuse; Tx ant., traitements antérieurs; Mob., le type de mobilisation; Auc., aucune mobilisation; mICE, miniIdarubicine/Cytarabine/Etoposide; PC, phase chronique; PA, phase accélérée; Ph, chromosome de Philadelphie; ND, non déterminé; J0, jour initial de culture en milieu liquide; J6, jour 6 de culture en milieu liquide; †, pourcentage de cellules Ph⁺ déterminé par D-FISH; P, Pixykine321; FL, Flt3-ligand; G, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF).

4.1.2 Cytokines recombinantes humaines

La Pixykine321 (IL-3/granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) fusion protein) et le ligand recombinant humain Flt3 (rhFL) nous ont généreusement été fournis par Immunex Corporation (Seattle, WA). Le «granulocyte colony stimulating factor» recombinant humain (rhG-CSF) a été un généreux don de Amgen (Thousand Oaks, CA).

4.1.3 Marquage au CFSE

Une solution stock à 5 mM de CFSE [5-(et -6)- carboxyfluoresceine diacétate succinimidyl ester, Molecular Probes, Eugene, OR] préparée dans du DMSO, conservée à -80°C, a été ajoutée aux cellules CD34⁺ diluées à 5 x 10⁶ cellules/ml dans une solution de HBSS, à une concentration finale de 2.5 µM. Suite à une incubation à 37°C de 10 minutes, les cellules ont été lavées à 3 reprises dans une solution froide de HBSS/10% SVF afin d'interrompre le mouvement intracellulaire de colorant, selon la méthode décrite par Lyons & Parish (1994).²⁴⁷ La fluorescence cellulaire a été stabilisée par incubation de 15 heures des cellules à 37°C dans le milieu de culture composé de milieu X-Vivo 15 + 2% L-glutamine + 1% pénicilline-streptomycine + 1% Albumine humaine), une technique modifiée de Nordon RE et al. (1997).²⁴⁸

4.1.4 Conditions de culture cellulaire

Les cellules CD34⁺ colorées au CFSE ont été diluées dans un milieu sans sérum et sans stroma, composé de milieu X-Vivo 15 (Biowittaker; Walkersville, MD) auquel nous avons ajouté 1% d'albumine humaine, 2% L-glutamine avec les cytokines suivantes seules ou en combinaison: Pixykin321 (P) (100 ng/ml), ligand du Flt3 (FL) (200 ng/ml), G-CSF (G) (100 ng/ml), P (100 ng/ml) + FL (200 ng/ml) et P (100 ng/ml) + FL (200 ng/ml) + G (100 ng/ml). Les cellules ont été cultivées sur plaques de 12 puits (Nunc, Burlington, Canada) à 1 x 10⁵ cellules/ml et incubées à 37°C avec 5% CO₂ dans une atmosphère entièrement humidifiée pendant 6 jours. Les cultures cellulaires ont été nourries tous les 2 jours par semi-déplétion, puis on ajoute le milieu de culture complet avec cytokines, aux mêmes concentrations qu'initialement. La cinétique de croissance des cellules au cours des 6 jours de culture et le profil de prolifération au jour 6 ont été faits par analyse de cytométrie en flux.

4.1.5 Anticorps

Les expressions de CD34 et CD38 ont été évaluées du jour 0 au jour 6 de culture avec les anticorps suivants: anti-CD34 couplé à la phycoérythrine (PE), anti-CD38 couplé à la phycoérythrine-cytochrome 5 (PECy5) (Beckman Coulter, Fullerton, CA). L'immunoglobuline G de souris conjuguée à la PE ou à la PE-Cy5 a été utilisée comme contrôle isotypique. De plus, les récepteurs de portions Fc à la surface cellulaire ont été bloqués par incubation des cellules avec l'immunoglobuline de souris (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Ontario, Canada).

4.1.6 Évaluation in vitro d'apoptose

L'apoptose a été évaluée par cytométrie en flux en 3 ou 4 couleurs avec l'anti-Apo2.7-PECy5 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) ainsi qu'avec l'AnnexineV biotinée révélée par la Streptavidine-APC. L'AnnexineV (PharMingen, San Diego, CA) a été utilisée tel que suggéré par la compagnie. Pour ce faire, 1×10^5 cellules, diluées dans 100 μ l de tampon de liaison, ont été incubées à une dilution 1/20 avec une solution d'AnnexineV-Biotine pendant 15 minutes à la noirceur, à la t°p. Ces cellules ont ensuite été lavées et l'AnnexineV, révélée avec Streptavidine-APC (SAV-APC) (Cedarlane, Hornby, Ont, Canada). Le 7-Amino-Actinomycine D (7-AAD) (PharMingen, San Diego, CA) a été ajouté (à 0.25 μ g/ 2×10^5 cellules) aux différents temps de la période de culture pour discriminer les cellules viables des non viables. Des cellules marquées uniquement à la SAV-APC ont été utilisées comme contrôles permettant de déterminer les quadrants d'analyse de fluorescence. L'analyse par cytométrie en flux a suivi.

4.1.7 Analyse par cytométrie en flux

Du jour 0 au jour 6 de culture, les cellules marquées au CFSE ont été comptées par exclusion au Bleu de Trypan, incubées avec les anticorps ci-haut mentionnés, puis analysées sur un appareil FACScan™. Elles ont aussi été triées à l'aide d'un appareil FACSort™ (Becton Dickinson, San Jose, CA) ou du MoFlo High Speed Sorter (Cytomation Inc., Fort Collins, CO).

Les sous-populations de phénotype CD34/CD38/AnnexineV et CD34/CD38/Apo2.7 ont été analysées selon leur profil de division (fluorescence en FITC du CFSE). La fluorescence-contrôle de cellules non divisées a été déterminée par culture de cellules dans un milieu sans facteurs de croissance.

La sous-population de cellules immatures CD34⁺CD38⁻ a été triée selon le nombre de divisions cellulaires par sa fluorescence en FITC, puis analysée par coloration au Wright-Giemsa, par essais clonogéniques de progéniteurs et par hybridation *in situ* en fluorescence, pour les échantillons leucémiques. Les pourcentages de CFCs *bcr-abl* positives et de cellules Ph⁺ ont ainsi été déterminés selon le nombre de divisions cellulaires de la sous-population CD34⁺CD38⁻.

4.1.8 Analyse par hybridation in situ en fluorescence (FISH)

Aux jours 0 et 6 de culture, les cellules totales ainsi que les cellules triées CD34⁺CD38⁻ aux divisions 0 à n ont été centrifugées sur lame par cytopspin pour être ensuite soumises à l'analyse par FISH. Brièvement, la technique de double-FISH (D-FISH) a été faite avec une sonde spécifique à la séquence en ADN de *bcr*, directement couplée à la rhodamine et avec une sonde spécifique à celle d'*abl* couplée au FITC (Oncor, Gaithersburg, USA). Le gène de fusion, entre les signaux rouge et vert, apparaît comme un signal jaune. Le système D-FISH permet en plus de visualiser le signal de fusion fluorescent sur les 2 chromosomes 9 et 22, dérivés de la fusion, impliqués dans la translocation du chromosome de Philadelphie. Un minimum de 100 cellules a été évalué dans chaque condition, permettant ainsi d'établir les pourcentages de cellules normales et leucémiques dans chaque situation.

4.1.9 Essais clonogéniques de progéniteurs

Les cellules CD34⁺ avec ou sans tri aux jours 0 et 6 de culture, diluées dans le milieu de méthylcellulose MethoCult (H4434; StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada), ont été mises en plaques dans des puits de 35 mm et leur contenu en cellules progénitrices, a été évalué selon les instructions du fabricant. Les colonies ont été observées à l'aide d'un microscope inversé (Leitz, Labovert FS),

après 14 jours de culture à 37°C dans une atmosphère humidifiée, à 5% CO₂ en air. Les colonies ont été classifiées comme CFU-GM, BFU-E ou CFU-GEMM.

4.1.10 Réaction en chaîne de transcriptase réverse-polymérase (RT-PCR)

Les colonies individuelles ont été prélevées du milieu de méthylcellulose et leur ARN a été directement extrait, soumis à la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) ainsi qu'à une première amplification par PCR en une même étape, en utilisant la trousse de RT-PCR en une étape de QIAGEN (QIAGEN Inc., Ont., Canada). La réaction a été faite selon les instructions du manufacturier. Les contrôles positifs consistaient en ARN extrait de colonies positives à 100% en *bcr-abl*, provenant d'un patient atteint de LMC. Les contrôles négatifs étaient des échantillons d'eau traitée au DEPC remplaçant l'ARN.

L'extraction d'ARN, sa synthèse en ADNc et l'amplification par RT-PCR (QIAGEN One-Step RT-PCR Kit, QIAGEN Inc., Ont., Canada) ont été faites avec le cocktail suivant pour chaque colonie: tampon 5X d'enzyme RT/*Taq* 5 µl, dNTP (10mM) 1µl, amorces externes 0.5 µl chacune (25 pM/µl) (amorce sens 5' *bcr* 5' tacacgttctgatctcctctgac 3'; amorce anti-sens 3' *abl* 5' tatcggattctgggcctcgaaaagt 3'; amorce contrôle sens 5' *abl* 5' atcacgccagtcacagctct 3'; amorce contrôle anti-sens 5' *abl* 5' gcgaaaccccgacctattac 3'), , inhibiteur de RNase (40U/µl) 0.15 µl, mélange d'enzymes RT/*Taq* 0.5 µl et 14.35 µl d'eau traitée au DEPC. Chaque colonie a été directement diluée dans ce mélange.

Une PCR nichée a suivi. Un quart du produit de première PCR (5 µl) a été ajouté à un mélange de réaction composé de dNTP 2mM 10X 5 µl, tampon KCl 10X 5 µl, amorces internes 0.5 µl chacune (amorces internes: amorce sens 5' *bcr* 5' tatgagcgtgcagagtg 3'; amorce anti-sens 3' *abl* 5' tcacaatagaggtgaccggg 3'; amorce contrôle sens 5' *abl* 5' gcaatgccgctgagtatctg 3'; amorce contrôle anti-sens 3' *abl* 5' cgggtggcaacttactactac 3'), eau stérile 30.5 µl et *Taq* DNA polymérase (5U/µl) dans un volume total de 50 µl. Suite à une incubation initiale à 94°C, 4.5 min, 35 cycles de dénaturation ont suivi à 94°C, 15 sec, 60°C, 15 sec, 72°C, 30 sec et une étape finale d'extension à 72°C, 5 min.

Les produits de PCR nichée ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% dans un tampon de TAE 1X avec Bromure d'Ethidium 1X, visualisés et photographiés sous UV.

4.1.11 Analyse des résultats

Les moyennes de groupes ont été comparées par analyse de variance de facteurs individuels et par tests de signification statistique. Les différences significatives entre données paires ont été évaluées par le test-T de Student.

Après six jours de culture et suite à la définition par cytométrie en flux des cellules progénitrices $CD34^+CD38^-$, le pourcentage de cellules de cette sous-population à chaque pic de fluorescence en CFSE a été déterminé par des marqueurs d'histogramme (technique modifiée de Nordon NE et al., 1997).²⁴⁸ Le ratio relatif de cellules appartenant à chaque pic a été exprimé comme un pourcentage du total.

4.2 Résultats

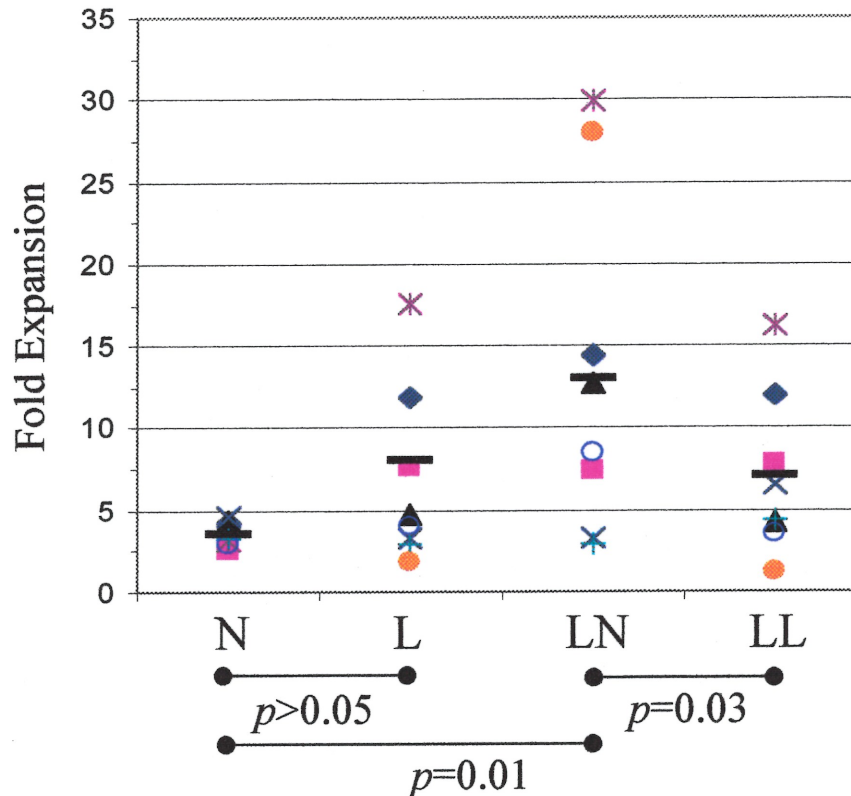
4.2.1 Expansion ex vivo des cellules normales et leucémiques

L'expansion des cellules totales d'individus normaux et de patients atteints de LMC a été évaluée à la suite d'une incubation avec des cytokines actives à diverses étapes du programme de différenciation hématopoïétique (Figure 20). Les cytokines P, FL et G ont été utilisées aux concentrations de 100 ng/ml, 200 ng/ml et 100 ng/ml, respectivement, tel qu'indiqué au Chapitre 3. La période de culture de six jours a été apparemment trop courte pour observer l'effet prolifératif différentiel des combinaisons de cytokines (P, P+FL et P+FL+G) ($p>0.05$), pourtant présent après douze jours (Chapitre 3). Ainsi, les résultats d'expansion obtenus avec P, P+FL et P+FL+G ont été combinés pour chaque échantillon à cette étape de l'étude.

En seulement six jours de culture *ex vivo*, les cellules Ph^- (LN) ont présenté l'augmentation (Fold Expansion) la plus importante en nombre de cellules totales (13.3 ± 2.3 ; moyenne \pm SEM), une expansion significativement plus élevée que celle, tant de la fraction leucémique des mêmes échantillons (LL) (7.0 ± 1.2) ($n=23$) ($p=0.03$)

que des échantillons de donneurs normaux (3.9 ± 0.5) ($n=6$) ($p=0.01$) (Figure 20). Plus particulièrement, parmi les échantillons leucémiques, une échelle de croissance des cellules totales a pu être établie: les cellules LN des échantillons plus infiltrés ($>70\%$ de cellules Ph^+ au J0) (cf. Tableau IV et Figure 20) présentant une expansion plus élevée (15.6 ± 2.52) ($n=18$) que celle de la fraction leucémique (7.23 ± 1.4) ($n=18$) ($p=0.003$) et supérieure aussi à celle des cellules LN des échantillons peu infiltrés ($<2\%$ de cellules Ph^+ au J0) (3.18 ± 0.48) ($n=5$) ($p=0.04$). Les cellules Ph^- d'échantillons peu infiltrés initialement (L4 et L8) ont proliféré de façon similaire aux cellules normales d'échantillons N ($2.3 \pm 0.5x$ et $3.9 \pm 10.5x$, respectivement) ($p=0.05$). Les nombres initiaux de cellules Ph^- n'ont pas influencé les profils d'expansion ci-haut mentionnés.

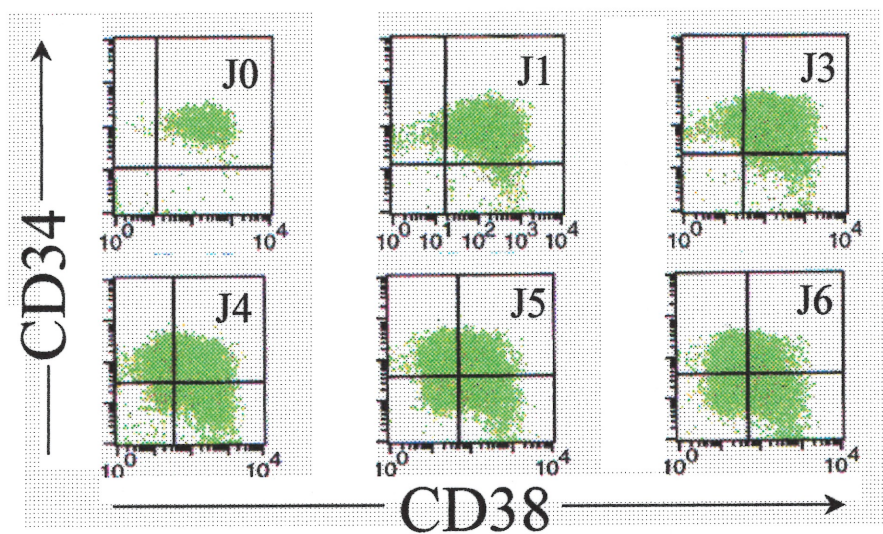
Figure 20. Expansion *ex vivo* des cellules d'échantillons normaux (N), et d'échantillons leucémiques (cellules Ph^- ou LN, et Ph^+ ou LL).



Des cellules CD34^+ , sélectionnées d'échantillons normaux (N) et d'échantillons leucémiques (L), ont été mises en culture pendant 6 jours dans un milieu sans sérum et sans stroma additionné des cytokines $\text{P}\pm\text{FL}\pm\text{G}$. Au J0 et au J6 de culture *ex vivo*, le pourcentage de cellules bcr-abl^- (LN) et bcr-abl^+ (LL) des échantillons leucémiques a été déterminé par hybridation *in situ* fluorescente-double (D-FISH) tel que décrit dans la section *Matériel et Méthodes*. Chaque symbole représente l'expansion moyenne (Fold Expansion ou FE du nombre initial) de chaque échantillon de cellules normales (N) ($n=6$), leucémiques totales (L) ($n=23$), bcr-abl^- (LN) ou bcr-abl^+ (LL), après incubation avec les différents cocktails de cytokines. — : valeur moyenne de chaque catégorie. ** $p=0.01$ pour la FE des cellules bcr-abl^- comparée à celle des cellules N; * $p=0.03$ pour la FE des cellules bcr-abl^- comparée à celle des cellules bcr-abl^+ .

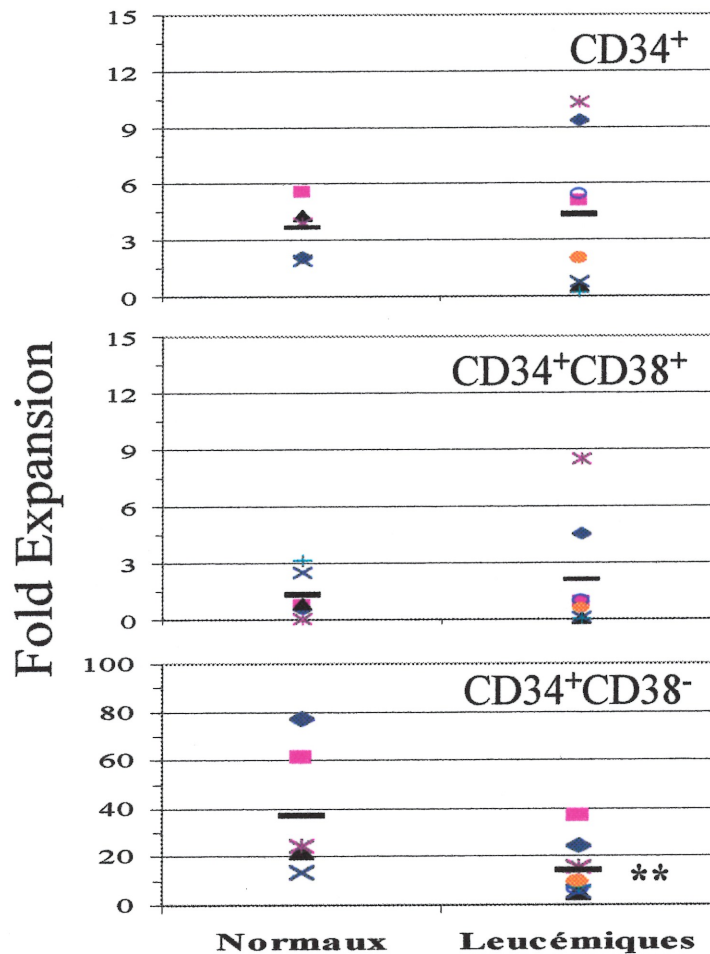
La contribution particulière des progéniteurs totaux, matures et immatures à l'expansion des cellules totales a été évaluée par analyse de cytométrie en flux. La Figure 21 présente une cinétique représentative du phénotype CD34/CD38 au cours des six jours de culture. Les analyses de contrôles isotypiques ont permis de définir les barrières de fluorescence afin d'exclure le marquage non spécifique. Le blocage des sites de récepteurs des portions Fc, avant incubation avec les anticorps d'intérêt, a permis de maintenir le marquage non spécifique des cellules pré et post-culture à un minimum. Au J0 et au J6, les pourcentages de cellules CD34⁺, CD34⁺CD38⁺ et CD34⁺CD38⁻ des échantillons normaux et leucémiques ont été évalués afin de déterminer leur augmentation en nombres absolus (Figure 22). En six jours de culture, chacun des trois sous-types cellulaires des échantillons normaux et leucémiques a présenté une expansion. Les échantillons normaux et leucémiques ont présenté des moyennes d'expansion semblables, tant au niveau des progéniteurs totaux (CD34⁺) qu'à celui des progéniteurs matures (CD34⁺CD38⁺). Pourtant, la comparaison d'expansion entre les cellules CD34⁺CD38⁺ normales et chaque échantillon leucémique pris individuellement a montré une augmentation significativement plus élevée de l'échantillon L7 (8.5±3) par rapport aux cellules normales ($p=0.01$). Par contre, au niveau plus immature des cellules CD34⁺CD38⁻, la situation a été différente, avec une croissance des échantillons normaux (36±10.6) supérieure à celle des leucémiques (14±2.3) ($p=0.003$). Ainsi, la croissance de la fraction immature des cellules progénitrices contribuerait à l'expansion différentielle des cellules normales par rapport aux leucémiques.

Figure 21. Cinétique de prolifération des cellules CD34/CD38 au cours de 6 jours de culture dans un milieu sans sérum et sans stroma.



Phénotype CD34/CD38 de cellules CD34⁺ sélectionnées au J0, d'une expérience représentative, au sixième jour de culture. Les cellules marquées avec les anticorps anti-CD34-PE et anti-CD38-PECy5 ont été analysées par cytométrie en flux.

Figure 22. Expansion *ex vivo* des cellules normales et leucémiques des compartiments de progéniteurs totaux ($CD34^+$), matures ($CD34^+CD38^+$) et immatures ($CD34^+CD38^-$).

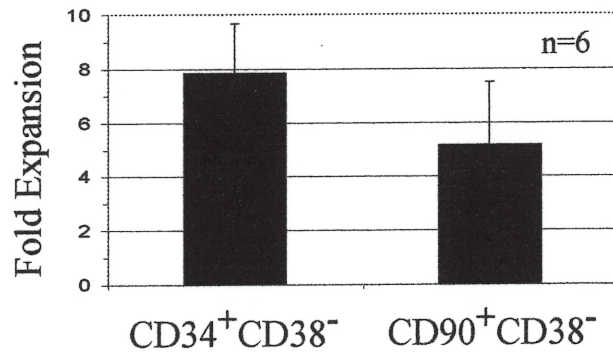
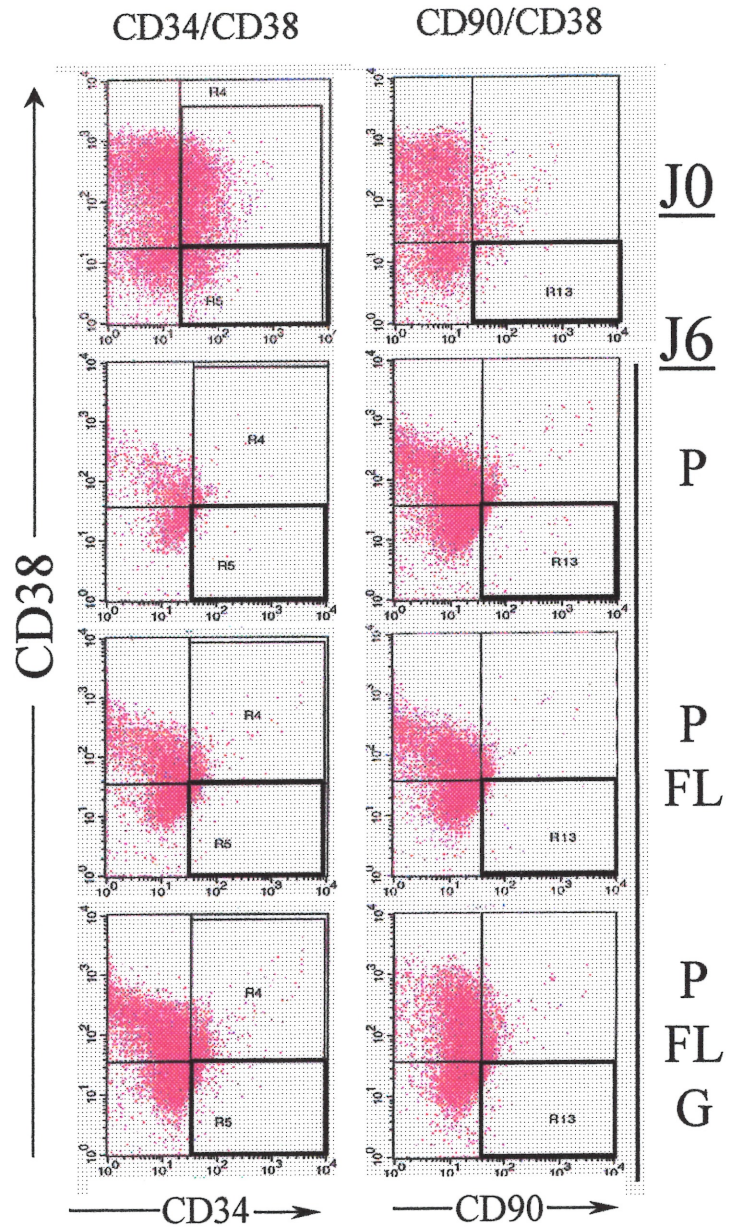


L'expansion de sous-populations de cellules $CD34^+$ sélectionnées d'échantillons normaux et leucémiques a été évaluée par cytométrie en flux. Au J0 et au J6 de culture *ex vivo* en présence de P±FL±G, les cellules ont été incubées avec les anticorps anti- $CD34$ couplé au PE et anti- $CD38$ couplé au PE-Cy5. Chaque symbole représente la FE moyenne de chaque échantillon. — : valeur moyenne de chaque catégorie (Normaux ou Leucémiques). * $p=0.003$ pour la FE des cellules $CD34^+CD38^-$ d'échantillons normaux comparée à celle des échantillons leucémiques.

A cette étape du projet, la nature progénitrice immature des cellules $CD34^+CD38^-$ devait être déterminée puisque, selon de récentes études, le phénotype $CD34^+CD38^-$ détecté après culture *ex vivo* ne définirait pas nécessairement une cellule progénitrice immature à potentiel de repopulation *in vivo*.²²² En effet, selon ces auteurs, le phénotype $CD34^+CD38^-$ de cellules, après culture, serait plutôt dû à une perte d'expression du CD38 à la surface des cellules plus matures $CD34^+CD38^+$. Nous avons donc confirmé la nature immature des cellules $CD34^+CD38^-$ produites avec les combinaisons de cytokines utilisées ici, grâce au marquage des mêmes cellules avec les anticorps anti-CD90 et anti-CD38. Le phénotype $CD90^+CD38^-$ définit théoriquement une fraction des cellules $CD34^+CD38^-$.²⁴⁹ Un exemple représentatif d'analyse phénotypique des cellules $CD34^+CD38^-$ et $CD90^+CD38^-$ d'un échantillon leucémique est présenté à la figure 23. Les diagrammes en point de cette figure montrent que du J0 au J6 d'expansion, la distribution des cellules de la région R5 ($CD34^+CD38^-$) est comparable à celle de la région R13 ($CD90^+CD38^-$). Ces résultats suggèrent ainsi que les combinaisons de cytokines utilisées ici n'ont pas nécessairement induit la perte d'expression du CD38. De plus, quoique l'expansion des cellules $CD34^+CD38^-$ ait été légèrement supérieure à celle des cellules $CD90^+CD38^-$, elles n'ont pas été significativement différentes l'une de l'autre ($p>0.05$).

Figure 23. Comparaison entre les phénotypes $CD34^+CD38^-$ et $CD90^+CD38^-$ des cellules leucémiques produites en 6 jours de culture *ex vivo*.

Dans cette expérience représentative (n=6), les cellules $CD34^+$ de patients atteints de LMC ont été mises en culture avec P seul (B et F), P+FL (C et G) ou P+FL+G (D et H). Avant (A et E) et après les six jours de culture (B-H), les cellules ont été marquées avec les anticorps anti- $CD34$ -PE et anti- $CD38$ -PECy5 (A-D) ou, anti- $CD90$ -PE et anti- $CD38$ -PECy5 (E-H) puis analysées par cytométrie en flux. R5 est la région définissant la fraction $CD34^+CD38^-$ et R13, la fraction $CD90^+CD38^-$. Les colonnes représentent l'expansion moyenne ou Fold Expansion (multiplication du nombre initial de cellules) de chaque fraction cellulaire; les barres d'erreur indiquent l'erreur standard sur la moyenne (SEM).



Dans toute culture cellulaire, le nombre total de cellules viables détectées est déterminé, non seulement par le taux de prolifération cellulaire, mais aussi par le taux de perte cellulaire, par apoptose entre autres. Nous avons entrepris d'analyser ce second aspect.

4.2.2 *Mort cellulaire programmée ou apoptose*

Aux stades précoces d'apoptose, la phosphatidylsérine, située du côté interne de la membrane plasmique des cellules viables, est transloquée vers la surface externe. Elle devient ainsi accessible à son ligand, l'AnnexineV, une protéine dépendante du calcium, qui se lie aux phospholipides.²⁵⁰ L'apoptose est également caractérisée par l'expression d'Apo2.7 (ou antigène 7A6).²⁵¹ L'Apo2.7 est une protéine de 38 kDa présente à la surface de la membrane mitochondriale dont l'expression dans le temps parvient après l'exposition externe de la phosphatidylsérine.²⁵² Afin de déterminer l'induction d'apoptose, précoce et plus avancée, au cours de la culture *ex vivo*, les cellules normales et leucémiques ont été évaluées avec les marqueurs d'apoptose, l'AnnexineV et l'Apo2.7, au J0 et au J6 d'expansion.

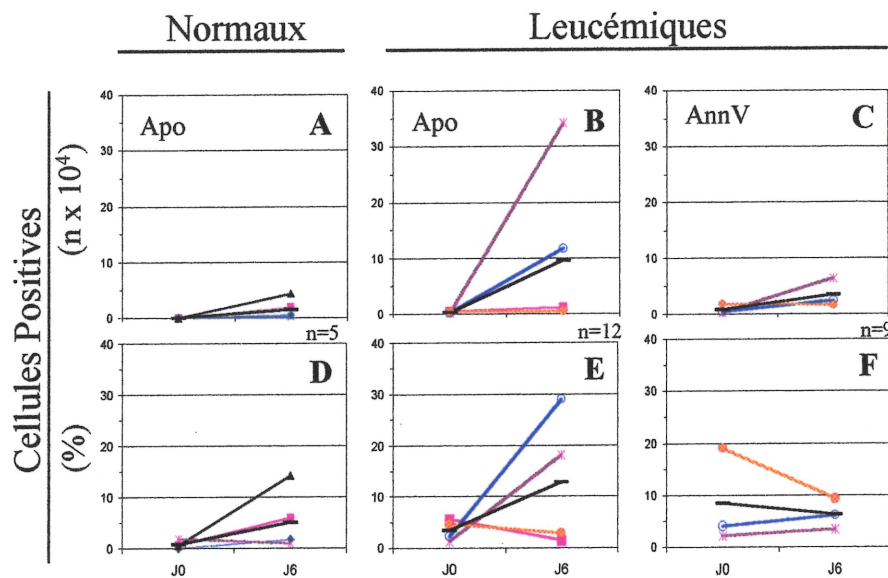
Nous avons débuté par l'évaluation d'apoptose parmi les cellules totales. Il fallait tenir compte du nombre de cellules positives au J0 et au J6 ainsi que du pourcentage qu'elles ont occupé à ces mêmes périodes. Au début de la période de culture J0, après élimination du CFSE excédentaire, la proportion de cellules Apo⁺ a été plus élevée parmi les échantillons leucémiques (3.3 ± 0.5) que parmi les normaux (0.4 ± 0.2) ($p=0.02$), indiquant une plus grande sensibilité des cellules leucémiques à la période de 15 heures d'incubation sans cytokines, une des étapes du protocole de marquage au CFSE.

Du J0 au J6, la culture *ex vivo* n'a pas induit un taux supérieur d'entrée en apoptose des cellules d'échantillons normaux ($n=5$) ($p=0.19$) ou d'échantillons leucémiques ($n=12$ pour Apo2.7 et $n=9$ pour AnnV) ($p=0.07$ et $p=0.31$, respectivement) (Figure 24). Aucune de ces fractions cellulaires n'a atteint de

proportions significativement plus élevées au terme des six jours de culture. Ce résultat suggère que l'expansion différentielle des cellules normales et leucémiques ne pourrait pas être expliquée par une induction accrue d'apoptose précoce ou plus tardive, parmi les cellules leucémiques en comparaison aux cellules normales.

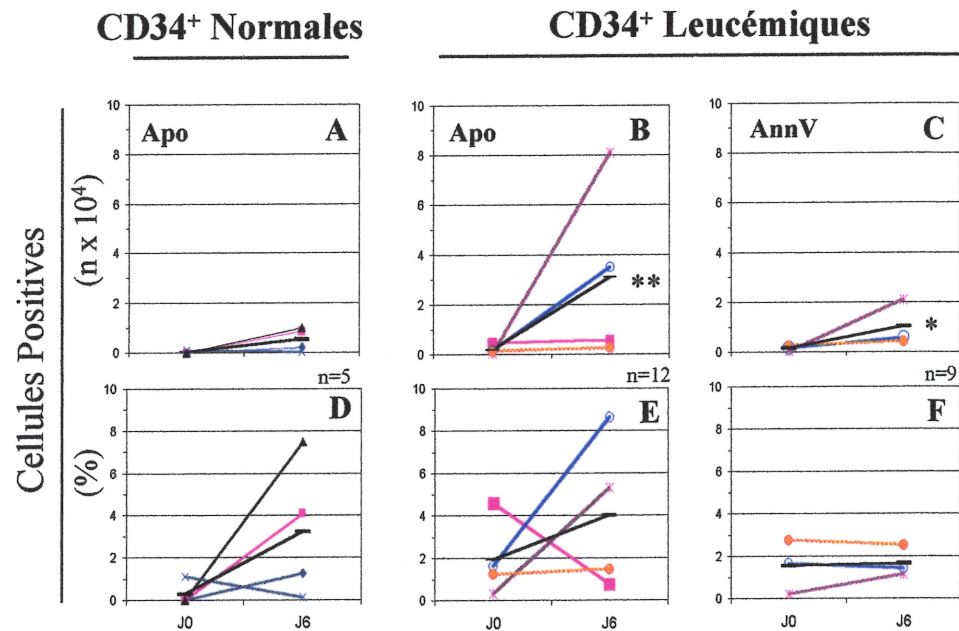
L'analyse de la mort cellulaire programmée, induite lors de la période de culture dans la population de progéniteurs totaux ($CD34^+$), a révélé une situation différente de la précédente (Figure 25). Bien que du J0 au J6, les pourcentages de cellules $CD34^+Apo2.7^+$ ou $CD34^+AnnV^+$ n'aient pas statistiquement changé dans les échantillons normaux ou leucémiques (Figure 25 D, E, F), les échantillons normaux et leucémiques ont réagi différemment lorsqu'on observe leurs nombres au J0 et au J6 (Figure 25 A, B, C). En effet, la culture *ex vivo* n'a pas induit des taux accrus d'entrée en apoptose des cellules $CD34^+$ normales, bien qu'elle ait provoqué l'augmentation du nombre de cellules leucémiques $CD34^+Apo2.7^+$ ($p=0.01$) et $CD34^+AnnV^+$ ($p=0.04$).

Figure 24. Induction d'apoptose des cellules totales d'échantillons normaux et leucémiques suite à la culture *ex vivo*.



Au J0 et au J6 de culture, les cellules d'échantillons normaux et leucémiques ont été incubées avec les marqueurs spécifiques de mort cellulaire programmée, l'anticorps anti-Apo2.7-PECy5 (Apo) ou l'AnnexineV (AnnV) biotinée, révélée par le système de Streptavidine-APC. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux dans la région de cellules viables (7-AAD négatives). L'expression d'Apo2.7 a été évaluée dans des échantillons normaux (n=5) (A,D) et leucémiques (n=12) (B,E); la liaison de l'AnnexineV, dans des échantillons leucémiques (n=9) (C,F). A-C) Nombres ($\times 10^4$) de cellules positives au J0 et au J6 d'échantillons normaux et leucémiques; D-F) pourcentages de ces cellules dans l'ensemble de la suspension cellulaire. Chaque symbole représente la moyenne des valeurs de chaque échantillon incubé avec $P \pm FL \pm G$. — : valeurs moyennes de chaque catégorie.

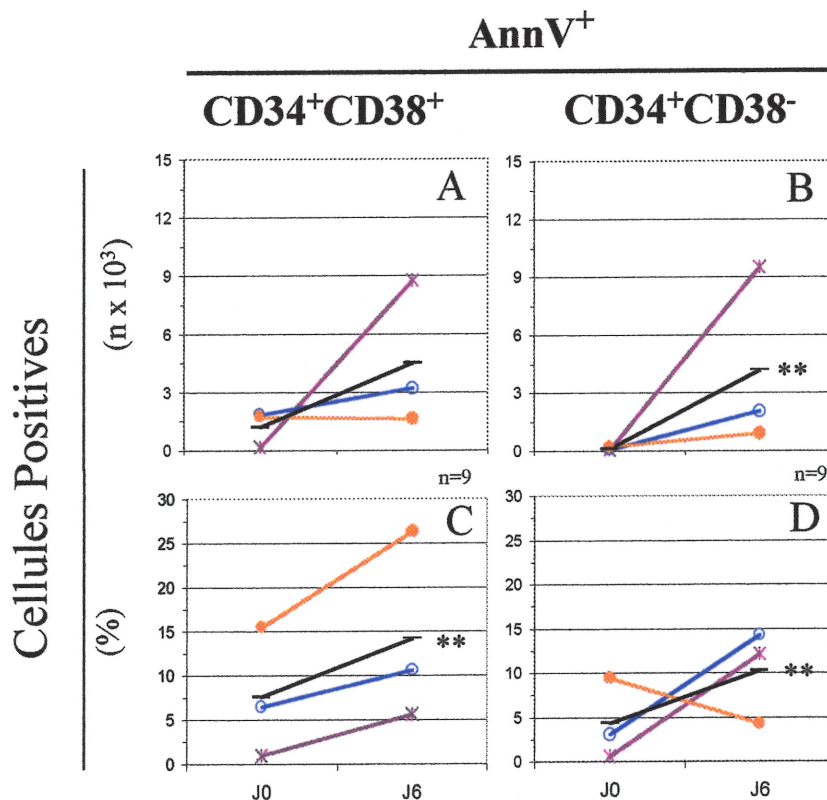
Figure 25. Induction d'apoptose des cellules progénitrices CD34⁺ d'échantillons normaux et leucémiques suite à la culture *ex vivo*.



Au J0 et au J6 de culture, les cellules d'échantillons normaux et leucémiques ont été incubées avec l'anticorps anti-CD34-PE et les marqueurs spécifiques de mort cellulaire programmée, l'anticorps anti-Apo2.7-PECy5 (Apo) ou l'AnnexineV (AnnV) biotinée révélée par le système de Streptavidine-APC. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux dans la région de cellules viables (7-AAD négatives). L'expression d'Apo2.7 a été évaluée dans des échantillons normaux (n=5) (A,D) et leucémiques (n=12) (B,E); la liaison de l'AnnexineV, dans des échantillons leucémiques (n=9) (C,F). A-C) Nombres ($\times 10^4$) de cellules CD34⁺ positives au J0 et au J6 d'échantillons normaux et leucémiques; D-F) pourcentages de ces cellules par rapport aux CD34⁺ totales. Chaque symbole représente la moyenne des valeurs de chaque échantillon incubé avec $P \pm FL \pm G$. — : valeurs moyennes de chaque catégorie. ** $p=0.01$ pour le nombre de cellules leucémiques CD34⁺Apo2.7⁺; * $p=0.04$ pour le nombre de cellules leucémiques CD34⁺AnnV⁺.

Nous avons poursuivi l'analyse de l'effet de la culture *ex vivo* sur l'induction d'apoptose dans les échantillons leucémiques, à des stades de maturation plus précoces, soit ceux des phénotypes $CD34^+CD38^+$ (progéniteurs matures) et $CD34^+CD38^-$ (progéniteurs immatures) (Figure 26). Bien que les cellules $CD34^+CD38^+AnnV^+$ aient occupé des proportions plus élevées, parmi les $CD34^+CD38^+$ leucémiques totales, tant au J6 qu'au J0 ($p=0.02$) (Figure 26C), leur nombre est demeuré relativement inchangé au cours de la même période ($p>0.05$) (Figure 26A). Par contre, au niveau des cellules $CD34^+CD38^-$, où nous avons noté une différence d'expansion entre les cellules normales et leucémiques totales (cf Figure 22), une augmentation tant du nombre (Figure 26B) que du pourcentage (Figure 26D) des cellules $CD34^+CD38^-AnnV^+$ a été observée. Plus précisément, l'augmentation d'induction d'apoptose a été la plus élevée pour L7; L9 a suivi puis finalement, L10. De plus, l'induction accrue d'apoptose des échantillons L7 et L9 a été supérieure à la croissance des cellules viables $AnnV^-$ ($p<0.05$). Cependant, l'inverse a été observé pour l'échantillon L10 où la culture *ex vivo* a plutôt semblé exercer un effet de protection contre l'apoptose puisque moins de cellules ont été induites à entrer en apoptose au terme de la période de culture ($p=0.0007$).

Figure 26. Induction d'apoptose des cellules progénitrices matures $CD34^+CD38^+$ et immatures $CD34^+CD38^-$ d'échantillons normaux et leucémiques suite aux 6 jours de culture *ex vivo*.



Au J0 et au J6 de culture, les cellules d'échantillons leucémiques ont été incubées avec les anticorps anti-CD34-PE, anti-CD38-PECy5 et l'AnnexineV (AnnV) biotinée, révélée par le système de Streptavidine-APC. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux dans la région de cellules viables (7-AAD négatives). La liaison de l'AnnexineV a été évaluée dans des échantillons leucémiques (n=9). Les graphiques du haut représentent les nombres ($\times 10^3$) de cellules $CD34^+CD38^+$ (A) et $CD34^+CD38^-$ (B) $AnnV^+$ au J0 et au J6; ceux du bas, les pourcentages de ces cellules par rapport aux $CD34^+CD38^+$ (C) et $CD34^+CD38^-$ (D) totales. Chaque symbole représente la moyenne des valeurs de chaque échantillon incubé avec $P \pm FL \pm G$. — : valeurs moyennes de chaque catégorie. ** $p=0.01$ pour le nombre de cellules leucémiques $CD34^+CD38^-AnnV^+$ (A); $p=0.02$ pour le pourcentage de cellules $CD34^+CD38^-AnnV^+$ (C); $p=0.02$ pour le pourcentage de cellules $CD34^+CD38^+AnnV^+$ (D).

4.2.3 Profil de division des cellules normales et leucémiques

Puisque l'expansion cellulaire dépend aussi de la prolifération cellulaire, il s'agissait également de répondre à la question suivante: les cellules normales auraient-elles proliféré plus rapidement que les cellules leucémiques après six jours de culture *ex vivo*, leur conférant ainsi un avantage d'expansion? Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé le CFSE pour sa capacité à se lier de façon covalente à des protéines intracellulaires par un groupe succinimidyl et à permettre l'évaluation directe par cytométrie en flux des divisions cellulaires. Au cours des études initiales, afin d'établir un parallèle avec le protocole d'expansion du chapitre 3, les cellules CD34⁺ sélectionnées et marquées au CFSE ont été mises en culture pendant douze jours. Les cellules obtenues à la fin de la culture n'avaient présenté que de très faibles niveaux de fluorescence du CFSE, se rapprochant des niveaux d'autofluorescence. Puisque l'intensité de fluorescence (CFSE) des cellules-filles diminue de moitié par rapport à la cellule parentale, le protocole a donc été modifié en ciblant six jours comme période de culture pour établir un profil précoce et complet de division cellulaire. Ceci a permis le marquage simultané des cellules en CFSE avec les anticorps d'intérêt. Pour les cellules totales, aucune différence des profils de division n'a été observée entre les échantillons leucémiques fortement ou faiblement infiltrés et les normaux.

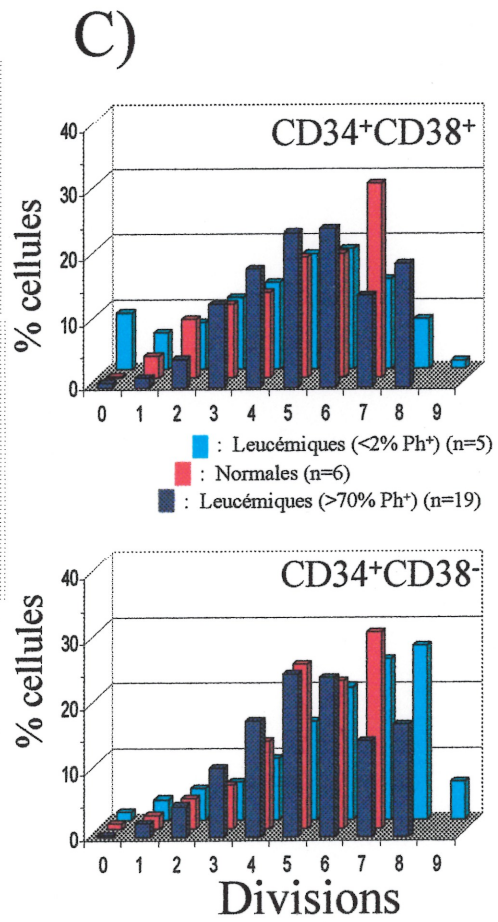
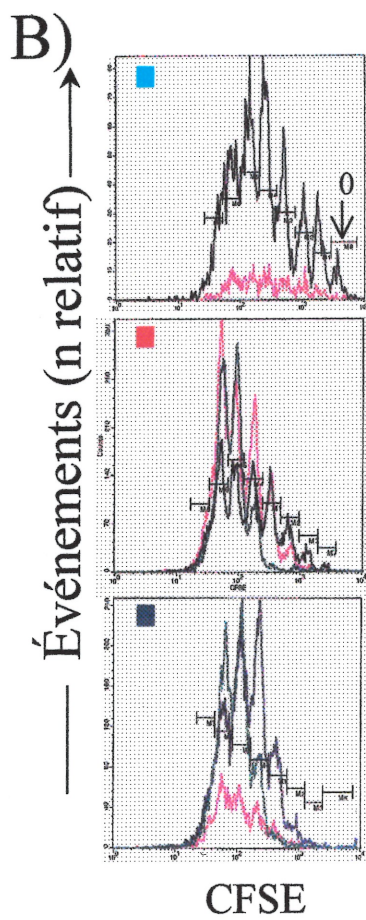
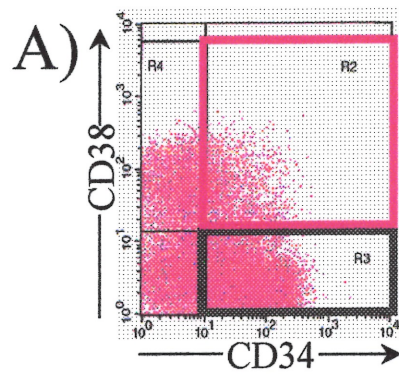
Nous avons procédé à la définition, par cytométrie en flux, de populations cellulaires, selon leur phénotype CD34/CD38 (Figure 27A). Les profils de CFSE présentés à la figure 27B sont ceux de 3 échantillons représentatifs des échantillons leucémiques (>70% Ph⁺ au J0), des échantillons normaux et des échantillons leucémiques (<2% Ph⁺ au J0). Le marqueur à l'extrémité droite comprend les cellules non divisées après les six jours de culture (Division 0). En six jours, au sein des mêmes échantillons, les fractions CD34⁺CD38⁺ et CD34⁺CD38⁻ se sont divisées autant de fois l'une que l'autre (Figure 27B). Les histogrammes de la figure 27C représentent les valeurs moyennes des profils de division des cellules CD34⁺CD38⁺

(histogramme du haut) et des cellules $CD34^+CD38^-$ (histogramme du bas). Parmi les cellules progénitrices matures ($CD34^+CD38^+$), alors que les échantillons leucémiques ($>70\% Ph^+$) ont présenté une majorité de cellules en divisions 5-6; celle des échantillons normaux a été en division 7 et, quant aux échantillons leucémiques ($<2\% Ph^+$), leur profil s'est étalé jusqu'à 9 divisions. De plus, parmi cette dernière catégorie, un pourcentage relativement élevé de cellules $CD34^+CD38^+$ est demeuré en division 0 ($8.7\pm 2.1\%$) par rapport à des pourcentages de 0.3 ± 0.05 et 0.7 ± 0.1 pour les échantillons normaux et leucémiques ($>70\% Ph^+$), respectivement.

Pour les cellules $CD34^+CD38^-$, la différence de profils de division cellulaire a été encore mieux définie. Ici encore, les cellules des échantillons leucémiques ($>70\% Ph^+$) ont présenté une majorité de cellules en divisions 5-6; les échantillons normaux à la division 7 et les leucémiques ($<2\% Ph^+$), clairement à la division 8. Toutefois, des pourcentages comparables de cellules demeurées indivisées ou en première division ont été observés parmi les 3 types d'échantillons.

Figure 27. Profil de marquage en CFSE des cellules progénitrices matures ($CD34^+CD38^+$) et immatures ($CD34^+CD38^-$).

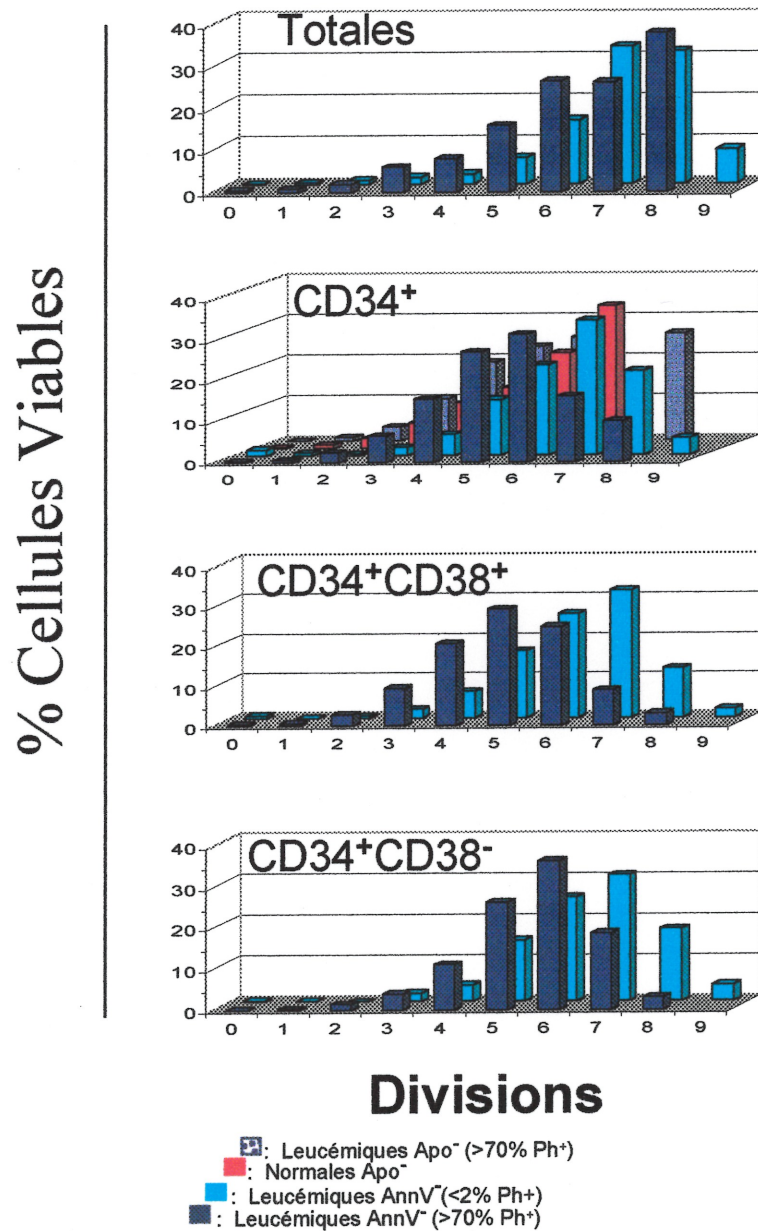
A) Exemple représentatif du phénotype CD34/CD38 de cellules $CD34^+$ sélectionnées initialement B) Au J6, l'intensité en CFSE des cellules $CD34^+CD38^+$ (—) et $CD34^+CD38^-$ (—) d'échantillons leucémiques fortement infiltrés au J0 ($> 70\% Ph^+$) (■) (n=19), normaux (■) (n=6), ou leucémiques faiblement infiltrés au J0 ($< 2\% Ph^+$) (■) (n=5), a été évaluée par cytométrie en flux. Présentation de 3 histogrammes représentatifs. C) Les profils de division des échantillons ont été évalués à partir de l'intensité moyenne de fluorescence des cellules au J0 de culture, pour déterminer le marqueur des cellules non divisées. Chaque colonne représente la moyenne de distribution des cellules à chaque division.



Puisque l'apoptose a semblé jouer un rôle important dans la prolifération différentielle des cellules normales et leucémiques, nous avons évalué les profils de division des cellules viables des sous-fractions (Figure 28). Bien qu'aucune différence majeure ne soit observée entre les profils de division des cellules viables totales, d'échantillons fortement et faiblement infiltrés en Ph⁺, la situation a été toute autre pour les fractions cellulaires CD34⁺, CD34⁺CD38⁺ et CD34⁺CD38⁻. Dans ces trois cas, la majorité des cellules viables d'échantillons fortement infiltrés initialement a présenté cinq à six divisions tandis que, dans les échantillons normaux ou leucémiques faiblement infiltrés, cette majorité se situait à sept divisions.

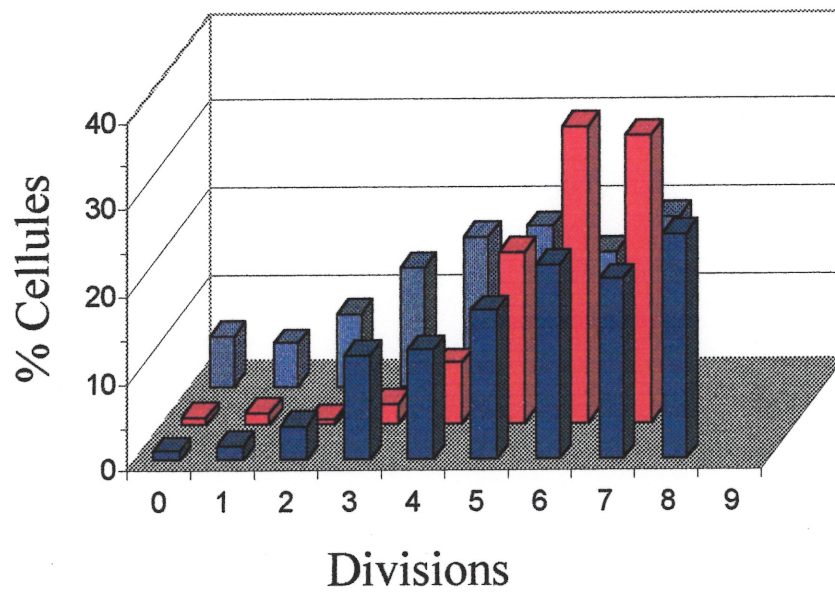
Il fallait parallèlement connaître le stade de division auquel se trouvaient les cellules entrées en apoptose. Les profils de division des cellules totales leucémiques AnnV⁺ et Apo⁺ ainsi que des cellules normales ont été déterminés (Figure 29). Les cellules leucémiques AnnV⁺ et Apo2.7⁺, et les cellules normales Apo2.7⁺ ont toutes trois présenté des pourcentages élevés parmi les cellules les plus divisées. Il faut également noter que 5% des cellules leucémiques Apo2.7⁺ en moyenne se situaient dans la région de cellules non divisées, en quiescence, tandis que des pourcentages significativement inférieurs de cellules normales Apo2.7⁺ se trouvaient à ce même stade.

Figure 28. Profils de division des cellules progénitrices viables $CD34^+$, matures ($CD34^+CD38^+$) et immatures ($CD34^+CD38^-$)



Au J6 de culture *ex vivo*, l'incubation avec anti-CD34-PE et/sans anti-CD38-PECy5 a permis de déterminer les régions de cellules $CD34^+$, $CD34^+CD38^+$ et $CD34^+CD38^-$ par cytométrie en flux. La mort cellulaire programmée a ensuite été évaluée sur ces fractions cellulaires à l'aide de l'anti-Apo2.7-PECy5 ou de l'AnnexineV biotinée, révélée par Streptavidine-APC sur les cellules préalablement marquées au CFSE (au J0).

Figure 29. Profil de division des cellules normales et leucémiques en voie de mort cellulaire au terme de 6 jours de culture *ex vivo*.



Les cellules totales, préalablement marquées au CFSE, ont été incubées avec l'anti-Apo2.7-PECy5 ou l'AnnexineV biotinée révélée par Streptavidine-APC. Le profil de division des cellules normales et leucémiques a été déterminé à partir de la région de cellules Apo2.7⁺ ou de cellules AnnexineV⁺ par cytométrie en flux.

4.2.4 Enrichissement du potentiel clonogénique avec la culture cellulaire

Finalement, afin de tester l'effet de la culture *ex vivo* sur la fonction et la nature des cellules progénitrices produites, nous avons effectué des essais clonogéniques de progéniteurs à court terme sur des cellules CD34⁺CD38⁻ triées à chaque pic de division ainsi que sur la population CD34⁺CD38⁻ totale. Tel qu'indiqué aux Tableaux V et VI, la culture *ex vivo* a induit une expansion particulièrement importante du potentiel clonogénique et du nombre total de CFC *bcr-abl*⁻ d'échantillons leucémiques, fortement infiltrés (>70% Ph⁺ au J0; LN2). En effet, tant en potentiel clonogénique qu'en nombre absolu de CFCs, l'échantillon LN2 a présenté les valeurs d'expansion les plus élevées. Dans les échantillons N, LL4 et LN4, des valeurs intermédiaires ont été observées et finalement, L1e a présenté les FE les plus faibles en potentiel clonogénique et en nombre absolu de CFCs.

TABLEAU V. «Fold Expansion» (FE) du potentiel clonogénique des CFCs d'échantillons N et L au terme de 6 jours de culture en présence de P seul, P+FL ou P+FL+G

FE	N	LN2	LL2	LN4	LL4
P	0.85	27	0.70	NF	NF
P+FL	1.71	62	0.59	2.07	2.7
P+FL+G	2.48	37	0.41	2.70	4.5
Moy.±SD	1.68±0.81	42±18.03	0.57±0.15	2.39±0.45	3.6±1.27

CFC indique colony forming cell; N, normal; L, leucémique; FE, fold expansion; LN2, valeurs des colonies *bcr-abl*⁻ de l'échantillon L.2 (cf tableau IV); LL2, valeurs des colonies *bcr-abl*⁺ de l'échantillon L2; LN4, valeurs des colonies *bcr-abl*⁻ de l'échantillon L4 (cf tableau IV); LL4, valeurs des colonies *bcr-abl*⁺ de l'échantillon L4; P, Pixykin321; FL, Flt3-ligand; G, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF).

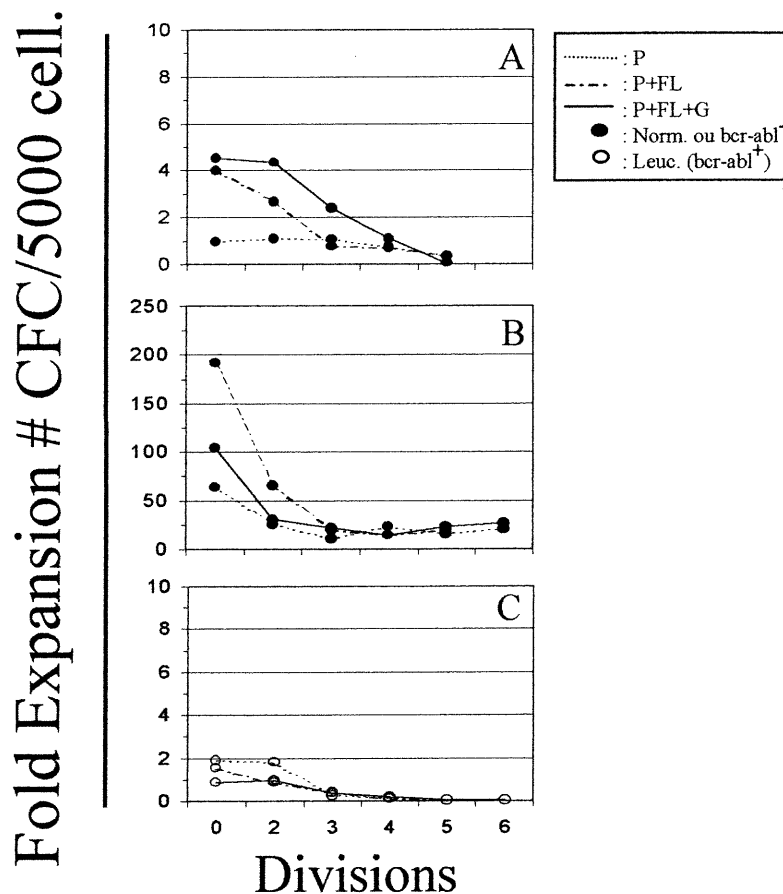
TABLEAU VI. «Fold Expansion» (FE) du nombre absolu de CFCs d'échantillons N et L au terme de 6 jours de culture en présence de P seul, P+FL ou P+FL+G

FE	N	LN2	LL2	LN4	LL4
P	4.51	1407	0.65	NF	NF
P+FL	4.80	1199	0.53	0.54	0.88
P+FL+G	13.16	1651	0.62	0.83	1.3
Moy.±SD	7.49±4.91	1419±226	0.60±0.06	0.68±0.21	1.09±0.29

CFC indique colony forming cell; N, normal; L, leucémique; FE, fold expansion; LN2, valeurs des colonies *bcr-abl*⁻ de l'échantillon L2 (cf tableau IV); LL2, valeurs des colonies *bcr-abl*⁺ de l'échantillon L2; LN4, valeurs des colonies *bcr-abl*⁻ de l'échantillon L.4 (cf tableau IV); LL4, valeurs des colonies *bcr-abl*⁺ de l'échantillon L.4; P, Pixykin321; FL, Flt3-ligand; G, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF).

Les tests clonogéniques sur cellules triées ont démontré que l'expansion *ex vivo* a permis d'enrichir le potentiel clonogénique des cellules progénitrices d'échantillons normaux et des progéniteurs *bcr-abl*⁻ d'échantillons fortement infiltrés en Ph⁺ au J0, retrouvées en divisions 0-1 au J6 d'expansion (Figure 30). Au niveau fonctionnel des progéniteurs, l'effet différentiel des combinaisons de cytokines a pu être observé. En effet, FL et G ont exercé un effet de synergie sur P pour amplifier le potentiel clonogénique des cellules normales et *bcr-abl*⁻ (Figure 30A et B). Par contre, le potentiel clonogénique des colonies *bcr-abl*⁺ quiescentes ou à une division a été peu ou pas amplifié, suite à l'exposition à ces facteurs de croissance (Figure 30C).

Figure 30. Potentiel clonogénique des cellules progénitrices $CD34^+CD38^-$ triées à la fin de la période de culture selon leur position dans le profil de CFSE.



Au J6 de culture *ex vivo*, le profil de division des cellules $CD34^+CD38^-$, tel que présenté à la figure 27, a été établi à l'aide de l'intensité de fluorescence du CFSE pour un échantillon normal (A) et un échantillon leucémique fortement infiltré au J0 (> 70% Ph^+ au J0) (B et C). B, valeurs des progéniteurs $bcr-abl^-$ et C, valeurs des progéniteurs $bcr-abl^+$. L'effet de chaque cocktail de cytokine sur le potentiel clonogénique est présenté (P;··· ; P+FL,- · ; P+FL+G,—). Les cellules $CD34^+CD38^-$ des divisions 0-1, 2, 3, 4, 5 et 6 ont été triées puis récoltées dans un milieu d'Iscove MDM⁺ 20% sérum de veau fœtal avant d'être mises en culture dans le milieu semi-solide MethoCult tel que décrit dans la section *Matériel et Méthodes*. Chaque point représente le nombre de CFCs par 5000 cellules produit par les cellules triées au pic de division d'intérêt, divisé par le nombre de CFCs par 5000 cellules dans la suspension initiale (au J0).

4.3 Discussion

A cette étape du projet, nous avons démontré que l'expansion préférentielle des cellules normales par rapport aux leucémiques suite à la culture *ex vivo* pouvait être expliquée par trois observations principales: une expansion plus importante du compartiment de progéniteurs immatures normaux, une induction plus élevée d'apoptose dans les échantillons leucémiques que les normaux et finalement, une prolifération plus rapide des progéniteurs viables *bcr-abl*⁻ et normaux.

Les cellules totales *bcr-abl*⁻ et les cellules progénitrices immatures normales ont présenté des croissances cellulaires plus importantes que les cellules leucémiques des catégories correspondantes, sous l'influence de la protéine de fusion IL-3/GM-CSF en particulier. Ces résultats sont quelque peu inattendus puisque, malgré les controverses, plusieurs chercheurs s'entendent pour dire que *bcr-abl* accroît la prolifération et prolonge la survie des cellules hématopoiétiques,^{192,253} même lors du retrait de facteurs de croissance des milieux de culture.²⁵⁴ Cette controverse apparente pourrait être expliquée par une réponse proliférative accrue des cellules *bcr-abl*⁻ dans un environnement où leurs pendants leucémiques *bcr-abl*⁺ produisent les cytokines IL-3 et G-CSF de façon endogène.²²⁴ L'indépendance des cellules *bcr-abl*⁺ aux facteurs de croissance expliquerait leur apparente neutralité face aux facteurs de croissance tant exogènes qu'endogènes. Une grande controverse existe quant à l'action paracrine et/ou autocrine des cytokines produites par les cellules progénitrices leucémiques. Tandis que certaines études avancent que les cytokines IL-3 et G-CSF produites par les cellules leucémiques exercent un effet paracrin et non autocrin dans le contexte de culture *ex vivo*,^{255,256} certaines autres suggèrent qu'un effet tant autocrin que paracrin serait exercé par ces cytokines endogènes.^{103,224,257} Quant aux cellules normales, elles présentent l'avantage supplémentaire de produire, de façon autocrine, la cytokine précoce FL par les cellules normales CD34⁺²⁵⁸ qui, en combinaison avec les autres cytokines produites du milieu conditionné par les cellules CD34⁺, stimule la prolifération de ces cellules normales.

Puisque l'expansion cellulaire implique tant la prolifération que la mort cellulaire, nous avons évalué cette dernière par liaison d'AnnexineV (apoptose précoce) ou par détection de l'Apo2.7 (apoptose intermédiaire). Nos résultats indiquent que l'incubation initiale de 15 heures, suivant le marquage au CFSE, induirait des taux plus élevés d'apoptose parmi les échantillons leucémiques que les normaux. Les cellules qui expriment *bcr-abl* seraient donc plus susceptibles d'entrer en apoptose que les cellules normales en conditions sans sérum, sans stroma et sans facteurs de croissance exogènes. Ce phénomène est plutôt surprenant puisque l'expression de *bcr-abl* est plutôt associée à une prolifération indépendante des facteurs de croissance exogènes.²⁵⁹ Le phénomène que nous observons revêt une certaine similitude avec l'effet de l'agent pyrrolo-1,5-benzoxapenine-6 (PBOX-6) qui, en moins de 24 heures en culture avec des cellules de LMC, induit la suppression de l'effet anti-apoptotique des cellules *bcr-abl*⁺ par un mécanisme indépendant de la caspase-3 donc, indépendant des voies de signalisation de *bcr-abl*.²⁶⁰ Il est alors possible que des mécanismes similaires induisent l'entrée en apoptose des cellules leucémiques après les premières 15 heures d'incubation.

Nos résultats suggèrent aussi que la culture cellulaire avec les cytokines ciblées (P, FL et G) induirait des taux d'apoptose accrus parmi les cellules progénitrices CD34⁺ leucémiques. Par ailleurs, dans les mêmes conditions, les cellules CD34⁺ normales ne seraient pas autant sensibilisées à l'induction d'apoptose. Ceci suggère que les cytokines exogènes agiraient particulièrement sur la sensibilité des cellules leucémiques au processus apoptotique. Puisque les cellules normales CD34⁺ produisent des cytokines (FL, KL, Tpo, IGF-1) qui inhibent l'apoptose, observée par activation de caspase-3, elles pourraient être protégées de l'induction du processus apoptotique dans nos conditions de culture *ex vivo*.²⁵⁸

Parmi les progéniteurs leucémiques, la sous-fraction de cellules progénitrices matures CD34⁺CD38⁺ n'a pas semblé être significativement influencée par le traitement aux cytokines exogènes. Par contre, les cellules CD34⁺CD38⁻ ont présenté des taux significativement plus élevés d'induction d'apoptose après la

période de culture. Cette fraction cellulaire est particulièrement essentielle à observer puisqu'elle fait partie d'un des compartiments cellulaires responsables de la reconstitution hématopoïétique à moyen et à long terme.²⁶¹ L'expression des récepteurs de cytokines à la surface des cellules $CD34^+CD38^-$ leucémiques et normales pourrait différer l'une de l'autre et ainsi, interférer avec la voie de signalisation anti-apoptotique, caractéristique de l'expression de *bcr-abl*. En effet, des cellules Mo7e exprimant *bcr-abl* présentent une expression significativement diminuée de la chaîne β du récepteur d'IL-3/GM-CSF lorsque comparée aux cellules Mo7e *bcr-abl*⁻.²²⁶ Ce résultat suggère que les cellules normales (*bcr-abl*⁻) seraient d'autant plus protégées des effets apoptotiques par leur expression normale des récepteurs aux cytokines exogènes de notre système (IL-3, GM-CSF, FL et G-CSF). Par ailleurs, on pourrait assister à la suppression de l'effet anti-apoptotique de *bcr-abl* par les cytokines exogènes. En effet, on pourrait établir un parallèle entre l'effet de ces dernières avec la protéine adénovirale E1A sur les cellules leucémiques en particulier, puisqu'il a été récemment publié que l'action anti-apoptotique de *bcr-abl* pouvait être contrebalancée par E1A.²⁶² La protéine E1A agit en contournant l'arrêt en G₂/M imposé par *bcr-abl* et en permettant ainsi le démarrage de la cascade apoptotique.

Compte tenu que l'expansion cellulaire dépend du taux de prolifération cellulaire et du taux de mort cellulaire, nous avons poursuivi en analysant le taux de prolifération des cellules normales et des cellules leucémiques, suite à l'action des cytokines exogènes. Les expériences de suivi d'intensité du CFSE indiquent qu'il n'existe pas de différence significative entre les profils de division des cellules totales normales et leucémiques. Les différences d'expansion entre ces deux populations ayant plutôt lieu aux stades plus immatures, nous avons analysé les profils de division de leurs fractions progénitrices. Les différences de profil de division entre les cellules normales et leucémiques semblent être plus marquées parmi les cellules progénitrices immatures, tel que le cas se présentait pour l'induction d'apoptose. Ceci pourrait être expliqué par les profils d'expression de gènes du récepteur à l'IL-3 et du Flt3 significativement différents entre les cellules $CD34^+CD38^+$ et les cellules

CD34⁺CD38⁻.²⁶³ Tandis que la majorité de cellules CD34⁺CD38⁻ d'échantillons leucémiques fortement infiltrés se situait à la cinquième ou sixième division, les normales étaient rendues à la division 7 et les leucémiques faiblement infiltrés, à la division 8. Ces résultats suggèrent que, dans cette population progénitrice immature, les cellules normales provenant d'individus leucémiques auraient un avantage prolifératif sur les cellules normales d'individus normaux et encore plus sur les cellules d'échantillons leucémiques fortement infiltrés initialement. Ces données pourraient être expliquées par un taux d'entrée en cycle cellulaire plus rapide parmi les cellules normales que les leucémiques accompagnée ou non d'une induction de mort cellulaire, moins élevée parmi les cellules normales plus divisées que les leucémiques. Pourtant, il a été publié que les cellules leucémiques entrent plus rapidement en cycle que les cellules normales.²⁶⁴ Ainsi, il est possible que les cellules progénitrices normales présentent un taux de renouvellement plus rapide que celui des cellules progénitrices leucémiques une fois entrées en cycle.

Il faut toutefois considérer que les pourcentages de cellules à chaque division (Figure 27) représentent la somme des cellules viables et en voie de mort cellulaire évaluée dans chacune des sous-fractions. Nous avons observé que, tant dans les échantillons normaux que les leucémiques, des pourcentages relativement élevés d'apoptose précoce ont surtout eu lieu après 3 à 4 divisions. Ces observations suggèrent que les cellules normales et leucémiques seraient programmées à subir un certain nombre de divisions avant l'induction d'apoptose. Un tel délai pourrait être expliqué par le fait qu'un inhibiteur d'apoptose pourrait être induit tôt après l'induction en cycle des cellules et serait graduellement dilué avec les divisions cellulaires subséquentes puis finalement, l'apoptose aurait lieu.²⁶⁵

D'un autre côté, le profil de division des cellules viables a révélé un ralentissement relatif des cellules progénitrices totales, matures et immatures, des échantillons leucémiques fortement infiltrés par rapport aux échantillons normaux ou leucémiques faiblement infiltrés. Ces résultats suggèrent que, sous l'influence des cytokines exogènes, le taux de doublement des cellules leucémiques serait ralenti ou que celui des cellules normales ou *bcr-abl*⁻ serait accéléré puisque les profils

d'induction d'apoptose semblent être relativement semblables parmi ces groupes. D'ailleurs, il est publié que, sous l'influence des cytokines IL-3, IL-11 et SCF, le temps de doublement des cellules progénitrices normales diminue sûrement à cause d'une diminution du temps passé en G1 du cycle cellulaire.²⁶⁶

Prises dans leur ensemble, nos données suggèrent que l'avantage d'expansion des cellules normales serait dû à un taux de prolifération accru de leur fraction viable et à une induction accrue d'apoptose des cellules leucémiques. Il s'agissait finalement de déterminer si ces cellules progénitrices, responsables en majeure partie des profils de division différentiels entre échantillons normaux et leucémiques, avaient conservé leur fonction clonogénique. Nos résultats indiquent que FL et G ont exercé une action de synergie sur l'effet de P quant à l'enrichissement du potentiel clonogénique des progéniteurs normaux, et surtout des progéniteurs *bcr-abl*⁻ d'échantillons leucémiques fortement infiltrés initialement. De plus, cet enrichissement du potentiel clonogénique des cellules, après culture, a été beaucoup plus faible pour les progéniteurs *bcr-abl*⁺. Les cellules normales et *bcr-abl*⁻ triées aux pics de division 0 et 1 ont particulièrement bien répondu à l'ajout de cytokines exogènes, présentant un enrichissement allant jusqu'à 200 fois. De plus, bien que les divisions subséquentes aient induit une diminution de FE du potentiel clonogénique, leurs valeurs étaient tout de même augmentées par rapport à celles du J0. Quant aux cellules *bcr-abl*⁺, leur potentiel clonogénique a été drastiquement diminué avec des divisions croissantes, suggérant que les cytokines exogènes utilisées auraient induit une perte de fonction clonogénique des progéniteurs leucémiques au cours des divisions et ainsi, une induction de différenciation. Par ailleurs, certaines cytokines peuvent induire la différenciation des cellules leucémiques puisque leur défaut de maturation peut être supplanté par l'ajout de hautes doses de cytokines exogènes, bien au-delà des doses physiologiques.²⁶⁷

La différence de réponse des cellules leucémiques par rapport aux normales pourrait provenir de leurs caractéristiques intrinsèques. Nous avons donc soulevé ces questions en tentant d'y répondre par les mécanismes d'action de *bcr-abl*, puis par

l'action des cytokines sur la combinaison des mécanismes physiologiques et des réponses cellulaires.

Une des principales caractéristiques des cellules de LMC est l'expression de la tyrosine kinase *bcr-abl*. Cette kinase active plusieurs voies de transduction de signaux impliquées dans la prolifération et l'anti-apoptose des cellules LMC. Stat5 et bcl-X jouent un rôle particulièrement important dans la survie *in vivo* de ces cellules.^{268,269} Les facteurs de croissance stimulent la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques par la formation de complexes de haute affinité avec leurs récepteurs. De plus, les résidus tyrosine de ces récepteurs de cytokines jouent aussi un rôle clé dans l'activation de familles de molécules de signalisation, telles que Jak et Stat.^{270,271} Bien que le profil d'expansion favorable aux cellules normales puisse impliquer des récepteurs de cytokines altérés, le dérèglement de l'activation transcriptionnelle par *bcr-abl*, induit par les cytokines, pourrait aussi être une des causes.

D'un autre côté, certaines cytokines comprenant GM-CSF et IL-3 qui ont exercé, sous la forme de P, la prolifération différentielle la plus importante entre les progéniteurs normaux et *bcr-abl*⁺, modifient également le potentiel d'adhésion des progéniteurs hématopoïétiques par la molécule de surface CD44.²⁷² En induisant l'adhésion à la matrice extracellulaire, les facteurs de croissance pourraient conduire à un ancrage accru de la tyrosine kinase *c-abl* à la F-actine cytoplasmique.²⁷³ En empêchant ainsi la translocation nucléaire de *c-abl* et l'induction d'expression de la protéine p73, un homologue fonctionnel de la protéine suppresseur de tumeurs p53,²⁷⁴ les cytokines inhiberaient l'apoptose²⁷⁵ et favoriseraient l'activité cytoplasmique de *c-abl* dans les cellules normales.²⁷⁶ De plus, bien que les cellules myéloïdes *bcr-abl*⁺ expriment F-actine de façon accrue, cette dernière présente une organisation anormale²³¹ conduisant à moins d'adhésions focales que dans les cellules normales.²⁷⁷ Ainsi, les cytokines pourraient accentuer la séquestration nucléaire de *bcr-abl*, et convertir la tyrosine kinase *bcr-abl* en un activateur d'apoptose.²⁷⁸

4.4 Conclusion

Le suivi de prolifération et d'apoptose des cellules produites par notre système de culture nous a permis d'élucider deux des mécanismes pouvant expliquer l'expansion préférentielle des cellules progénitrices normales par rapport aux leucémiques.

Puisque l'un des principaux buts visés par la culture *ex vivo* est la transplantation subséquente des greffons après leur manipulation *ex vivo*, nous avons également voulu nous assurer de la production de cellules progénitrices couvrant le plus grand spectre possible de l'hématopoïèse afin d'assurer une prise du greffon rapide, tant dans les lignées granulocytaires et monocytaires que les mégakaryocytaires.

C'est d'ailleurs cette dernière lignée qui a suscité un vif intérêt de notre part car la reprise *in vivo* inadéquate du système mégakaryocytaire constitue un des obstacles au succès des transplantations et peut se traduire par une thrombocytopénie puis des infections aigües chez les patients.

Le chapitre suivant traitera donc de l'application de l'expansion *ex vivo* en vue de pallier ce problème de taille dans le domaine de la transplantation hématopoiétique.

CHAPITRE 5

**Effet de synergie de cytokines dérivées de plaquettes matures
sur les cellules hématopoïétiques normales**

Chapitre 5. Effet de synergie de cytokines dérivées de plaquettes matures sur les cellules hématopoiétiques normales

La chimiothérapie à haute dose et la transplantation de cellules souches hématopoiétiques sont souvent associées à la morbidité causée par l'anémie et la thrombocytopénie. La thrombocytopénie en post-transplantation est attribuée à 3 facteurs principaux: la production inadéquate de facteurs de croissance mégakaryocytaires, la relâche de cytokines inhibitrices après dommages à la MO, et des nombres inadéquats de cellules progénitrices mégakaryocytaires dans le greffon du donneur.²⁷⁹ On note également que la reprise plaquettaire est faiblement stimulée par des cytokines telles que l'interleukine-3 (IL-3) et l'IL-6 qui, au contraire, induisent des niveaux relativement élevés de cytotoxicité plaquettaire.^{280,281} Par contre, les 2 autres cytokines précoces, Tpo et MDGF, sont très efficaces dans la reprise hématopoiétique de receveurs myélosupprimés.^{282,283} En fait, des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'expansion des CFU-Meg de cellules destinées à la transplantation, après une incubation de 2 jours avec un mélange de Tpo + c-kit ligand + IL-1 α + IL-3, conduit à une production accrue de plaquettes chez le receveur.²⁸⁴

Le saignement entraîné par la thrombocytopénie et l'anémie comptent parmi les complications principales de la transplantation de cellules souches hématopoiétiques. Des cytokines telles que le G-CSF et le GM-CSF ont été administrées *in vivo* pour diminuer le délai de reprise neutrophilique après une transplantation. Par contre, une reprise efficace du nombre de plaquettes devrait aussi être d'une extrême importance.

Dans l'étude actuelle, notre intérêt s'est dirigé vers l'effet de l'expansion *ex vivo* d'un mélange de facteurs de croissance extraits de plaquettes matures (PDFM), développé par Thératechnologies Inc. (Montréal, Canada). Aussi, procéderons-nous dans ce dernier chapitre à la description du matériel et des méthodes utilisées. Nous poursuivrons avec la description et l'analyse de nos résultats.

5.1 Matériel et Méthodes

5.1.1 Échantillons cliniques

Les CSPM ont été prélevées de donneurs volontaires normaux, après avoir obtenu leur consentement informé, sous les protocoles approuvés par le Comité de Protection des sujets humains de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Les cellules ont été anti-coagulées avec de l'héparine sans préservatif.

5.1.2 Facteurs de croissance

Un extrait de cytokines dérivées de plaquettes matures d'origine porcine, développé par Thératechnologies Inc. (Montréal, Canada), a été testé quant à son effet à doses croissantes sur des CSPM normales, après une expansion *ex vivo* en conditions sans sérum ni stroma. Suite à l'extraction des facteurs de croissance plaquettaires et à leur caractérisation par profil en HPLC, il a été défini que l'extrait de 10^{10} plaquettes contenait les cytokines suivantes: Albumine 36.9 µg, Fibronectine 20.1 µg, Thrombospondine 17.4 µg, PDGF (AA, AB, BB) 0.269 µg, TGF-β1 0.217 µg, TGF-β2 0.145 µg. Par ailleurs, l'Epidermal Growth Factor, l'Insulin Growth Factor-1, le Vascular-Fibroblast Growth Factor, le Vascular Epidermal Growth Factor et IL-1β, tous des facteurs impliqués dans la reconstitution tissulaire, n'ont pas été détectés.

Le PDFM a été utilisé à des doses variant de 1/5 à 1/160 (v/v) avec les suspensions cellulaires.

5.1.3 Cultures en suspension liquide

Les CSPM ont été mises en culture dans le milieu de culture sans sérum X-Vivo15 (Biowhittaker; Walkersville, MD), additionné d'albumine humaine 1%, L-glutamine 2%, et des doses croissantes de PDFM (Theratechnologies Inc., Montréal, Canada). Les cellules ont été mises en culture à 1×10^6 cells/ml dans des plaques de 24 puits (Nunc, Burlington, Canada) à raison de 2 ml par puits pendant 2 jours à 37°C avec 5% de CO₂ dans une atmosphère entièrement humidifiée. Les contrôles négatifs

consistaient en suspensions cellulaires cultivées dans le milieu de culture, sans ajout de facteurs de croissance. La période d'incubation optimale a été évaluée à 2 jours avec le PDFM. Des périodes d'incubation plus longues ont conduit à l'agrégation des cellules, sûrement à cause de la maturation des progéniteurs mégakaryocytaires en plaquettes, tel que déjà identifié.²⁸⁵ Les cellules prélevées aux jours 0 et 2 ont été diluées, comptées au Bleu de Trypan et l'effet dose-réponse des facteurs de croissance a été évalué par calcul de la «fold expansion» des cellules totales et par les caractéristiques clonogéniques des cellules post-expansion.

5.1.4 Quantification des progéniteurs clonogéniques par essais clonogéniques de progéniteurs

Les CSPM prélevées avant et après 2 jours de culture avec les diverses doses de PDFM ont été évaluées quant à leur potentiel clonogénique pour les lignées tant myéloïdes que mégakaryocytaires.

Le potentiel myéloïde clonogénique a été évalué en mettant les cellules d'intérêt en plaques dans un milieu de méthylcellulose (MethoCult H4434; StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canada) dans des puits de 35 mm en plastique selon les instructions du manufacturier. Les CFU-GM, BFU-E et les CFU-GEMM ont été évalués après 14 jours de culture à 37°C (5% CO₂), dans une atmosphère entièrement humidifiée, à l'aide d'un microscope inversé (Leitz, Labovert FS).

L'évaluation du potentiel clonogénique mégakaryocytaire (CFU-MK) a été faite aux jours 0 et 2 de culture *ex vivo* dans les conditions ci-haut mentionnées. Pour ce faire, 0.1 ml de CSPM diluées dans l'Iscove's MDM (Gibco BRL, Grand Island, NY) à 2.2×10^6 cellule/ml ont été ajoutées à chaque tube de 2 ml de milieu MegaCult™-C (MegaCult-C, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC) contenant la Thrombopoïétine recombinante humaine (rh) 50 ng/ml, IL-6 rh 10ng/ml, IL-3 rh 10 ng/ml, albumine sérique bovine 1%, insuline pancréatique bovine 10 µg/ml, transferrine humaine saturée de fer 200 µg/ml, 2-Mercaptoethanol 10^{-4} M 2 mM, et collagène 1.1 mg/ml. Le mélange de culture final (0.75 ml) a été distribué dans chacun des 2 puits d'une lame de culture à 2 chambres. Suite à l'incubation de 10

jours à 37°C, dans une atmosphère à 5% CO₂, humidifiée, le milieu a été déshydraté et les colonies ont été fixées avec un mélange de méthanol/acétone (1/3, v/v).

La détection des CFU-MK a été faite en colorant les cellules avec un anticorps primaire spécifique à la glycoprotéine mégakaryocytaire humaine GPIIb/IIIa (CD41), couplé à un anticorps secondaire biotinylé, révélé par un système de détection d'avidine alcaline phosphatase. Les cellules ont finalement été contre colorées dans une solution d'Evans bleu/Méthanol 0.5% p/v. L'évaluation a ensuite été faite au microscope. Trois catégories ont été identifiées: colonies mégakaryocytaires (Mk) pures (CFU-Mk), colonies Mk mixtes (contenant des cellules Mk ainsi que des cellules d'autres lignées), et des colonies non Mk, surtout de la lignée granulo-monocytaire.

5.2 Résultats et Discussion

5.2.1 *Effet dose-réponse de l'extrait de facteurs dérivé de plaquettes (PDFM) sur la «fold expansion» des cellules totales*

L'effet de doses croissantes de l'extrait de facteurs dérivés de plaquettes (PDFM) sur l'expansion des cellules totales de prélèvements de SPM normal a été évalué. La Figure 31 présente les valeurs de «fold expansion» de 4 expériences différentes et leur valeur moyenne après 2 jours d'incubation, des suspensions cellulaires avec des doses de PDFM variant de 1/5 à 1/160.

On note le maintien ou de faibles diminutions du nombre de cellules totales aux concentrations testées (de 0.4 à 1.2 x). Des concentrations de 1/10 à 1/20 de PDFM ont semblé être optimales pour le maintien du nombre total de cellules. Les concentrations adjacentes de PDFM ont été au détriment de l'expansion cellulaire.

Puisque le PDFM est principalement composé de cytokines précoces, nous avons procédé à l'évaluation de son effet sur les compartiments cellulaires plus immatures, les progéniteurs myéloïdes et mégakaryocytaires.

5.2.2 Expansion ex vivo des progéniteurs mégakaryocytaires en réponse à l'extrait de facteurs dérivés de plaquettes (PDFM)

Les progéniteurs mégakaryocytaires ont été catégorisés en colonies CFU-Mk, Non Mk et en colonies plus immatures, les Mk mixtes. Bien que le PDFM n'ait pas semblé exercer un effet significatif sur l'expansion des cellules totales, il a toutefois induit une expansion importante des CFU-Mk. Plus précisément, après 2 jours d'expansion, les CFU-Mk ont présenté des expansions variant de 2.75 à 13.5 fois tandis que les cellules incubées sans PDFM n'ont présenté que de modestes expansions variant de 0.9 à 3.5 fois, en comparaison aux chiffres de CFU-Mk initialement décelables. Les nombres de colonies les plus élevés ont été obtenus suite à l'incubation avec le PDFM à la concentration 1/10 (Figure 32 A, B, C). L'effet a été moins clairement défini pour les colonies Non Mk qui ont présenté un maintien général de leurs nombres en réponse aux doses de PDFM testées. Les concentrations de 1/80 et 1/160 ont uniquement maintenu les quantités initiales de CFU-Mk et de colonies Non Mk (Figure 32C). Quant aux colonies immatures Mk mixtes, leurs nombres sont demeurés généralement faibles. Cette constatation peut être expliquée, d'une part, du fait que les échantillons de SP initialement mobilisés n'aient pas été sélectionnés pour les cellules progénitrices CD34⁺ et n'aient donc compris que 1 à 3% de progéniteurs; d'autre part, que la période d'incubation ait été trop courte (2 jours).

5.2.3 Expansion ex vivo des progéniteurs myéloïdes en réponse à l'extrait de facteurs dérivés de plaquettes (PDFM)

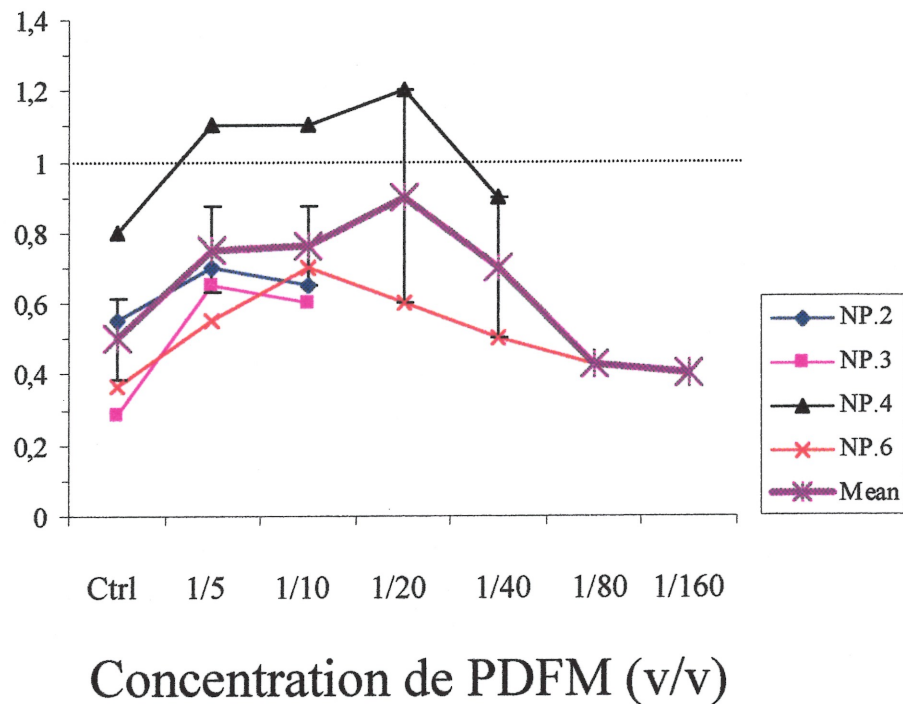
L'effet parallèle du PDFM sur les progéniteurs myéloïdes a aussi été évalué puisque cet extrait contient des facteurs précoces tels que le PDGF qui agit aux stades précoces de l'hématopoïèse, même avant l'engagement des progéniteurs à la lignée mégakaryocytaire.²⁹ Les nombres de CFU-GM ont présenté une croissance variant de 1.3 à 2.9 fois après l'incubation de 2 jours en présence de diverses doses de PDFM en comparaison à leur expansion sans PDFM. De plus, lorsque les chiffres du jour 2 ont été comparés aux chiffres initiaux, les CFU-GM ont présenté une expansion variant de 0.5 à 3.2 fois (Figure 33 A, B, C). Un effet significatif du PDFM sur l'expansion des BFU-E a été observé. Tel que présenté à la Figure 33, des

incubations de 2 jours avec le PDFM 1/10 ont induit des expansions de BFU-E atteignant 11.1 x (Figure 33A), suggérant ainsi que cet extrait de cytokines pourrait exercer des effets très précoces sur l'expansion *ex vivo* des progéniteurs érythroïdes. Quant aux colonies immatures CFU-GEMM, leurs nombres ont légèrement diminué, à la suite de l'incubation avec le PDFM dans 2 cas (Figure 33 A et C); tandis qu'au troisième cas, bien qu'aucune CFU-GEMM n'ait été décelable initialement, elles ont atteint des niveaux relativement élevés au terme des 2 jours de culture avec le PDFM (Figure 33B).

Ces données mettent donc l'emphase sur l'avantage que procurent les cytokines extraites de plaquettes matures. De façon importante, ces dernières produisent spécialement des cytokines qui agissent à des étapes précoces de l'hématopoïèse.

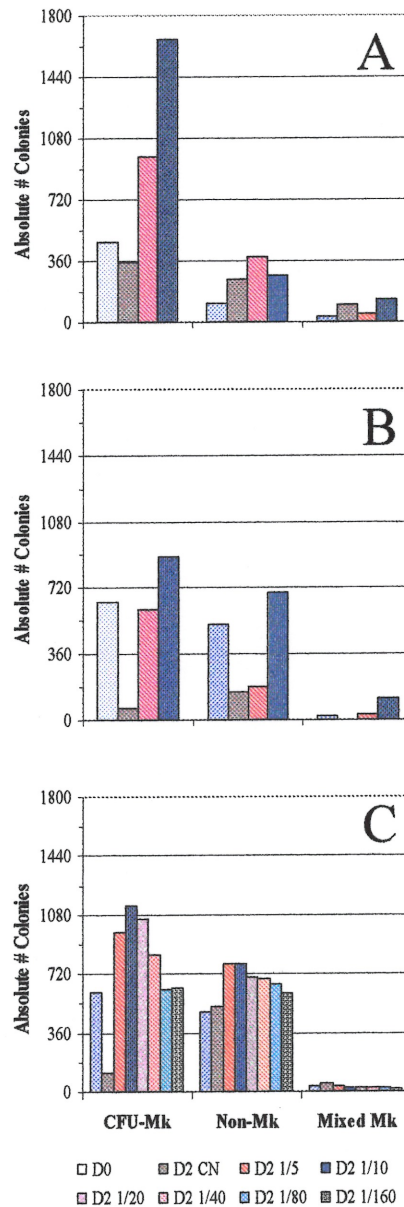
Dans des expériences futures, il sera très intéressant d'évaluer l'effet fonctionnel du PDFM sur les voies d'agrégation plaquettaire, par exemple. Le PDFM pourrait également être utilisé *in vivo* pour la mobilisation périphérique des progéniteurs mégakaryocytaires et érythroïdes puisque ces 2 lignées ont semblé répondre particulièrement bien au PDFM. D'ailleurs, une étude clinique a récemment suggéré que l'administration *in vivo* de Tpo et de G-CSF a conduit à une reprise hématopoïétique dans des délais cliniquement raisonnables.²⁸³ La reconstitution hématopoïétique est également observée suite à l'injection de MGDF chez des souris myélosupprimées.²⁸²

Figure 31. Courbes dose-réponse de la «fold expansion» des cellules totales suite à l'incubation avec l'extrait de facteurs dérivés de plaquettes (PDFM).



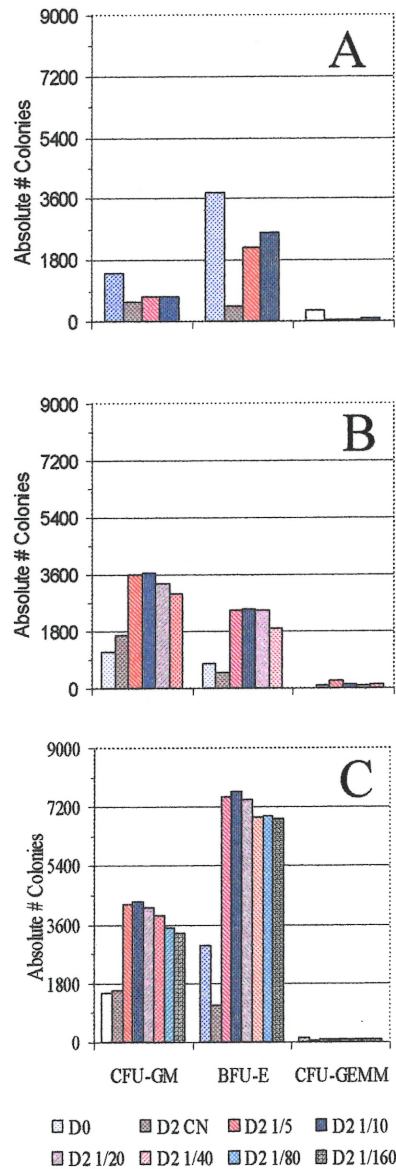
Les cellules de SP mobilisé ont été incubées pendant 2 jours dans un milieu de culture sans sérum avec des concentrations de PDFM variant de 1/5 à 1/160 (v/v). Les contrôles négatifs (Ctrl) ont consisté en des cellules de SP mobilisées incubées dans le milieu de culture uniquement, sans facteur de croissance ajouté. Valeur moyenne de «fold expansion» (Moy. \pm SEM).

Figure 32. Effet dose-réponse du PDFM sur l'expansion des colonies CFU-Mk, Non Mk et Mk mixtes suite à 2 jours de culture *ex vivo*.



Aux jours 0 et 2 post-culture sans PDFM ou avec des doses de PDFM variant de 1/5 à 1/160 (v/v), les cellules de SP mobilisées ont été mises en plaques dans le milieu de culture Mega-CultC™. Après 10 jours d'incubation à 37°C, 5% CO₂ dans une atmosphère entièrement humidifiée, les colonies ont été évaluées au microscope. A, Exp NP.2; B, Exp NP.3; C, Exp NP.6.

Figure 33. Effet dose-réponse du PDFM sur l'expansion des colonies CFU-GM, BFU-E et CFU-GEMM suite à 2 jours de culture *ex vivo*.



Aux jours 0 et 2 post-culture sans PDFM ou avec des doses de PDFM variant de 1/5 à 1/160 (v/v), les cellules de SP mobilisées ont été mises en plaques dans le milieu de culture Metho-Cult™. Après 14 jours d'incubation à 37°C, 5% CO₂ dans une atmosphère entièrement humidifiée, les colonies ont été évaluées au microscope inversé. A, Exp NP.3; B, Exp NP.4; C, Exp NP.6.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion Générale

Pour pallier les problèmes de contamination des greffons autologues par des cellules malignes résiduelles et de transfusion de greffons contenant de faibles quantités de cellules souches et progénitrices normales dans le contexte des néoplasies hématologiques, nous avons entrepris de tirer profit des caractéristiques moléculaires et cellulaires de deux types de tumeurs hématologiques.

Dans un premier temps, nous avons démontré le potentiel thérapeutique de l'agent photosensibilisateur BPD-MA, le dérivé de benzoporphyrine monoacide A, afin d'éliminer les cellules de lymphome non-Hodgkinien d'un greffon de cellules souches hématopoïétiques. Ce volet de notre étude a mis en évidence que des concentrations de 20 à 30 ng/ml de BPD-MA induisent l'élimination de 2 à 4 logs de cellules lymphomateuses parmi des cellules normales. En parallèle, à ces concentrations de BPD-MA (20-30 ng/ml), seulement 30% des CFU-GM immatures, 43% des CFU-GM matures, 24% des BFU-E et 40% des colonies endogènes ont été éliminées. Ce type de traitement offre donc une perspective intéressante pour le traitement de greffons de cellules souches hématopoïétiques de patients atteints de lymphome non-Hodgkinien.

Bien que le faible taux d'élimination de progéniteurs normaux ne devrait pas altérer la prise du greffon, la reprise hématopoïétique pourrait être compromise dans les cas où le taux d'infiltration par des cellules malignes est très élevé, et où les cellules souches normales se retrouvent en faible nombre. Cette situation s'apparente particulièrement à celle de la leucémie myéloïde chronique (LMC) où seulement de faibles proportions de cellules souches hématopoïétiques normales persistent tout au cours de la maladie. Nous avons donc évalué le potentiel de cytokines exogènes à promouvoir l'expansion de progéniteurs normaux de greffons de cellules souches prélevées de patients en phase avancée de la LMC. Des cellules CD34⁺ de patients atteints de LMC ont été exposées à des cytokines dont l'utilisation *in vivo* est autorisée: Flt3-ligand (FL), Pixykin321 (P) (protéine de fusion entre GM-CSF et IL-3), G-CSF (G), P+FL, et P+FL+G, incubées dans un milieu sans sérum et sans

stroma jusqu'à une période de 18 jours, et évaluées quant à leur croissance clonogénique par essais de progéniteurs à court et à long terme. De toutes les combinaisons testées, nos résultats indiquent que P (\pm FL \pm G) a été la plus efficace et a particulièrement induit l'expansion préférentielle de CFCs et LTC-ICs Ph⁻ aux dépens de leurs pendants leucémiques, avec des valeurs d'expansion de $392.3 \pm 178.8x$ par rapport à $17.3 \pm 5.9x$ (moyenne \pm SEM) pour les CFCs Ph⁻ en comparaison aux Ph⁺, et $1.1 \pm 0.4x$ par rapport à $0.7 \pm 0.3x$ pour les LTC-ICs, respectivement. L'expansion *in vitro* des CFCs leucémiques (CFU-GM et BFU-E) prélevées de patients en phase accélérée ou blastique de la LMC a été marginale (0.4 - $3.2x$) lorsque comparée aux progéniteurs correspondants de patients en phase chronique de la maladie (14 - $41x$). Nos études ont démontré que les combinaisons de cytokines comprenant GM-CSF/IL-3 ont été particulièrement efficaces à induire l'expansion préférentielle de progéniteurs normaux aux dépens des leucémiques, et que ces cytokines peuvent même agir chez les patients en phase avancée de la LMC.

Ce patron de croissance particulier des progéniteurs normaux et leucémiques, jusqu'alors non atteint dans de pareilles conditions avec un cocktail réduit de cytokines approuvées en clinique, a soulevé la question des mécanismes impliqués dans le développement d'un tel effet sur l'expansion cellulaire, soit la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire des progéniteurs normaux et leucémiques, en réponse à nos conditions de culture *ex vivo*. A cette étape du projet, nous avons combiné l'évaluation de fluorescence du CFSE à la détection du chromosome de Philadelphie et à celle de l'apoptose de cellules progénitrices CD34⁺ afin d'établir une corrélation entre les patrons d'expansion des progéniteurs normaux et leucémiques, et leurs profils de division cellulaire, leurs fractions apoptotiques et leurs degrés de différenciation dans nos conditions de culture *ex vivo*. Nos résultats indiquent que l'expansion préférentielle des progéniteurs normaux dans le contexte de la LMC dépendrait de 2 facteurs principaux, i- la prolifération accélérée des cellules progénitrices normales (Ph⁻) (jusqu'à 9 divisions en 6 jours) des échantillons de LMC en comparaison à leurs pendants leucémiques (Ph⁺) (majorité des cellules à 5/6 divisions) ainsi qu'aux cellules normales (d'échantillons normaux); ii- des fractions

apoptotiques plus élevées parmi les cellules leucémiques que les normales, surtout dans les échantillons à forts pourcentages initiaux de cellules Ph⁺. Ces études démontrent donc que l'expansion leucémique prédominante *in vivo* peut être manipulée *ex vivo* afin de promouvoir la croissance préférentielle des cellules normales résiduelles et ceci, malgré un encombrement leucémique majeur.

Finalement, bien que nous soyions parvenus à l'expansion préférentielle de cellules normales dans le contexte leucémique, la thrombocytopénie et l'anémie sont des problèmes souvent associés à l'autogreffe en LMC. Les extraits de plaquettes se sont avérés ici, de façon tout à fait inédite, efficaces dans l'expansion des populations de progéniteurs mégakaryocytaires et érythroïdes. Nos résultats indiquent qu'une incubation de seulement 2 jours de cellules de sang périphérique mobilisé avec un extrait de plaquettes matures PDFM (Platelet Derived Factor Mix) a induit l'expansion tant de colonies mégakaryocytaires (CFU-Mk) (2.8-13.5x), de colonies myéloïdes (0.5-3.2x) que de colonies érythroïdes (BFU-E) (jusqu'à 11.1x). Ces observations suggèrent que l'incubation, en présence du PDFM, de cellules progénitrices permettrait d'atteindre une reconstitution plaquettaire dans des délais accélérés, et que cet effet pourrait même affecter la reprise hématologique myéloïde et érythroïde.

Nos résultats permettent donc d'envisager la possibilité d'utiliser les différentes combinaisons de cytokines afin de produire des greffons à fonctions précises; la reconstitution myéloïde d'un côté, et les reconstitutions mégakaryocytaire et érythrocytaire de l'autre, pour atteindre une efficacité thérapeutique optimale.

Nos études sous-tendent une application clinique et sont aussi déterminantes dans la mise en évidence de la dérégulation des mécanismes de prolifération des cellules dans le contexte de la LMC. La capacité intrinsèque des cellules leucémiques à produire des facteurs de croissance endogènes, spécialement dans les cas de LMC en phase avancée, serait particulièrement avantageuse pour les cellules normales résiduelles dans les conditions de culture *ex vivo* sans sérum et sans stroma décrites ici. Nos résultats suggèrent donc un nouveau mécanisme biologique pour

expliquer la survie prolongée de progéniteurs hématopoiétiques normaux dans un contexte d'invasion massive par des cellules leucémiques. Nous ouvrons ainsi de nouvelles voies vers la compréhension de la relation entre la croissance des progéniteurs Ph^- , celle des progéniteurs Ph^+ , l'effet des cytokines IL-3 et GM-CSF tant endogènes qu'exogènes, ainsi que l'absence de contrôle prolifératif du microenvironnement leucémique sur les progéniteurs Ph^- et Ph^+ dans nos conditions sans sérum et sans stroma. Ainsi, grâce à notre système *in vitro* et à l'effet bénéfique potentiel des cellules Ph^+ sur la croissance préférentielle des cellules Ph^- décrite dans notre étude, il sera intéressant de déterminer i- quel est le profil de cytokines produites, après culture, par des échantillons de LMC à forts pourcentages initiaux de cellules Ph^+ et le comparer à des échantillons de LMC à faibles pourcentages initiaux en cellules Ph^+ ; ii- quelle est la contribution des facteurs inhibiteurs ou promoteurs de croissance cellulaire, et des protéines transductrices de signaux de mort cellulaire ou de différenciation dans les cellules Ph^- et Ph^+ , avant et après culture.

Finalement, il serait intéressant d'investiguer comment les mécanismes qui confèrent un privilège de croissance aux cellules normales *in vitro*, pourraient être utilisés afin d'identifier des approches thérapeutiques *in vivo*. Donc, le dérèglement tumoral pourrait être altéré, à son tour, et supplanté par un «déséquilibre» des cellules normales. En fait, en prêtant une grande attention aux phénomènes expérimentaux et en intégrant ces données dans le contexte global des connaissances des cellules tumorales, nous pourrions parvenir à une meilleure compréhension du tout complexe que représente la transformation néoplasique.

À cet égard, nous terminerons par une citation de Pascal tirée de «Pensées»:

«... les parties du monde ont toutes un tel rapport et un tel enchaînement
l'une avec l'autre, que je crois impossible de connaître l'une sans l'autre et
sans le tout.»²⁸⁶

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

1. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;81:2844-2853.
2. Furukawa Y. Cell cycle control during hematopoietic cell differentiation. *Hum Cell*. 1997;10:159-164.
3. Nakahata T, Gross AJ, Ogawa M. A stochastic model of self-renewal and commitment to differentiation of the primitive hemopoietic stem cells in culture. *J Cell Physiol*. 1982;113:455-458.
4. Suda T, Suda J, Ogawa M. Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:2520-2524.
5. Metcalf D. Lineage commitment of hemopoietic progenitor cells in developing blast cell colonies: influence of colony-stimulating factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:11310-11314.
6. Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Nagata S. Growth and differentiation signals mediated by different regions in the cytoplasmic domain of granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Cell*. 1993;74:1079-1087.
7. Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F, Risdon G, Patterson B, Broxmeyer HE, Dick JE. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood*. 1994;83:2489-2497.

8. Cashman JD, Lapidot T, Wang JC, Doedens M, Shultz LD, Lansdorp P, Dick JE, Eaves CJ. Kinetic evidence of the regeneration of multilineage hematopoiesis from primitive cells in normal human bone marrow transplanted into immunodeficient mice. *Blood*. 1997;89:4307-4316.
9. Bhatia R, McGlave PB, Miller JS, Wissink S, Lin WN, Verfaillie CM. A clinically suitable ex vivo expansion culture system for LTC-IC and CFC using stroma-conditioned medium. *Exp Hematol*. 1997;25:980-991.
10. Bock TA, Orlic D, Dunbar CE, Broxmeyer HE, Bodine DM. Improved engraftment of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient (SCID) mice carrying human cytokine transgenes. *J Exp Med*. 1995;182:2037-2043.
11. Namikawa R, Weilbaecher KN, Kaneshima H, Yee EJ, McCune JM. Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse. *J Exp Med*. 1990;172:1055-1063.
12. Heike Y, Ohira T, Takahashi M, Saijo N. Long-term human hematopoiesis in SCID-hu mice bearing transplanted fragments of adult bone and bone marrow cells. *Blood*. 1995;86:524-530.
13. DiGiusto D, Chen S, Combs J, Webb S, Namikawa R, Tsukamoto A, Chen BP, Galy AH. Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood*. 1994;84:421-432.
14. Hill B, Rozler E, Travis M, Chen S, Zannettino A, Simmons P, Galy A, Chen B, Hoffman R. High-level expression of a novel epitope of CD59 identifies a subset of CD34+ bone marrow cells highly enriched for pluripotent stem cells. *Exp Hematol*. 1996;24:936-943.

15. Rappold I, Ziegler BL, Kohler I, Marchetto S, Rosnet O, Birnbaum D, Simmons PJ, Zannettino AC, Hill B, Neu S, Knapp W, Alitalo R, Alitalo K, Ullrich A, Kanz L, Buhring HJ. Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood*. 1997;90:111-125.
16. Uchida N, Yang Z, Combs J, Pourquoi O, Nguyen M, Ramanathan R, Fu J, Welply A, Chen S, Weddell G, Sharma AK, Leiby KR, Karagogeos D, Hill B, Humeau L, Stallcup WB, Hoffman R, Tsukamoto AS, Gearing DP, Peault B. The characterization, molecular cloning, and expression of a novel hematopoietic cell antigen from CD34+ human bone marrow cells. *Blood*. 1997;89:2706-2716.
17. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90:5002-5012.
18. Verstegen MM, van HP, Terpstra W, van dB, Wielenga JJ, van RN, Ploemacher RE, Wagemaker G, Wognum AW. Transplantation of human umbilical cord blood cells in macrophage-depleted SCID mice: evidence for accessory cell involvement in expansion of immature CD34+CD38- cells. *Blood*. 1998;91:1966-1976.
19. Schibler KR, Li Y, Ohls RK, Nye NC, Durham MC, White W, Liechty KW, Le T, Christensen RD. Possible mechanisms accounting for the growth factor independence of hematopoietic progenitors from umbilical cord blood. *Blood*. 1994;84:3679-3684.

20. Phillips RL, Ernst RE, Brunk B, Ivanova N, Mahan MA, Deanehan JK, Moore KA, Overton GC, Lemischka IR. The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science*. 2000;288:1635-1640.
21. Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety?. *Blood*. 1993;82:3515-3523.
22. Gupta P, McCarthy JB, Verfaillie CM. Stromal fibroblast heparan sulfate is required for cytokine-mediated ex vivo maintenance of human long-term culture-initiating cells. *Blood*. 1996;87:3229-3236.
23. Gupta P, Oegema TRJ, Brazil JJ, Dudek AZ, Slungaard A, Verfaillie CM. Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche. *Blood*. 1998;92:4641-4651.
24. Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, Ruggieri L, Li ZH, Lyman SD. Flt3 ligand stimulates/costimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. *Exp Hematol*. 1995;23:1121-1129.
25. Slanicka KM, Nissen C, Manz CY, Toksoz D, Lyman SD, Wodnar-Filipowicz A. The membrane-bound isoform of stem cell factor synergizes with soluble flt3 ligand in supporting early hematopoietic cells in long-term cultures of normal and aplastic anemia bone marrow. *Exp Hematol*. 1998;26:365-373.
26. Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood*. 1993;81:2579-2584.

27. McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp Hematol.* 1991;19:226-231.
28. Liu J, Li K, Yuen PM, Fok TF, Yau FW, Yang M, Li CK. Ex vivo expansion of enriched CD34+ cells from neonatal blood in the presence of thrombopoietin, a comparison with cord blood and bone marrow. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24:247-252.
29. Su RJ, Li K, Yang M, Zhang XB, Tsang KS, Fok TF, Li CK, Yuen PM. Platelet-derived growth factor enhances ex vivo expansion of megakaryocytic progenitors from human cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27:1075-1080.
30. McKinstry WJ, Li CL, Rasko JE, Nicola NA, Johnson GR, Metcalf D. Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997;89:65-71.
31. Macias MP, Fitzpatrick LA, Brenneise I, McGarry MP, Lee JJ, Lee NA. Expression of IL-5 alters bone metabolism and induces ossification of the spleen in transgenic mice. *J Clin Invest.* 2001;107:949-959.
32. Hatakeyama M, Tsudo M, Minamoto S, Kono T, Doi T, Miyata T, Miyasaka M, Taniguchi T. Interleukin-2 receptor beta chain gene: generation of three receptor forms by cloned human alpha and beta chain cDNA's. *Science.* 1989;244:551-556.
33. Mosley B, Beckmann MP, March CJ, Idzerda RL, Gimpel SD, VandenBos T, Friend D, Alpert A, Anderson D, Jackson J. The murine interleukin-4 receptor:

- molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell*. 1989;59:335-348.
34. Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science*. 1988;241:825-828.
 35. Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, Jerzy R, Falk BA, Gimpel S, Cosman D, Dower SK, March CJ, Namen AE. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell*. 1990;60:941-951.
 36. Renauld JC, Druetz C, Kermouni A, Houssiau F, Uyttenhove C, Van RE, Van SJ. Expression cloning of the murine and human interleukin 9 receptor cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:5690-5694.
 37. Hilton DJ, Hilton AA, Raicevic A, Rakar S, Harrison-Smith M, Gough NM, Begley CG, Metcalf D, Nicola NA, Willson TA. Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *EMBO J*. 1994;13:4765-4775.
 38. Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, Truitt TP, Nunes P, Minetti LJ, Warriar RR, Presky DH, Levine JF, Gately MK. Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol*. 1994;153:128-136.
 39. Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Seto Y, Nagata S. Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Cell*. 1990;61:341-350.

40. D'Andrea AD, Fasman GD, Lodish HF. Erythropoietin receptor and interleukin-2 receptor beta chain: a new receptor family. *Cell*. 1989;58:1023-1024.
41. Vigon I, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila MT, Tambourin P, Gisselbrecht S, Souyri M. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:5640-5644.
42. Murakami M, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, Taga T, Kishimoto T. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:11349-11353.
43. Vandenberg GR, deCastro CM, Taylor H, Dew-Knight S, Kaufman RE. Cloning and structural analysis of the human c-kit gene. *Oncogene*. 1992;7:1259-1266.
44. Wypych J, Bennett LG, Schwartz MG, Clogston CL, Lu HS, Broudy VC, Bartley TD, Parker VP, Langley KE. Soluble kit receptor in human serum. *Blood*. 1995;85:66-73.
45. Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 1995;80:213-223.
46. Nakamura Y, Russell SM, Mess SA, Friedmann M, Erdos M, Francois C, Jacques Y, Adelstein S, Leonard WJ. Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling. *Nature*. 1994;369:330-333.

47. Taniguchi T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*. 1995;268:251-255.
48. Merida I, Williamson P, Kuziel WA, Greene WC, Gaulton GN. The serine-rich cytoplasmic domain of the interleukin-2 receptor beta chain is essential for interleukin-2-dependent tyrosine protein kinase and phosphatidylinositol-3-kinase activation. *J Biol Chem*. 1993;268:6765-6770.
49. Muller M, Briscoe J, Laxton C, Guschin D, Ziemiecki A, Silvennoinen O, Harpur AG, Barbieri G, Witthuhn BA, Schindler C. The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction. *Nature*. 1993;366:129-135.
50. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:369-398.
51. Watling D, Guschin D, Muller M, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Quelle FW, Rogers NC, Schindler C, Stark GR, Ihle JN. Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature*. 1993;366:166-170.
52. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990;61:203-212.
53. Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Nagata S. Purification and characterization of the receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem*. 1990;265:14008-14015.

54. Roessler E, Grant A, Ju G, Tsudo M, Sugamura K, Waldmann TA. Cooperative interactions between the interleukin 2 receptor alpha and beta chains alter the interleukin 2-binding affinity of the receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:3344-3347.
55. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D, Anderson D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J*. 1994;13:2822-2830.
56. Narazaki M, Witthuhn BA, Yoshida K, Silvennoinen O, Yasukawa K, Ihle JN, Kishimoto T, Taga T. Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:2285-2289.
57. Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C. Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell*. 1993;74:237-244.
58. Morella KK, Bruno E, Kumaki S, Lai CF, Fu J, Wang HM, Murray L, Hoffman R, Timour M, Benit L. Signal transduction by the receptors for thrombopoietin (c-mpl) and interleukin-3 in hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Blood*. 1995;86:557-571.
59. Miura O, Miura Y, Nakamura N, Quelle FW, Witthuhn BA, Ihle JN, Aoki N. Induction of tyrosine phosphorylation of Vav and expression of Pim-1 correlates with Jak2-mediated growth signaling from the erythropoietin receptor. *Blood*. 1994;84:4135-4141.
60. Chen JX, Watanabe S, Muto A, Miyajima A, Yokota T, Arai K. Activation of early response genes and cell proliferation by human interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin-5 receptors: comparison

with human interleukin-4 receptor signaling. *J Allergy & Clin Immunol.* 1994;94:605-611.

61. Lia F, Rajotte D, Clark S, Hoang T. A Dominant Negative Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Receptor alpha Chain Reveals the Multimeric Structure of the Receptor Complex. *J Biol Chem.* 1996;271:28287-28293.
62. Patel N, Herrman JM, Timans JC, Kastelein RA. Functional Replacement of Cytokine Receptor Extracellular Domains by Leucine Zippers. *J Biol Chem.* 1996;271:30386-30391.
63. Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J.* 1995;14:1421-1429.
64. Nicholson SE, Oates AC, Harpur AG, Ziemiecki A, Wilks AF, Layton JE. Tyrosine kinase JAK1 is associated with the granulocyte-colony-stimulating factor receptor and both become tyrosine-phosphorylated after receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:2985-2988.
65. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, van DJ, Grosveld G, Ihle JN. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell.* 1998;93:385-395.
66. Candotti F, Oakes SA, Johnston JA, Giliani S, Schumacher RF, Mella P, Fiorini M, Ugazio AG, Badolato R, Notarangelo LD, Bozzi F, Macchi P, Strina D, Vezzoni P, Blaese RM, O'Shea JJ, Villa A. Structural and functional basis for

- JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood*. 1997;90:3996-4003.
67. Okuda K, Sanghera JS, Pelech SL, Kanakura Y, Hallek M, Griffin JD, Druker BJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor induce rapid tyrosine phosphorylation of p42 and p44 MAP kinase. *Blood*. 1992;79:2880-2887.
 68. Torti M, Marti KB, Altschuler D, Yamamoto K, Lapetina EG. Erythropoietin induces p21ras activation and p120GAP tyrosine phosphorylation in human erythroleukemia cells. *J Biol Chem*. 1992;267:8293-8298.
 69. McCormick F. Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature*. 1993;363:15-16.
 70. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell*. 1992;70:431-442.
 71. Sato N, Sakamaki K, Terada N, Arai K, Miyajima A. Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signaling. *EMBO J*. 1993;12:4181-4189.
 72. Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, Bar-Sagi D, Margolis B, Schlessinger J. Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*. 1993;363:85-88.

73. Chen RH, Abate C, Blenis J. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:10952-10956.
74. Giordano V, De FG, Chiari R, Quinto I, Pelicci PG, Bartholomew L, Delmastro P, Gadina M, Scala G. Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase. *J Immunol*. 1997;158:4097-4103.
75. Ernst M, Oates A, Dunn AR. Gp130-mediated signal transduction in embryonic stem cells involves activation of Jak and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*. 1996;271:30136-30143.
76. Horvath CM, Wen Z, Darnell JEJ. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes & Dev*. 1995;9:984-994.
77. Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JEJ. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*. 1994;76:821-828.
78. Zhong Z, Wen Z, Darnell JEJ. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. 1994;264:95-98.
79. Gouilleux F, Wakao H, Mundt M, Groner B. Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J*. 1994;13:4361-4369.
80. Quelle FW, Shimoda K, Thierfelder W, Fischer C, Kim A, Ruben SM, Cleveland JL, Pierce JH, Keegan AD, Nelms K. Cloning of murine Stat6 and

- human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. *Mol & Cell Biol.* 1995;15:3336-3343.
81. Carlo-Stella C, Mangoni L, Almici C, Caramatti C, Cottafavi L, Dotti GP, Rizzoli V. Autologous transplant for chronic myelogenous leukemia using marrow treated *ex vivo* with mafosfamide. *Bone Marrow Transplant.* 1994;14:425-432.
 82. Petzer AL, Hogge DE, Landsdorp PM, Reid DS, Eaves CJ. Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture- initiating cells) *in vitro* and their expansion in defined medium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:1470-1474.
 83. Elwood NJ, Zogos H, Willson T, Begley CG. Retroviral transduction of human progenitor cells: use of granulocyte colony-stimulating factor plus stem cell factor to mobilize progenitor cells *in vivo* and stimulation by Flt3/Flk-2 ligand *in vitro*. *Blood.* 1996;88:4452-4462.
 84. Brasel K, McKenna HJ, Morrissey PJ, Charrier K, Morris AE, Lee CC, Williams DE, Lyman SD. Hematologic effects of flt3 ligand *in vivo* in mice. *Blood.* 1996;88:2004-2012.
 85. Namikawa R, Muench MO, Firpo MT, Humeau L, Xu Y, Menon S, Roncarolo MG. Administration of Flk2/Flt3 ligand induces expansion of human high-proliferative potential colony-forming cells in the SCID-hu mouse. *Exp Hematol.* 1999;27:1029-1037.
 86. Pless M, Wodnar-Filipowicz A, John L, Baldomero H, Lyman SD, Nissen C, Gratwohl A. Synergy of growth factors during mobilization of peripheral blood

- precursor cells with recombinant human Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor in rabbits. *Exp Hematol.* 1999;27:155-161.
87. Fay JW, Lazarus H, Herzig R, Saez R, Stevens DA, Collins RH, Pineiro LA, Cooper BW, DiCesare J, Campion M. Sequential administration of recombinant human interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after autologous bone marrow transplantation for malignant lymphoma: a phase I/II multicenter study. *Blood.* 1994;84:2151-2157.
 88. Bruno E, Briddell RA, Cooper RJ, Brandt JE, Hoffman R. Recombinant GM-CSF/IL-3 fusion protein: its effect on in vitro human megakaryocytopoiesis. *Exp Hematol.* 1992;20:494-499.
 89. Miller LL, Korn EL, Stevens DS, Janik JE, Gause BL, Kopp WC, Holmlund JT, Curti BD, Sznol M, Smith JW, Urba WJ, Donegan SE, Watson TM, Longo DL. Abrogation of the hematological and biological activities of the interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein PIXY321 by neutralizing anti-PIXY321 antibodies in cancer patients receiving high-dose carboplatin. *Blood.* 1999;93:3250-3258.
 90. Bachier CR, Gokmen E, Teale J, Lanzkron S, Childs C, Franklin W, Shpall E, Douville J, Weber S, Muller T, Armstrong D, LeMaistre CF. Ex-vivo expansion of bone marrow progenitor cells for hematopoietic reconstitution following high-dose chemotherapy for breast cancer. *Exp Hematol.* 1999;27:615-623.
 91. De Felice L, Di Pucchio T, Mascolo MG, Agostini F, Breccia M, Guglielmi C, Ricciardi MR, Tafuri A, Screnci M, Mandelli F, Arcese W. Flt3LP3 induces the ex-vivo amplification of umbilical cord blood committed progenitors and early stem cells in short-term cultures. *Br J Haematol.* 1999;106:133-141.

92. Nakajima H, Ihle JN. Granulocyte colony-stimulating factor regulates myeloid differentiation through CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *Blood*. 2001;98:897-905.
93. Petzer AL, Zandstra PW, Piret JM, Eaves CJ. Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *J Exp Med*. 1996;183:2551-2558.
94. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, Fagioli F, Berger M, Aglietta M. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood*. 1997;89:2644-2653.
95. Rebel VI, Dragowska W, Eaves CJ, Humphries RK, Lansdorp PM. Amplification of Sca-1+ Lin- WGA+ cells in serum-free cultures containing steel factor, interleukin-6, and erythropoietin with maintenance of cells with long-term in vivo reconstituting potential. *Blood*. 1994;83:128-136.
96. Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood*. 1996;87:30-37.
97. Breems DA, Blokland EA, Ploemacher RE. Stroma-conditioned media improve expansion of human primitive hematopoietic stem cells and progenitor cells. *Leukemia*. 1997;11:142-150.
98. Cashman JD, Eaves AC, Raines EW, Ross R, Eaves CJ. Mechanisms that regulate the cell cycle status of very primitive hematopoietic cells in long-term human marrow cultures. I. Stimulatory role of a variety of mesenchymal cell activators and inhibitory role of TGF-beta. *Blood*. 1990;75:96-101.

99. Gishizky ML, Johnson-White J, Witte ON. Efficient transplantation of BCR-ABL-induced chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:3755-3759.
100. Udomsakdi C, Eaves CJ, Swolin B, Reid DS, Barnett MJ, Eaves AC. Rapid decline of chronic myeloid leukemic cells in long-term culture due to a defect at the leukemic stem cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:6192-6196.
101. Marley SB, Lewis JL, Scott MA, Goldman JM, Gordon MY. Evaluation of 'discordant maturation' in chronic myeloid leukaemia using cultures of primitive progenitor cells and their production of clonogenic progeny (CFU-GM). *Br J Haematol*. 1996;95:299-305.
102. Yanagisawa K, Yamauchi H, Kaneko M, Kohno H, Hasegawa H, Fujita S. Suppression of cell proliferation and the expression of a bcr-abl fusion gene and apoptotic cell death in a new human chronic myelogenous leukemia cell line, KT-1, by interferon-alpha. *Blood*. 1998;91:641-648.
103. Sirard C, Laneuville P, Dick JE. Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism. *Blood*. 1994;83:1575-1585.
104. Hallek M, Danhauser-Riedl S, Herbst R, Warmuth M, Winkler A, Kolb HJ, Druker B, Griffin JD, Emmerich B, Ullrich A. Interaction of the receptor tyrosine kinase p145c-kit with the p210bcr/abl kinase in myeloid cells. *Br J Haematol*. 1996;94:5-16.
105. Spencer A, Yan XH, Chase A, Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL-positive lymphoblastoid cells display limited proliferative capacity under in vitro culture conditions. *Br J Haematol*. 1996;94:654-658.

106. Laneuville P, Heisterkamp N, Groffen J. Expression of the chronic myelogenous leukemia-associated p210bcr/abl oncoprotein in a murine IL-3 dependent myeloid cell line. *Oncogene*. 1991;6:275-282.
107. Laneuville P, Sun G, Timm M, Vekemans M. Clonal evolution in a myeloid cell line transformed to interleukin-3 independent growth by retroviral transduction and expression of p210bcr/abl. *Blood*. 1992;80:1788-1797.
108. Laneuville P, Timm M, Hudson AT. bcr/abl expression in 32D cl3(G) cells inhibits apoptosis induced by protein tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Research*. 1994;54:1360-1366.
109. Carlesso N, Griffin JD, Druker BJ. Use of a temperature-sensitive mutant to define the biological effects of the p210BCR-ABL tyrosine kinase on proliferation of a factor-dependent murine myeloid cell line. *Oncogene*. 1994;9:149-156.
110. Danhauser-Riedl S, Warmuth M, Druker BJ, Emmerich B, Hallek M. Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells. *Cancer Res*. 1996;56:3589-3596.
111. Sawyers CL, Callahan W, Witte ON. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell*. 1992;70:901-910.
112. Pendergast AM, Gishizky ML, Havlik MH, Witte ON. SH1 domain autophosphorylation of P210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Molecular & Cellular Biology*. 1993;13:1728-1736.

113. Afar DE, Goga A, McLaughlin J, Witte ON, Sawyers CL. Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc. *Science*. 1994;264:424-426.
114. Skorski T, Kanakaraj P, Ku DH, Nieborowska-Skorska M, Canaani E, Zon G, Perussia B, Calabretta B. Negative regulation of p120GAP GTPase promoting activity by p210bcr/abl: implication for RAS-dependent Philadelphia chromosome positive cell growth. *J Exp Med*. 1994;179:1855-1865.
115. Anderson SM, Mladenovic J. The BCR-ABL oncogene requires both kinase activity and src-homology 2 domain to induce cytokine secretion. *Blood*. 1996;87:238-244.
116. Ilaria RLJ, Van ER. The SH2 domain of P210BCR/ABL is not required for the transformation of hematopoietic factor-dependent cells. *Blood*. 1995;86:3897-3904.
117. Jonuleit T, Peschel C, Schwab R, van dK, Buchdunger E, Fischer T, Huber C, Aulitzky WE. Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *Br J Haematol*. 1998;100:295-303.
118. Afar DE, McLaughlin J, Sherr CJ, Witte ON, Roussel MF. Signaling by ABL oncogenes through cyclin D1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:9540-9544.
119. Eaves AC, Cashman JD, Gaboury LA, Kalousek DK, Eaves CJ. Unregulated proliferation of primitive chronic myeloid leukemia progenitors in the presence of normal marrow adherent cells [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Feb;84(4):1117]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:5306-5310.

120. Bedi A, Zehnbaauer BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1994;83:2038-2044.
121. Gishizky ML, Witte ON. Initiation of deregulated growth of multipotent progenitor cells by bcr-abl in vitro. *Science*. 1992;256:836-839.
122. Wetzler M, Talpaz M, Lowe DG, Baiocchi G, Gutterman JU, Kurzrock R. Constitutive expression of leukemia inhibitory factor RNA by human bone marrow stromal cells and modulation by IL-1, TNF-alpha, and TGF-beta. *Exp Hematol*. 1991;19:347-351.
123. Bhatia R, McGlave PB, Dewald GW, Blazar BR, Verfaillie CM. Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood*. 1995;85:3636-3645.
124. Hurley RW, McCarthy JB, Verfaillie CM. Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. *J Clin Invest*. 1995;96:511-519.
125. Bhatia R, McCarthy JB, Verfaillie CM. Interferon-alpha restores normal beta 1 integrin-mediated inhibition of hematopoietic progenitor proliferation by the marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1996;87:3883-3891.
126. Lundell BI, McCarthy JB, Kovach NL, Verfaillie CM. Activation-dependent alpha5beta1 integrin-mediated adhesion to fibronectin decreases proliferation of chronic myelogenous leukemia progenitors and K562 cells. *Blood*. 1996;87:2450-2458.

127. Kantarjian HM, Smith TL, McCredie KB, Keating MJ, Walters RS, Talpaz M, Hester JP, Bligham G, Gehan E, Freireich EJ. Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. *Blood*. 1985;66:1326-1335.
128. Teixido J, Hemler ME, Greenberger JS, Anklesaria P. Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J Clin Invest*. 1992;90:358-367.
129. Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alterations in their interaction with fibronectin. *J Exp Med*. 1991;174:693-703.
130. McWhirter JR, Wang JY. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J*. 1993;12:1533-1546.
131. Gotoh A, Miyazawa K, Ohyashiki K, Tauchi T, Boswell HS, Broxmeyer HE, Toyama K. Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125FAK) by BCR-ABL oncoprotein. *Exp Hematol*. 1995;23:1153-1159.
132. Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem*. 1994;269:22925-22928.
133. Salgia R, Uemura N, Okuda K, Li JL, Pisick E, Sattler M, de JR, Druker B, Heisterkamp N, Chen LB. CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem*. 1995;270:29145-29150.

134. Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. *J Clin Invest.* 1992;90:1232-1241.
135. Bhatia R, Wayner EA, McGlave PB, Verfaillie CM. Interferon-alpha restores normal adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors to bone marrow stroma by correcting impaired beta 1 integrin receptor function. *J Clin Invest.* 1994;94:384-391.
136. Bhatia R, Munthe H, Verfaillie CM. Decreased Beta1-integrin receptor capping in CML progenitors reflecting abnormal receptor cytoskeletal interactions is normalized by interferon-alpha. *Blood.* 1996;88:2537a.
137. Bhatia R, McGlave PB, Verfaillie CM. Treatment of marrow stroma with interferon-alpha restores normal beta 1 integrin-dependent adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. Role of MIP-1 alpha. *J Clin Invest.* 1995;96:931-939.
138. Bhatia R, Verfaillie CM. Inhibition of BCR-ABL expression with antisense oligodeoxynucleotides restores beta1 integrin-mediated adhesion and proliferation inhibition in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. *Blood.* 1998;91:3414-3422.
139. Hurley RW, McCarthy JB, Wayner EA, Verfaillie CM. Monoclonal antibody crosslinking of the alpha 4 or beta 1 integrin inhibits committed clonogenic hematopoietic progenitor proliferation. *Exp Hematol.* 1997;25:321-328.

140. Salgia R, Brunkhorst B, Pisick E, Li JL, Lo SH, Chen LB, Griffin JD. Increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in myeloid cell lines expressing p210BCR/ABL. *Oncogene*. 1995;11:1149-1155.
141. Sattler M, Salgia R, Okuda K, Uemura N, Durstin MA, Pisick E, Xu G, Li JL, Prasad KV, Griffin JD. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene*. 1996;12:839-846.
142. Aneskievich BJ, Haimovich B, Boettiger D. Phosphorylation of integrin in differentiating ts-Rous sarcoma virus-infected myogenic cells. *Oncogene*. 1991;6:1381-1390.
143. Johansson MW, Larsson E, Luning B, Pasquale EB, Ruoslahti E. Altered localization and cytoplasmic domain-binding properties of tyrosine-phosphorylated beta 1 integrin. *Journal of Cell Biology*. 1994;126:1299-1309.
144. McGahon A, Bissonnette R, Schmitt M, Cotter KM, Green DR, Cotter TG. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood*. 1994;83:1179-1187.
145. Zhu J, Nabissa PM, Hoffman B, Liebermann DA, Shore SK. Activated abl oncogenes and apoptosis: differing responses of transformed myeloid progenitor cell lines. *Blood*. 1996;87:4368-4375.
146. Salomoni P, Wasik MA, Riedel RF, Reiss K, Choi JK, Skorski T, Calabretta B. Expression of constitutively active Raf-1 in the mitochondria restores antiapoptotic and leukemogenic potential of a transformation-deficient bcr/abl mutant. *J Exp Med*. 1998;187:1995-2007.

147. Kinoshita T, Yokota T, Arai K, Miyajima A. Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells. *Oncogene*. 1995;10:2207-2212.
148. Bender JG, Unverzagt KL, Walker DE, Lee W, Van Epps DE, Smith DH, Stewart CC, To LB. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood*. 1991;77:2591-2596.
149. To LB, Shepperd KM, Haylock DN, Dyson PG, Charles P, Thorp DL, Dale BM, Dart GW, Roberts MM, Sage RE. Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp Hematol*. 1990;18:442-447.
150. Kotasek D, Shepherd KM, Sage RE, Dale BM, Norman JE, Charles P, Gregg A, Pillow A, Bolton A. Factors affecting blood stem cell collections following high-dose cyclophosphamide mobilization in lymphoma, myeloma and solid tumors. *Bone Marrow Transplant*. 1992;9:11-17.
151. Gheilmini M, Pettengell R, Coutinho LH, Testa N, Crowther D. The effect of the GM-CSF/IL-3 fusion protein PIXY321 on bone marrow and circulating haemopoietic cells of previously untreated patients with cancer. *Br J Haematol*. 1996;93:6-12.
152. Copelan EA, Ceselski SK, Ezzone SA, Lasky LC, Penza SL, Bechtel TP, Klein JL, Hehmeyer DM, Scholl MD, Marshall DD, Elder PJ, Risley GL, Avalos BR. Mobilization of peripheral-blood progenitor cells with high-dose etoposide and granulocyte colony-stimulating factor in patients with breast cancer, non-Hodgkin's lymphoma, and Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*. 1997;15:759-765.

153. Brenner MK, Rill DR, Holladay MS, Heslop HE, Moen RC, Buschle M, Krance RA, Santana VM, Anderson WF, Ihle JN. Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet*. 1993;342:1134-1137.
154. Deisseroth AB, Zu Z, Claxton D, Hanania EG, Fu S, Ellerson D, Goldberg L, Thomas M, Janicek K, Anderson WF. Genetic marking shows that Ph⁺ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood*. 1994;83:3068-3076.
155. Gorin NC, Aegerter P, Auvert B, Meloni G, Goldstone AH, Burnett A, Carella A, Korbling M, Herve P, Maraninchi D. Autologous bone marrow transplantation for acute myelocytic leukemia in first remission: a European survey of the role of marrow purging. *Blood*. 1990;75:1606-1614.
156. Fiere D, Lepage E, Sebban C, Boucheix C, Gisselbrecht C, Vernant JP, Varet B, Broustet A, Cahn JY, Rigal-Huguet F. Adult acute lymphoblastic leukemia: a multicentric randomized trial testing bone marrow transplantation as postremission therapy. The French Group on Therapy for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 1993;11:1990-2001.
157. Douay L, Mary JY, Giarratana MC, Najman A, Gorin NC. Establishment of a reliable experimental procedure for bone marrow purging with mafosfamide (ASTA Z 7557). *Exp Hematol*. 1989;17:429-432.
158. Rowley SD, Miller CB, Piantadosi S, Davis JM, Santos GW, Jones RJ. Phase I study of combination drug purging for autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1991;9:2210-2218.

159. Juneja HS, Harvey WH, Brasher WK, Thompson EB. Successful in vitro purging of leukemic blasts from marrow by cortivazol, a pyrazolosteroid: a preclinical study for autologous transplantation in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 1995;9:1771-1778.
160. Traul DL, Anderson GS, Bilitz JM, Krieg M, Sieber F. Potentiation of merocyanine 540-mediated photodynamic therapy by salicylate and related drugs. *Photochem Photobiol*. 1995;62:790-799.
161. Jamieson C, Richter A, Levy JG. Efficacy of benzoporphyrin derivative, a photosensitizer, in selective destruction of leukemia cells using a murine tumor model. *Exp Hematol*. 1993;21:629-634.
162. Pal P, Zeng H, Durocher G, Girard D, Li T, Gupta AK, Giasson R, Blanchard L, Gaboury L, Balassy A, Turmel C, Laperriere A, Villeneuve L. Phototoxicity of some bromine-substituted rhodamine dyes: synthesis, photophysical properties and application as photosensitizers. *Photochem Photobiol*. 1996;63:161-168.
163. Leonard BM, Hetu F, Busque L, Gyger M, Belanger R, Perreault C, Roy DC. Lymphoma cell burden in progenitor cell grafts measured by competitive polymerase chain reaction: less than one log difference between bone marrow and peripheral blood sources. *Blood*. 1998;91:331-339.
164. Kanteti R, Miller K, McCann J, Roitman D, Morelli J, Hurley C, Berkman E, Schenkein D. Randomized trial of peripheral blood progenitor cell vs bone marrow as hematopoietic support for high-dose chemotherapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease: a clinical and molecular analysis. *Bone Marrow Transplant*. 1999;24:473-481.

165. Gribben JG, Freedman AS, Neuberg D, Roy DC, Blake KW, Woo SD, Grossbard ML, Rabinowe SN, Coral F, Freeman GJ. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 1991;325:1525-1533.
166. Roy DC, Felix M, Cannady WG, Cannistra S, Ritz J. Comparative activities of rabbit complements of different ages using an in-vitro marrow purging model. *Leuk Res.* 1990;14:407-416.
167. Mohr M, Dalmis F, Hilgenfeld E, Oelmann E, Zuhlsdorf M, Kratz-Albers K, Nolte A, Schmitmann C, Onaldi-Mohr D, Cassens U, Serve H, Sibrowski W, Kienast J, Berdel WE. Simultaneous immunomagnetic CD34+ cell selection and B-cell depletion in peripheral blood progenitor cell samples of patients suffering from B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7:51-57.
168. Voso MT, Hohaus S, Moos M, Pforsich M, Cremer FW, Schlenk RF, Martin S, Hegenbart U, Goldschmidt H, Haas R. Autografting with CD34+ peripheral blood stem cells: retained engraftment capability and reduced tumour cell content. *Br J Haematol.* 1999;104:382-391.
169. Roy DC, Bélanger R, Perreault C, Bonny Y, Busque L, Kassis J, et al. Autologous bone marrow transplantation for patients with non-Hodgkin's lymphoma using anti-B4-bR immunotoxin purging. [abstract]. *Proc Fourth Int Symp Immunotoxin.* 1995;140a.
170. Negrin RS, Kusnierz-Glaz CR, Still BJ, Schriber JR, Chao NJ, Long GD, Hoyle C, Hu WW, Horning SJ, Brown BW. Transplantation of enriched and purged peripheral blood progenitor cells from a single apheresis product in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1995;85:3334-3341.

171. Horning SJ, Negrin RS, Hoppe RT, Rosenberg SA, Chao NJ, Long GD, Brown BW, Blume KG. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma in first complete or partial remission: results of a phase II clinical trial. *Blood*. 2001;97:404-409.
172. Sieber F. Elimination of residual tumor cells from autologous bone marrow grafts by dye-mediated photolysis: preclinical data. *Photochem Photobiol*. 1987;46:71-76.
173. Richter AM, Waterfield E, Jain AK, Sternberg ED, Dolphin D, Levy JG. In vitro evaluation of phototoxic properties of four structurally related benzoporphyrin derivatives. *Photochem Photobiol*. 1990;52:495-500.
174. Gluck S, Chadderton A, Ho AD. The selective uptake of benzoporphyrin derivative mono-acid ring A results in differential cell kill of multiple myeloma cells in vitro. *Photochem & Photobiol*. 1996;63:846-853.
175. Lemoli RM, Igarashi T, Knizewski M, Acaba L, Richter A, Jain A, Mitchell D, Levy J, Gulati SC. Dye-mediated photolysis is capable of eliminating drug-resistant (MDR+) tumor cells. *Blood*. 1993;81:793-800.
176. Jamieson C, Hornby A, Richter A, Mitchell D, Levy J. Relative sensitivity of leukemic (CML) and normal progenitor cells to treatment with the photosensitizer benzoporphyrin derivative and light. *J Hematother*. 1993;2:383-386.
177. Keating A, Jamieson C, Hornby A, Wang XH, Levy J. Photodynamic elimination of clonogenic Ph⁺ chronic myeloid leukemia cells. *Leuk & Lymph*. 1993;11 Suppl 1:265-269.

178. Schmidt-Erfurth U, Flotte TJ, Gragoudas ES, Schomacker K, Birngruber R, Hasan T. Benzoporphyrin-lipoprotein-mediated photodestruction of intraocular tumors. *Exp Eye Res.* 1996;62:1-10.
179. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van der Lelie H, Bron D, Sonneveld P, Gisselbrecht C, Cahn JY, Harousseau JL. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1995;333:1540-1545.
180. Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, Bastion Y, Coiffier B, Brice P, Bosly A, Dupriez B, Nouvel C, Tilly H, Lederlin P, Biron P, Briere J, Gaulard P, Reyes F. Benefit of autologous bone marrow transplantation over sequential chemotherapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: updated results of the prospective study LNH87-2. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol.* 1997;15:1131-1137.
181. Granville DJ, Jiang H, An MT, Levy JG, McManus BM, Hunt DW. Overexpression of Bcl-X(L) prevents caspase-3-mediated activation of DNA fragmentation factor (DFF) produced by treatment with the photochemotherapeutic agent BPD-MA. *FEBS Letters.* 1998;422:151-154.
182. Granville DJ, Jiang H, An MT, Levy JG, McManus BM, Hunt DW. Bcl-2 overexpression blocks caspase activation and downstream apoptotic events instigated by photodynamic therapy. *Br J Cancer.* 1999;79:95-100.
183. Tao J, Sanghera JS, Pelech SL, Wong G, Levy JG. Stimulation of stress-activated protein kinase and p38 HOG1 kinase in murine keratinocytes following photodynamic therapy with benzoporphyrin derivative. *J Biol Chem.* 1996;271:27107-27115.

184. Widmer L, Pichert G, Jost LM, Stahel RA. Fate of contaminating t(14; 18)+ lymphoma cells during ex vivo expansion of CD34-selected hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1996;88:3166-3175.
185. Barnett MJ, Eaves CJ, Phillips GL, Gascoyne RD, Hogge DE, Horsman DE, Humphries RK, Klingemann HG, Lansdorp PM, Nantel SH. Autografting with cultured marrow in chronic myeloid leukemia: results of a pilot study. *Blood*. 1994;84:724-732.
186. Wetzler M, Talpaz M, Van Etten RA, Hirsh-Ginsberg C, Beran M, Kurzrock R. Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J Clin Invest*. 1993;92:1925-1939.
187. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247:824-830.
188. Jiang Y, Zhao RCH, Verfaillie CM. Abnormal integrin-mediated regulation of chronic myelogenous leukemia CD34+ cell proliferation: BCR/ABL up-regulates the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27Kip, which is relocated to the cell cytoplasm and incapable of regulating cdk2 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:10538-10543.
189. Jonuleit T, van der Kuip H, Miething C, Michels H, Hallek M, Duyster J, Aulitzky WE. Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood*. 2000;96:1933-1939.
190. Giannola DM, Shlomchik WD, Jegathesan M, Liebowitz D, Abrams CS, Kadesch T, Dancis A, Emerson SG. Hematopoietic Expression of HOXB4 Is

Regulated in Normal and Leukemic Stem Cells through Transcriptional Activation of the HOXB4 Promoter by Upstream Stimulating Factor (USF)-1 and USF-2. *J Exp Med.* 2000;192:1479-1490.

191. Tang X, Downes CP, Whetton AD, Owen-Lynch PJ. Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Specific Protein Kinase B Isoforms in the Suppression of Apoptosis Mediated by the Abelson Protein-tyrosine Kinase. *J Biol Chem.* 2000;275:13142-13148.
192. Bedi A, Zehnbaauer BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1994;83:2038-2044.
193. Wognum AW, Krystal G, Eaves CJ, Eaves AC, Lansdorp PM. Increased erythropoietin-receptor expression on CD34-positive bone marrow cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1992;79:642-649.
194. Ghaffari S, Dougherty GJ, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ. Differentiation-associated changes in CD44 isoform expression during normal hematopoiesis and their alteration in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1995;86:2976-2985.
195. Ghaffari S, Dougherty GJ, Eaves AC, Eaves CJ. Diverse effects of anti-CD44 antibodies on the stromal cell-mediated support of normal but not leukaemic (CML) haemopoiesis in vitro. *Br J Haematol.* 1997;97:22-28.
196. Verfaillie CM, McCarthy JB, McGlave PB. Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. *J Clin Invest.* 1992;90:1232-1241.

197. Coulombel L, Kalousek DK, Eaves CJ, Gupta CM, Eaves AC. Long-term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 1983;308:1493-1498.
198. Sirard C, Lapidot T, Vormoor J, Cashman JD, Doedens M, Murdoch B, Jamal N, Messner H, Addey L, Minden M, Laraya P, Keating A, Eaves A, Lansdorp PM, Eaves CJ, Dick JE. Normal and leukemic SCID-repopulating cells (SRC) coexist in the bone marrow and peripheral blood from CML patients in chronic phase, whereas leukemic SRC are detected in blast crisis. *Blood.* 1996;87:1539-1548.
199. Coutinho LH, Chang J, Brereton ML, Morgenstern GR, Scarffe JH, Harrison CJ, Yin JA, Darbyshire PJ, Burdach S, Dexter TM, Testa NG. Autografting in Philadelphia (Ph)+ chronic myeloid leukaemia using cultured marrow: an update of a pilot study. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:969-976.
200. Young JC, Bruno E, Luens KM, Wu S, Backer M, Murray LJ. Thrombopoietin stimulates megakaryocytopoiesis, myelopoiesis, and expansion of CD34+ progenitor cells from single CD34+Thy-1+Lin- primitive progenitor cells. *Blood.* 1996;88:1619-1631.
201. Rusten LS, Lyman SD, Veiby OP, Jacobsen SE. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. *Blood.* 1996;87:1317-1325.
202. Sutherland HJ, Hogge DE, Cook D, Eaves CJ. Alternative mechanisms with and without steel factor support primitive human hematopoiesis. *Blood.* 1993;81:1465-1470.

203. Alcorn MJ, Holyoake TL, Richmond L, Pearson C, Farrell E, Kyle B, Dunlop DJ, Fitzsimons E, Steward WP, Pragnell IB, Franklin IM. CD34-positive cells isolated from cryopreserved peripheral-blood progenitor cells can be expanded ex vivo and used for transplantation with little or no toxicity. *J Clin Oncol.* 1996;14:1839-1847.
204. Henschler R, Brugger W, Luft T, Frey T, Mertelsmann R, Kanz L. Maintenance of transplantation potential in ex vivo expanded CD34(+)-selected human peripheral blood progenitor cells. *Blood.* 1994;84:2898-2903.
205. McNiece I, Jones R, Bearman SI, Cagnoni P, Nieto Y, Franklin W, Ryder J, Steele A, Stoltz J, Russell P, McDermitt J, Hogan C, Murphy J, Shpall EJ. Ex vivo expanded peripheral blood progenitor cells provide rapid neutrophil recovery after high-dose chemotherapy in patients with breast cancer. *Blood.* 2000;96:3001-3007.
206. Stiff P, Chen B, Franklin W, Oldenberg D, Hsi E, Bayer R, Shpall E, Douville J, Mandalam R, Malhotra D, Muller T, Armstrong RD, Smith A. Autologous transplantation of ex vivo expanded bone marrow cells grown from small aliquots after high-dose chemotherapy for breast cancer. *Blood.* 2000;95:2169-2174.
207. Carella AM, Dejana A, Lerma E, Podesta M, Benvenuto F, Chimirri F, Parodi C, Sessarego M, Prencipe E, Frassoni F. In vivo mobilization of karyotypically normal peripheral blood progenitor cells in high-risk MDS, secondary or therapy-related acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1996;95:127-130.
208. Hogge DE, Lansdorp PM, Reid D, Gerhard B, Eaves CJ. Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in

- cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1996;88:3765-3773.
209. Collins SJ, Groudine MT. Rearrangement and amplification of c-abl sequences in the human chronic myelogenous leukemia cell line K-562. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80:4813-4817.
210. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis. *J Immunol*. 1981;126:1614-1619.
211. Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, Valtieri M, Luchetti L, Samoggia P, Vitelli L, Barberi T, Testa U, Lyman S. Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood*. 1995;86:1661-1670.
212. Yonemura Y, Ku H, Lyman SD, Ogawa M. In vitro expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells: comparison between FLT3/FLK-2 ligand and KIT ligand. *Blood*. 1997;89:1915-1921.
213. Petzer AL, Hogge DE, Landsdorp PM, Reid DS, Eaves CJ. Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:1470-1474.
214. Petzer AL, Zandstra PW, Piret JM, Eaves CJ. Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *J Exp Med*. 1996;183:2551-2558.

215. Dao MA, Hannum CH, Kohn DB, Nolta JA. FLT3 ligand preserves the ability of human CD34+ progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immunodeficient mice after ex vivo retroviral-mediated transduction. *Blood*. 1997;89:446-456.
216. Agarwal R, Doren S, Hicks B, Dunbar CE. Long-term culture of chronic myelogenous leukemia marrow cells on stem cell factor-deficient stroma favors benign progenitors. *Blood*. 1995;85:1306-1312.
217. Moore S, Haylock DN, Levesque JP, McDiarmid LA, Samels LM, To LB, Simmons PJ, Hughes TP. Stem cell factor as a single agent induces selective proliferation of the Philadelphia chromosome positive fraction of chronic myeloid leukemia CD34(+) cells. *Blood*. 1998;92:2461-2470.
218. Coulombel L, Kalousek DK, Eaves CJ, Gupta CM, Eaves AC. Long-term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 1983;308:1493-1498.
219. Agarwal R, Doren S, Hicks B, Dunbar CE. Long-term culture of chronic myelogenous leukemia marrow cells on stem cell factor-deficient stroma favors benign progenitors. *Blood*. 1995;85:1306-1312.
220. Fogli M, Amabile M, Martinelli G, Fortuna A, Rondelli D, Ratta M, Curti A, Tura S, Lemoli RM. Selective expansion of normal haemopoietic progenitors from chronic myelogenous leukaemia marrow. *Br J Haematol*. 1998;101:119-129.
221. Curtis BM, Williams DE, Broxmeyer HE, Dunn J, Farrah T, Jeffery E, Clevenger W, deRoos P, Martin U, Friend D. Enhanced hematopoietic activity

- of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-interleukin 3 fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:5809-5813.
222. Dorrell C, Gan OI, Pereira DS, Hawley RG, Dick JE. Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood*. 2000;95:102-110.
223. Engelhardt M, Douville J, Behringer D, Jahne A, Smith A, Henschler R, Lange W. Hematopoietic recovery of ex vivo perfusion culture expanded bone marrow and unexpanded peripheral blood progenitors after myeloablative chemotherapy. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27:249-259.
224. Jiang X, Lopez A, Holyoake T, Eaves A, Eaves C. Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:12804-12809.
225. Holyoake TL, Jiang X, Jorgensen HG, Graham S, Alcorn MJ, Laird C, Eaves AC, Eaves CJ. Primitive quiescent leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia spontaneously initiate factor-independent growth in vitro in association with up-regulation of expression of interleukin-3. *Blood*. 2001;97:720-728.
226. Donato NJ, Wu JY, Zhang L, Kantarjian H, Talpaz M. Down-regulation of interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta-chain in BCR-ABL(+) human leukemic cells: association with loss of cytokine-mediated Stat-5 activation and protection from apoptosis after BCR-ABL inhibition. *Blood*. 2001;97:2846-2853.

227. Ganser A, Lindemann A, Ottmann OG, Seipelt G, Hess U, Geissler G, Kanz L, Frisch J, Schulz G, Herrmann F. Sequential in vivo treatment with two recombinant human hematopoietic growth factors (interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) as a new therapeutic modality to stimulate hematopoiesis: results of a phase I study. *Blood*. 1992;79:2583-2591.
228. Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amin S, Rockwell P, Witte L, Burrow C, Ratajczak MZ, Gewirtz AM. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:459-463.
229. Xiao M, Oppenlander BK, Plunkett JM, Dooley DC. Expression of Flt3 and c-kit during growth and maturation of human CD34+CD38- cells. *Exp Hematol*. 1999;27:916-927.
230. McLemore ML, Grewal S, Liu F, Archambault A, Poursine-Laurent J, Haug J, Link DC. STAT-3 activation is required for normal G-CSF-dependent proliferation and granulocytic differentiation. *Immunity*. 2001;14:193-204.
231. Salgia R, Li JL, Ewaniuk DS, Pear W, Pisick E, Burky SA, Ernst T, Sattler M, Chen LB, Griffin JD. BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function. *J Clin Invest*. 1997;100:46-57.
232. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001;344:1031-1037.

233. Topaly J, Zeller WJ, Fruehauf S. Synergistic activity of the new ABL-specific tyrosine kinase inhibitor STI571 and chemotherapeutic drugs on BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia*. 2001;15:342-347.
234. Mahon FX, Pigeonnier-Lagarde V, Chahine H, Barbot C, Jazwiec B, Ripoché J, Reiffers J. Ex vivo cytokine expansion of peripheral blood 5-fluorouracil-treated CD34-positive chronic myeloid leukaemia cells increases the selection of Ph-negative cells. *Br J Haematol*. 1997;98:467-473.
235. Hoyle C, Bangs CD, Chang P, Kamel O, Mehta B, Negrin RS. Expansion of Philadelphia chromosome-negative CD3(+)CD56(+) cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: in vitro and in vivo efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice. *Blood*. 1998;92:3318-3327.
236. Verfaillie CM, Miller WJ, Boylan K, McGlave PB. Selection of benign primitive hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia on the basis of HLA-DR antigen expression. *Blood*. 1992;79:1003-1010.
237. Kirk JA, Reems JA, Roecklein BA, Van Devanter DR, Bryant EM, Radich J, Edmands S, Lee A, Torok-Storb B. Benign marrow progenitors are enriched in the CD34+/HLA-DR^{lo} population but not in the CD34+/CD38^{lo} population in chronic myeloid leukemia: an analysis using interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood*. 1995;86:737-743.
238. Delforge M, Boogaerts MA, McGlave PB, Verfaillie CM. BCR/ABL-CD34(+)HLA-DR- progenitor cells in early chronic phase, but not in more advanced phases, of chronic myelogenous leukemia are polyclonal. *Blood*. 1999;93:284-292.

239. Bhatia R, Verfaillie CM. Inhibition of BCR-ABL expression with antisense oligodeoxynucleotides restores beta1 integrin-mediated adhesion and proliferation inhibition in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. *Blood*. 1998;91:3414-3422.
240. de Fabritiis P, Petti MC, Montefusco E, De Propriis MS, Sala R, Bellucci R, Mancini M, Lisci A, Bonetto F, Geiser T, Calabretta B, Mandelli F. BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotide in vitro purging and autologous bone marrow transplantation for patients with chronic myelogenous leukemia in advanced phase. *Blood*. 1998;91:3156-3162.
241. Petzer AL, Eaves CJ, Barnett MJ, Eaves AC. Selective expansion of primitive normal hematopoietic cells in cytokine-supplemented cultures of purified cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1997;90:64-69.
242. Roy DC, Paquette Y, Balassy A, Villeneuve L, Beauger N, Blanchard L, Giorgi O, Gladu I, Hamel R, Perreault C, Molfino N. Elimination of Chronic Myeloid Leukemia (CML) Cells with a Novel Photodynamic Treatment [abstract]. *Blood*. 1999;94:144a.
243. Roy DC, Boileau J, Laplante J, Busque L, Fish D, Kassis J, et al. Phase I study of autologous progenitor cell transplantation (PCT) purged with a photodynamic approach for patients with chronic myeloid leukemia (abstr). *Blood*. 2000;96:2504a.
244. Szilvassy SJ, Weller KP, Chen B, Juttner CA, Tsukamoto A, Hoffman R. Partially differentiated ex vivo expanded cells accelerate hematologic recovery in myeloablated mice transplanted with highly enriched long-term repopulating stem cells. *Blood*. 1996;88:3642-3653.

245. Scaradavou A, Isola L, Rubinstein P, Galperin Y, Najfeld V, Berlin D, Gordon J, Weinberg RS. A murine model for human cord blood transplantation: near-term fetal and neonatal peripheral blood cells can achieve long-term bone marrow engraftment in sublethally irradiated adult recipients. *Blood*. 1997;89:1089-1099.
246. DiGiusto DL, Lee R, Moon J, Moss K, O'Toole T, Voytovich A, Webster D, Mule JJ. Hematopoietic potential of cryopreserved and ex vivo manipulated umbilical cord blood progenitor cells evaluated in vitro and in vivo. *Blood*. 1996;87:1261-1271.
247. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1994;171:131-137.
248. Nordon RE, Ginsberg SS, Eaves CJ. High-resolution cell division tracking demonstrates the FLT3-ligand-dependence of human marrow CD34+CD38- cell production in vitro. *Br J Haematol*. 1997;98:528-539.
249. Murray LJ, Bruno E, Uchida N, Hoffman R, Nayar R, Yeo EL, Schuh AC, Sutherland DR. CD109 is expressed on a subpopulation of CD34+ cells enriched in hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol*. 1999;27:1282-1294.
250. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995;182:1545-1556.

251. Zhang C, Ao Z, Seth A, Schlossman SF. A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J Immunol.* 1996;157:3980-3987.
252. Pepper C, Thomas A, Tucker H, Hoy T, Bentley P. Flow cytometric assessment of three different methods for the measurement of in vitro apoptosis. *Leuk Res.* 1998;22:439-444.
253. Bedi A, Barber JP, Bedi GC, el-Deiry WS, Sidransky D, Vala MS, Akhtar AJ, Hilton J, Jones RJ. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood.* 1995;86:1148-1158.
254. Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG, Arlinghaus R, Pawson T. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J.* 1994;13:764-773.
255. Li S, Gillessen S, Tomasson MH, Dranoff G, Gilliland DG, Van Etten RA. Interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are not required for induction of chronic myeloid leukemia-like myeloproliferative disease in mice by BCR/ABL. *Blood.* 2001;97:1442-1450.
256. Chai SK, Nichols GL, Rothman P. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol.* 1997;159:4720-4728.
257. Peters DG, Klucher KM, Perlingeiro RC, Dessain SK, Koh EY, Daley GQ. Autocrine and paracrine effects of an ES-cell derived, BCR/ABL-transformed hematopoietic cell line that induces leukemia in mice. *Oncogene.* 2001;20:2636-2646.

258. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrkowski Z, Kowalska MA, Gewirtz AM, Emerson SG, Ratajczak MZ. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*. 2001;97:3075-3085.
259. Cambier N, Chopra R, Strasser A, Metcalf D, Elefanty AG. BCR-ABL activates pathways mediating cytokine independence and protection against apoptosis in murine hematopoietic cells in a dose-dependent manner. *Oncogene*. 1998;16:335-348.
260. Mc GM, Campiani G, Ramunno A, Fattorusso C, Nacci V, Lawler M, Williams DC, Zisterer DM. Pyrrolo-1,5-benzoxazepines induce apoptosis in chronic myelogenous leukemia (CML) cells by bypassing the apoptotic suppressor bcr-abl. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;296:31-40.
261. Carayol G, Robin C, Bourhis JH, Bennaceur-Griscelli A, Chouaib S, Coulombel L, Caignard A. NK cells differentiated from bone marrow, cord blood and peripheral blood stem cells exhibit similar phenotype and functions. *Eur J Immunol*. 1998;28:1991-2002.
262. Stiewe T, Parssanedjad K, Esche H, Opalka B, Putzer BM. E1A overcomes the apoptosis block in BCR-ABL+ leukemia cells and renders cells susceptible to induction of apoptosis by chemotherapeutic agents. *Cancer Res*. 2000;60:3957-3964.
263. Oh IH, Lau A, Eaves CJ. During ontogeny primitive (CD34(+)CD38(-)) hematopoietic cells show altered expression of a subset of genes associated with early cytokine and differentiation responses of their adult counterparts. *Blood*. 2000;96:4160-4168.

264. Traycoff CM, Halstead B, Rice S, McMahel J, Srour EF, Cornetta K. Chronic myelogenous leukaemia CD34+ cells exit G0/G1 phases of cell cycle more rapidly than normal marrow CD34+ cells. *Br J Haematol.* 1998;102:759-767.
265. Lo ML, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, Chieffi P, Tramontano D, De Rosa G, Altieri DC. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2001;70:249-254.
266. Mahmud N, Katayama N, Itoh R, Tanaka R, Ohishi K, Masuya M, Mimami N, Shiku H. A possible change in doubling time of haemopoietic progenitor cells with stem cell development. *Br J Haematol.* 1996;94:242-249.
267. Bhatia R, Munthe HA, Williams AD, Zhang F, Forman SJ, Slovak ML. Chronic myelogenous leukemia primitive hematopoietic progenitors demonstrate increased sensitivity to growth factor-induced proliferation and maturation. *Exp Hematol.* 2000;28:1401-1412.
268. Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood.* 2000;96:2269-2276.
269. Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I, Prosper F, Fernandez-Luna JL. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med.* 2000;191:977-984.
270. Lilly MB, Zemskova M, Frankel AE, Salo J, Kraft AS. Distinct domains of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha

- subunit mediate activation of Jak/Stat signaling and differentiation. *Blood*. 2001;97:1662-1670.
271. Wang Q, Miyakawa Y, Fox N, Kaushansky K. Interferon-alpha directly represses megakaryopoiesis by inhibiting thrombopoietin-induced signaling through induction of SOCS-1. *Blood*. 2000;96:2093-2099.
272. Legras S, Levesque JP, Charrad R, Morimoto K, Le Bousse C, Clay D, Jasmin C, Smadja-Joffe F. CD44-mediated adhesiveness of human hematopoietic progenitors to hyaluronan is modulated by cytokines. *Blood*. 1997;89:1905-1914.
273. Plattner R, Kadlec L, DeMali KA, Kazlauskas A, Pendergast AM. c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev*. 1999;13:2400-2411.
274. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG. p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*. 1997;389:191-194.
275. Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG, Levvero M, Wang JY. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*. 1999;399:806-809.
276. Lewis JM, Schwartz MA. Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J Biol Chem*. 1998;273:14225-14230.
277. Gaston I, Stenberg PE, Bhat A, Druker BJ. Abl kinase but not PI3-kinase links to the cytoskeletal defects in Bcr-Abl transformed cells. *Exp Hematol*. 2000;28:77-86.

278. Vigneri P, Wang JY. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med.* 2001;7:228-234.
279. Hassan HT, Zander AR. Thrombocytopenia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation: an unresolved problem and possible approaches to resolve it. *J Hematother.* 1996;5:407-414.
280. Gordon MS, Nemunaitis J, Hoffman R, Paquette RL, Rosenfeld C, Manfreda S, Isaacs R, Nimer SD. A phase I trial of recombinant human interleukin-6 in patients with myelodysplastic syndromes and thrombocytopenia. *Blood.* 1995;85:3066-3076.
281. Nand S, Sosman J, Godwin JE, Fisher RI. A phase I/II study of sequential interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1994;83:357-360.
282. Shibuya K, Akahori H, Takahashi K, Tahara E, Kato T, Miyazaki H. Multilineage hematopoietic recovery by a single injection of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor in myelosuppressed mice. *Blood.* 1998;91:37-45.
283. Somlo G, Sniecinski I, ter Veer A, Longmate J, Knutson G, Vuk-Pavlovic S, Bhatia R, Chow W, Leong L, Morgan R, Margolin K, Raschko J, Shibata S, Tetef M, Yen Y, Forman S, Jones D, Ashby M, Fyfe G, Hellmann S, Doroshow JH. Recombinant human thrombopoietin in combination with granulocyte colony-stimulating factor enhances mobilization of peripheral blood progenitor cells, increases peripheral blood platelet concentration, and accelerates hematopoietic recovery following high-dose chemotherapy. *Blood.* 1999;93:2798-2806.

284. Ratajczak MZ, Ratajczak J, Machalinski B, Mick R, Gewirtz AM. In vitro and in vivo evidence that ex vivo cytokine priming of donor marrow cells may ameliorate posttransplant thrombocytopenia. *Blood*. 1998;91:353-359.
285. Lefebvre P, Winter JN, Meng Y, Cohen I. Ex vivo expansion of early and late megakaryocyte progenitors. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000;9:913-921.
286. Pascal, *Pensées*, Paris, Éditions Hachette, coll. GF-Flammarion, 1976, p.69.

ANNEXES

ANNEXE I

ANNEXE II

nal chemistry
elopments in

University of

nd

ognition

hich may be
of each title

**ANTIBODIES IN DIAGNOSIS AND
THERAPY
TECHNOLOGIES, MECHANISMS AND
CLINICAL DATA**

Edited by

Siegfried Matzku

*Department of Gene Expression and Biotechnology
Merck KGaA
Darmstadt, Germany*

and

Rolf A. Stahel

*Laboratory of Oncology
University Hospital Zürich
Switzerland*



harwood academic publishers

Australia • Canada • China • France • Germany • India • Japan
Luxembourg • Malaysia • The Netherlands • Russia • Singapore
Switzerland

Published by
The Gordon

by any means,
g, or by any
ing from the

CONTENTS

Preface to the Series	vii
Preface	ix
Contributors	xiii
1 Recombinant Antibodies: Construction and Production <i>Melvyn Little and Sergey M. Kipriyanov</i>	1
2 Bispecific Antibodies <i>David M. Segal, Barbara A. Vance and Giuseppe Sconocchia</i>	49
3 Targeted Cytotoxicity: Antibody-Drug and Antibody-Toxin Conjugates <i>Uwe Zangemeister-Wittke and Winfried Wels</i>	81
4 Selective Drug Delivery Using Targeted Enzymes for Prodrug Activation <i>Nathan O. Siemers and Peter D. Senter</i>	115
5 Immunoscintigraphy and Radioimmunotherapy <i>Angelika Bischof Delaloye</i>	135
6 Clinical Studies in Oncology <i>Jan Schmielau and Wolff Schmiegel</i>	159
7 Clinical Studies in Acute and Chronic Inflammation <i>Janice C. Wherry</i>	203
8 Marrow Purging and Stem Cell Preparation <i>Denis C. Roy, Nadine Beauger and Martin Gyger</i>	255
Index	305

CONTRIBUTORS

Nadine Beauger
Division of Hematology-
Immunology
Maisonneuve-Rosemont Hospital
Research Center
5415 L'Assumption Blvd
Montreal, Quebec
Canada H1T 2M4

Angelika Bischof Delaloye
Service de Médecine Nucléaire
Centre Hospitalier Universitaire
Vaudois
Rue du Bugnon
1011 Lausanne
Switzerland

Martin Gyger
Division of Hematology-
Immunology
Maisonneuve-Rosemont Hospital
Research Center
5415 L'Assumption Blvd
Montreal, Quebec
Canada H1T 2M4

Sergey M. Kipriyanov
Recombinant Antibody Research
Group (0445)
Diagnostics and Experimental
Therapy Program
German Cancer Research Center
(DKFZ)
Im Neuenheimerfeld 280
69120 Heidelberg
Germany

Melvyn Little
Recombinant Antibody Research
Group (0445)

Diagnostics and Experimental
Therapy Program
German Cancer Research Center
(DKFZ)
Im Neuenheimerfeld 280
69120 Heidelberg
Germany

Denis C. Roy
Division of Hematology-
Immunology
Maisonneuve-Rosemont Hospital
Research Center
5415 L'Assumption Blvd
Montreal, Quebec
Canada H1T 2M4

Wolff Schmiegel
Medizinische Klinik
Ruhruniversität Bochum
Knappschaftskrankenhaus
In der Schornau 23-25
44892 Bochum
Germany

Jan Schmielau
Medizinische Klinik
Ruhruniversität Bochum
Knappschaftskrankenhaus
In der Schornau 23-25
44892 Bochum
Germany

Giuseppe Sconocchia
National Institutes of Health
National Cancer Institute
Experimental Immunology Branch
Bethesda MD 20892-1360
USA

David M. Segal
National Institutes of Health
National Cancer Institute
Experimental Immunology Branch
Bethesda MD 20892-1360
USA

Peter D. Senter
Bristol Myers Squibb Pharmaceutical
Research Institute
3005 First Avenue
Seattle WA 98121
USA

Nathan O. Siemers
Bristol Myers Squibb Pharmaceutical
Research Institute
3005 First Avenue
Seattle WA 98121
USA

Barbara A. Vance
National Institutes of Health
National Cancer Institute
Experimental Immunology Branch
Bethesda MD 20892-1360
USA

Winfried Wels
Institute for Experimental Cancer
Research
Tumor Biology Center
Breisacher Strasse 117
79106 Freiburg
Germany

Janice C. Wherry
Clinical Project Director
Clinical Immunology and
Infectious Disease
Schering-Plough Research Institute
2015 Galloping Hill Road
Kenilworth NJ 07033
USA

Uwe Zangemeister-Wittke
Laboratory of Oncology
Department of Internal Medicine
University Hospital Zürich
Haeldeliweg 4
8044 Zürich
Switzerland

Copyright © 1999 OPA (Overseas Publishers Association) N.V. Published by license under the Harwood Academic Publishers imprint, part of The Gordon and Breach Publishing Group.

All rights reserved.

No part of this book may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying and recording, or by any information storage or retrieval system, without permission in writing from the publisher. Printed in Singapore.

Amsteldijk 166
1st Floor
1079 LH Amsterdam
The Netherlands

British Library Cataloguing in Publication Data

Antibodies in diagnosis and therapy :
technologies, mechanisms and clinical data. – (studies in
medicinal chemistry; v. 3)
1. Monoclonal antibodies – Therapeutic use 2. Monoclonal
antibodies – Diagnostic use
I. Matzku, Siegfried II. Stahel, Rolf A.
616'.0798

ISBN: 90-5702-310-5
ISSN: 1024-8056

Studies in Medicinal Chemistry

A series of books presenting various aspects of the research on medicinal chemistry and providing comprehensive accounts of recent and important developments in the field.

Edited by Atta-ur-Rahman, H.E.J. Research Institute of Chemistry, University of Karachi, Pakistan

Volume 1

Progress in Medicinal Chemistry
edited by M. Iqbal Choudhary

Volume 2

Biological Inhibitors
edited by M. Iqbal Choudhary

Volume 3

Antibodies in Diagnosis and Therapy – Technologies, Mechanisms and Clinical Data
edited by Siegfried Matzku and Rolf A. Stahel

Volumes in preparation

The Guanidine Entity in Medicinal Chemistry and in Molecular Recognition
I. Agranat and S. Topiol

Immunosuppressive and Immunomodulating Agents
M. Iqbal Choudhary

This book is part of a series. The publisher will accept continuation orders which may be cancelled at any time and which provide for automatic billing and shipping of each title in the series upon publication. Please write for details.

8. MARROW PURGING AND STEM CELL PREPARATION

DENIS CLAUDE ROY, NADINE BEAUGER and MARTIN GYGER

*Division of Hematology-Immunology, Maisonneuve-Rosemont Hospital;
Department of Medicine, Universite de Montreal, Quebec, Canada*

INTRODUCTION

Aggressive therapeutic modalities using high doses of chemotherapy and/or radiation therapy are now commonplace treatments, and are no longer restricted to hematologic malignancies. Indeed, these intensive approaches can induce major responses and remissions in patients with relapsed and even refractory diseases, ultimately contributing to improve the disease-free-survival of patients with high risk hematologic malignancies, and, hopefully, solid tumors. The widespread use of bone marrow transplantation (BMT), probably better defined as progenitor cell transplantation (PCT), also reflects the major improvements in patient management that have resulted in significant lowering of the treatment-related morbidity and mortality. It is difficult to envision this rapid expansion in PCT without the recent biotechnological advances, in particular the development of (i) growth factors, which not only facilitate stem cell collection, but also decrease the duration of aplasia, and (ii) monoclonal antibodies (mAbs), which permit accurate identification and selection and/or elimination of specific cell populations responsible for engraftment, graft-versus-host disease (GVHD) and relapse.

Monoclonal antibodies have enabled an accurate definition of each of the different steps involved in the ontogeny of normal and malignant cells. Thus, it is not surprising that these agents are amongst the most popular to purge blood or marrow grafts of (i) their malignant cells prior to autologous PCT, or (ii) their T cells prior to allogeneic PCT. In this chapter, we will review the principal purging methodologies using mAbs either for the elimination of malignant cells or defined normal cell subsets, and discuss clinical applications and outcomes. We will focus primarily on the purging of hematologic malignancies, but will also discuss important recent findings associated with the purging of solid tumors. This chapter will be divided in two sections corresponding to the two main strategies of treatment of the progenitor cell graft: (a) negative selection procedures to eliminate unwanted cells and (b) positive selection procedures to isolate normal progenitor cells.

Relapse after Autologous Transplantation: What is the Contribution of Progenitor Cell Graft Contamination to this Event?

Relapse is the primary limitation of autologous PCT (Ritz *et al.*, 1994). Relapse can originate either from malignant cells in the host escaping elimination by the

preparative regimen or from residual tumor cells in the bone marrow graft reinfused at the time of PCT (Gribben *et al.*, 1991b). However, the source of relapsing cells after autologous PCT has never been clearly defined. Nevertheless, bone marrow is the primary site of disease either at diagnosis or relapse in almost all patients with acute leukemia, a large proportion of patients with lymphoma and numerous solid tumors like neuroblastomas and small cell lung cancer (SCLC). Furthermore, even when these patients reach complete remission, residual malignant cells are detectable using either mAbs (Stahel *et al.*, 1985; Uckun *et al.*, 1992), culture assays (Estrov *et al.*, 1986; Sharp *et al.*, 1992), or sensitive molecular techniques such as the polymerase chain reaction (PCR) (Yamada *et al.*, 1990; Jonsson *et al.*, 1990; Ngan *et al.*, 1989; Gribben *et al.*, 1991a; Hetu *et al.*, 1994). In order to clearly determine whether or not malignant cells from the bone marrow graft contribute to relapse, Brenner *et al.* have transferred the neomycin-resistance gene into bone marrow graft cells from patients with acute myeloid leukemia and neuroblastoma (Brenner *et al.*, 1993). Malignant cells from patients relapsing following autologous PCT were shown to possess the retrovirally-introduced gene. These results indicate that occult malignant cells are not only present in the marrow graft but most likely contribute to disease recurrence. Consistent with this finding, Gorin *et al.* reported that patients with acute myeloid leukemia transplanted with a purged marrow have a better disease-free-survival than patients receiving unpurged marrow grafts (Gorin *et al.*, 1990). Furthermore, in patients with acute leukemia (Forman *et al.*, 1987; Rowley *et al.*, 1989; Uckun *et al.*, 1992) and non-Hodgkin's lymphoma (Gribben *et al.*, 1991b), a better prognosis is associated with lower numbers of detectable residual tumor cells in the marrow graft following purging. Although these observations are quite convincing, the genuine necessity for a "clean" stem cell graft remains to be confirmed in controlled randomized clinical trials. One of the reasons hampering the implementation of such trials has been the need to develop selection procedures that (i) are highly effective in eliminating malignant cells, (ii) preserve normal hematopoietic progenitor cells, and (iii) involve widely applicable methodologies. During the last fifteen years, most efforts have focused on the first two aspects, resulting in the development of increasingly effective and less harmful purging approaches. We may now be very close to answering the third requirement, which is needed to finally make purging accessible and, most importantly, evaluable in large randomized trials.

• NEGATIVE SELECTION •

PURGING OR NEGATIVE SELECTION PROCEDURES

A variety of agents and techniques have been developed to purge selective cell populations, mainly from remission marrow; these include primarily physical, pharmacologic, photodynamic and immunologic methods. Physical methods are most diverse, and include centrifugation-based methodologies (albumin density

gradients (Dicke *et al.*, 1979) and counterflow elutriation (Wagner *et al.*, 1990; Preijers *et al.*, 1994)), lectins (soybean agglutination for T-cell depletion (Young *et al.*, 1992), peanut agglutinin to eliminate normal and malignant plasma cells (Lazzaro *et al.*, 1995)), and hyperthermia either alone or in combination with lipids (Min *et al.*, 1994). Pharmacologic methods have been particularly favored, using 4-hydroperoxycyclophosphamide or mafosfamide, either alone, or in combination with other chemotherapeutic agents or immunotoxins (Douay *et al.*, 1989; Uckun *et al.*, 1987; Rowley *et al.*, 1991). Also new agents like cortivazol, a glucocorticoid with an unusual structure (Juneja *et al.*, 1995), molecules for photodynamic therapy (Traul *et al.*, 1995; Jamieson *et al.*, 1993; Pal *et al.*, 1996), and cellular effector cells like NK cells or T cells (Scheffold *et al.*, 1995; Cesano *et al.*, 1996), activated with IL-2 and/or other cytokines (Beaujean *et al.*, 1995; Verma *et al.*, 1994; Arbour *et al.*, 1996) have expanded our horizon and represent other appealing purging alternatives. Molecular approaches, primarily using anti-sense oligonucleotides also show potential for the eradication of leukemia cells (Bishop *et al.*, 1994).

Nevertheless, mAbs, which were among the first purging agents developed, in association with complement (Stepan *et al.*, 1984; Zola *et al.*, 1987) or immunomagnetic beads (Kvalheim *et al.*, 1988; Reading *et al.*, 1987), and also in the form of immunotoxin conjugates (Casellas *et al.*, 1985; Stong *et al.*, 1985) still remain among the most practical and widely used. Preclinical *in vitro* studies have demonstrated that virtually all of these techniques are capable of eliminating at least 3 to 4 logarithms (logs) of malignant cells from normal human marrow. While non-immunologic methods usually show advantages in terms of reagent availability, standardization and spectrum of activity against numerous different tumour cells, they are often burdened by non-specific toxicity against normal hematopoietic progenitors. In addition, although some agents could eliminate specific cell populations, like T cells, for the prevention of graft-versus-host disease (GVHD), their activity was neither selective nor effective (Rosenfeld *et al.*, 1995). Monoclonal antibodies have different limitations, such as the need to ascertain the presence of the targeted antigen on the surface of malignant cells, and potential heterogeneity in antigen expression of neoplastic cells. However, the specificity of mAb-mediated targeting, which enables extensive elimination of distinct cell types and spares the majority of normal progenitor cells, represents a major advantage explaining their widespread use and potential for future applications.

Antibodies Directed against Myeloid Antigens

Acute myelogenous leukemia

Autologous bone marrow transplantation is playing an increasing role in the treatment of acute myelogenous leukemia (AML) (Zittoun *et al.*, 1995; Imrie *et al.*, 1996). Most impressive results were first achieved when high risk patients with AML, in second and subsequent remission, were treated by autologous PCT using marrows purged with 4-hydroperoxycyclophosphamide or mafosfamide

(Yeager *et al.*, 1986; Korbling *et al.*, 1989), but no randomized trial has been completed. For first remission AML, a non-randomized study indicates that patients transplanted within the first 6 months after remission induction have an improved disease-free-survival (DFS) when they receive purged rather than unpurged marrow grafts (Gorin *et al.*, 1990). Purging with cyclophosphamide derivatives is yet a delicate procedure that must take into account the hematocrit, the nucleated cell concentration, the nature of cells and even the concentration of plasma (Giarratana *et al.*, 1995). It is also associated with non-specific elimination of normal hematopoietic progenitors, and some problems with platelet reconstitution were observed (Yeager *et al.*, 1986; Korbling *et al.*, 1989). Fortunately, some of these obstacles could be alleviated with agents like amifostine, which was recently shown to protect normal progenitor cells from mafosfamide toxicity (Douay *et al.*, 1995). There are concerns over the role of purging in inducing cytogenetic abnormalities and secondary malignancies after autologous PCT with mafosfamide or 4-HC purged marrows (Perot *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1993; Bassan *et al.*, 1995). However, as secondary myelodysplastic syndromes and leukemias were documented following unpurged PCT (Rohatiner, 1994), such a proposition is not substantiated at the present time.

Elimination of malignant cells with mAbs should have the advantage of specificity and decreased toxicity. However, in acute myelogenous leukemia (AML), selection of the optimal cell marker for purging is particularly difficult for numerous reasons. First, antigens present on AML cells are extremely diverse, with their patterns of expression being usually associated with their FAB subtype, and few antigens being present on a majority of AML cases (Griffin *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1995). In addition, within individual patients, leukemia cells can exhibit considerable heterogeneity of antigenic expression (Griffin *et al.*, 1981, 1983b; Neame *et al.*, 1986; Sabbath *et al.*, 1985). Moreover, antigens present on detectable AML cells may not correspond to those expressed by AML progenitor cells (Griffin *et al.*, 1983b; Sabbath *et al.*, 1985). Indeed, the maturation process, which prevails in AML cells, generates a majority of AML cells which are differentiated and non-dividing. In order to address this problem, several indirect approaches, using mainly *in vitro* clonogenic assays, were developed (Sabbath *et al.*, 1985; Lange *et al.*, 1984; Griffin *et al.*, 1983a). Finally, selection of the appropriate target is complicated by the sharing of antigens on malignant and normal myeloid progenitor cells (Sabbath *et al.*, 1985; Griffin and Lowenberg, 1986). Thus, elimination of AML cells through a poorly selected target antigen could impair and even prevent progenitor cell engraftment.

The mAbs PM-81 and AML-2-23, which react with differentiation antigens CD15 and CD14, respectively, were used by Ball *et al.* in association with rabbit complement (C) for purging of AML cells (Ball *et al.*, 1986). PM-81 and AML-2-23 were chosen for mAb purging because they react with the majority of cells from 91% and 77% of cases with AML, respectively; they can also bind to a majority of clonogenic AML progenitors (L-CFC) in 65% and 30% of AML patients, respectively (Griffin *et al.*, 1986; Griffin and Lowenberg, 1986). PM-81 binds to a highly immunogenic pentasaccharide, lacto-N-fucopentose-III (LNF-III), and AML-2-23, primarily to FAB-M4 and -M5 blasts. Interestingly, CD15

expression on AML cells has been shown to increase following treatment with neuraminidase (Ball *et al.*, 1991), and to result in higher depletion of leukemia cells (Ball *et al.*, 1990b). CD15 is also present on approximately 50% of normal CFU-GM progenitors, but neuraminidase has no effect on LNF-III expression in normal progenitor cells (Ball and Howell, 1988), and does not impair engraftment (Ball *et al.*, 1990b).

This combination of mAbs and C was used to treat marrow grafts from 30 patients in first (6 patients), second (18 patients) or third (6 patients) complete remission (Ball *et al.*, 1990a). Median time to neutrophil engraftment*¹ was 30 days and time to platelet engraftment*² was 45 days. These patients experienced delayed T-cell immune reconstitution, that did not translate into significant clinically-related toxicity (Ericson *et al.*, 1992). The relapse-free-survival (RFS) at 3 years was of 67% for patients in CR1, 25% in CR2 and 18% in CR3 patients. These patients were followed for up to 9 years and additional patients entered in a multicenter trial, to evaluate the curative potential of this treatment strategy. A total of 63 patients with AML were thus transplanted while in CR1 (7 pts), CR2 (44 pts), CR3 (1 pt), and first relapse (R1: 11 pts) (Selvaggi *et al.*, 1994). The preparative regimen of the first 36 patients consisted of cyclophosphamide (Cy: 120 mg/kg) and fractionated total body irradiation (TBI: 1200 cGy), and in the subsequent patients of busulfan (Bu: 16 mg/kg) and Cy. Engraftment occurred at a median of 37 days for neutrophils and 44 days for platelets ($>20 \times 10^9/L$). The 4- to 5-year disease-free-survival (DFS) was estimated at 53% for the 7 CR1 patients, 45% for R1 patients and 30% for CR2/3 patients. Interestingly, patients receiving Bu/Cy as preparative regimen had an improved DFS over patients receiving Cy/TBI. This could be attributable to a lower toxicity of Bu/Cy, particularly in the older patients, but other confounding prognostic factors such as CD15 expression on AML blasts prevent definitive conclusions.

Fabritiis *et al.* used another mouse mAb (S4-7) reacting with CD15 on human myelomonocytic cells and selected acute myelogenous leukemia (AML) cells. Seven AML patients, 6 in first complete remission (CR) and one in second CR underwent autologous PCT with S4-7+C purged marrow after BAVC conditioning regimen (De Fabritiis *et al.*, 1989). Granulopoiesis recovered rapidly at a median of 20 days post-PCT. The patient transplanted in CR2 relapsed 3 months after autologous PCT, and of the 6 patients transplanted in 1st CR, 3 remained in continuous CR at 35, 47 and 57 months. It is noteworthy that AML cells from 2 patients, studied at the time of relapse, had a significant percentage of S4-7 negative cells that, in both instances, were not detectable either at diagnosis or previous relapse, an observation that confirms the importance of eliminating the earliest clonogenic AML cells.

CD33 is a surface glycoprotein of 67 kd, member of the immunoglobulin superfamily, and homologous to sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 antigen, and a particularly appealing antigen to target AML cells

¹ In this section, neutrophil engraftment will be defined as the time to greater than 0.5×10^9 neutrophils/L.

² In this section, platelet engraftment will be defined as the time to greater than 20×10^9 platelets/L.

(Simmons and Seed, 1988; Freeman *et al.*, 1995; Griffin *et al.*, 1984; Takahashi *et al.*, 1992). Indeed, greater than 80% of AML cells express this sialic acid-dependent cell adhesion molecule (Freeman *et al.*, 1995; Griffin *et al.*, 1984; 1986). Moreover, it is found on the majority of leukemia progenitor cells (L-CFC) in almost all AML patients evaluated (95%) (Griffin and Lowenberg, 1986). MY9, a mAb with reactivity against CD33, in combination with C is capable of eliminating 3.6 logarithms (logs) of clonogenic HL-60 cells (Griffin *et al.*, 1984; Roy *et al.*, 1991). When its effect was measured against normal hematopoietic progenitors, MY9+C inhibited the growth of 99% of day 7 and 14 CFU-GM and 53% of CFU-GEMM (Roy *et al.*, 1991; Griffin *et al.*, 1984; Griffin and Lowenberg, 1986). Following purging, hematologic reconstitution would thus probably originate from CFU-GEMM progenitors, which were only partially eliminated by such treatment, and from the hematopoietic progenitor cells that do not express CD33 (Griffin, 1987). With these results, Robertson *et al.* used CD33+C to treat marrow grafts from 12 patients with AML in CR2 (10 pts), CR1 (1 pt) and CR3 (1 pt). Neutrophil engraftment* was achieved at a median interval of 43 days, and platelet engraftment* at 92 days following autologous PCT. The DFS at 3 to 4 years was estimated at 33% with 4 patients in continuous CR at 3 to 5 years post PCT. These results clearly demonstrate that it is possible to target AML clonogenic cells for purging, and that radical eradication of CFU-GM and even partial elimination of CFU-GEMM do not irreversibly impair engraftment.

Combinations of different purging techniques could increase treatment efficacy. Indeed, the addition of chemotherapeutic agents 4-hydroperoxycyclophosphamide (4-HC) and VP-16 to mAbs M195 (anti-CD33) and F23 (anti-CD13) with C, increased leukemia cell elimination by approximately 3 logs, while sparing hematopoietic progenitors earlier than CFU-GM (Lemoli *et al.*, 1991). Similarly, ara-C and VP-16 synergize with MY9+C to increase purging efficacy (Stiff *et al.*, 1991). It is noteworthy that M195+C induced much less elimination of AML cells than MY9+C, underlining the importance of mAb selection in C mediated purging (Gee and Boyle, 1988). As mAb and C purging implies sequential incubations and washes, methods were developed to increase not only treatment efficacy, but also its efficiency. Continuous infusion of complement by an automated cell processor, to replace early complement components which are rapidly exhausted (Martin, 1987), was shown to increase cytotoxicity, and reduce treatment duration and reagents costs (Howell *et al.*, 1989). Decay-accelerating factor (DAF)(CD55) is a membrane protein protecting host cells from damage by autologous C. In an attempt to increase C-mediated cytotoxicity, an anti-CD55 mAb was used to block DAF activity; it was found to markedly increase target cell lysis by human complement (Zhong *et al.*, 1995). All the methods described above take advantage of rabbit complement to bind the murine mAbs and cause cell lysis. Complement is, however, associated with numerous drawbacks including limited availability, variable efficacy and non-specific toxicity, need for appropriate standardization, not to mention the difficult compliance with regulatory issues (See chapter on Regulatory issues) (Roy *et al.*, 1990a; Gee and Boyle, 1988).

In an attempt to facilitate the use of mAbs by rendering them directly cytotoxic, several groups have developed immunoconjugates. Thus, M195, an

anti-CD33 mAb, conjugated with iodine 131 was able to target marrow cells and demonstrated significant leukemic cytoreduction after *in vivo* administration (Schwartz *et al.*, 1993). However, with a range of β -emission of approximately 50 cell diameters, *ex vivo* purging with such radioactive conjugates would most likely cause irreversible damage to bystander-stem cells, preventing their *in vitro* use. Immunotoxins (ITs) represent another alternative, and Myers *et al.* were the first to produce an IT directed against AML cells by conjugating AML-2-23 (anti-CD14) and MCS-2 (anti-CD13) mAbs to the ribosome-inactivating phytotoxin, ricin (Myers *et al.*, 1988). Ricin consists of two subunits, the A and B chains, which are linked by a single disulfide bond as well as noncovalent interactions (Vitetta *et al.*, 1987; Blakey and Thorpe, 1988). The A chain is an enzyme which inactivates the 60S subunit of eukaryotic ribosomes, and the B chain binds to galactose-terminated oligosaccharides that are ubiquitous on eukaryotic cell surfaces. Thus, lactose was added *in vitro* to block non-specific binding of the whole ricin fraction of the ITs to normal cells (Myers *et al.*, 1988). Both ITs selectively bound to target cells, inhibited protein synthesis, and prevented the clonogenic growth of fresh marrow blasts from AML patients as well as KG-1 (AML) cells. Tecce *et al.* rather used saporin emitoxin (SAP) conjugates, which demonstrated low cytotoxicity in unconjugated form, and highly specific cytotoxicity and favorable pharmacokinetic properties once conjugated to LAM3 and LAM7 mAbs (Tecce *et al.*, 1991). These ITs yet suffered from a narrow spectrum of activity against monocytes and M5b AML. Nevertheless, the fact that immunotoxins do not necessitate the complicated standardization procedures associated with complement use, nor the sophisticated apparatus required for magnetic purging methods, warrants further developments in this field (Arbour *et al.*, 1996).

Lambert *et al.* had developed a technique to chemically block the two galactose binding sites of the ricin B chain, thereby preventing non-specific linkage to eukaryotic cells (Lambert *et al.*, 1991a;b). An anti-MY9-blocked-ricin (anti-MY9-bR) IT, comprised of anti-MY9 mAb conjugated to a modified whole ricin, eliminated several logs of AML cell lines and patient cells (Roy *et al.*, 1991). As expected, MY9-bR was toxic to normal CFU-GM, which express CD33 and also to BFU-E and CFU-GEMM, although to a lesser extent. When compared to anti-MY9+C, anti-MY9-bR could be used in conditions which provided more effective depletion of AML cells with substantially less depletion of normal CFU-GM. Therefore, MY9-bR was used at high IT concentrations for short incubation periods and evaluated for *in vitro* purging of AML cells from autologous marrow.

A phase I/II clinical trial using anti-MY9-bR for purging of the marrow graft was initiated in 2 centers, Maisonneuve-Rosemont Hospital in Montreal and the Dana-Farber Cancer Institute in Boston. Twenty-six adult patients without an HLA-matched donor underwent autologous PCT for AML. Median age at PCT was 40 years (range: 18-57). At the time of harvest, 11 patients were in CR1, 13 patients were in CR2 and 1 patient in CR3. Patient bone marrow was harvested just prior to autologous PCT and purged with anti-MY9-bR. All patients received Bu/Cy for preparative regimen. This IT eliminated 40% of erythroid

progenitors and 60% of myeloid progenitors. Median time to neutrophil engraftment* was 40 days (range: 17–64) and to platelet engraftment* was 63 days (range: 16–307). Patients transplanted with anti-MY9–bR experienced significantly more rapid neutrophil engraftment compared to patients receiving anti-MY9+C purged marrows ($p=0.0005$ for time to achieve a neutrophil count greater than $0.1 \times 10^9/L$) (Robertson *et al.*, 1994). Interestingly, 9 of the 11 patients transplanted in first remission are alive and in continuous unmaintained complete remission, with a median follow-up of 28 months post-PCT. Five of 13 patients transplanted in second or subsequent CR are alive and leukemia-free +18, +20, +21, +44 and +45 months post-PCT.

Hematopoietic engraftment is notoriously slow in patients with AML, even when unpurged marrows are used (Lowenberg *et al.*, 1990). The above mentioned studies demonstrate that the selective elimination of early myeloid progenitor cells, even those that are CD33 positive, may delay, but not prevent stem cell engraftment. Thus, methodologies such as *in vitro* expansion may be useful to induce maturation of progenitor cells prior to their administration and to shorten time to engraftment. Nevertheless, slow engraftment was not associated with a higher incidence of procedure-related toxicity. Moreover, more than 60% of patients with AML in first complete remission and treated by autologous mAb purged marrow transplants have a prolonged DFS. Even more compelling is the 30% long-term DFS that we and others reported for patients transplanted in second or subsequent remission, patients with dismal prognosis when treated by standard approaches. These results warrant randomized clinical trials to clearly define the contribution of mAb purging of progenitor cell grafts to long-term survival.

Chronic myelogenous leukemia

Results from 8 major centers compiled by McGlave *et al.* show that autologous transplants can be performed successfully in patients with chronic myelogenous leukemia (CML). Indeed, autologous PCT results in low procedure-related toxicity, adequate engraftment, and most impressively a survival curve with a plateau (McGlave *et al.*, 1994). Not surprisingly, contamination of the progenitor cell graft by CML cells is of significant concern, and several centers use marrow purging techniques. Options for purging of CML cells were previously described, ranging from long-term culture systems (Barnett *et al.*, 1994), to interferon administered *ex vivo* (McGlave *et al.*, 1990) or *in vivo* (Carella *et al.*, 1996), and incubation with anti-sense oligonucleotides (Tari *et al.*, 1994), 5-fluorouracil (Jazwiec *et al.*, 1995), eilatin (Einat *et al.*, 1995), etc. However, few studies have used mAbs to purge CML cells, mostly because of the difficulty in specifically targeting the very early CML progenitor cells. When antigens such as erythropoietin receptor and HLA-DR were identified on the surface of CD34+ CML cells by Wognum *et al.* and Verfaillie *et al.*, respectively, a major step forward has been made (Wognum *et al.*, 1992; Verfaillie *et al.*, 1992). It may now be possible to identify benign primitive hematopoietic progenitor cells that can be distinguished from their malignant CML counterparts. However, limitations such as

the number of CD34+DR- progenitor cells, and the need for *in vitro* culture and expansion may preclude the immediate application of these methods, but maybe not for long! (Verfaillie, 1994)

Antibodies Directed against B-lineage Antigens

Neoplastic cells from 80–85% of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and non-Hodgkin's lymphoma (NHL) patients originate from B-lineage cells, the rest deriving primarily from T cells. The majority of B-lineage ALL cells express one or more of the following antigens: Ia, CD19, CD10, CD9 and CD24 (Abramson *et al.*, 1981; Kersey *et al.*, 1981; Ritz *et al.*, 1980; Freedman *et al.*, 1988), which are surface markers found on the surface of normal pre-B cells. Several lines of evidence suggest that these leukemia cells not only share surface markers with normal B-lineage lymphoblasts but that these ALL cells are in fact derived from stages of pre-B cell differentiation (Foa *et al.*, 1989).

Acute lymphoblastic leukemia

B-lineage leukemia cells consistently express the same combinations of surface antigens and can be classified according to their maturation stage (Nadler *et al.*, 1984). Early ALL cells, expressing HLA-DR alone or HLA-DR+CD19+CD10-, tend to be found in infants and young children and carry a poor prognosis. HLA-DR+CD19+CD10+ ALL represent approximately one third of ALL and are most frequently encountered in children. ALL with an HLA-DR+CD19+CD20+ phenotype are detected predominantly overall (48% of ALL). Patients with the more mature B-cell ALL phenotype (HLA-DR+CD19+CD20+sIg+) are usually adults and present a particularly aggressive disease (Copelan and McGuire, 1995).

Culture conditions were developed to study target antigens most frequently found on clonogenic ALL cells. Interestingly, the antigens detected on the majority of ALL blasts, namely Ia, CD19, CD10 and CD9 were also found to be expressed on the proliferating fraction of cells in this disease (Hudson *et al.*, 1989; Uckun and Ledbetter, 1988; Freedman, 1996). This finding suggests that surface markers present on the whole population of ALL cells, whether they are dividing or not, also characterize the clonogenic precursor cells (Hudson *et al.*, 1989).

Several groups reported on the use of autologous PCT to treat patients with ALL who do not have a histocompatible donor. As shown in Table 1, autologous PCT was performed at all stages of the disease, sometimes in high risk first remission, but usually in second or subsequent remission and rarely at relapse (Kersey *et al.*, 1987; Janossy *et al.*, 1988; Simonsson *et al.*, 1989; Rizzoli *et al.*, 1989; Gorin *et al.*, 1989; Sallan *et al.*, 1989; Schroeder *et al.*, 1991; Carey *et al.*, 1991; Cahn *et al.*, 1991; Gilmore *et al.*, 1991; Schmid *et al.*, 1993; Uckun *et al.*, 1993; Soiffer *et al.*, 1993; Doney *et al.*, 1993; Morishima *et al.*, 1993; Fiere *et al.*, 1993). Most studies used purging procedures, mAbs and C being the preferred option.

Table 1 Autologous bone marrow transplantation for patients with ALL.

Authors	Remission Status			N	Age Range	Preparative Regimen	Purging	Relapse	DFS (3-4Y)	
	1	2	3+							
Kersey <i>et al.</i> , 87	3	17	25	0	45	0-50	CY+TBI±6MP±MTX	B: Anti-CD9+CD10+CD24+C T: Anti-CD3±CD5±CD18+Ricin	79%	20%
Janossy <i>et al.</i> , 88	10	23	3	0	36	6-42	multiple CT+TBI	Anti-CD10±CD19±CD7+C	90%CR1	57% CR2+
Simonsson <i>et al.</i> , 89	21	29	3	0	54	3-55	TBI+multiple CT	B: Anti-CD10±CD19+C T: Anti-CD7+C	65% CR1	31% CR2+
Rizzoli <i>et al.</i> , 89	37	45	0	0	82	2-57	CY+TBI	Maf or no purging	38% CR1	27% CR2
Gorin <i>et al.</i> , 89	233	205	0	0	438	1-55	Multiple CT±TBI	mAb+C or Maf or no purging	41% CR1	29% CR2
Sallan <i>et al.</i> , 89	1	11	5	1	44	1-14	CY+Ara C+VM26+TBI	Anti-CD9+CD10+C	29%	29%
Schroeder <i>et al.</i> , 91	0	17	7	0	24	0-16	Mel+TBI	Campath-1 or no purging	45%	45%
Carey <i>et al.</i> , 91	15	0	0	0	15	18-51	Mel+TBI	No purging	52%	48%
Cahn <i>et al.</i> , 91	6	16	3	1	26	2-38	TBI+Ara C+ Mel	mAbs+C±Maf	62%	28%

Gilmore <i>et al.</i> , 91	27	0	0	0	27	11-15	CY+TBI+Ara C	B: Anti-CD10±CD19+C T: Anti-CD7+C	65%	32%
Schmid <i>et al.</i> , 93	0	13	8	1	22	1-16	VP16+TBI	B: Anti-CD10+CD19+CD24+IB T: Anti-CD2+CD3+CD5+CD7+IB	80%	18%
Uckun <i>et al.</i> , 93	11	47	25	0	83	1-48	TBI±AraC± VP-16±CTX	B: Anti-CD9+CD10+CD24+C+4HC or Anti-CD19-PAP+4HC T: Anti-CD5 +CD7-Ricin+4HC	85%	15%
Soiffer <i>et al.</i> , 93	1	11	7	3	22	18-54	CY±AraC±VM26+TBI	Anti-CD9+CD10+C	75%	20%
Doney <i>et al.</i> , 93	10	27	25	27	89	2-47	CY±VP16+TBI	mAb+C or 4HC	27%	50%-CR1 50%-CR2+
Morishima <i>et al.</i> , 93	8	5	2	2	17	4-51	multiple CT+TBI	Anti-CD10+C	90%	0%-Rel 75%-CR1 20%-CR2 0%-CR3
Fièrè <i>et al.</i> , 93	63	0	0	0	63	15-50	CY+TBI	B: Anti-CD10+CD19+C±Maf T: Anti-CD2+CD5+CD7±Maf	51%	

Abbreviations: N: number of patients, Rel: relapse, 6MP: 6-mercaptopurine, MTX: methotrexate, TBI: total body irradiation, CY: cyclophosphamide, Bu: busulfan, B: B-cells, T: T-cells, C: complement, IB: immunomagnetic beads, Maf: Maflosamide, Mel: Melphalan, CT: chemotherapy, 4HC: 4-hydroperoxycyclophosphamide.

Monoclonal antibodies varied between centers, yet the targeted antigens were mainly CD9, CD10 and CD19 for B-lineage ALL cells, and CD5 and CD7 for T-ALL cells. When autologous PCT was performed in CR1, the DFS was in the range of 50% at 3-4 years post-PCT. As observed in AML, the field of bone marrow transplantation suffers from the lack of randomized controlled studies. Fiere *et al.* conducted one of the few large scale randomized studies comparing autologous PCT and chemotherapy. They were not able to find a difference in DFS between autologous PCT and chemotherapy arms, but late relapses occurred mainly in the chemotherapy arm, and reanalysis after further follow-up will be interesting (Fiere *et al.*, 1993). For patients in second or subsequent remission, the prolonged DFS was in the range of 20-30%, results highly similar to those reported for allogeneic PCT in such high risk patients (Kersey *et al.*, 1987; Fiere *et al.*, 1993). In fact, relapse was the main cause for treatment failure after autologous PCT, and also a major determinant after allogeneic PCT (Kersey *et al.*, 1987; Fiere *et al.*, 1993). When added to the poor results of lymphocyte infusions after allogeneic PCT for relapsed ALL, these results suggest that the GVL effect may not be so active against ALL cells (Kolb *et al.*, 1995).

The high relapse rates after allogeneic PCT and the identification of leukemic burden as an important predictor of outcome show that present preparative regimens are insufficient to eradicate residual host ALL cells (Kersey *et al.*, 1987; Uckun *et al.*, 1992; Fiere *et al.*, 1993). Also, the observation that leukemic progenitor cells can be detected in the purged graft in numerous cases, coupled with the highly variable efficacy of different purging methods, suggest that the most potent purging procedures will have to be identified and optimized (Uckun *et al.*, 1992; 1993; Roy *et al.*, 1990a; Soiffer *et al.*, 1993). However, methods for the detection of patient ALL cells remain either complex and time consuming, or difficult to reproduce. Ph+ ALL offers a unique opportunity to easily monitor residual leukemia cells. Martin *et al.* found that a cocktail of anti-CD9, -CD10 and AB4 mAbs coupled to immunomagnetic beads was consistently able to eradicate PCR detectable cells from all peripheral blood progenitor cell grafts, confirming that mAb purging approaches can be most effective (Martin *et al.*, 1995). In terms of clinical studies to evaluate purging, the European Bone Marrow Transplantation Group has reported the results of autologous PCT in 560 patients with ALL (Gorin *et al.*, 1989). Patients with ALL were treated with heterogeneous conditioning regimen and a majority of these patients had marrow purging according to various protocols. In this retrospective analysis, a comparison of disease-free probability for patients receiving purged versus unpurged marrows showed a trend in favor of marrow purging.

In summary, results of most studies of autologous PCT have demonstrated that this type of intensive treatment is a reasonable approach to the treatment of high risk first remission patients and can provide effective salvage therapy for patients who have failed standard treatment. In most studies results of autologous PCT are similar to those obtained following allogeneic PCT in patients who have HLA-matched donors. Finally, the great majority of studies evaluating autologous PCT in adult and pediatric patients and reporting interesting survival have used purging methods to eliminate residual neoplastic cells in the marrow grafts.

Non-Hodgkin's lymphoma

Autologous PCT is usually performed in patients with NHL who have relapsed following optimal chemotherapy and/or radiation therapy regimens. Indeed, salvage chemotherapy in these relapsed patients can often induce CR, but these remissions are usually of short duration and only a few of these patients can be cured (Philip *et al.*, 1987). In contrast, autologous PCT in this high risk patient population can result in prolonged disease-free-survival rates ranging from 30 to 50% (Freedman *et al.*, 1990; Colombat *et al.*, 1990; Petersen *et al.*, 1990; Philip *et al.*, 1995; Stahel *et al.*, 1995). These impressive results were obtained with different conditioning regimens, using either purged or unpurged marrows. Unmanipulated marrow grafts are almost uniformly used in patients without marrow involvement at the time of harvest, and preferentially at any time since diagnosis (Philip *et al.*, 1995; Stahel *et al.*, 1995). Purging of the marrow graft is based on the histologic documentation of bone marrow infiltration at the time of diagnosis or relapse in a large proportion of patients with NHL. In addition, clonogenic methodologies have shown that lymphoma cells can be cultured from histologically negative bone marrows (Philip and Favrot, 1988; Sharp *et al.*, 1992). These observations, coupled with the finding that molecular rearrangements found in lymphoma cells were also detected by polymerase chain reaction (PCR) in all relapsed patients, even after achieving a CR, suggest that bone marrow purging should probably be performed even in patients with NHL who show no evidence of marrow infiltration by conventional techniques (Gribben *et al.*, 1991a). Similar observations were also made in peripheral blood stem cell grafts (McCann *et al.*, 1996). Nevertheless, the clinical implications of the persistence of NHL cells in progenitor cell grafts is still debated.

Among purging agents, some groups use 4-hydroperoxycyclophosphamide or mafosfamide (Gulati *et al.*, 1992; Colombat *et al.*, 1990), but most centers rely on mAb-mediated purging methodologies. The nature of the clonogenic cell in NHL is poorly defined, but the mature phenotype of NHL cells suggest that its clonogenic precursor is probably more mature than its ALL clonogenic counterpart, and therefore amenable to immunologic purging (Freedman, 1996). At the Dana-Farber Cancer Institute, Boston, 114 patients with relapsed NHL and marrows presenting a 14:18 translocation detectable by PCR had their bone marrows purged with either anti-CD20 mAb+C, or anti-CD10, -CD20 and -B5+C, which could eliminate more than 3-4 logs of NHL cells (Gribben *et al.*, 1991b). PCR detectable cells were eliminated from half of the patients. These patients had a significantly better DFS than the other half of patients who received a persistently PCR positive marrow graft. This was true for patients with up to 5% infiltration of the intratrabecular space, but all patients with higher lymphoma cell content had a poor outcome. This suggests that 5% infiltration by lymphoma cells was the upper limit for efficacy of this purging procedure, or corresponded to the highest lymphoma burden that could be eliminated by the preparative regimen. Studies of the Nebraska group, that did not use stem cell purging, are also supporting a negative impact of progenitor cell graft contamination by lymphoma cells (Sharp *et al.*, 1996). Indeed, when lymphoma cells

could be grown from marrow grafts, these patients had a lower DFS than those receiving grafts without detectable clonogenic lymphoma cells.

In follicular lymphomas, where marrow infiltration is prominent, Freedman *et al.* reported a 4-year DFS of approximately 45% after autologous purged PCT (Freedman *et al.*, 1991). Rohatiner *et al.* deployed similar efforts to purge grafts from 75 patients with follicular NHL, and obtained an identical 4–5 year overall DFS (Johnson *et al.*, 1994). In the latter study, only 14% of marrow samples tested negative by PCR for the t(14;18) after purging with a single CD20 mAb+C, while marrow purging by the Boston group resulted in 50% of samples becoming negative. This higher purging efficacy could be attributed to the multiple mAb approach of the latter group, yet other unexplored factors, such as the pre-purge lymphoma burden, could explain this difference.

Other mAb purging methods include primarily immunomagnetic beads, which can eliminate 3 to 5 logs of lymphoma cells after 2 cycles of treatment with multiple mAbs (Kvalheim *et al.*, 1988; 1989). Monoclonal antibodies are comprised of IgG and/or IgM, and they can target even weakly expressed cell surface antigens (Kvalheim *et al.*, 1988, 1989). Importantly, when utilized in small numbers of patients for purging of peripheral blood progenitor cell grafts, such immunomagnetic beads did not affect engraftment (Dreger *et al.*, 1995b; Straka *et al.*, 1995). Immunotoxins were also tested for the elimination of lymphoma cells and shown to deplete similar numbers of clonogenic lymphoma cells (Roy *et al.*, 1995b; Lambert *et al.*, 1991a; Uckun and Reaman, 1995). Although not exclusively, several ITs target CD19, an antigen expressed on all pre-B and B cells, and nearly all B-cell leukemias (both acute and chronic) and lymphomas (Freedman, 1996). Anti-CD19 mAbs were mostly linked to either whole blocked ricin (anti-B4–bR), deglycosylated ricin-A chain or other toxin moieties such as PAP (B43-PAP) (Uckun and Reaman, 1995; Ghetie *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 1995b), and primarily administered *in vivo* to patients with B-cell NHL and also ALL in clinical phase I–II trials (Uckun and Reaman, 1995; Sausville *et al.*, 1995; Grossbard *et al.*, 1993a;b). Anti-B4–bR is particularly appealing for purging because only a few hours of incubation are necessary to induce very high levels of cytotoxic activity, a factor most important in progenitor cell purging as it decreases manipulation time, lowers chances of contamination by infectious agents and facilitates laboratory work. A phase I trial of autologous PCT using anti-B4–bR as a purging agent was initiated in patients with high risk NHL (Roy *et al.*, 1995a). Preliminary results on 41 patients show that all patients evaluable demonstrated engraftment with purged marrow, without signs of delayed neutrophil or platelet engraftment. In addition, the 3- to 4-year DFS for these high risk relapsed patients was 62%. This result, as well as those of other studies reported above, justifies efforts to further evaluate the role of purging in PCT for patients with NHL. Although it may be best evaluated in controlled randomized trials, this patient population is highly heterogeneous and such studies may benefit from stratification according to the level of contamination of the progenitor cell graft. Furthermore, PCR positivity may not be sufficient because it can detect an extremely large range of lymphoma cells. Fortunately, semi-quantitative and quantitative PCR measurements of the numbers of malignant cells are now

available and should permit accurate estimations of the lymphoma cell burden present before and after purging (Hetu *et al.*, 1994; Meijerink *et al.*, 1993).

Other hematologic malignancies

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) and multiple myeloma (MM) are other B cell malignancies where autologous PCT is gaining ground. CLL cells are usually CD19+, CD20+, CD23+, CD5+, CD22± and FMC7± (Matutes *et al.*, 1994). Rabinowe *et al.* purged marrow grafts of CLL patients with a combination of mAbs directed against CD10, CD20, and B5 in association with rabbit complement (Rabinowe *et al.*, 1993). Anti-CD10 mAb is consistently absent from CLL cells, and was used with the intent of eliminating theoretical early clonogenic CLL precursors. Khouri *et al.* rather used a single anti-CD19 mAb with sheep antimouse IgG1-conjugated magnetic beads which resulted in a median depletion of leukemic cells of 1.3 log (Khouri *et al.*, 1994). In both studies, CLL cells were easily detectable by flow-cytometry or pathological examination in a majority of patients before purging of the marrow graft. After transplantation, CLL cells were not identified in numerous patients by Southern blot analysis and/or immunophenotyping, for periods extending up to 2 years. Although interesting, survival curves are impossible to interpret because of the short follow-up period.

Similar approaches were used for purging of multiple myeloma, using either mAbs directed at CD10, CD20 and PCA-1 with complement (Anderson *et al.*, 1993), or CD19 and sheep antimouse IgG1 conjugated magnetic beads (Dimopoulos *et al.*, 1993). In both instances, malignant cells could not be detected by flow-cytometry after purging, yet PCR for CDR3 showed tumor cell involvement in 17 of 28 patients before purging, and 10 patients after purging. Another alternative is positive selection of CD34+ cells, as multiple myeloma cells may not express CD34 (Vescio *et al.*, 1994). The role of purging in these diseases is especially difficult to define as the role of autologous PCT itself remains uncertain. It is probable that with such traditionally "incurable diseases", transplantation, and most likely purging, may offer a better chance of cure in patients with favorable prognostic features such as stage I disease, minimal exposure to chemotherapy, and complete remission (Anderson, 1995).

Elimination of malignant T cells, either leukemia or lymphoma, from progenitor cell grafts can be performed effectively using immunotoxin conjugates, immunomagnetic microspheres, or combinations of ITs and pharmacologic methods (predominantly using 4-hydroperoxycyclophosphamide or mafosfamide) (Casellas *et al.*, 1985; Stong *et al.*, 1985; Uckun *et al.*, 1987; Bertolini *et al.*, 1997b). However, T-cell purging of autologous grafts was associated with an increased incidence of lymphoproliferative disorders, a complication that significantly hampered its widespread implementation (Anderson *et al.*, 1990).

Antibodies Directed against Antigens Found on Solid Tumors

Neuroblastoma is one of the first diseases for which marrow purging techniques were developed. Although the necessity for marrow purging was never

conclusively demonstrated, the rationale of marrow treatment is based on a number of indirect findings. In neuroblastoma, up to 50% of patients have marrow infiltration detectable by light microscopy examination, and this number increases when more sensitive immunofluorescence techniques are used (Johnson and Goldman, 1993; Moss *et al.*, 1991). In addition, the infusion of marrow grafts contaminated by neuroblastoma cells has been associated with the development of pulmonary metastases, an infrequent finding in neuroblastoma patients (Glorieux *et al.*, 1986). Moreover, large numbers of tumor cells in the marrow graft have been shown to correlate with marrow relapse (Matthay *et al.*, 1993). Furthermore, ongoing studies by Rill *et al.* show that when patients with neuroblastoma relapse after autologous bone marrow transplantation, the malignant cells harbor the genetic marker originally introduced in the marrow graft (Rill *et al.*, 1994). Thus, in a majority of clinical trials using autologous bone marrow transplantation for the treatment of patients with neuroblastoma, purging is performed, usually with mAbs and immunomagnetic microspheres (Graham-Pole *et al.*, 1991; Matthay *et al.*, 1993). Several mAbs are reactive against antigens found on the surface of neuroblastoma cells, and were used in combination to try to bypass escape mechanisms, such as low antigen density, antigenic modulation, and inter- and intra-patient antigenic heterogeneity (Graham-Pole *et al.*, 1991; Matthay *et al.*, 1993; Ladenstein *et al.*, 1994). Recently, the antigen CD56 was found to display high levels of expression on neuroblastoma cells and its targeting with a blocked ricin conjugate (N901-bR) resulted in specific and effective cytotoxicity, suggesting that it may be one of the best target antigens to deplete neuroblastoma cells (Roy *et al.*, 1996).

After PCT with purged marrow grafts, hematologic reconstitution seemed delayed, with neutrophil engraftment extending up to 100 days. While marrow purging procedures were only marginally implicated, pre-existing factors such as cumulative chemotherapy and interval from last chemotherapy to harvest were shown to be associated with slow engraftment (Graham-Pole *et al.*, 1991). There were also concerns that the high relapse rates observed after autologous purged PCT could be attributed to the persistence of malignant cells in the graft at levels below detectable thresholds. Although possible, the above purging procedures could remove more than 3–4 logs of tumor cells, resulting in contamination of marrow grafts by less than 1 tumor cell in 10^5 marrow cells (Graham-Pole *et al.*, 1991; Ladenstein *et al.*, 1994; Matthay *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 1996). In addition, similar relapse rates were observed following allogeneic PCT, rather suggesting that neuroblastoma cells in the host escape elimination by the preparative regimen (Matthay *et al.*, 1994; Ladenstein *et al.*, 1994).

Several mAbs were also developed against solid tumors, including breast cancer and small cell lung cancer (SCLC) (Stahel *et al.*, 1994). Conjugation of these mAbs with toxins or their association with magnetic microspheres produces agents capable of eliminating more than 3–5 logs of malignant cells from progenitor cell grafts (Myklebust *et al.*, 1994; Zangemeister-Wittke *et al.*, 1994; Roy *et al.*, 1996). The fact that progenitor cell treatment methodologies are now effective, accessible and close to standardization, along with the extremely rapid expansion of

PC
im;

T-c

Gra

PC

pri:

the

GV

the

(M:

198

inc:

dor

hos

198

to s

of

unp

pos

:

inc

ad:

(C:

or

effe

ins:

the

on:

GV

:

elin

(Re

sm:

et a

ma:

198

inc:

reje

T-c

obs

Ch:

was

it c

PCT for the treatment of patients with solid tumors, will most likely favor the implantation of purging methodologies in this field.

T-cell depletion in allogeneic progenitor cell transplantation

Graft-versus-host disease (GVHD) is a major obstacle to successful allogeneic PCT, and results from an alloreaction of T-lymphocytes against normal host cells, primarily skin, liver and gut. Thus, T-cell depletion of the marrow graft is theoretically the most logical approach to decrease the incidence and severity of GVHD. Most groups have used mAbs for pan-T cell depletion, and shown that the incidence of both acute and chronic GVHD was significantly decreased (Mitsuyasu *et al.*, 1986; Henslee *et al.*, 1987; Pollard *et al.*, 1986; Goldman *et al.*, 1988; Gratwohl *et al.*, 1993). However, the troublesome finding of a higher incidence of leukemic relapse indicates that T-cell depletion also eliminates donor cells with graft-versus-leukemia (GVL) activity, i.e. capable of eradicating host leukemia cells (Mitsuyasu *et al.*, 1986; Henslee *et al.*, 1987; Pollard *et al.*, 1986; Goldman *et al.*, 1988; Gratwohl *et al.*, 1993). In fact, relapse rates increased to such an extent that the survival advantage afforded by the decreased severity of GVHD was absent or even decreased in comparison to patients receiving unmanipulated marrow grafts. Thus, the most pertinent question became: is it possible to dissociate GVHD and GVL effectors?

Bortin *et al.* have demonstrated that, in AKR mice, the GVL effect can be increased by alloimmunization, without increasing GVHD (Bortin *et al.*, 1979). In addition, Truitt *et al.* were able to generate clones of cytotoxic T lymphocytes (CTL) directed specifically against either leukemia cells only, normal cells only, or against these 2 cell types (Truitt *et al.*, 1983). These results suggest that GVL effect and GVHD can occur as two separate phenomena and that in these instances the effector cells are probably distinct (Bortin *et al.*, 1973). Therefore, the ideal option would be to selectively deplete grafts of T cell subpopulations only responsible for graft-versus-host disease (GVHD), and preserve T cells with GVL activity.

Depletion of CD6+ (anti-T12) T-cell was attempted by Ritz *et al.* in order to eliminate "mature" T lymphocytes of the marrow graft prior to allogeneic PCT (Roy *et al.*, 1990b; Soiffer *et al.*, 1992). Such an approach spares NK cells and a small proportion of T-cells, CD4+ or CD8+ (Rohatiner *et al.*, 1986; Rasmussen *et al.*, 1994). Champlin *et al.* rather opted to eliminate CD8+ T-cells from the marrow graft, sparing CD4+ T cells and a majority of NK cells (Champlin *et al.*, 1990). In both instances, such efforts at selective T-cell depletion resulted in a low incidence of GVHD (Champlin *et al.*, 1990; Soiffer *et al.*, 1997). In addition, graft rejection, which was previously found to be a major problem in non-selective T-cell depleted transplants, occurred with an incidence comparable to that observed in transplants with unmanipulated marrow grafts (Soiffer *et al.*, 1992; Champlin *et al.*, 1990; Voltarelli *et al.*, 1990; Soiffer *et al.*, 1997). Mixed chimerism was documented in 51% of patients receiving CD6-depleted marrow grafts, and it correlated with lower numbers of CD4+ cells early post-PCT, but not with

relapse, survival and disease-free-survival (Roy *et al.*, 1990b). These results suggest that the subset of cells responsible for the GVL effect is distinct from those that may be responsible for preventing recurrence of normal recipient hematopoiesis.

Pichert *et al.* explored the respective roles of T-cell depletion, ablative regimen, and GVHD, in the persistence of minimal residual disease after allogeneic PCT (Pichert *et al.*, 1995). Ninety-two (92) patients with CML either received T-depleted marrow grafts using CD6 mAb+C as sole method of GVHD prophylaxis, or unmanipulated grafts with cyclosporine and methotrexate (von Buechtzingsloewen *et al.*, 1993). Patients received either cyclophosphamide and total body irradiation (Cy/TBI), or busulfan and cyclophosphamide (Bu/Cy) as preparative regimen. During the first six months post-PCT, the majority of patients (80–83%) in both patient populations had PCR-detectable CML cells (PCR+), suggesting that both preparative regimens were incapable of totally eradicating malignant cells (Pichert *et al.*, 1995). However, between 6 and 24 months post-PCT, the majority of patients receiving unmodified marrows converted to PCR negativity, while the proportion of PCR+ patients remained unchanged in those receiving T-cell depleted marrow. Most interestingly, this decrease in PCR detectable CML cells post-PCT followed the development of chronic GVHD, suggesting an association between GVHD and GVL activity. This was further strengthened by noting that persistent PCR- and intermittent PCR- results were clearly associated with both acute and chronic GVHD. Nevertheless, a significant proportion of patients (44%) without GVHD also had intermittent or persistent PCR- assays, a result providing evidence that although GVL is frequently linked to GVHD, it can happen in its absence (Pichert *et al.*, 1995).

The difficulty in identifying specific antigens that would discriminate GVHD from GVL effector cells remains an obstacle to selective T-cell depletion. An alternative to more selective T-cell purging would be to add post-transplant strategies to enhance the GVL activity, e.g. with cytokines such as interleukin-2 (IL-2) (Soiffer *et al.*, 1994; Massumoto *et al.*, 1996). These maneuvers, along with the rapid expansion of PCT using mismatched and especially unrelated marrow donors, which are associated with a very high incidence of severe GVHD, have rejuvenated interest in T-cell depletion of the graft. Humanized Campath mAbs, which are attractive because of their capacity to activate human complement directly, can be used in conditions that fulfill these requirements (Naparstek *et al.*, 1995; Hale and Waldmann, 1994). Immunomagnetic separation procedures and immunotoxins also offer appealing alternatives to rabbit complement for mAb-mediated T-cell depletions (Lamb *et al.*, 1994; Filipovich *et al.*, 1990). Also, in patients with non-malignant diseases, T-cell purging of progenitor cells decreases the incidence and severity of GVHD, and although there remains an increased propensity for graft rejection, it may be controlled by additional host immunosuppression (Hale and Waldmann, 1994). Finally, in the context of transplantation with unrelated or mismatched donors, recent studies demonstrated that T-cell depletions were able to lower the incidence of severe GVHD, and preserve sufficient GVL activity to prevent relapse (Spencer *et al.*, 1995; Hessner *et al.*, 1995).

Another application for T-cell depletion has appeared with the revolutionary infusion of donor lymphocytes (Kolb *et al.*, 1990). Indeed, patients with relapsed

CML after allogeneic PCT could be induced back into complete remission and even molecular negativity by simply administering peripheral blood lymphocytes of the donor. More recently, several groups have used this approach with some success for the treatment of patients with other relapsing malignancies, such as acute leukemias and even myelodysplastic syndromes (Bar *et al.*, 1993; Porter *et al.*, 1994; Kolb *et al.*, 1995). These results clearly demonstrate that unsensitized peripheral blood donor lymphocytes have the potential to recognize and eventually eliminate recipient malignant cells *in vivo*, but significant GVHD can be encountered. The infusion of CD8-depleted lymphocytes or reduced numbers of lymphocytes were able to induce GVL activity, without as much GVHD (Mackinnon *et al.*, 1995; Giralt *et al.*, 1994; Alyea *et al.*, 1995). It thus seems that lymphocyte preparations selectively T-cell depleted may be useful to treat relapses following allogeneic PCT. This "adoptive" form of GVL immunotherapy could also be implemented to prevent disease recurrence (Naparstek *et al.*, 1995).

• POSITIVE SELECTION •

POSITIVE SELECTION OF NORMAL HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS

Selective elimination of contaminating malignant cells or normal T cells may not be the only approach to purge autologous or allogeneic progenitor cell grafts. A potentially simpler alternative, circumventing the difficulty in eliminating all unwanted malignant or T cells, would be to identify and select normal hematopoietic stem cells (Spangrude, 1991). For a number of years, the difficulty of this approach has resided in defining the nature of the hematopoietic stem cell. However, the pursuit of the phenotypic and functional characteristics of this elusive cell is now yielding dividends.

Despite the fact that normal hematopoietic progenitors only constitute a fraction (less than 3%) of the total BM cells (Civin *et al.*, 1984; Baum *et al.*, 1992), they can be identified and selected by taking advantage of their unique surface markers and physical properties, such as size and density (Lasky and Zanjani, 1985; Humblet *et al.*, 1988). However, density separation methods are not very specific nor practical for daily application (Lasky and Zanjani, 1985; Humblet *et al.*, 1988). Cell fractionation by counterflow centrifugal elutriation can result in collection of progenitor cells, but T cells are recovered in the same fraction, since they have the same sedimentation rate (Gao *et al.*, 1987; Noga *et al.*, 1986). Therefore, physical separation methods give rise to a low degree of purification of stem cells.

CD34 Expression According to Hematopoietic Maturation

Hematopoietic cells at different stages of the differentiation process express different cell surface antigens (Krause *et al.*, 1996; Beverley *et al.*, 1980;

Fitchen *et al.*, 1981; Civin and Loken, 1987). The quest to identify these antigens has led to the development of mAbs recognizing CD34, a cell surface marker almost exclusively expressed on immature hematopoietic cells (Fina *et al.*, 1990; Civin *et al.*, 1984; Andrews *et al.*, 1986; Uchansak-Ziegler *et al.*, 1989; Watt *et al.*, 1987; Young *et al.*, 1995). The CD34 molecule is a heavily glycosylated type I transmembrane protein which is a member of the sialomucin family of surface antigens (Civin *et al.*, 1984; Andrews *et al.*, 1986; Watt *et al.*, 1987). This 115 kDa molecule is expressed on 1-3% of human normal bone marrow cells, including almost all committed progenitor cells along with the more primitive progenitors, such as long-term culture-initiating cells (LTC-IC) (Civin *et al.*, 1984; Loken *et al.*, 1987; Berenson *et al.*, 1988; Andrews *et al.*, 1986). CD34 is also expressed on some types of nonhematopoietic cells such as small-vessel endothelial cells (Fina *et al.*, 1990; Young *et al.*, 1995) and embryonic fibroblasts (Brown *et al.*, 1991). The combination of CD34 purification, colony-forming assays and flow cytometric analysis has provided insights into the expression of CD34 along the hematopoietic maturational pathway. The earliest hematopoietic progenitors, such as LTC-IC, CFU-blast and CFU-GEMM, were primarily identified within the highly fluorescent CD34 fraction (CD34^{bright}) (Strauss *et al.*, 1986; Krause *et al.*, 1994; Bernstein *et al.*, 1991; Leary and Ogawa, 1987; Krause *et al.*, 1996). The more mature CFU-G, CFU-GM, BFU-E and CFU-megakaryocytes could also be recovered in the CD34^{bright} fraction, but most mature lineage-committed progenitors were CD34^{dim} (Andrews *et al.*, 1986; Krause *et al.*, 1994; Civin and Loken, 1987; Andrews *et al.*, 1989).

Further studies showed that a single CD34+ progenitor cell should have the potential to give rise to all the lymphoid and myeloid progeny, and to sustain long-term hematopoiesis (Berenson *et al.*, 1988; Baum *et al.*, 1992; Huang and Terstappen, 1992). Single-cell liquid culture assays demonstrated a high level of immunophenotypic heterogeneity among CD34+ cells, which translated into distinct clonogenic properties (Huang and Terstappen, 1994). CD34+ cells could be divided into four populations based on co-expression of HLA-DR and/or CD38. The majority (90%) of CD34+ cells also express the antigens CD38 and HLA-DR (CD34+CD38+DR+) and present the lowest self-renewal potential. These cells only generate myeloid colonies and do not have the potential to induce second generation progeny. They are lineage-specific (lin+), thus bearing various differentiation markers such as CD33, CD14 and CD19. However, they could be involved in early hematopoietic reconstitution occurring during the first weeks post-transplant (Lapointe *et al.*, 1996). CD34+CD38+DR- and CD34+CD38-DR- cells each represent approximately 4% of the whole CD34+ population: both populations only generate cells of the myeloid lineage in short-term culture assays. Finally, few CD34+ cells (3%) are CD38- while being HLA-DR+ (CD34+CD38-DR+). This population includes the only cells able to reconstitute long-term hematopoiesis, as evidenced by their potential to induce long-term cultures (5 weeks and more). These CD34+CD38-DR+ cells can generate lymphoid and myeloid colonies, express the Thy-1 antigen (present on early undifferentiated progenitors) and do not bear differentiation markers (lin-) (CD5-, CD10-, CD33-, CD71-) (Huang and Terstappen, 1994).

CD34 expression has also been detected on lymphoid cells rearranging either immunoglobulin genes (B lymphocytes) (Loken *et al.*, 1987) or T-cell antigen receptor genes (T lymphocytes) (Gore *et al.*, 1991), as consistent with previous studies showing expression of CD34 on primitive B- and T-lymphocyte precursors (Ryan *et al.*, 1986). Furthermore, CD34 expression can be detected early in the B cell differentiation arm on CD19+CD10+ cells, but it disappears as CD20 is expressed (Strauss *et al.*, 1986).

CD34 Expression on Malignant Cells

In addition to its expression on normal hematopoietic cells, the CD34 antigen was found to be expressed on their malignant counterparts (Krause *et al.*, 1996). For instance, approximately 40% of cases of acute myeloid leukemia (AML) express CD34 (Civin *et al.*, 1984; Borowitz *et al.*, 1989; Soligo *et al.*, 1991; Vaughan *et al.*, 1988; Geller *et al.*, 1990). CD34 expression can also be detected *in vitro* on colony-forming progenitor cells of chronic myelogenous leukemia (CML) (Silvestri *et al.*, 1992; Katz *et al.*, 1986). In addition, in patients with myelodysplasia, increased numbers of CD34+ cells could be used as a prognostic indicator of blast crisis (Guyotat *et al.*, 1990). Moreover, CD34 was found to be expressed in approximately 70% of cases of childhood B-lineage ALL and in a minority of cases of T-lineage ALL (Gore *et al.*, 1991). In patients with follicular lymphoma, bcl-2-IgH rearranged lymphoma cells were detectable in the CD34+CD19+ fraction, but rarely in the CD34+CD19- fraction (Macintyre *et al.*, 1995).

Unlike leukemic cell types previously mentioned, no CD34 expression has been detected to date on chronic lymphocytic leukemia cells or on multiple myeloma cells (Krause *et al.*, 1996; Vescio *et al.*, 1994). Also, most solid tumors do not express CD34. Indeed, CD34 expression has not been detected on breast cancer, ovarian cancer and neuroblastoma cells (Berenson *et al.*, 1991). However, CD34 expression was detected on tumors of vascular endothelium, like angiosarcoma and Kaposi's sarcoma (Sankey *et al.*, 1990; Krause *et al.*, 1996).

Monoclonal Antibodies Directed against CD34

Numerous anti-CD34 mAbs have been described (Civin, 1989), including My10 (Civin *et al.*, 1984), BI.3C5 (Katz *et al.*, 1985), 12.8 and 115.2 (Andrews *et al.*, 1986), ICH3 (Watt *et al.*, 1987) and TUK3 (Uchansak-Ziegler *et al.*, 1989), which were generated following immunization with KG1/KG1a cell lines. Immunization with human placental endothelial cells produced the anti-CD34 mAb QBEND10 (Fina *et al.*, 1990). All these mAbs, which bind to epitopes located on the extracellular domain of CD34, were classified into 3 different classes according to the differential sensitivity of their epitopes to various enzymes (Sutherland *et al.*, 1992). Class I mAbs (My10, BI.3C5, 12.8, ICH3) are directed against epitopes which are sensitive to neuraminidase, chymopapain and Pasteurella hemolytica-derived glycoprotease (PHDG)(specific cleavage of sialylated O-linked glycans).

Class II mAbs (QBEND10) recognize an epitope sensitive to chymopapain and PHDG but resistant to neuraminidase. Class III mAbs (TUK3, 115.2) bind to epitopes which are insensitive to the enzymes previously mentioned.

Sources of CD34+ Cells and Mobilization Procedures

CD34+ cells are particularly abundant in BM, yet only 1-3% of these CD34+ cells are capable of long-term marrow reconstitution (Huang and Terstappen, 1994; Krause *et al.*, 1996; Hardwick *et al.*, 1992). However, the presence of both committed and stem cell populations seems to be important for rapid and sustained engraftment. Indeed, committed and non-committed progenitor cells were isolated by counterflow elutriation of BM from lethally irradiated mice and transplanted separately. The fraction containing the less primitive progenitors gave transient, early engraftment while the stem cell fraction produced delayed, but durable engraftment (Jones *et al.*, 1989; 1990).

Hematopoietic progenitor cells are present in the peripheral blood, and they are capable of both early and late hematopoietic reconstitution (Goldman *et al.*, 1978; Korbling *et al.*, 1981). However, when compared to BM, the number of progenitor cells normally present in the peripheral circulation is small (Kessinger *et al.*, 1986; Bender *et al.*, 1991). Fortunately, human peripheral blood progenitor cell concentration has been shown to vary with exercise, diurnal cycle, prior cell harvests, administration of steroids and other hormones, endotoxins, dextran and most importantly with chemotherapy and/or hematopoietic growth factors (Lasky, 1991).

High levels of committed and non-committed progenitor cells were mobilized into the peripheral blood (PB) after the administration of a single high dose of cyclophosphamide (Kotasek *et al.*, 1992; To *et al.*, 1990b). Alternatively, growth factors such as G-CSF and GM-CSF were successful at increasing the CD34 cell content of PB (Gianni *et al.*, 1989; Sheridan *et al.*, 1992). Currently, several mobilization regimens with IL-3, IL-6, PIXY321, and other cytokine combinations are evaluated in clinical trials (Guillaume *et al.*, 1993).

Mobilization with chemotherapy alone or single growth factors can increase the CD34+ cell concentration by 10-fold or greater and limit the number of leukophereses to 3 or 4 (Siena *et al.*, 1989; Dreger *et al.*, 1993). However, by combining intensive chemotherapy and cytokine administration during hematopoietic recovery, the steady state PB progenitor cell concentration could be multiplied by up to 1000, and a single collection was shown to provide sufficient numbers of CD34+ cells for durable engraftment (Siena *et al.*, 1991; Gianni *et al.*, 1989; Pettengell *et al.*, 1993; Negrin *et al.*, 1995). Nevertheless, there are legitimate concerns that the mobilization procedure itself may recruit not only the desired hematopoietic progenitor cells, but also malignant cells into the peripheral blood. Indeed, patients with multiple myeloma, breast cancer, small cell lung cancer and also recently NHL were found to have increased numbers of malignant cells in their blood following mobilization, and breast tumors recovered were found to be clonogenic *in vitro* (Lemoli *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 1992; Brugger *et al.*, 1994a; Leonard *et al.*, 1997).

CLINICAL USES OF CD34

Quantification of Progenitor Cells in the Graft

Neither leukocyte counts nor morphologic assessment provide a reliable estimate of the numbers of progenitor cells necessary for a safe engraftment. The number, morphologic and functional characteristics of hematopoietic progenitor cells can be evaluated in short- and long-term colony-forming assays, long-term culture-initiating cells (LTC-IC) probably providing the best qualitative assessment of the hematopoietic stem cell potential of a graft (Pettengell *et al.*, 1994; Hirao *et al.*, 1994). However, because of the delay in obtaining results, the main utility of such assays is in retrospective analysis.

CD34+ cell counts provide an objective and precise measurement of hematopoietic progenitor cells, particularly when higher numbers are attained following mobilization (Siena *et al.*, 1993; 1989; Sutherland *et al.*, 1994; Pettengell *et al.*, 1993). In addition, CD34 content can be determined within a few hours, allowing immediate adjustments in the harvesting and transplant schedules, and it can even be predicted by preceding day PB sampling (Elliott *et al.*, 1996). Nevertheless, the low numbers of CD34+ cells mandate careful control of flow cytometric procedures. Thus, major efforts are presently developed to standardize procedures, and to implant large scale quality controls.

There is a general agreement that grafts with a threshold number of more than 2 million CD34+ mobilized blood cells/kg patient weight, usually result in adequate and sustained engraftment of neutrophils and platelets (Bensinger *et al.*, 1995; Haas *et al.*, 1995; Haynes *et al.*, 1995; Weaver *et al.*, 1995). CD34+ cell counts in the peripheral blood before apheresis also predict the yield of progenitor cells that can be collected by leukopheresis (Sutherland *et al.*, 1994; Haas *et al.*, 1994). Nevertheless, because of the varying cloning efficiencies and heterogeneity of CD34+ cells, these numbers must be individually established for each combination of cytokines used. In addition, caution must be exercised as the composition of CD34+ cell subsets may vary between individuals and between harvests. For example, CD34+CD19+ B lymphoid progenitors, which do not contribute to generation of neutrophils and platelets, could represent a high proportion of CD34+ cells (Gorin *et al.*, 1995). These findings justify efforts to identify cell surface molecules present on normal cells and responsible for hematopoietic engraftment, such as CD34+Thy1+ or CD34+CD38- cells (Baum *et al.*, 1992; Huang and Terstappen, 1994).

Purification of Stem and Progenitor Cells

In addition to their role in the quality control of progenitor cell grafts, anti-CD34 mAbs are being used to specifically purify normal stem and progenitor cells administered to rescue hematopoiesis in myeloablated patients (Shpall *et al.*, 1994). This process decreases the amount of cells to be stored and allows removal of unwanted cells that can be occult cancer cells, or cells of a specific hematopoietic

compartment, like T cells. This may be especially important in PCT, to eliminate contaminating tumor cells released in PB after growth factor or chemotherapy mobilization (Lemoli *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 1992; Brugger *et al.*, 1994a).

Selection methods include flow cytometry (Korbling *et al.*, 1994) and solid phase techniques such as avidin-biotin column chromatography (Korbling *et al.*, 1994; De Bruyn *et al.*, 1995; Dreger *et al.*, 1995a; David *et al.*, 1995; Dewynter *et al.*, 1995; Mahe *et al.*, 1995; Link *et al.*, 1995; Brugger *et al.*, 1995; 1994b; Bohbot *et al.*, 1996; Shpall *et al.*, 1994; Gorin *et al.*, 1995; Lemoli *et al.*, 1996), immunomagnetic separation (Straka *et al.*, 1995; Dreger *et al.*, 1995a; David *et al.*, 1995; Lane *et al.*, 1995; Dewynter *et al.*, 1995; Bensinger *et al.*, 1995a; Cornetta *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1996) and panning (Dewynter *et al.*, 1995; Cardoso *et al.*, 1995; 1993; Holyoake *et al.*, 1994). Although high-speed flow sorting allows selection of single cells harboring specific antigen characteristics, its clinical use is limited primarily by considerations of availability of the apparatus and sterility (Verfaillie *et al.*, 1996). Table 2 provides results on the efficiency of the different methods in terms of quality of the graft: median yield of CD34+ cells, purity, and level of tumor cell and T-cell depletion; and time to hematopoietic reconstitution.

Avidin-biotin chromatography

Avidin-biotin chromatography takes advantage of the capacity of avidin to bind to biotinylated CD34 mAbs to recuperate CD34+ cells (Berenson *et al.*, 1986; Lemoli *et al.*, 1988, 1989). Cells are first exposed to biotinylated anti-CD34 mAbs, and then, to avidin-coated polyacrylamide beads. CD34- cells flow through the column and are removed by continuous column washing. Bound CD34+ cells are eluted from the column by mechanical agitation theoretically *via* breakage of the weak link between antigen and antibody. Thus, high affinity of binding between avidin and biotin prevents release of the mAb, which is not administered to the patient among the antigen-positive cells (Auditore-Hargreaves *et al.*, 1994).

This method was used to select CD34+ cells from the peripheral blood of patients with various hematologic malignancies and solid tumors (Korbling *et al.*, 1994; De Bruyn *et al.*, 1995; Dreger *et al.*, 1995a; Lill *et al.*, 1994; David *et al.*, 1995; Dewynter *et al.*, 1995; Mahe *et al.*, 1995; Link *et al.*, 1995; Brugger *et al.*, 1994b; Bohbot *et al.*, 1996; Shpall *et al.*, 1994; Lemoli *et al.*, 1996). As shown in Table 2, the purity of CD34+ cells selected by immunoadsorption columns was approximately 70%, and between 30 and 60% of CD34+ cells were recovered. T-cell depletion was in the range of 1.5 to 3 logs, which may be sufficient to decrease the risk of GVHD (Dreger *et al.*, 1995a; Bensinger *et al.*, 1995a; Cornetta *et al.*, 1995). Neutrophil engraftment* occurred between days 10 and 22, while the time to more than 50×10^9 platelets/L ranged from 12 to 24 days.

Immunomagnetic selection

Immunomagnetic separation relies on the binding of CD34+ cells first to anti-CD34 mAb and then to ferric oxide-treated polystyrene beads coated with sheep

anti-mouse IgG (Hardwick *et al.*, 1992; Krause *et al.*, 1996; Auditore-Hargreaves *et al.*, 1994). Magnets applied to the side of the column pull out bead-rosetted CD34+ cells and free CD34- cells are washed out by gravity flow. Chymopapain was first used to cleave a peripheral domain of the CD34 molecule, and separate CD34+ cells from beads and mAbs. As chymopapain is potentially toxic, *Pasteurella haemolytica* glycoprotease, a non-cytotoxic enzyme, has been used to cleave CD34 epitopes (Marsh *et al.*, 1992). This strategy permitted recovery of up to 78% of CD34+ cells, with a purity of up to 95%. More recently, enzymes were replaced by a releasing agent that competes for antibody binding (PR-34) and eliminates mAb and beads from the surface of CD34+ cells (Hansen *et al.*, 1995). The physiologic role of CD34 epitopes and the impact of such deletions being unknown, this last procedure has the significant advantage of releasing CD34+ cells without altering the CD34 molecule.

Recovery of CD34+ cells by immunomagnetic selection ranged from 5 to 65%; purity, from 26 to 94%; and T-cell elimination, from 3 to 4 logs (Table 2). These results could yet be influenced by the nature of previous mobilization regimens and experience with the procedure. In terms of hematopoietic reconstitution, initial clinical studies showed no significant differences in engraftment between immunomagnetically separated and unseparated marrow cells (Dreger *et al.*, 1995a). Finally, concerns about reinfusion of residual beads, which could lead to the elimination of cells attached by the reticuloendothelial system, or other side effects did not yet materialize (Kemshead, 1991).

Selection by panning

An alternative to immunoadsorption and immunomagnetic separation is positive selection by panning. In this methodology, anti-CD34 mAbs are attached to a solid matrix (polystyrene flasks), and cells released by mechanical agitation. The isolation is performed in two steps: panning with soybean agglutinin to first decrease the number of unwanted T cells, followed by panning with anti-CD34 antibody (IC13) (Okarma, 1992; Lebkowski *et al.*, 1992).

Panning has been used *in vitro* for the selection of CD34+ cells from either human bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood (Cardoso *et al.*, 1995, 1993; Holyoake *et al.*, 1994; Dewynter *et al.*, 1995). In general, this technique has yielded CD34+ recoveries ranging from 17 to 74%, and with a purity estimated between 32 and 94%. Clinical results on transplantation and engraftment of patients with cells selected by panning have not been published yet. This may be related to the technical problems associated with the sequential enrichment steps, and large surface areas needed to accommodate the high numbers of CD34+ cells necessary for engraftment.

Clinical Application of CD34 Positive Selection

Before considering widespread application of this procedure, there were definite obstacles to consider. Foremost were concerns that the selection process would result in the loss of cells, either CD34+ or CD34-, directly or indirectly

Table 2 Results of CD34 positive selection procedures

METHODS	Source of CD34+ cells	Origin	N	Mobilization	Yield	Purity	T cell depletion	Neutrophils (>0.5 x 10 ⁹ /L)	Platelets (20-50 x 10 ⁹ /L)	Authors
Avidin-Biotin	BM	P	5	None		83%				Korbling <i>et al.</i> , 1994
Chromatography	UCB	D	15	None	28%	77%				DeBruyn <i>et al.</i> , 1995
	BM	D	6	None	27%	92%				Dreger <i>et al.</i> , 1995
	PB	D+P	6	G-CSF	27%	65%	3 logs			Mahé <i>et al.</i> , 1995
	PB	P	6	G-CSF		71%				David <i>et al.</i> , 1995
	UCB	D	1	None		62%				DeWynter <i>et al.</i> , 1995
	PB	D	5	Chemo+G-CSF		85%				
	UCB	D	3	None	54%	56%				
	BM	D	3	None	40%	75%				
	PB	P	7	chemo+G-CSF	30%	84%				
	BM ± PB ± GF	P	44	Chemo+G-CSF	PB:52% BM:42%	PB:42% BM:72%		10-34 days	9-156 days	Shpall <i>et al.</i> , 1994
	PB	P	15	Chemo+G-CSF	73%	61%	3 logs	12 days	15 days	Brugger <i>et al.</i> , 1994
	PB'	D	5	G-CSF	PB:30%	PB:70%	PB:3 logs	15 days†	24 days'	Link <i>et al.</i> , 1995
	PB+BM	D	5	G-CSF	BM:48%	BM:66%	BM:2 logs	15 days	41 days	
	PB	P	10	Chemo+G-CSF	64%	72%	11-15 days*	14 days*		Brugger <i>et al.</i> , 1995
	BM+GF	P	25	None		49%		15 days	23 days	Gorin <i>et al.</i> , 1995
	PB	P	10	Chemo+G-CSF	58%	90%	10 days	12 days		Lenzoli <i>et al.</i> , 1996
	PB ^o	P	5	Chemo+G-CSF	92%	87%		11 days ^{oo}	22 days ^{oo}	Bohbot <i>et al.</i> , 1996

Immunomagnetic separation	PB	D	8	G-CSF	30%	94%	4 logs	
	UCB	D	3	None	35%			Dreger <i>et al.</i> , 1995
	PB	P	3	Chemo+G-CSF	38%			David <i>et al.</i> , 1995
	PB	D	13	G-CSF ± G-M-CSF	48-79%	22-81%	3 logs	Lane <i>et al.</i> , 1995
	UCB	D	2	None	8%	13%		DeWynter <i>et al.</i> , 1995
	BM	D	6	None	3%	30%		
	PB	P	3	Chemo+G-CSF	5%	35%		
	PB	D	7	G-CSF			4 logs	Bensing <i>et al.</i> , 1995
	BM	D	9		49%	59%	3 logs	Cornetta <i>et al.</i> , 1995
	PB	P	9	Chemo+G-CSF		91%	8 days*	Williams <i>et al.</i> , 1996
Panning	UCB	D		None	49%	93%		Cardoso <i>et al.</i> , 1993
	BM	D	13		61%	79%		Holyoake <i>et al.</i> , 1994
	BM	D	7	None	66%	94%		Cardoso <i>et al.</i> , 1995
	UCB	D	4	None	4%	31%		DeWynter <i>et al.</i> , 1995
	BM	D	7	None	9%	34%		
	PB	P	4	Chemo+G-CSF	39%	31%		

Abbreviations: PB: peripheral blood, UCB: umbilical cord blood, BM: bone marrow, D: normal donor, P: patient, N: number of samples, Neutro: neutrophils, *: infusion of expanded ± unexpanded CD34+ selected cells, †: transplantation of PB CD34+ cells along with unselected BM cells, °: selection of CD34+ cells on thawed cells, °°: data on only one patient, Gf: growth factor administration after infusion of this graft.

responsible for short- and long-term engraftment. However, a first study by Berenson *et al.* showed that autologous CD34+ cells from the marrow of patients with breast cancer and neuroblastoma infused after marrow ablative therapy resulted in successful engraftment in all evaluable patients (Berenson *et al.*, 1991). Subsequently, with the development of standardized methodologies for the selection of CD34+ cells, engraftment was documented with CD34+ cells from bone marrow and/or peripheral blood (Table 2). Time to granulocyte and platelet reconstitution was 10–14 days and 14–15 days, respectively, in most patients. Also, Brugger *et al.* showed that in patients with breast cancer, transfusion of the same numbers of positively selected CD34+ cells or unseparated PB progenitor cells after high-dose chemotherapy and mobilization with G-CSF, led to identical times to neutrophil and platelet recovery (Brugger *et al.*, 1994b). However, patients transplanted with CD34+ cells from peripheral blood seemed to engraft more rapidly than CD34+ selected cells from bone marrow (Shpall *et al.*, 1994). Thus, fears of impaired early engraftment did not materialize, and although it is too early to conclude about the quality of long-term reconstitution, a few years of follow-up do not indicate any reason for worry.

Other problems associated with the use of CD34 selection include requirements in terms of time, equipment and expense for this procedure. In addition, the efficacy of purging must be sufficient to eradicate malignant cells from the graft. To date, this aspect has not been thoroughly addressed, but purity levels attained imply that residual malignant cells will persist in CD34 selected grafts. Nevertheless, CD34 selection was shown capable of eliminating several logs of various malignant cells and of depleting breast cancer cells from progenitor cell grafts below detectable levels (Shpall *et al.*, 1994).

Among the other advantages of CD34 selection is the reduction in number of cells to be stored and administered, resulting in a decrease in the size of freezing containers and in requirements for storage space. The decreased amount of potentially toxic cryopreservatives such as dimethylsulfoxide also translates in decreased toxicity to the patient at the time of administration of the graft. Interestingly, one study shows that it would even be possible to do the CD34 selection after thawing of unselected peripheral blood cells (Bohbot *et al.*, 1996). In the five patients evaluated, the selection yielded 92% of CD34+ cells with a purity of 87%; and in the one patient who received a post-thawing CD34 selected graft, neutrophil and platelet engraftment were documented at 11 and 22 days, respectively. Furthermore, in the field of gene therapy, enrichment for cells with long-term clonogenic potential could facilitate transfection procedures and enhance chances for stable expression of transduced genes (see chapter on Gene Therapy) (Korbling, 1995).

Allogeneic PCT

In allogeneic PCT transplantation, the severity of GVHD stems in part from the T cells present in the graft and mainly from the degree of mismatch between donor and recipient (Martin, 1990; 1992). Allogeneic PBPCs can be mobilized with hematopoietic growth factors in healthy BM donors (Tjonnfjord *et al.*, 1994;

Arseniev *et al.*, 1994). However, the allogeneic recipients of PBPCs are exposed to a high risk of acute graft-versus-host disease (aGVHD) because of the high content of immunocompetent T cells in the apheresis product. In order to optimize allogeneic PBPC, positive selection of CD34+ cells could reduce T-cell content by 2- to 3-logs (Dreger *et al.*, 1995a; Brugger *et al.*, 1994b; Link *et al.*, 1995; Bensinger *et al.*, 1995a; Cornetta *et al.*, 1995). However, in contrast to what was feared, unselected peripheral blood progenitor cell grafts with their high levels of T cells did not generate a higher incidence of GVHD than bone marrow grafts (Bensinger *et al.*, 1995b; Korbiling *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 1995). The induction of a predominant Th2 phenotype by G-CSF would be a plausible explanation for this result (Pan *et al.*, 1995). Thus, these findings suggest that CD34 selection of PB progenitor cells may represent a particularly attractive option to prevent GVHD in high risk patients and enable transplants of patients across the major histocompatibility barrier. Indeed, in the few patients where PB progenitor cells were CD34 selected, acute GVHD seldom occurred (Link *et al.*, 1995).

Combining Positive and Negative Selection

Taken together, negative and positive selection procedures present their limitations. In both positive and negative selection, tumor cells can remain after the procedure. Even if the purity of CD34 selections could be increased by several passages on the columns, the final fraction could still contain CD34 - clonogenic precursors. Therefore, in order to generate grafts of the highest quality, it is likely that future approaches will lie in the combination of positive and negative selection procedures. This may be true for both autologous and allogeneic progenitor cell grafts (Bertolini *et al.*, 1997b).

Ex vivo expansion of progenitor cells

Positive, negative or combinations of these selection procedures to eliminate malignant cells may yet cause significant depletion of normal hematopoietic progenitor cells, particularly when antigens on early stem cells are targeted as is the case for CML cells, and result in delayed engraftment. As the number of CFU-GM and/or CD34+ cells in progenitor cell grafts correlate with the rate of recovery for both neutrophils and platelets (To *et al.*, 1992; 1990a), it was postulated that the rate of hematopoietic reconstitution could be enhanced by increasing the number of progenitor cells infused at the time of transplant (Haylock *et al.*, 1992). Indeed, previous studies in mice have shown that *ex vivo* expanded bone marrow cells led to a more rapid recovery than unexpanded BM cells (Muench and Moore, 1992).

Interestingly, CD34 selection has favored progenitor cell growth *in vitro*, most likely because some CD34 - marrow or blood cells limited their expansion (Auditore-Hargreaves *et al.*, 1994). Several growth factor combinations are being tested to increase the number of CD34+ cells and also to induce differentiation (Brugger *et al.*, 1993). CD34+ cells cultured in a mixture of IL-3, GM-CSF, and

G-CSF resulted in an 18-fold increase in cell number after only 10 to 12 days in culture (Smith *et al.*, 1993). Various combinations of Stem Cell Factor (SCF), IL-3, -4, -6, -11, -12, G-CSF, GM-CSF, and other cytokines, such as FLT3L and PIXY321, also gave rise to major expansion of stem and progenitor cells (Ogawa, 1993; Elwood *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1996; Gabbianelli *et al.*, 1995; Shapiro *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1996). Such cytokines may also alter "homing" characteristics (Tavassoli *et al.*, 1991; Zanjani *et al.*, 1992). Optimum growth conditions can even be defined to promote the expansion of various cell lineages such as megakaryocytes or lymphocytes (Bertolini *et al.*, 1997a; Rosenzweig *et al.*, 1996). However, studies on murine hematopoietic cells suggested that IL-1, IL-3 or *ex vivo* expansion itself may impair the long term reconstituting ability of stem cells (Yonemura *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 1996). Results from clinical studies should thus yield crucial information on the long term reconstituting potential of such treated cells. To date, their use in humans for *ex vivo* expansion of PB grafts harboring less than 10 percent of the usual number of CD34+ cells has resulted in rapid engraftment (Brugger *et al.*, 1995). In addition, Williams *et al.* recently demonstrated that after expansion with PIXY321 alone, the final product was comprised of about 70% granulocytic precursors. Reinfusion of these expanded myeloid progenitors did not lead to acute toxicity and hematopoietic recovery was prompt although not shortened when compared to historical cases (Williams *et al.*, 1996). Furthermore, in a phase I clinical study conducted on patients with nonmyeloid malignancies, Alcorn *et al.* demonstrated that even with cryopreserved PBPCs, CD34 selection, *ex vivo* expansion and reinfusion can be performed successfully (Alcorn *et al.*, 1996). Nevertheless, the capacity of progenitor cell expansion to enhance engraftment and to eliminate the toxic effects of positive and/or negative purging on normal hematopoietic progenitor cells remains to be determined. Moreover, the absolute effect on both transient and sustained engraftment remains to be confirmed in clinical trials using intensive preparative regimens.

Residual tumor cells can be detected in the CD34-selected fraction of a number of autologous harvests (Brugger *et al.*, 1994b; Shpall *et al.*, 1994; Willems *et al.*, 1996). If *ex vivo* culture of stem cells could support the growth of normal progenitors, while inhibiting the growth of malignant cells, as demonstrated with long term culture of CML and AML cells, it could have an additional purging effect (Barnett *et al.*, 1994). Widmer *et al.* have recently addressed this question in patients with non-Hodgkin's lymphoma (Widmer *et al.*, 1996). Using a competitive PCR titration assay, this study determined the number of residual lymphoma cells before and after selection and *ex vivo* expansion in the presence of SCF, IL-1 β , IL-3 and IL-6. Their results show that in a majority of cases, residual lymphoma cells do not proliferate under conditions which allow expansion of CD34+ cells.

Ex vivo expansion of CD34+ selected cells has the potential to limit the size of progenitor cell collections, decrease the engraftment period and facilitate graft manipulation, including gene therapy approaches. It could also enable optimization of the T-cell dose, to prevent the rejection of T-cell depleted allografts, and even enable "cell farming" for transfusion purposes.

CONCLUSIONS

Monoclonal antibodies, with their capacity to target specific cell populations, are now implanted in the field of progenitor cell transplantation. The need for bone marrow and peripheral blood progenitor cell purging either by positive or negative selection, and most likely both approaches in sequence, is becoming increasingly evident. In addition, the numerous other applications of mAbs, which include progenitor cell enumeration and expansion, have set deep roots for their usage. Moreover, their prominent advantages for genetic therapies promise that the coming years will be most exciting.

BIBLIOGRAPHY

- Abramson, C.S., Kersey, J.H. and LeBien, T.W. (1981) A monoclonal antibody (BA-1) reactive with cells of human B lymphocyte lineage. *J. Immunol.*, **126**, 83-88.
- Alcorn, M.J., Holyoake, T.L., Richmond, L., Pearson, C., Farrell, E., Kyle, B., Dunlop, D.J., Fitzsimons, E., Steward, W.P., Pragnell, I.B. and Franklin, I.M. (1996) CD34-positive cells isolated from cryopreserved peripheral-blood progenitor cells can be expanded *ex vivo* and used for transplantation with little or no toxicity. *J. Clin. Oncol.*, **14**, 1839-1847.
- Alyea, E., Soiffer, R., Murray, C., Bartett-Pandite, L., Collins, H., Pickett, C., Wang, Y., Chartier, S., Anderson, K. and Ritz, J. (1995) Adoptive immunotherapy following allogeneic bone marrow transplantation with donor lymphocytes depleted of CD8+ T cells. *Blood*, **85** Suppl. 1, 1158-1150.
- Anderson, K.C., Soiffer, R., DeLage, R., Takvorian, T., Freedman, A.S., Rabinowe, S.L., Nadler, L.M., Dear, K., Hefflin, L. and Mauch, P. (1990) T-cell-depleted autologous bone marrow transplantation therapy: analysis of immune deficiency and late complications. *Blood*, **76**, 235-244.
- Anderson, K.C., Andersen, J., Soiffer, R., Freedman, A.S., Rabinowe, S.N., Robertson, M.J., Spector, N., Blake, K., Murray, C. and Freeman, A. (1993) Monoclonal antibody-purged bone marrow transplantation therapy for multiple myeloma. *Blood*, **82**, 2568-2576.
- Anderson, K.C. (1995) Who benefits from high-dose therapy for multiple myeloma? *J. Clin. Oncol.*, **13**, 1291-1296.
- Andrews, R.G., Singer, J.W. and Bernstein, I.D. (1986) Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood*, **67**, 842-845.
- Andrews, R.G., Singer, J.W. and Bernstein, I.D. (1989) Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J. Exp. Med.*, **169**, 1721-1731.
- Arbour, S., Toupin, S., Belanger, R., Gyger, M., Halle, J.P., Perreault, C. and Roy, D.C. (1996) Phenotypic and functional characterization of peripheral blood and bone marrow natural killer cells prior to autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, **17**, 315-322.
- Arseniev, L., Tischler, H.J., Batumer, K., Sudmeier, I., Casper, J. and Link, H. (1994) Treatment of poor marrow graft function with allogeneic CD34+ cells immunoselected from G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells of the marrow donor. *Bone Marrow Transplant.*, **14**, 791-797.
- Auditore-Hargreaves, K., Heimfeld, S. and Berenson, R.J. (1994) Selection and transplantation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Bioconjugate Chemistry*, **5**, 287-300.
- Ball, E.D., Mills, L.E., Coughlin, C.T., Beck, J.R. and Cornwell, G.G. (1986) Autologous bone marrow transplantation in acute myelogenous leukemia: *in vitro* treatment with myeloid cell-specific monoclonal antibodies. *Blood*, **68**, 1311-1315.
- Ball, E.D., Mills, L.E., Cornwell, G.G., Davis, B.H., Coughlin, C.T., Howell, A.L., Stukel, T.A., Dain, B.J., McMillan, R., Spruce, W., Miller, W.E. and Thompson, L. (1990a) Autologous bone

- marrow transplantation for acute myeloid leukemia using monoclonal antibody-purged bone marrow. *Blood*, **75**, 1199-1206.
- Ball, E.D., Vredenburgh, J.J., Mills, L.E., Cornwell, G.G., Schwarz, L., Howell, A.L. and Troy, K. (1990b) Autologous bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia following *in vitro* treatment with neuraminidase and monoclonal antibodies. *Bone Marrow Transplant.*, **6**, 277-280.
- Ball, E.D., Schwarz, L.M. and Bloomfield, C.D. (1991) Expression of the CD15 antigen on normal and leukemic myeloid cells: effects of neuraminidase and variable detection with a panel of monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.*, **28**, 951-958.
- Ball, E.D. and Howell, A.L. (1988) Monoclonal antibodies to carbohydrate antigens in autologous bone marrow transplantation. *J. Cell. Biochem.*, **36**, 445-452.
- Bar, B.M., Schattenberg, A., Mensink, E.J., Geurts Van Kessel, A., Smetsers, T.F., Knops, G.H., Linders, E.H. and de Witte, T. (1993) Donor leukocyte infusions for chronic myeloid leukemia relapsed after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.*, **11**, 513-519.
- Barnett, M.J., Eaves, C.J., Phillips, G.L., Gascoyne, R.D., Hogge, D.E., Horsman, D.E., Humphries, R.K., Klingemann, H.G., Lansdorp, P.M. and Nantel, S.H. (1994) Autografting with cultured marrow in chronic myeloid leukemia: results of a pilot study. *Blood*, **84**, 724-732.
- Bassan, R., Cortelazzo, S., Rambaldi, A., Cornelli, P., Borleri, G., Bellavita, P., Biondi, A. and Barbui, T. (1995) Autologous PBSC transplant for late onset AML after mafosfamide-purged and TBI-containing autologous BMT. *Bone Marrow Transplant*, **15**, 791-793.
- Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.M. and Peault, B. (1992) Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2804-2808.
- Beaujean, F., Bernaudin, F., Kuentz, M., Lemerle, S., Cordonnier, C., Le Forestier, C., Reinert, P., Duedari, N., Brandely, M. and Vernant, J.P. (1995) Successful engraftment after autologous transplantation of 10-day cultured bone marrow activated by interleukin 2 in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*, **15**, 691-696.
- Bender, J.G., Unverzagt, K.L., Walker, D.E., Lee, W., Van Epps, D.E., Smith, D.H., Stewart, C.C. and To, L.B. (1991) Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood*, **77**, 2591-2596.
- Bensinger, W., Appelbaum, F., Rowley, S., Storb, R., Sanders, J., Lilleby, K., Gooley, T., Demirer, T., Schiffman, K. and Weaver, C. (1995) Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J. Clin. Oncol.*, **13**, 2547-2555.
- Bensinger, W.I., Rowley, S., Appelbaum, F.R., Mils, B., Oldham, F., Chauncey, T. and Buckner, C.D. (1995a) CD34 selected allogeneic peripheral blood stem cell (PBSC) transplantation in older patients with advanced hematologic malignancies. *Blood*, **86** (Suppl. 1), 97a.
- Bensinger, W.I., Weaver, C.H., Appelbaum, F.R., Rowley, S., Demirer, T., Sanders, J., Storb, R. and Buckner, C.D. (1995b) Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, **85**, 1655-1658.
- Berenson, R.J., Bensinger, W.I. and Kalamasz, D. (1986) Positive selection of viable cell populations using avidin-biotin immunoadsorption. *J. Imm. Meth.*, **91**, 11-19.
- Berenson, R.J., Andrews, R.G., Bensinger, W.I., Kalamasz, D., Knitter, G., Buckner, C.D. and Bernstein, I.D. (1988) Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J. Clin. Invest.*, **81**, 951-955.
- Berenson, R.J., Bensinger, W.I., Hill, R.S., Andrews, R.G., Garcia-Lopez, J., Kalamasz, D.F., Still, B.J., Spitzer, G., Buckner, C.D., Bernstein, I.D. and Thomas, E.D. (1991) Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood*, **77**, 1717-1722.
- Bernstein, I.D., Leary, A.G., Andrews, R.G. and Ogawa, M. (1991) Blast colony-forming cells and precursors of colony-forming cells detectable in long-term marrow culture express the same phenotype (CD33- CD34+). *Exp. Hematol.*, **19**, 680-682.
- Bertolini, F., Battaglia, M., Pedrazzoli, P., Daprada, G.A., Lanza, A., Soligo, D., Caneva, L., Sarina, B., Murphy, S., Thomas, T. and Dellacuna, G.R. (1997a) Megakaryocytic progenitors can be generated *ex vivo* and safely administered to autologous peripheral blood progenitor cell transplant recipients. *Blood*, **89**, 2679-2688.
- Bertolini, F., Thomas, T., Battaglia, M., Gibelli, N., Pedrazzoli, P. and Dellacuna, G.R. (1997b) A new two step procedure for 4.5 log depletion of T and B cells in allogeneic transplantation and of neoplastic cells in autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **19**, 615-619.

- Beverley, P.C., Linch, D. and Delia, D. (1980) Isolation of human haematopoietic progenitor cells using monoclonal antibodies. *Nature*, **287**, 332-333.
- Bishop, M.R., Warkentin, P.I., Jackson, J.D., Bayever, E., Iversen, P.L., Whalen, V.I., Lastovica, J., Haines, K. and Kessinger, A. (1994) Antisense oligonucleotide OL (1) p53 for *in vitro* purging of autologous bone marrow in acute myelogenous leukemia. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **389**, 183-187.
- Blakey, D.C. and Thorpe, P.E. (1988) An overview of therapy with immunotoxins containing ricin or its A chain. *Antibody Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals*, **1**, 1-16.
- Bohbot, A., Lioure, B., Faradji, A., Schmitt, M., Cuillerot, J.M., Laplace, A. and Oberling, F. (1996) Positive selection of CD34(+) cells from cryopreserved peripheral blood stem cells after thawing - technical aspects and clinical use. *Bone Marrow Transplant*, **17**, 259-264.
- Borowitz, M.J., Gockerman, J.P., Moore, J.O., Civin, C.I., Page, S.O., Robertson, J. and Bigner, S.H. (1989) Clinicopathologic and cytogenetic features of CD34 (My 10)-positive acute nonlymphocytic leukemia. *American Journal of Clinical Pathology*, **91**, 265-270.
- Bortin, M.M., Rimm, A.A., Saltzstein, E.C. and Rodey, G.E. (1973) Graft versus leukemia. 3. Apparent independent antihost and antileukemia activity of transplanted immunocompetent cells. *Transplantation*, **16**, 182-188.
- Bortin, M.M., Truitt, R.L., Rimm, A.A. and Bach, F.H. (1979) Graft-versus-leukaemia reactivity induced by alloimmunisation without augmentation of graft-versus-host reactivity. *Nature*, **281**, 490-491.
- Brenner, M.K., Rill, D.R., Holladay, M.S., Heslop, H.E., Moen, R.C., Buschle, M., Krance, R.A., Santana, V.M., Anderson, W.F. and Ihle, J.N. (1993) Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet*, **342**, 1134-1137.
- Brown, J., Greaves, M.F. and Molgaard, H.V. (1991) The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *International Immunology*, **3**, 175-184.
- Brugger, W., Mocklin, W., Heimfeld, S., Berenson, R.J., Mertelsmann, R. and Kanz, L. (1993) *Ex vivo* expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood*, **81**, 2579-2584.
- Brugger, W., Bross, K.J., Glatt, M., Weber, F., Mertelsmann, R. and Kanz, L. (1994a) Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood*, **83**, 636.
- Brugger, W., Henschler, R., Heimfeld, S., Berenson, R.J., Mertelsmann, R. and Kanz, L. (1994b) Positively selected autologous blood CD34+ cells and unseparated peripheral blood progenitor cells mediate identical hematopoietic engraftment after high-dose VP16, ifosfamide, carboplatin, and epirubicin. *Blood*, **84**, 1421-1426.
- Brugger, W., Heimfeld, S., Berenson, R.J., Mertelsmann, R. and Kanz, L. (1995) Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated *ex vivo*. *N. Engl. J. Med.*, **333**, 283-287.
- Cahn, J.Y., Bordigoni, P., Souillet, G., Pico, J.L., Plouvier, E., Reiffers, J., Benz-Lemoine, E., Bergerat, J.P., Lutz, P. and Colombat, P. (1991) The TAM regimen prior to allogeneic and autologous bone marrow transplantation for high-risk acute lymphoblastic leukemias: a cooperative study of 62 patients. *Bone Marrow Transplant*, **7**, 1-4.
- Cardoso, A.A., Li, M.L., Batard, P., Sansilvestri, P., Hatzfeld, A., Levesque, J.P., Lebkowski, J.S. and Hatzfeld, J. (1993) Human umbilical cord blood CD34+ cell purification with high yield of early progenitors. *Journal of Hematotherapy*, **2**, 275-279.
- Cardoso, A.A., Watt, S.M., Batard, P., Li, M.L., Hatzfeld, A., Genevier, H. and Hatzfeld, J. (1995) An improved panning technique for the selection of CD34+ human bone marrow hematopoietic cells with high recovery of early progenitors. *Exp. Hematol.*, **23**, 407-412.
- Carella, A.M., Chimirri, F., Podesta, M., Pitto, A., Piaggio, G., Dejana, A., Lerma, E., Pollicardo, N., Vassallo, F., Soracco, M., Benvenuto, F., Valbonesi, M., Carlier, P., Vimercati, R., Prencipe, E., Gatti, A.M., Ferrara, R.A., Incagliato, M., Florio, G. and Frassoni, F. (1996) High-dose chemoradiotherapy followed by autologous Philadelphia chromosome-negative blood progenitor cell transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant*, **17**, 201-205.

- Carey, P.J., Proctor, S.J., Taylor, P. and Hamilton, P.J. (1991) Autologous bone marrow transplantation for high-grade lymphoid malignancy using melphalan/irradiation conditioning without marrow purging or cryopreservation. The Northern Regional Bone Marrow Transplant Group. *Blood*, **77**, 1593-1598.
- Casellas, P., Canat, X., Fauser, A.A., Gros, O., Laurent, G., Poncelet, P. and Jansen, F.K. (1985) Optimal elimination of leukemic T cells from human bone marrow with T101-ricin A-chain immunotoxin. *Blood*, **65**, 289-297.
- Cesano, A., Pierson, G., Visonneau, S., Migliaccio, A.R. and Santoli, D. (1996) Use of a lethally irradiated major histocompatibility complex nonrestricted cytotoxic T-cell line for effective purging of marrows containing lysis-sensitive or -resistant leukemic targets. *Blood*, **87**, 393-403.
- Champlin, R., Ho, W., Gajewski, J., Feig, S., Burnison, M., Holley, G., Greenberg, P., Lee, K., Schmid, I. and Giorgi, J. (1990) Selective depletion of CD8+ T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, **76**, 418-423.
- Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F. and Shaper, J.H. (1984) Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.*, **133**, 157-165.
- Civin, C.I. (1989) Reducing the cost of the cure in childhood leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **321**, 185-187.
- Civin, C.I. and Loken, M.R. (1987) Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. *Int. J. Cell Cloning*, **5**, 267-288.
- Colombat, P., Gorin, N.C., Lemonnier, M.P., Binet, C., Laporte, J.P., Douay, L., Desbois, I., Lopez, M., Lamagnere, J.P. and Najman, A. (1990) The role of autologous bone marrow transplantation in 46 adult patients with non-Hodgkin's lymphomas. *J. Clin. Oncol.*, **8**, 630-637.
- Copelan, E.A. and McGuire, E.A. (1995) The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*, **85**, 1151-1168.
- Cornetta, K., Gharpure, V., Hromas, R., Abonour, R., Broun, E.R., Cox, E., Wyman, N., Menke, C., Baute, J., Mills, B., Oldham, F. and Srour, E.F. (1995) Sibling-matched allogeneic bone marrow transplantation using CD34 cells obtained by immunomagnetic bead separation. *Blood*, **86** (Suppl. 1), 389a.
- David, S., Rice, A., Vianes, I., Duperray, V., Dupouy, M. and Reiffers, J. (1995) Expansion of blood CD34 positive cells - committed precursors expansion does not affect immature hematopoietic progenitors. *Nouvelle Revue Francaise d'Hematologie*, **37**, 343-349.
- De Bruyn, C., Delforge, A., Bron, D., Bernier, M., Massy, M., Ley, P., de Hemptinne, D. and Stryckmans, P. (1995) Comparison of the coexpression of CD38, CD33 and HLA-DR antigens on CD34+ purified cells from human cord blood and bone marrow. *Stem Cells*, **13**, 281-288.
- De Fabritiis, P., Ferrero, D., Sandrelli, A., Tarella, C., Meloni, G., Pulsoni, A., Pregno, P., Badoni, R., De Felice, L., Gallo, E., Amadori, S., Mandelli, F. and Pileri, A. (1989) Monoclonal antibody purging and autologous bone marrow transplantation in acute myelogenous leukemia in complete remission. *Bone Marrow Transplant*, **4**, 669-674.
- Dewynter, E.A., Coutinho, L.H., Pei, X., Marsh, J.C.W., Hows, J., Luft, T. and Testa, N.G. (1995) Comparison of purity and enrichment of CD34(+) cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. *Stem Cells*, **13**, 524-532.
- Dicke, K.A., Zander, A., Spitzer, G., Verma, D.S., Peters, L., Vellekoop, L., McCredie, K.B. and Hester, J. (1979) Autologous bone-marrow transplantation in relapsed adult acute leukaemia. *Lancet*, **1**, 514-517.
- Dimopoulos, M.A., Alexanian, R., Przepiorka, D., Hester, J., Andersson, B., Giral, S., Mehra, R., van Besien, K., Delasalle, K.B., Reading, C., Deisseroth, A.B. and Champlin, R.E. (1993) Thiotepa, busulfan, and cyclophosphamide: a new preparative regimen for autologous marrow or blood stem cell transplantation in high-risk multiple myeloma. *Blood*, **82**, 2324-2328.
- Doney, K., Buckner, C.D., Fisher, L., Petersen, F.B., Sanders, J., Appelbaum, F.R., Anasetti, C., Badger, C., Bensinger, W. and Deeg, H.J. (1993) Autologous bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*, **12**, 315-321.
- Douay, L., Mary, J.Y., Giarratana, M.C., Najman, A. and Gorin, N.C. (1989) Establishment of a reliable experimental procedure for bone marrow purging with mafosfamide (ASTA Z 7557). *Exp. Hematol.*, **17**, 429-432.

- Douay, L., Hu, C., Giarratana, M.C., Bouchet, S., Conlon, J., Capizzi, R.L. and Gorin, N.C. (1995) Amifostine improves the antileukemic therapeutic index of mafosfamide: implications for bone marrow purging. *Blood*, **86**, 2849-2855.
- Dreger, P., Marquardt, P., Haferlach, T., Jacobs, S., Mulverstedt, T., Eckstein, V., Suttorp, M., Loffler, H., Muller-Ruchholz, W. and Schmitz, N. (1993) Effective mobilisation of peripheral blood progenitor cells with 'Dexa-BEAM' and G-CSF: timing of harvesting and composition of the leukapheresis product. *British Journal of Cancer*, **68**, 950-957.
- Dreger, P., Viehmann, K., Steinmann, J., Eckstein, V., Muller-Ruchholz, W., Loffler, H. and Schmitz, N. (1995a) G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation: comparison of T cell depletion strategies using different CD34+ selection systems or CAMPATH-1. *Exp. Hematol.*, **23**, 147-154.
- Dreger, P., Vonneuhoff, N., Suttorp, M., Loffler, H. and Schmitz, N. (1995b) Rapid engraftment of peripheral blood progenitor cell grafts purged with B cell-specific monoclonal antibodies and immunomagnetic beads. *Bone Marrow Transplant*, **16**, 627-629.
- Einat, M., Lishner, M., Amiel, A., Nagler, A., Yarkorli, S., Rudi, A., Kashman, Y., Markel, D. and Fabian, I. (1995) Eilatin - a novel marine alkaloid inhibits *in vitro* proliferation of progenitor cells in chronic myeloid leukemia patients. *Exp. Hematol.*, **23**, 1439-1444.
- Elliott, C., Samson, D.M., Armitage, S., Lyttelton, M.P., McGuigan, D., Hargreaves, R., Giles, C., Abrahamson, G., Abboudi, Z., Brennan, M. and Kanfer, E.J. (1996) When to harvest peripheral-blood stem cells after mobilization therapy: prediction of CD34-positive cell yield by preceding day CD34-positive concentration in peripheral blood. *J. Clin. Oncol.*, **14**, 970-973.
- Elwood, N.J., Zogos, H., Willson, T. and Begley, C.G. (1996) Retroviral transduction of human progenitor cells: use of granulocyte colony-stimulating factor plus stem cell factor to mobilize progenitor cells *in vivo* and stimulation by flt3/flk-2 ligand *in vitro*. *Blood*, **88**, 4452-4462.
- Ericson, S.G., Colby, E., Welch, L. and Ball, E.D. (1992) Engraftment of leukocyte subsets following autologous bone marrow transplantation in acute myeloid leukemia using anti-myeloid (CD14 and CD15) monoclonal antibody-purged bone marrow. *Bone Marrow Transplant*, **9**, 129-137.
- Estrov, Z., Grunberger, T., Dube, I.D., Wang, Y.P. and Freedman, M.H. (1986) Detection of residual acute lymphoblastic leukemia cells in cultures of bone marrow obtained during remission. *N. Engl. J. Med.*, **315**, 538-542.
- Fiere, D., Lepage, E., Sebban, C., Boucheix, C., Gisselbrecht, C., Vernant, J.P., Varet, B., Broustet, A., Cahn, J.Y., Rigal-Huguet, F., Witz, F., Michaux, J.-L., Michallet, M. and Reiffers, J. (1993) Adult acute lymphoblastic leukemia: a multicentric randomized trial testing bone marrow transplantation as postremission therapy. *J. Clin. Oncol.*, **11**, 1990-2001.
- Filipovich, A.H., Vallera, D., McClave, P., Polich, D., Gaji-Peczalska, K., Haake, R., Lasky, L., Blazar, B., Ramsay, N.K. and Kersey, J. (1990) T cell depletion with anti-CD5 immunotoxin in histocompatible bone marrow transplantation. The correlation between residual CD5 negative T cells and subsequent graft-versus-host disease. *Transplantation*, **50**, 410-415.
- Fina, L., Molgaard, H.V., Robertson, D., Bradley, N.J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D.R., Baker, M.A. and Greaves, M.F. (1990) Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, **75**, 2417-2426.
- Fitch, J.H., Foon, K.A. and Cline, M.J. (1981) The antigenic characteristics of hematopoietic stem cells. *N. Engl. J. Med.*, **305**, 17-25.
- Foa, R., Migone, N., Francia di Celle, P., Fierro, M.T., Tassinari, A., Lo Coco, F., Casorati, G. and Gavosto, F. (1989) Ontogeny, gene rearrangements and immunophenotype of acute leukaemias. *Bone Marrow Transplant*, **4** (Suppl. 1), 66-69.
- Forman, S.J., O'Donnell, M.R., Nademanee, A.P., Snyder, D.S., Bierman, P.J., Schmidt, G.M., Fahey, J.L., Stein, A.S., Parker, P.M. and Blume, K.G. (1987) Bone marrow transplantation for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **70**, 587-588.
- Freedman, A.S., Griffin, J.D. and Nadler, L.M. (1988) Leukemias and the Ontogeny of Leukocytes. *Diagnostic Immunopathology* (ed. by R.B. Colvin, A.K. Bhan and R.T. McCluskey), p.245. Raven Press, New York.
- Freedman, A.S., Takvorian, T., Anderson, K.C., Mauch, P., Rabinowe, S.N., Blake, K., Yeap, B., Soiffer, R., Coral, F., Heflin, L., Ritz, J. and Nadler, L.M. (1990) Autologous bone marrow

- transplantation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: very low treatment-related mortality in 100 patients in sensitive relapse. *J. Clin. Oncol.*, **8**, 784-791.
- Freedman, A.S., Ritz, J., Neuberg, D., Anderson, K.C., Rabinowe, S.N., Mauch, P., Takvorian, T., Soiffer, R., Blake, K. and Yeap, B. (1991) Autologous bone marrow transplantation in 69 patients with a history of low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, **77**, 2524-2529.
- Freedman, A.S. (1996) Cell surface antigens in leukemias and lymphomas. *Cancer Invest.*, **14**, 252-276.
- Freeman, S.D., Kelm, S., Barber, E.K. and Crocker, P.R. (1995) Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. *Blood*, **85**, 2005-2012.
- Gabbianelli, M., Pelosi, E., Montesoro, E., Valtieri, M., Luchetti, L., Samoggia, P., Vitelli, L., Barberi, T., Testa, U., Lyman, S. *et al.* (1995) Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood*, **86**, 1661-1670.
- Gao, I.K., Noga, S.J., Wagner, J.E., Cremona, C.A., Davis, J. and Donnenberg, A.D. (1987) Implementation of a semiclosed large scale counterflow centrifugal elutriation system. *Journal of Clinical Apheresis*, **3**, 154-160.
- Gee, A.P. and Boyle, M.D. (1988) Purging tumor cells from bone marrow by use of antibody and complement: a critical appraisal. *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 154-159.
- Geller, R.B., Zahurak, M., Hurwitz, C.A., Burke, P.J., Karp, J.E., Piantadosi, S. and Civin, C.I. (1990) Prognostic importance of immunophenotyping in adults with acute myelocytic leukaemia: the significance of the stem-cell glycoprotein CD34 (My10). *Br. J. Haematol.*, **76**, 340-347.
- Ghetie, V., Engert, A., Schnell, R. and Vitetta, E.S. (1995) The *in vivo* anti-tumor activity of immunotoxins containing two versus one deglycosylated ricin A chains. *Cancer Lett.*, **98**, 97-101.
- Gianni, A.M., Siena, S., Bregni, M., Tarella, C., Stern, A.C., Pileri, A. and Bonadonna, G. (1989) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haemopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet*, **2**, 580-585.
- Giarratana, M.C., Gorin, N.C. and Douay, L. (1995) Plasma interacts with mafosfamide toxicity to normal haematopoietic progenitor cells: impact on *in vitro* marrow purging. *Nouvelle Revue Francaise d'Hematologie*, **37**, 125-130.
- Gilmore, M.J., Hamon, M.D., Prentice, H.G., Katz, F., Slaper-Cortenbach, I.C., Hunter, A.E., Gandhi, L., Brenner, M.K., Hoffbrand, A.V. and Mehta, A.B. (1991) Failure of purged autologous bone marrow transplantation in high risk acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission. *Bone Marrow Transplant*, **8**, 19-26.
- Giralt, S., Hester, J., Huh, Y., Hirsch-Ginsberg, C., Rondon, G., Guo, J., Lee, M., Gajewski, J., Talpaz, M., Kantarjian, H., Fischer, H., Deisseroth, A. and Champlin, R. (1994) CD8+ depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: graft vs leukemia without graft vs host disease. *Blood*, **84** (Suppl. 1), 538a.
- Glorieux, P., Bouffet, E., Philip, I., Biron, P., Holzapfel, L., Floret, D., Bouvier, R., Vitrey, D., Pinkerton, R. and Brunat-Mentigny, M. (1986) Metastatic interstitial pneumonitis after autologous bone marrow transplantation. A consequence of reinjection of malignant cells? *Cancer*, **58**, 2136-2139.
- Goldman, J.M., Th'ng, K.H. and Park, D.S. (1978) Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukaemia in transformation. *Br. J. Haematol.*, **40**, 185-195.
- Goldman, J.M., Gale, R.P., Horowitz, M.M., Biggs, J.C., Champlin, R.E., Gluckman, E., Hoffmann, R.G., Jacobsen, S.J., Marmont, A.M. and McGlave, P.B. (1988) Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann. Intern. Med.*, **108**, 806-814.
- Gore, S.D., Kastan, M.B. and Civin, C.I. (1991) Normal human bone marrow precursors that express terminal deoxynucleotidyl transferase include T-cell precursors and possible lymphoid stem cells. *Blood*, **77**, 1681-1690.
- Gorin, N.C., Aegerter, P. and Auvvert, B. (1989) Autologous bone marrow transplantation for acute leukemia in remission: an analysis of 1322 cases. *Bone Marrow Transplant*, **4** (Suppl. 2), 3-5.
- Gorin, N.C., Aegerter, P., Auvvert, B., Meloni, G., Goldstone, A.H., Burnett, A., Carella, A., Korbling, M., Herve, P., Maraninchi, D., Lowenberg, R., Verdonck, L., dePlanque, M., Hermans, J., Helbig, W.,

- Porcellini, A., Rizzoli, V., Alessandrino, E.P., Franklin, I.M., Reiffers, J., Colleselli, P. and Goldman, J.M. (1990) Autologous bone marrow transplantation for acute myelocytic leukemia in first remission: a European survey of the role of marrow purging. *Blood*, **75**, 1606-1614.
- Gorin, N.C., Lopez, M., Laporte, J.P., Quittet, P., Lesage, S., Lemoine, F., Berenson, R.J., Isnard, F., Grande, M. and Stachowiak, J. (1995) Preparation and successful engraftment of purified CD34+ bone marrow progenitor cells in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, **85**, 1647-1654.
- Graham-Pole, J., Gee, A., Emerson, S., Gallo, J., Lee, C., Luzins, J., Janssen, W.E., Pick, T., Worthington-White, D. and Elfenbein, G. (1991) Myeloablative chemoradiotherapy and autologous bone marrow infusions for treatment of neuroblastoma: factors influencing engraftment. *Blood*, **78**, 1607-1614.
- Gratwohl, A., Hermans, J., Niederwieser, D., Frassoni, F., Arcese, W., Gahrton, G., Bandini, G., Carreras, E., Vernant, J.P. and Bosi, A. (1993) Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: long-term results. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **12**, 509-516.
- Gribben, J.G., Freedman A.S., Woo, S.D., Blake, K., Shu, R.S., Freeman, G., Longtine, J.A., Pinkus, G.S. and Nadler, L.M. (1991a) All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 have residual cells containing the bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood*, **78**, 3275-3280.
- Gribben, J.G., Freedman, A.S., Neuberger, D., Roy, D.C., Blake, K.W., Woo, S.D., Grossbard, M.L., Rabinowe, S.N., Coral, F., Freeman, G.J., Ritz, J. and Nadler, L.M. (1991b) Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, **325**, 1525-1533.
- Griffin, J.D., Ritz, J., Nadler, L.M. and Schlossman, S.F. (1981) Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells. *J. Clin. Invest.*, **68**, 932-941.
- Griffin, J.D., Larcom, P. and Schlossman, S.F. (1983a) Use of surface markers to identify a subset of acute myelomonocytic leukemia cells with progenitor cell properties. *Blood*, **62**, 1300-1303.
- Griffin, J.D., Mayer, R.J., Weinstein, H.J., Rosenthal, D.S., Coral, F.S., Beveridge, R.P. and Schlossman, S.F. (1983b) Surface marker analysis of acute myeloblastic leukemia: identification of differentiation-associated phenotypes. *Blood*, **62**, 557-563.
- Griffin, J.D., Linch, D., Sabbath, K., Larcom, P. and Schlossman, S.F. (1984) A monoclonal antibody reactive with normal and leukemic human myeloid progenitor cells. *Leukemia Research*, **8**, 521-534.
- Griffin, J.D., Davis, R., Nelson, D.A., Davey, F.R., Mayer, R.J., Schiffer, C., McIntyre, O.R. and Bloomfield, C.D. (1986) Use of surface marker analysis to predict outcome of adult acute myeloblastic leukemia. *Blood*, **68**, 1232-1241.
- Griffin, J.D. (1987) The use of monoclonal antibodies in the characterization of myeloid leukemias. *Hematologic Pathology*, **1**, 81-91.
- Griffin, J.D. and Lowenberg, B. (1986) Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood*, **68**, 1185-1195.
- Grossbard, M.L., Gribben, J.G., Freedman, A.S., Lambert, J.M., Kinsella, J., Rabinowe, S.N., Eliseo, L., Taylor, J.A., Blattler, W.A. and Epstein, C.L. (1993a) Adjuvant immunotoxin therapy with anti-B4-blocked ricin after autologous bone marrow transplantation for patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, **81**, 2263-2271.
- Grossbard, M.L., Lambert, J.M., Goldmacher, V.S., Spector, N.L., Kinsella, J., Eliseo, L., Coral, F., Taylor, J.A., Blattler, W.A., Epstein, C.L. and Nadler, L.M. (1993b) Anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of 7-day continuous infusion in patients with B-cell neoplasms. *J. Clin. Oncol.*, **11**, 726-737.
- Guillaume, T., D'Hondt, V. and Symann, M. (1993) IL-3 and peripheral blood stem cell harvesting. *Stem Cells*, **11**, 173-181.
- Gulati, S., Yahalom, J., Acaba, L., Reich, L., Motzer, R., Crown, J., Toia, M., Igarashi, T., Lemoli, R. and Hanninen, E. (1992) Treatment of patients with relapsed and resistant non-Hodgkin's lymphoma using total body irradiation, etoposide, and cyclophosphamide and autologous bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.*, **10**, 936-941.
- Guyotat, D., Campos, L., Thomas, X., Vila, L., Shi, Z.H., Charrin, C., Gentilhomme, O. and Fiere, D. (1990) Myelodysplastic syndromes: a study of surface markers and *in vitro* growth patterns. *Am. J. Hematol.*, **34**, 26-31.

- Haas, R., Mohle, R., Fruhauf, S., Goldschmidt, H., Witt, B., Flentje, M., Wannemacher, M. and Hunstein, W. (1994) Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood*, **83**, 3787-3794.
- Haas, R., Witt, B., Mohle, R., Goldschmidt, H., Hohaus, S., Fruhauf, S., Wannemacher, M. and Hunstein, W. (1995) Sustained long-term hematopoiesis after myeloablative therapy with peripheral blood progenitor cell support. *Blood*, **85**, 3754-3761.
- Hale, G. and Waldmann, H. (1994) Control of graft-versus-host disease and graft rejection by T cell depletion of donor and recipient with Campath-1 antibodies. Results of matched sibling transplants for malignant diseases. *Bone Marrow Transplant*, **13**, 597-611.
- Hansen, M., Yacob, D., Schaeffer, A., Jain, R., Guha, M. and Deans, R. (1995) A comparison of expansion potential and phenotype of cultured CD34+ cells released from immunomagnetic beads by chymopapain or a peptide epitope release reagent. *Blood*, **86** (Suppl. 1), 666a.
- Hardwick, R.A., Kulcinski, D., Mansour, V., Ishizawa, L., Law, P. and Gee, A.P. (1992) Design of large-scale separation systems for positive and negative immunomagnetic selection of cells using superparamagnetic microspheres. *Journal of Hematotherapy*, **1**, 379-386.
- Haylock, D.N., To, L.B., Dowse, T.L., Juttner, C.A. and Simmons, P.J. (1992) *Ex vivo* expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage. *Blood*, **80**, 1405-1412.
- Haynes, A., Hunter, A., McQuaker, G., Anderson, S., Bienz, N. and Russell, N.H. (1995) Engraftment characteristics of peripheral blood stem cells mobilised with cyclophosphamide and the delayed addition of G-CSF. *Bone Marrow Transplant*, **16**, 359-363.
- Henslee, P.J., Thompson, J.S., Romond, E.H., Doukas, M.A., Metcalfe, M., Marshall, M.E. and MacDonald, J.S. (1987) T cell depletion of HLA and haploidentical marrow reduces graft-versus-host disease but it may impair a graft-versus-leukemia effect. *Transplantation Proceedings*, **19**, 2701-2706.
- Hessner, M.J., Endean, D.J., Casper, J.T., Horowitz, M.M., Keever-Taylor, C.A., Roth, M., Flomenberg, N. and Drobyski, W.R. (1995) Use of unrelated marrow grafts compensates for reduced graft-versus-leukemia reactivity after T-cell-depleted allogeneic marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, **86**, 3987-3996.
- Hetu, F., Coutlee, F. and Roy, D.C. (1994) A non-isotopic nested polymerase chain reaction method to quantitate minimal residual disease in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Mol. Cell Probes*, **8**, 449-457.
- Hirao, A., Kawano, Y., Takaue, Y., Suzue, T., Abe, T., Sato, J., Saito, S., Okamoto, Y., Makimoto, A., Kawahito, M. and Kuroda, Y. (1994) Engraftment potential of peripheral and cord blood stem cells evaluated by a long-term culture system. *Exp. Hematol.*, **22**, 521-526.
- Holyoake, T.L., Alcorn, M.J., Richmond, L.J., Freshney, M.G., Pearson, C., Fitzsimons, E., Steward, W.P., Dunlop, D.J. and Pragnell, I.B. (1994) Efficient isolation of human CD34 positive hemopoietic progenitor cells by immune panning. *Stem Cells*, **12**, 114-124.
- Howell, A.L., Fogg-Leach, M., Davis, B.H. and Ball, E.D. (1989) Continuous infusion of complement by an automated cell processor enhances cytotoxicity of monoclonal antibody sensitized leukemia cells. *Bone Marrow Transplant*, **4**, 317-322.
- Huang, S. and Terstappen, L.W. (1992) Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature*, **360**, 745-749.
- Huang, S. and Terstappen, L.W. (1994) Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells. *Blood*, **83**, 1515-1526.
- Hudson, A.M., Makrynika, V., Kabral, A. and Bradstock, K.F. (1989) Immunophenotypic analysis of clonogenic cells in acute lymphoblastic leukemia using an *in vitro* colony assay. *Blood*, **74**, 2112-2120.
- Humblet, Y., Lefebvre, P., Jacques, J.L., Bosly, A., Feyens, A.M., Sekhvat, M., Agaliotis, D. and Symann, M. (1988) Concentration of bone marrow progenitor cells by separation on a Percoll gradient using the Haemonetics model 30. *Bone Marrow Transplant*, **3**, 63-67.
- Imrie, K., Dicke, K.A. and Keating, A. (1996) Autologous bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia. *Stem Cells*, **14**, 69-78.
- Jamieson, C., Richter, A. and Levy, J.G. (1993) Efficacy of benzoporphyrin derivative, a photosensitizer, in selective destruction of leukemia cells using a murine tumor model. *Exp. Hematol.*, **21**, 629-634.

- Janosy, G., Campana, D., Burnett, A., Coustan-Smith, E., Timms, A., Bekassy, A.N., Hann, I., Alcorn, M.J., Totterman, T. and Simonsson, B. (1988) Autologous bone marrow transplantation in acute lymphoblastic leukemia—preclinical immunologic studies. *Leukemia*, **2**, 485–495.
- Jazwiec, B., Mahon, F.X., Pigneux, A., Pigeonnier, V. and Reiffers, J. (1995) 5-Fluorouracil-resistant CD34(+) cell population from peripheral blood of CML patients contains bcr-abl-negative progenitor cells. *Exp. Hematol.*, **23**, 1509–1514.
- Johnson, F.L. and Goldman, S. (1993) Role of autotransplantation in neuroblastoma. *Hematol. Oncol. Clinics of N. America*, **7**, 647–662.
- Johnson, P.W., Price, C.G., Smith, T., Cotter, F.E., Meerabux, J., Rohatiner, A.Z., Young, B.D. and Lister, T.A. (1994) Detection of cells bearing the t(14;18) translocation following myeloablative treatment and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, **12**, 798–805.
- Jones, R.J., Celano, P., Sharkis, S.J. and Sensenbrenner, L.L. (1989) Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice. *Blood*, **73**, 397–401.
- Jones, R.J., Wagner, J.E., Celano, P., Zicha, M.S. and Sharkis, S.J. (1990) Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature*, **347**, 188–189.
- Jonsson, O.G., Kitchens, R.L., Scott, F.C. and Smith, R.G. (1990) Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin hypervariable region specific oligonucleotide probes. *Blood*, **76**, 2072–2079.
- Juneja, H.S., Harvey, W.H., Brasher, W.K. and Thompson, E.B. (1995) Successful *in vitro* purging of leukemic blasts from marrow by cortivazol, a pyrazolosteroid: a preclinical study for autologous transplantation in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*, **9**, 1771–1778.
- Katz, F.E., Tindle, R., Sutherland, D.R. and Greaves, M.F. (1985) Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. *Leuk. Res.*, **9**, 191–198.
- Katz, F.E., Watt, S.M., Martin, H., Lam, G., Capellaro, D., Goldman, J.M. and Greaves, M.F. (1986) Co-ordinate expression of BI.3C5 and HLA-DR antigens on haemopoietic progenitors from chronic myeloid leukaemia. *Leuk. Res.*, **10**, 961–971.
- Kemshead, J.T. (1991) The immunomagnetic manipulation of bone marrow. *Bone marrow processing and purging* (ed. by A.P. Gee), p. 293. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kersey, J.H., LeBien, T.W., Abramson, C.S., Newman, R., Sutherland, R. and Greaves, M. (1981) P-24: a human leukemia-associated and lymphohemopoietic progenitor cell surface structure identified with monoclonal antibody. *J. Exp. Med.*, **153**, 726–731.
- Kersey, J.H., Weisdorf, D., Nesbit, M.E., LeBien, T.W., Woods, W.G., McGlave, P.B., Kim, T., Vallera, D.A., Goldman, A.I., Bostrom, B., Hurd, D. and Ramsay, N.K.C. (1987) Comparison of autologous and allogeneic bone marrow transplantation for treatment of high-risk refractory acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **317**, 461–467.
- Kessinger, A., Armitage, J.O., Landmark, J.D. and Weisenburger, D.D. (1986) Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp. Hematol.*, **14**, 192–196.
- Khoury, I.F., Keating, M.J., Vriesendorp, H.M., Reading, C.L., Przepiorka, D., Huh, Y.O., Andersson, B.S., van Besien, K.W., Mehra, R.C., Giralt, S.A., Ippoliti, C., Marshall, M., Thomas, M.W., O'Brien, S., Robertson, L.E., Deisseroth, A.B. and Champlin, R.E. (1994) Autologous and allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia: preliminary results. *J. Clin. Oncol.*, **12**, 748–758.
- Kolb, H.J., Mittermuller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M. and Wilmanns, W. (1990) Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*, **76**, 2462–2465.
- Kolb, H.J., Schattenberg, A., Goldman, J.M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieser, D. *et al.* (1995) Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*, **86**, 2041–2050.
- Korbling, M., Burke, P., Braine, H., Elflein, G., Santos, B.W. and Kaizer, H. (1981) Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exp. Hematol.*, **9**, 684–690.

- Korbling, M., Hunstein, W., Fliedner, T.M., Cayeux, S., Dorken, B., Fehrentz, D., Haas, R., Ho, A.D., Keilholz, U., Knauf, W., Konig, A., Mende, U., Pezzutto, A., von Reumont, J., Wolf, G.K., Wannenmacher, M., zum Winkel, K. and Rother, K. (1989) Disease-free survival after autologous bone marrow transplantation in patients with acute myelogenous leukemia. *Blood*, **74**, 1898-1904.
- Korbling, M., Drach, J., Champlin, R.E., Engel, H., Huynh, L., Kleine, H.D., Berenson, R., Deisseroth, A.B. and Andreeff, M. (1994) Large-scale preparation of highly purified, frozen/thawed CD34+, HLA-DR- hematopoietic progenitor cells by sequential immunoadsorption (CEPRATE SC) and fluorescence-activated cell sorting: implications for gene transduction and/or transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **13**, 649-654.
- Korbling, M. (1995) Blood stem cell transplantation and gene therapy of cancer. *Stem Cells*, **13**, 106-113.
- Korbling, M., Huh, Y.O., Durett, A., Mirza, N., Miller, P., Engel, H., Anderlini, P., van Besien, K., Andreeff, M. and Przepiorka, D. (1995) Allogeneic blood stem cell transplantation: peripheralization and yield of donor-derived primitive hematopoietic progenitor cells (CD34+ Thy-1dim) and lymphoid subsets, and possible predictors of engraftment and graft-versus-host disease. *Blood*, **86**, 2842-2848.
- Kotasek, D., Shepherd, K.M., Sage, R.E., Dale, B.M., Norman, J.E., Charles, P., Gregg, A., Pillow, A. and Bolton, A. (1992) Factors affecting blood stem cell collections following high-dose cyclophosphamide mobilization in lymphoma, myeloma and solid tumors. *Bone Marrow Transplant*, **9**, 11-17.
- Krause, D.S., Ito, T., Fackler, M.J., Smith, O.M., Collector, M.I., Sharkis, S.J. and May, W.S. (1994) Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, **84**, 691-701.
- Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I. and May, W.S. (1996) CD34 - Structure, biology, and clinical utility. *Blood*, **87**, 1-13.
- Kvalheim, G., Sorensen, O., Fodstad, O., Funderud, S., Kiesel, S., Dorken, B., Nustad, K., Jakobsen, E., Ugelstad, J. and Pihl, A. (1988) Immunomagnetic removal of B-lymphoma cells from human bone marrow: a procedure for clinical use. *Bone Marrow Transplant*, **3**, 31-41.
- Kvalheim, G., Fjeld, J.G., Pihl, A., Funderud, S., Ugelstad, J., Fodstad, O. and Nustad, K. (1989) Immunomagnetic removal of B-lymphoma cells using a novel mono-sized magnetizable polymer bead, M-280, in conjunction with primary IgM and IgG antibodies. *Bone Marrow Transplant*, **4**, 567-574.
- Ladenstein, R., Lasset, C., Hartmann, O., Klingebiel, T., Bouffet, E., Gadner, H., Paolucci, P., Burdach, S., Chauvin, F. and Pinkerton, R. (1994) Comparison of auto versus allografting as consolidation of primary treatments in advanced neuroblastoma over one year of age at diagnosis: report from the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **14**, 37-46.
- Lamb, L., Metherell, J., Lee, C., Brouillette, M., Thompson, J., Brown, S., Henslee-Downey, P.J. and Gee, A. (1994) Development of an immunomagnetic separation procedure to deplete V alpha beta-positive T cells from marrow for use in partially mismatched related donor (PMRD) transplantation. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **389**, 541-550.
- Lambert, J.M., Goldmacher, V.S., Collinson, A.R., Nadler, L.M. and Blattler, W.A. (1991a) An immunotoxin prepared with blocked ricin: a natural plant toxin adapted for therapeutic use. *Cancer Research*, **51**, 6236-6242.
- Lambert, J.M., McIntyre, G., Gauthier, M.N., Zullo, D., Rao, V., Steeves, R.M., Goldmacher, V.S. and Blattler, W.A. (1991b) The galactose-binding sites of the cytotoxic lectin ricin can be chemically blocked in high yield with reactive ligands prepared by chemical modification of glycopeptides containing triantennary N-linked oligosaccharides. *Biochemistry*, **30**, 3234-3247.
- Lane, T.A., Law, P., Maruyama, M., Young, D., Burgess, J., Mullen, M., Mealiffe, M., Terstappen, L.W., Hardwick, A. and Moubayed, M. (1995) Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood*, **85**, 275-282.
- Lange, B., Ferrero, D., Pessano, S., Palumbo, A., Faust, J., Meo, P. and Rovera, G. (1984) Surface phenotype of clonogenic cells in acute myeloid leukemia defined by monoclonal antibodies. *Blood*, **64**, 693-700.

- Lapointe, C., Forest, L., Lussier, P., Busque, L., Lagace, F., Perreault, C., Roy, D.C. and Gyger, M. (1996) Sequential analysis of early hematopoietic reconstitution following allogeneic bone marrow transplantation with fluorescence in situ hybridization (FISH). *Bone Marrow Transplant*, **17**, 1143-1148.
- Lasky, L.C. (1991) Peripheral blood stem cell collection and use. *Cellular and humoral immunotherapy and apheresis* (ed. by R.A. Sacher, D.B. Brubaker, D.O. Kasprisin and L.J. McCarthy), p.73. American Association of Blood Banks, Arlington.
- Lasky, L.C. and Zanjani, E.D. (1985) Size and density characterization of human committed and multipotent hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.*, **13**, 680-684.
- Lazzaro, G.E., Meyer, B.F., Willis, J.I., Erber, W.N., Herrmann, R.P. and Davies, J.M. (1995) The synthesis of a peanut agglutinin-ricin A chain conjugate-Potential as an *in vitro* purging agent for autologous bone marrow in multiple myeloma. *Exp. Hematol.*, **23**, 1347-1352.
- Leary, A.G. and Ogawa, M. (1987) Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. *Blood*, **69**, 953-956.
- Lebkowski, J.S., Schain, L.R., Okrongly, D., Levinsky, R., Harvey, M.J. and Okarma, T.B. (1992) Rapid isolation of human CD34 hematopoietic stem cells-purging of human tumor cells. *Transplantation*, **53**, 1011-1019.
- Léonard, B.M., Héту, F., Busque, L., Gyger, M., Bélanger, R., Perreault, C. and Roy, D.C. (1998) Lymphoma Cell Burden in Progenitor Cell Grafts Measured by Competitive Polymerase Chain Reaction: Less Than One Log Difference Between Bone Marrow and Peripheral Blood Sources. *Blood*, **91**, 331-339.
- Lemoli, R.M., Gobbi, M., Tazzari, P.L., Grassi, G., Dinota, A., Gherlinzoni, F., Mazza, P. and Tura, S. (1988) Avidin-biotin immunoadsorption for *ex vivo* bone marrow purging: effect of percentage of target cells and flow rate. *Haematologica*, **73**, 183-185.
- Lemoli, R.M., Gobbi, M., Tazzari, P.L., Tassi, T.C., Dinota, A., Visani, G., Grassi, G., Mazza, P., Cavo, M. and Tura, S. (1989) Bone marrow purging for multiple myeloma by avidin-biotin immunoadsorption. *Transplantation*, **47**, 385-387.
- Lemoli, R.M., Gasparetto, C., Scheinberg, D.A., Moore, M.A., Clarkson, B.D. and Gulati, S.C. (1991) Autologous bone marrow transplantation in acute myelogenous leukemia: *in vitro* treatment with myeloid-specific monoclonal antibodies and drugs in combination. *Blood*, **77**, 1829-1836.
- Lemoli, R.M., Fortuna, A., Motta, M.R., Rizzi, S., Giudice, V., Nannetti, A., Martinelli, G., Cavo, M., Amabile, M., Mangianti, S., Fogli, M., Conte, R. and Tura, S. (1996) Concomitant mobilization of plasma cells and hematopoietic progenitors into peripheral blood of multiple myeloma patients-positive selection and transplantation of enriched CD34(+) cells to remove circulating tumor cells. *Blood*, **87**, 1625-1634.
- Lill, M.C., Lynch, M., Fraser, J.K., Chung, G.Y., Schiller, G., Glaspy, J.A., Souza, L., Baldwin, G.C. and Gasson, J.C. (1994) Production of functional myeloid cells from CD34-selected hematopoietic progenitor cells using a clinically relevant *ex vivo* expansion system. *Stem Cells*, **12**, 626-637.
- Link, H., Arseniev, L., Bahre, O., Berenson, R.J., Battmer, K., Kadar, J.G., Jacobs, R., Casper, J., Kuhl, J. and Schubert, J. (1995) Combined transplantation of allogeneic bone marrow and CD34+ blood cells. *Blood*, **86**, 2500-2508.
- Loken, M.R., Shah, V.O., Dattilio, K.L. and Civin, C.I. (1987) Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood*, **69**, 255-263.
- Lowenberg, B., Verdonck, L.J., Dekker, A.W., Willemze, R., Zwaan, F.E., de Planque, M., Abels, J., Sonneveld, P., van der Lelie, J., Goudsmit, R., van Putten, W.L.J., Sizoo, W., Hagenbeek, A. and de Gast, G.C. (1990) Autologous bone marrow transplantation in acute myeloid leukemia in first remission: results of a Dutch prospective study. *J. Clin. Oncol.*, **8**, 287-294.
- Macintyre, E.A., Belanger, C., Debert, C., Canioni, D., Turhan, A.G., Azagury, M., Hermine, O., Varet, B., Flandrin, G. and Schmitt, C. (1995) Detection of clonal CD34(+)19(+) progenitors in bone marrow of bcl-2-IgH-positive follicular lymphoma patients. *Blood*, **86**, 4691-4698.
- Mackinnon, S., Papadopoulos, P., Carabasi, M.H., Reich, L. et al. (1995) Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia following bone marrow transplantation: Separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood*, **86**, 1261-1268.

- Mahe, B., Menard, A., Accard, F., Pineau, D., Robillard, N. and Hermouet, S. (1995) *In vitro* expansion of CD34+ cells from peripheral blood of myeloma and lymphoma patients. *Nouvelle Revue Francaise d'Hematologie*, **37**, 335-341.
- Marsh, J.C., Sutherland, D.R., Davidson, J., Mellors, A. and Keating, A. (1992) Retention of progenitor cell function in CD34+ cells purified using a novel O-sialoglycoprotease. *Leukemia*, **6**, 926-934.
- Martin, H., Atta, J., Zumpe, P., Eder, M., Elsner, S., Rode, C., Wassmann, B., Bruecher, J. and Hoelzer, D. (1995) Purging of peripheral blood stem cells yields bcr-abl-negative autografts in patients with bcr-abl-positive acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Hematol.*, **23**, 1612-1618.
- Martin, P.J. (1987) T cell purging with antibody - the Seattle experience. *Bone Marrow Transplant*, **2** (Suppl. 2), 53-57.
- Martin, P.J. (1990) The role of donor lymphoid cells in allogeneic marrow engraftment. *Bone Marrow Transplant*, **6**, 283-289.
- Martin, P.J. (1992) Animal experimentation relevant to human marrow transplantation. *Current Opinion in Oncology*, **4**, 239-246.
- Massumoto, C., Benyunes, M.C., Sale, G., Beauchamp, M., York, A., Thompson, J.A., Buckner, C.D. and Fefer, A. (1996) Close simulation of graft-versus-host disease by interleukin-2 administered after autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancy. *Bone Marrow Transplant*, **17**, 351-356.
- Matthay, K.K., Atkinson, J.B., Stram, D.O., Selch, M., Reynolds, C.P. and Seeger, R.C. (1993) Patterns of relapse after autologous purged bone marrow transplantation for neuroblastoma: a Childrens Cancer Group pilot study. *J. Clin. Oncol.*, **11**, 2226-2233.
- Matthay, K.K., Seeger, R.C., Reynolds, C.P., Stram, D.O., O'Leary, M.C., Harris, R.E., Selch, M., Atkinson, J.B., Haase, G.M. and Ramsay, N.K. (1994) Allogeneic versus autologous purged bone marrow transplantation for neuroblastoma: a report from the Childrens Cancer Group. *J. Clin. Oncol.*, **12**, 2382-2389.
- Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., Garcia Marco, J., Houlihan, A., Que, T.H. and Catovsky, D. (1994) The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, **8**, 1640-1645.
- McCann, J.C., Kanteti, R., Shilepsky, B., Miller, K.B., Sweet, M. and Schenkein, D.P. (1996) High degree of occult tumor contamination in bone marrow and peripheral blood stem cells of patients undergoing autologous transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Biol. Blood and Marrow Transplant*, **2**, 37-43.
- McGlave, P.B., Arthur, D., Miller, W.J., Lasky, L. and Kersey, J. (1990) Autologous transplantation for CML using marrow treated *ex vivo* with recombinant human interferon gamma. *Bone Marrow Transplant*, **6**, 115-120.
- McGlave, P.B., De Fabritiis, P., Deisseroth, A., Goldman, J., Barnett, M., Reiffers, J., Simonsson, B., Carella, A. and Aeppli, D. (1994) Autologous transplants for chronic myelogenous leukaemia: results from eight transplant groups. *Lancet*, **343**, 1486-1488.
- Meijerink, J.P., Smetsers, T.F., Raemaekers, J.M., Bogman, M.J., de Witte, T. and Mensink, E.J. (1993) Quantitation of follicular non-Hodgkin's lymphoma cells carrying t(14;18) by competitive polymerase chain reaction. *Br. J. Haematol.*, **84**, 250-256.
- Min, W., Kim, D., Lee, J., Park, J. and Kim, C. (1994) Autologous bone marrow rescue for patients with acute myelogenous leukemia: purging with hyperthermia and ether lipid *in vitro*. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **389**, 197-203.
- Mitsuyasu, R.T., Champlin, R.E., Gale, R.P., Ho, W.G., Lenarsky, C., Winston, D., Selch, M., Elashoff, R., Giorgi, J.V., Wells, J., Terasaki, P., Billing, R. and Feig, S. (1986) Treatment of donor bone marrow with monoclonal anti-T-cell antibody and complement for the prevention of graft-versus-host disease. A prospective, randomized, double-blind trial. *Ann. Intern. Med.*, **105**, 20-26.
- Morishima, Y., Miyamura, K., Kojima, S., Ueda, R., Morishita, Y., Sao, H., Tanimoto, M., Ohno, R., Sobue, R. and Hirano, M. (1993) Autologous BMT in high risk patients with CALLA-positive ALL: possible efficacy of *ex vivo* marrow leukemia cell purging with monoclonal antibodies and complement. *Bone Marrow Transplant*, **11**, 255-259.
- Moss, T.J., Reynolds, C.P., Sather, H.N., Romansky, S.G., Hammond, G.D. and Seeger, R.C. (1991) Prognostic value of immunocytologic detection of bone marrow metastases in neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.*, **324**, 219-226.

- Muench, M.O. and Moore, M.A. (1992) Accelerated recovery of peripheral blood cell counts in mice transplanted with *in vitro* cytokine-expanded hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.*, **20**, 611-618.
- Myers, D.E., Uckun, F.M., Ball, E.D. and Valleria, D.A. (1988) Immunotoxins for *ex vivo* marrow purging in autologous bone marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia. *Transplantation*, **46**, 240-245.
- Myklebust, A.T., Godal, A., Juell, S., Pharo, A. and Fodstad, O. (1994) Comparison of two antibody-based methods for elimination of breast cancer cells from human bone marrow. *Cancer Research*, **54**, 209-214.
- Nadler, L.M., Korsmeyer, S.J., Anderson, K.C., Boyd, A.W., Slaughenhoupt, B., Park, E., Jensen, J., Coral, F., Mayer, R.J. and Sallan, S.E. (1984) B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation. *J. Clin. Invest.*, **74**, 332-340.
- Naparstek, E., Or, R., Nagler, A., Cividali, G., Engelhard, D., Aker, M., Gimon, Z., Manny, N., Sacks, T., Tochner, Z., Weiss, L., Samuel, S., Brautbar, C., Hale, G., Waldmann, H., Steinberg, S.M. and Slaviv, S. (1995) T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukaemia using Campath-1 antibodies and post-transplant administration of donor's peripheral blood lymphocytes for prevention of relapse. *Br. J. Haematol.*, **89**, 506-515.
- Neame, P.B., Soamboonsrup, P., Browman, G.P., Meyer, R.M., Bengler, A., Wilson, W.E., Walker, I.R., Saeed, N. and McBride, J.A. (1986) Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB-immunologic classification of AML. *Blood*, **68**, 1355-1362.
- Negrin, R.S., Kusnierz-Glaz, C.R., Still, B.J., Schriber, J.R., Chao, N.J., Long, G.D., Hoyle, C., Hu, W.W., Horning, S.J. and Brown, B.W. (1995) Transplantation of enriched and purged peripheral blood progenitor cells from a single apheresis product in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, **85**, 3334-3341.
- Ngan, B.Y., Nourse, J. and Cleary, M.L. (1989) Detection of chromosomal translocation t(14;18) within the minor cluster region of bcl-2 by polymerase chain reaction and direct genomic sequencing of the enzymatically amplified DNA in follicular lymphomas. *Blood*, **73**, 1759-1762.
- Noga, S.J., Donnenberg, A.D., Schwartz, C.L., Strauss, L.C., Civin, C.I. and Santos, G.W. (1986) Development of a simplified counterflow centrifugation elutriation procedure for depletion of lymphocytes from human bone marrow. *Transplantation*, **41**, 220-229.
- Ogawa, M. (1993) Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, **81**, 2844-2853.
- Okarma, T.B. (1992) Stem cell selection for autologous bone marrow transplantation. *Seminars in Hematology*, **29**, 9-20.
- Pal, P., Zeng, H.L., Durocher, G., Girard, D., Li, T.C., Gupta, A.K., Giasson, R., Blanchard, L., Gaboury, L., Balassy, A., Turmel, C., Laperriere, A. and Villeneuve, L. (1996) Phototoxicity of some bromine-substituted rhodamine dyes-synthesis, photophysical properties and application as photosensitizers. *Photochemistry and Photobiology*, **63**, 161-168.
- Pan, L., Delmonte, J., Jr., Jalonon, C.K. and Ferrara, J.L. (1995) Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood*, **86**, 4422-4429.
- Perot, C., van den Akker, J., Laporte, J.P., Douay, L., Lopez, M., Stachowiak, J., Isnard, F., Taillemitte, J.L., Najman, A. and Gorin, N.C. (1993) Multiple chromosome abnormalities in patients with acute leukemia after autologous bone marrow transplantation using total body irradiation and marrow purged with mafosfamide. *Leukemia*, **7**, 509-515.
- Peters, S.O., Kittler, E.L., Ramshaw, H.S. and Quesenberry, P.J. (1996) *Ex vivo* expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (il-3), il-6, il-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood*, **87**, 30-37.
- Petersen, F.B., Appelbaum, F.R., Hill, R., Fisher, L.D., Bigelow, C.L., Sanders, J.E., Sullivan, K.M., Bensinger, W.I., Witherspoon, R.P., Storb, R., Clift, R.A., Fefer, A., Press, O.W., Weiden, P.L., Singer, J., Thomas, E.D. and Buckner, C.D. (1990) Autologous marrow transplantation for malignant lymphoma: a report of 101 cases from Seattle. *J. Clin. Oncol.*, **8**, 638-647.
- Pettengell, R., Morgenstern, G.R., Woll, P.J., Chang, J., Rowlands, M., Young, R., Radford, J.A., Scarffe, J.H., Testa, N.G. and Crowther, D. (1993) Peripheral blood progenitor cell transplantation in lymphoma and leukemia using a single apheresis. *Blood*, **82**, 3770-3777.

- Pettengell, R., Luft, T., Henschler, R., Hows, J.M., Dexter, T.M., Ryder, D. and Testa, N.G. (1994) Direct comparison by limiting dilution analysis of long-term culture-initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood, and blood stem cells. *Blood*, **84**, 3653-3659.
- Philip, I. and Favrot, M. (1988) [Cell cultures in Burkitt's lymphoma. Detection of residual disease and application to autologous graft purging]. [French]. *Pathologie Biologie*, **36**, 79-82.
- Philip, T., Armitage, J.O., Spitzer, G., Chauvin, F., Jagannath, S., Cahn, J.Y., Colombat, P., Goldstone, A.H., Gorin, N.C., Flesh, M., Laporte, J.P., Maraninchi, D., Pico, J., Bosly, A., Anderson, C., Schots, R., Biron, P., Cabanillas, F. and Dicke, K. (1987) High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate-grade or high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, **316**, 1493-1498.
- Philip, T., Guglielmi, C., Hagenbeek, A., Somers, R., Van der Lelie, H., Bron, D., Sonneveld, P., Gisselbrecht, C., Cahn, J.Y., Harousseau, J.L., Coiffier, B., Biron, P., Mandelli, F. and Chauvin, F. (1995) Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, **333**, 1540-1545.
- Pichert, G., Roy, D.C., Gonin, R., Alyea, E.P., Belanger, R., Gyger, M., Perreault, C., Bonny, Y., Lerra, I., Murray, C., Soiffer, R.J. and Ritz, J. (1995) Distinct patterns of minimal residual disease associated with graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Oncol.*, **13**, 1704-1713.
- Pollard, C.M., Powles, R.L., Millar, J.L., Shepherd, V., Milan, S., Lakhani, A., Zuiable, A., Treleaven, J. and Helenglass, G. (1986) Leukaemic relapse after Campath 1 treated bone marrow transplantation for leukaemia. *Lancet*, **2**, 1404.
- Porter, D.L., Roth, M.S., McGarigle, C., Ferrara, J.L. and Antin, J.H. (1994) Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **330**, 100-106.
- Preijers, F., Ruijs, P., Schattenberg, A. and de Witte, T. (1994) T-cell depletion from allogeneic bone marrow by counterflow centrifugation is not associated with a substantial loss of CD34-positive cells. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **389**, 339-344.
- Rabinowe, S.N., Soiffer, R.J., Gribben, J.G., Daley, H., Freedman, A.S., Daley, J., Pesek, K., Neuberger, D., Pinkus, G., Leavitt, P.R., Spector, N.A., Grossbard, M.L., Anderson, K., Robertson, M.J., Mauch, P., Chayt-Marcus, K., Ritz, J. and Nadler, L.M. (1993) Autologous and allogeneic bone marrow transplantation for poor prognosis patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, **82**, 1366-1376.
- Rasmussen, R.A., Counts, S.L., Daley, J.F. and Schlossman, S.F. (1994) Isolation and characterization of CD6-T cells from peripheral blood. *J. Immunol.*, **152**, 527-536.
- Reading, C.L., Thomas, M.W., Hickey, C.M., Chandran, M., Tindle, S., Ball, E.D., Poynton, C.H. and Dicke, K.A. (1987) Magnetic affinity colloid (MAC) cell separation of leukemia cells from autologous bone marrow aspirates. *Leukemia Research*, **11**, 1067-1077.
- Rill, D.R., Santana, V.M., Roberts, W.M., Nilson, T., Bowman, L.C., Krance, R.A., Heslop, H.E., Moen, R.C., Ihle, J.N. and Brenner, M.K. (1994) Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood*, **84**, 380-383.
- Ritz, J., Pesando, J.M., Notis-McConarty, J., Lazarus, H. and Schlossman, S.F. (1980) A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukaemia antigen. *Nature*, **283**, 583-585.
- Ritz, J., Ramsay, N.K. and Kersey, J.H. (1994) Autologous bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Bone marrow transplantation* (ed. by S.J. Forman, K.G. Blume and E.D. Thomas), p.731. Blackwell Scientific Publications, Boston.
- Rizzoli, V., Mangoni, L., Carella, A.M., Aglietta, M., Porcellini, A., Coleselli, P., Angrilli, F., Alessandrino, E.P., Madon, E., Locatelli, F., Mozzana, A., DeLaurenzi, A., Greco, M.M., Bernabei, P.A. and Tarella, C. (1989) Drug-mediated marrow purging: mafosfamide in adult acute leukemia in remission. The experience of the Italian study group. *Bone Marrow Transplant*, **4** (Suppl. 1), 190-194.
- Robertson, M.J., Roy, D.C., Stone, R.M. and Ritz, J. (1994) Use of CD33 monoclonal antibodies in bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **389**, 47-63.
- Rohatiner, A., Gelber, R., Schlossman, S.F. and Ritz, J. (1986) Depletion of T cells from human bone marrow using monoclonal antibodies and rabbit complement. A quantitative and functional analysis. *Transplantation*, **42**, 73-80.

- ohatiner, A. (1994) Myelodysplasia and acute myelogenous leukemia after myeloablative therapy with autologous stem-cell transplantation [editorial]. *J. Clin. Oncol.*, **12**, 2521-2523.
- Rosenfeld, C.S., Thiele, D.L., Shadduck, R.K., Zeigler, Z.R. and Schindler, J. (1995) *Ex vivo* purging of allogeneic marrow with L-Leucyl-L-leucine methyl ester. A phase I study. *Transplantation*, **60**, 678-683.
- Rosenzweig, M., Marks, D.F., Zhu, H., Hempel, D., Mansfield, K.G., Sehgal, P.K., Kalams, S., Scadden, D.T. and Johnson, R.P. (1996) *In vitro* T lymphopoiesis of human and rhesus CD34+ progenitor cells. *Blood*, **87**, 4040-4048.
- Ross, A.A., Cooper, B.W., Lazarus, H.M., Mackay, W. and Moss, T.J. (1992) Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood*, **10**, 936-941.
- Rowley, S.D., Jones, R.J., Piantadosi, S., Braine, H.G., Colvin, O.M., Davis, J., Saral, R., Sharkis, S., Wingard, J., Yeager, A.M. and Santos, G.W. (1989) Efficacy of *ex vivo* purging for autologous bone marrow transplantation in the treatment of acute nonlymphoblastic leukemia. *Blood*, **74**, 501-506.
- Rowley, S.D., Miller, C.B., Piantadosi, S., Davis, J.M., Santos, G.W. and Jones, R.J. (1991) Phase I study of combination drug purging for autologous bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.*, **9**, 2210-2218.
- Roy, D.C., Felix, M., Cannady, W.G., Cannistra, S. and Ritz, J. (1990a) Comparative activities of rabbit complements of different ages using an *in vitro* marrow purging model. *Leukemia Research*, **14**, 407-416.
- Roy, D.C., Tantravahi, R., Murray, C., Dear, K., Gorgone, B., Anderson, K.C., Freedman, A.S., Nadler, L.M. and Ritz, J. (1990b) Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: a stable equilibrium. *Blood*, **75**, 296-304.
- Roy, D.C., Griffin, J.D., Belvin, M., Blattler, W.A., Lambert, J.M. and Ritz, J. (1991) Anti-MY9-blocked-ricin: an immunotoxin for selective targeting of acute myeloid leukemia cells. *Blood*, **77**, 2404-2412.
- Roy, D.C., Bélanger, R., Perreault, C., Bonny, Y., Busque, L., Kassis, J., Guertin, M.J., Esseltine, D. and Gyger, M. (1995a) Autologous bone marrow transplantation for patients with non-Hodgkin's lymphoma using anti-B4-bR immunotoxin purging. *Proc. Fourth Internat. Symp. Immunotoxins.*, 158a.
- Roy, D.C., Perreault, C., Bélanger, R., Gyger, M., Le Houillier, C., Blattler, W.A., Lambert, J.M. and Ritz, J. (1995b) Elimination of B-lineage leukemia and lymphoma cells from bone marrow grafts using anti-B4-blocked-ricin immunotoxin. *J. Clin. Immunol.*, **15**, 51-57.
- Roy, D.C., Ouellet, S., Le Houillier, C., Ariniello, P.D., Perreault, C. and Lambert, J.M. (1996) Elimination of neuroblastoma and small cell lung cancer cells with an anti-neural cell adhesion molecule immunotoxin. *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 1136-1145.
- Ryan, D., Kossover, S., Mitchell, S., Frantz, C., Hennessy, L. and Cohen, H. (1986) Subpopulations of common acute lymphoblastic leukemia antigen-positive lymphoid cells in normal bone marrow identified by hematopoietic differentiation antigens. *Blood*, **68**, 417-425.
- Sabbath, K.D., Ball, E.D., Larcom, P., Davis, R.B. and Griffin, J.D. (1985) Heterogeneity of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *J. Clin. Invest.*, **75**, 746-753.
- Sallan, S.E., Niemeyer, C.M., Billett, A.L., Lipton, J.M., Tarbell, N.J., Gelber, R.D., Murray, C., Pittinger, T.P., Wolfe, L.C., Bast, R.C., Jr. and Ritz, J. (1989) Autologous bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, **7**, 1594-1601.
- Sankey, E.A., More, L. and Dhillon, A.P. (1990) QBEnd/10: a new immunostain for the routine diagnosis of Kaposi's sarcoma. *Journal of Pathology*, **161**, 267-271.
- Sausville, E.A., Headlee, D., Steider-Stevenson, M., Jaffe, E.S., Solomon, D., Figg, W.D., Herdt, J., Kopp, W.C., Rager, H. and Steinberg, S.M. (1995) Continuous infusion of the anti-CD22 immunotoxin IgG-RFB+SMPT-dgA in patients with B-cell lymphoma: a phase I study. *Blood*, **85**, 3457-3465.
- Scheffold, C., Brandt, K., Johnston, V., Lefterova, P., Degen, B., Schontube, M., Huhn, D., Neubauer, A. and Schmidt-Wolf, I.G. (1995) Potential of autologous immunologic effector cells for bone marrow purging in patients with chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*, **15**, 33-39.
- Schmid, H., Henze, G., Schwerdtfeger, R., Baumgarten, E., Besserer, A., Scheffler, A., Serke, S., Zingsem, J. and Siegert, W. (1993) Fractionated total body irradiation and high-dose VP-16 with

- purged autologous bone marrow rescue for children with high risk relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*, **12**, 597-602.
- Schmitz, N., Dreger, P., Sutorp, M., Rohwedder, E.B., Haferlach, T., Löffler, H., Hunter, A. and Russell, N.H. (1995) Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor). *Blood*, **85**, 1666-1672.
- Schroeder, H., Pinkerton, C.R., Powles, R.L., Meller, S.T., Tait, D., Milan, S. and McElwain, T.J. (1991) High dose melphalan and total body irradiation with autologous marrow rescue in childhood acute lymphoblastic leukaemia after relapse. *Bone Marrow Transplant*, **7**, 11-15.
- Schwartz, M.A., Lovett, D.R., Redner, A., Finn, R.D., Graham, M.C., Divgi, C.R., Dantis, L., Gee, T.S., Andreeff, M. and Old, L.J. (1993) Dose-escalation trial of M195 labeled with iodine 131 for cytoreduction and marrow ablation in relapsed or refractory myeloid leukemias. *J. Clin. Oncol.*, **11**, 294-303.
- Selvaggi, K.J., Wilson, J.W., Mills, L.E., Cornwell, G.G., Hurd, D., Dodge, W., Gingrich, R., Martin, S.E., McMillan, R., Miller, W. and Ball, E.D. (1994) Improved outcome for high-risk acute myeloid leukemia patients using autologous bone marrow transplantation and monoclonal antibody-purged bone marrow. *Blood*, **83**, 1698-1705.
- Shah, A.J., Smogorzewska, E.M., Hannum, C. and Crooks, G.M. (1996) Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow cd34+cd38- cells and maintains progenitor cells *in vitro*. *Blood*, **87**, 3563-3570.
- Shah, N.K., Wingard, J.R., Piantadosi, S., Rowley, S., Santos, G. and Griffin, C.A. (1993) Chromosome abnormalities in patients treated with 4-hydroperoxycyclophosphamide-purged autologous bone marrow transplantation. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **65**, 135-140.
- Shapiro, F., Pytowski, B., Rafii, S., Witte, L., Hicklin, D.J., Yao, T.J. and Moore, M.A.S. (1996) The effects of Flk-2/flt3 ligand as compared with c-kit ligand on short-term and long-term proliferation of CD34+ hematopoietic progenitors elicited from human fetal liver, umbilical cord blood, bone marrow, and mobilized peripheral blood. *Journal of Hematotherapy*, **5**, 655-662.
- Sharp, J.G., Joshi, S.S., Armitage, J.O., Bierman, P., Coccia, P.F., Harrington, D.S., Kessinger, A., Crouse, D.A., Mann, S.L. and Weisenburger, D.D. (1992) Significance of detection of occult non-Hodgkin's lymphoma in histologically uninvolved bone marrow by a culture technique. *Blood*, **79**, 1074-1080.
- Sharp, J.G., Kessinger, A., Mann, S., Crouse, D.A., Armitage, J.O., Bierman, P. and Weisenburger, D.D. (1996) Outcome of high-dose therapy and autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma based on the presence of tumor in the marrow or infused hematopoietic harvest. *J. Clin. Oncol.*, **14**, 214-219.
- Sheridan, W.P., Begley, C.G., Juttner, C.A., Szer, J., To, L.B., Maher, D., McGrath, K.M., Morstyn, G. and Fox, R.M. (1992) Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet*, **339**, 640-644.
- Shpall, E.J., Jones, R.B., Bearman, S.I., Franklin, W.A., Archer, P.G., Curiel, T., Bitter, M., Claman, H.N., Stemmer, S.M., Purdy, M., Myers, S.E., Hami, L., Taffs, S., Heimfeld, S., Hallagan, J. and Berenson, R.J. (1994) Transplantation of enriched CD34-positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: influence of CD34-positive peripheral-blood progenitors and growth factors on engraftment. *J. Clin. Oncol.*, **12**, 28-36.
- Siena, S., Bregni, M., Brando, B., Ravagnani, F., Bonadonna, G. and Gianni, A.M. (1989) Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, **74**, 1905-1914.
- Siena, S., Bregni, M., Brando, B., Belli, N., Ravagnani, F., Gandola, L., Stern, A.C., Lansdorp, P.M., Bonadonna, G. and Gianni, A.M. (1991) Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood*, **77**, 400-409.
- Siena, S., Bregni, M., Bonsi, L., Skjenar, I., Bagnara, G.P., Bonadonna, G. and Gianni, A.M. (1993) Increase in peripheral blood megakaryocyte progenitors following cancer therapy with high-dose cyclophosphamide and hematopoietic growth factors. *Exp. Hematol.*, **21**, 1583-1590.
- Silvestri, F., Banavali, S., Baccarani, M. and Preisler, H.D. (1992) The CD34 hemopoietic progenitor cell associated antigen: biology and clinical applications. *Haematologica*, **77**, 265-273.

- Simmons, D. and Seed, B. (1988) Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. *J. Immunol.*, **141**, 2797-2800.
- Simonsson, B., Burnett, A.K., Prentice, H.G., Hann, I.H., Brenner, M.K., Gibson, B., Grob, J.P., Lonnerholm, G., Morrison, A. and Smedmyr, B. (1989) Autologous bone marrow transplantation with monoclonal antibody purged marrow for high risk acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **3**, 631-636.
- Smith, S.L., Bender, J.G., Maples, P.B., Unverzagt, K., Schilling, M., Lum, L., Williams, S. and Van Epps, D.E. (1993) Expansion of neutrophil precursors and progenitors in suspension cultures of CD34+ cells enriched from human bone marrow. *Exp. Hematol.*, **21**, 870-877.
- Soiffer, R.J., Murray, C., Mauch, P., Anderson, K.C., Freedman, A.S., Rabinowe, S.N., Takvorian, T., Robertson, M.J., Spector, N. and Gonin, R. (1992) Prevention of graft-versus-host disease by selective depletion of CD6-positive T lymphocytes from donor bone marrow. *J. Clin. Oncol.*, **10**, 1191-1200.
- Soiffer, R.J., Roy, D.C., Gonin, R., Murray, C., Anderson, K.C., Freedman, A.S., Rabinowe, S.N., Robertson, M.J., Spector, N., Pesek, K., Mauch, P., Nadler, L.M. and Ritz, J. (1993) Monoclonal antibody-purged autologous bone marrow transplantation in adults with acute lymphoblastic leukemia at high risk of relapse. *Bone Marrow Transplant*, **12**, 243-251.
- Soiffer, R.J., Murray, C., Gonin, R. and Ritz, J. (1994) Effect of low-dose interleukin-2 on disease relapse after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, **84**, 964-971.
- Soiffer, R.J., Fairclough, D., Robertson, M., Alyea, E., Anderson, K., Freedman, A., Bartlett-pandite, L., Fisher, D., Schlossman, R.L., Stone, R., Murray, C., Freeman, A., Marcus, K., Mauch, P., Nadler, L. and Ritz, J. (1997) CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia in first complete remission. *Blood*, **89**, 3039-3047.
- Soligo, D., Delia, D., Oriani, A., Cattoretti, G., Orazi, A., Bertolli, V., Quirici, N. and Deliliers, G.L. (1991) Identification of CD34+ cells in normal and pathological bone marrow biopsies by QBEND10 monoclonal antibody. *Leukemia*, **5**, 1026-1030.
- Spangrude, G.J. (1991) Hematopoietic stem-cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.*, **3**, 171-178.
- Spencer, A., Szydlo, R.M., Brookes, P.A., Kaminski, E., Rule, S., van Rhee, F., Ward, K.N., Hale, G., Waldmann, H. and Hows, J.M. (1995) Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia with volunteer unrelated donors using *ex vivo* or *in vivo* T-cell depletion: major prognostic impact of HLA class I identity between donor and recipient. *Blood*, **86**, 3590-3597.
- Stahel, R.A., Mabry, M., Skarin, A.T., Speak, J. and Bernal, S.D. (1985) Detection of bone marrow metastasis in small-cell lung cancer by monoclonal antibody. *J. Clin. Oncol.*, **3**, 455-461.
- Stahel, R.A., Gilks, W.R. and Schenker, T. (1994) Antigens of lung cancer: results of the Third International Workshop on Lung Tumor and Differentiation Antigens. *J. Natl. Cancer Inst.*, **86**, 669-672.
- Stahel, R.A., Jost, L.M., Pichert, G. and Widmer, L. (1995) High-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation for malignant lymphomas. *Cancer Treat. Rev.*, **21**, 3-32.
- Stepan, D.E., Bartholomew, R.M. and LeBien, T.W. (1984) *In vitro* cytodestruction of human leukemic cells using murine monoclonal antibodies and human complement. *Blood*, **63**, 1120-1124.
- Stiff, P.J., Schulz, W.C., Bishop, M. and Marks, L. (1991) Anti-CD33 monoclonal antibody and etoposide/cytosine arabinoside combinations for the *ex vivo* purification of bone marrow in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood*, **77**, 355-362.
- Stong, R.C., Uckun, F., Youle, R.J., Kersey, J.H. and Valleria, D.A. (1985) Use of multiple T cell-directed intact ricin immunotoxins for autologous bone marrow transplantation. *Blood*, **66**, 627-635.
- Straka, C., Drexler, E., Mitterer, M., Langenmayer, I., Pfefferkorn, L., Stade, B., Koll, R. and Emmerich, B. (1995) Autotransplantation of B-cell purged peripheral blood progenitor cells in B-cell lymphoma. *Lancet*, **345**, 797-798.
- Strauss, L.C., Rowley, S.D., La Russa, V.F., Sharkis, S.J., Stuart, R.K. and Civin, C.I. (1986) Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.*, **14**, 878-886.
- Sutherland, D., Marsh, J., Davidson, J., Baker, M., Keating, A. and Mellors, A. (1992) Differential sensitivity of CD34 epitopes to cleavage by *Pasteurella haemolytica* glycoprotease: Implications for purification of CD34-positive progenitor cells. *Exp. Hematol.*, **20**, 590.

- Sutherland, D.R., Keating, A., Nayar, R., Anania, S. and Stewart, A.K. (1994) Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Exp. Hematol.*, **22**, 1003-1010.
- Takahashi, M., Maruyama, S., Moriyama, Y. and Shibata, A. (1992) Applicability of antimyeloid monoclonal antibodies (L4F3, 1G10) to autologous bone marrow transplantation for patients with acute myelogenous leukemia. *Transplantation Proceedings*, **24**, 416-418.
- Tari, A.M., Tucker, S.D., Deisseroth, A. and Lopez-Berestein, G. (1994) Liposomal delivery of methylphosphonate antisense oligodeoxynucleotides in chronic myelogenous leukemias. *Blood*, **84**, 601-607.
- Tavassoli, M., Konno, M., Shiota, Y., Omoto, E., Minguell, J.J. and Zanjani, E.D. (1991) Enhancement of the grafting efficiency of transplanted marrow cells by preincubation with interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, **77**, 1599-1606.
- Tecce, R., Fraioli, R., De Fabritiis, P., Sandrelli, A., Savarese, A., Santoro, L., Cuomo, M. and Natali, P.G. (1991) Production and characterization of two immunotoxins specific for M5b ANLL leukemia. *Int. J. Cancer.*, **49**, 310-316.
- Tjonnfjord, G.E., Steen, R., Evensen, S.A., Thorsby, E. and Egeland, T. (1994) Characterization of CD34+ peripheral blood cells from healthy adults mobilized by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, **84**, 2795-2801.
- To, L.B., Haylock, D.N., Dyson, P.G., Thorp, D., Roberts, M.M. and Juttner, C.A. (1990a) An unusual pattern of hemopoietic reconstitution in patients with acute myeloid leukemia transplanted with autologous recovery phase peripheral blood. *Bone Marrow Transplant*, **6**, 109-114.
- To, L.B., Shepperd, K.M., Haylock, D.N., Dyson, P.G., Charles, P., Thorp, D.L., Dale, B.M., Dart, G.W., Roberts, M.M., Sage, R.E. and Juttner, C.A. (1990b) Single high doses of cyclophosphamide enable the collection of high numbers of hemopoietic stem cells from the peripheral blood. *Exp. Hematol.*, **18**, 442-447.
- To, L.B., Roberts, M.M., Haylock, D.N., Dyson, P.G., Branford, A.L., Thorp, D., Ho, J.Q., Dart, G.W., Horvath, N., Davy, M.L., Olweny, C.L.M., Abdi, E. and Juttner, C.A. (1992) Comparison of haematological recovery times and supportive care requirements of autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplants, autologous bone marrow transplants and allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant*, **9**, 277-284.
- Traul, D.L., Anderson, G.S., Bilitz, J.M., Krieg, M. and Sieber, F. (1995) Potentiation of merocyanine 540-mediated photodynamic therapy by salicylate and related drugs. *Photochemistry and Photobiology*, **62**, 790-799.
- Truitt, R.L., Shih, C.Y., Lefever, A.V., Tempelis, L.D., Andreani, M. and Bortin, M.M. (1983) Characterization of alloimmunization-induced T lymphocytes reactive against AKR leukemia *in vitro* and correlation with graft-vs-leukemia activity *in vivo*. *J. Immunol.*, **131**, 2050-2058.
- Uchansak-Ziegler, B., Petrasch, S., Michel, J. and Ziegler, A. (1989) Characterization of the CD34-specific monoclonal antibody TUK3. *Tissue Antigens*, **33**, 230
- Uckun, F.M., Gajl-Peczalska, K., Meyers, D.E., Ramsay, N.C., Kersey, J.H., Colvin, M. and Vallera, D.A. (1987) Marrow purging in autologous bone marrow transplantation for T-lineage acute lymphoblastic leukemia: efficacy of *ex vivo* treatment with immunotoxins and 4-hydroperoxycyclophosphamide against fresh leukemic marrow progenitor cells. *Blood*, **69**, 361-366.
- Uckun, F.M., Kersey, J.H., Haake, R., Weisdorf, D. and Ramsay, N.K. (1992) Autologous bone marrow transplantation in high-risk remission B-lineage acute lymphoblastic leukemia using a cocktail of three monoclonal antibodies (BA-1/CD24, BA-2/CD9, and BA-3/CD10) plus complement and 4-hydroperoxycyclophosphamide for *ex vivo* bone marrow purging. *Blood*, **79**, 1094-1104.
- Uckun, F.M., Kersey, J.H., Haake, R., Weisdorf, D., Nesbit, M.E. and Ramsay, N.K. (1993) Pretransplantation burden of leukemic progenitor cells as a predictor of relapse after bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **329**, 1296-1301.
- Uckun, F.M. and Ledbetter, J.A. (1988) Immunobiologic differences between normal and leukemic human B-cell precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8603-8607.
- Uckun, F.M. and Reaman, G.H. (1995) Immunotoxins for treatment of leukemia and lymphoma. *Leuk. Lymphoma*, **18**, 195-201.
- Vaughan, W.P., Civin, C.L., Weisenburger, D.D., Karp, J.E., Graham, M.L., Sanger, W.G., Grierson, H.L., Joshi, S.S. and Burke, P.J. (1988) Acute leukemia expressing the normal human hematopoietic stem cell membrane glycoprotein CD34 (MY10). *Leukemia*, **2**, 661-666.

- Verfaillie, C.M., Miller, W.J., Boylan, K. and McGlave, P.B. (1992) Selection of benign primitive hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia on the basis of HLA-DR antigen expression. *Blood*, **79**, 1003-1010.
- Verfaillie, C.M. (1994) Can human hematopoietic stem cells be cultured ex vivo? *Stem Cells*, **12**, 466-476.
- Verfaillie, C.M., Bhatia, R., Miller, W., Mortari, F., Roy, V., Burger, S., McCullough, J., Stieglbauer, K., Dewald, G., Heimfeld, S., Miller, J.S. and McGlave, P.B. (1996) BCR/ABL-negative primitive progenitors suitable for transplantation can be selected from the marrow of most early-chronic phase but not accelerated-phase chronic myelogenous leukemia patients. *Blood*, **87**, 4770-4779.
- Verma, U.N., Bagg, A., Brown, E. and Mazumder, A. (1994) Interleukin-2 activation of human bone marrow in long-term cultures: an effective strategy for purging and generation of anti-tumor cytotoxic effectors. *Bone Marrow Transplant*, **13**, 115-123.
- Vescio, R.A., Hong, C.H., Cao, J., Kim, A., Schiller, G.J., Lichtenstein, A.K., Berenson, R.J. and Berenson, J.R. (1994) The hematopoietic stem cell antigen, CD34, is not expressed on the malignant cells in multiple myeloma. *Blood*, **84**, 3283-3290.
- Vitetta, E.S., Fulton, R.J., May, R.D., Till, M. and Uhr, J.W. (1987) Redesigning nature's poisons to create anti-tumor reagents. *Science*, **238**, 1098-1104.
- Voltarelli, J.C., Corpuz, S. and Martin, P.J. (1990) *In vitro* comparison of two methods of T cell depletion associated with different rates of graft failure after allogeneic marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **6**, 419-423.
- von Bueltingsloewen, A., Belanger, R., Perreault, C., Bonny, Y., Roy, D.C., Lalonde, Y., Boileau, J., Kassis, J., Lavallee, R., Lacombe, M. and Gyger, M. (1993) Acute graft-versus-host disease prophylaxis with methotrexate and cyclosporine after busulfan and cyclophosphamide in patients with hematologic malignancies. *Blood*, **81**, 849-855.
- Wagner, J.E., Santos, G.W., Noga, S.J., Rowley, S.D., Davis, J., Vogelsang, G.B., Farmer, E.R., Zehnbauser, B.A., Saral, R. and Donnenberg, A.D. (1990) Bone marrow graft engineering by counterflow centrifugal elutriation: results of a phase I-II clinical trial. *Blood*, **75**, 1370-1377.
- Wang, J.C., Beaugard, P., Soamboonsrup, P. and Neame, P.B. (1995) Monoclonal antibodies in the management of acute leukemia. *Am. J. Hematol.*, **50**, 188-199.
- Watt, S.M., Karhi, K., Ganer, K., Furley, A.J., Katz, F.E., Healy, L.E., Altass, L.J., Bradley, N.J., Sutherland, D.R. and Levinsky, R. (1987) Distribution and epitope analysis of the cell membrane glycoprotein (HPCA-1) associated with human hemopoietic progenitor cells. *Leukemia*, **1**, 417-426.
- Weaver, C.H., Hazelton, B., Birch, R., Palmer, P., Allen, C., Schwartzberg, L. and West, W. (1995) An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood*, **86**, 3961-3969.
- Widmer, L., Pichert, G., Jost, L.M. and Stahel, R.A. (1996) Fate of contaminating t(14; 18)+ lymphoma cells during *in vivo* expansion of CD34-selected hematopoietic progenitor cells. *Blood*, **88**, 3166-3175.
- Willems, P., Croockewit, A., Raymakers, R., Holdrinet, R., van Der Bosch, G., Huys, E. and Mensink, E. (1996) CD34 selections from myeloma peripheral blood cell autografts contain residual tumour cells due to impurity, not to CD34+ myeloma cells. *Br. J. Hematol.*, **93**, 613-622.
- Williams, S.F., Lee, W.J., Bender, J.G., Zimmerman, T., Swinney, P., Blake, M., Carreon, J., Schilling, M., Smith, S., Williams, D.E., Oldham, F. and Van Epps, D. (1996) Selection and expansion of peripheral blood CD34(+) cells in autologous stem cell transplantation for breast cancer. *Blood*, **87**, 1687-1691.
- Wognum, A.W., Krystal, G., Eaves, C.J., Eaves, A.C. and Lansdorp, P.M. (1992) Increased erythropoietin-receptor expression on CD34-positive bone marrow cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*, **79**, 642-649.
- Yamada, M., Wasserman, R., Lange, B., Reichard, B.A., Womer, R.B. and Rovera, G. (1990) Minimal residual disease in childhood B-lineage lymphoblastic leukemia. Persistence of leukemic cells during the first 18 months of treatment. *N. Engl. J. Med.*, **323**, 448-455.
- Yeager, A.M., Kaizer, H., Santos, G.W., Saral, R., Colvin, O.M., Stuart, R.K., Braine, H.G., Burke, P.J., Ambinder, R.F. and Burns, W.H. (1986) Autologous bone marrow transplantation in patients with

