HAL
open science

Stress oxydant et régulation des propriétés des cellules souches hématopoïétiques : implication des faibles doses d'irradiation et utilisation d'antioxydants pour la culture ex vivo en thérapie génique et cellulaire

Elia Henry

▶ **To cite this version:**

Elia Henry. Stress oxydant et régulation des propriétés des cellules souches hématopoïétiques : implication des faibles doses d'irradiation et utilisation d'antioxydants pour la culture ex vivo en thérapie génique et cellulaire. Hématologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7163 . tel-03274645

HAL Id: tel-03274645

https://theses.hal.science/tel-03274645v1

Submitted on 30 Jun 2021

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

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

Thèse de doctorat de l'Université de Paris

Spécialité Hématologie

Ecole doctorale n°561 « Hématologie, Oncogenèse et Biothérapies »

préparée dans l'unité

INSERM U1274 – Niche et Cancer dans l'Hématopoïèse
CEA – Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire
Universités de Paris & Paris-Saclay – UMR Stabilité Génétique, Cellules Souches et Radiations

---

Stress oxydant et régulation des propriétés des cellules souches hématopoïétiques

Implication des faibles doses d'irradiation et utilisation d'antioxydants pour la culture *ex vivo* en thérapie génique et cellulaire

---

Dirigée par Marie-Laure ARCANGELI

Présentée et soutenue publiquement

par **Elia HENRY**

le 26 novembre 2020

devant un jury composé de :

Pr Olivier KOSMIDER	Président	PU-PH	Université de Paris
Pr Christian CHABANNON	Rapporteur	PU-PH	Université Aix-Marseille
Dr Philippe BRUNET-DE-LA-GRANGE	Rapporteur	MR	Université de Bordeaux
Dr Emmanuelle SIX	Examinatrice	CR	Université de Paris
Pr Olivier HERAULT	Examinateur	PU-PH	Université de Tours
Dr Marie-Laure ARCANGELI	Directrice	CR	Université de Paris

Remerciements

A ceux qui m'ont guidée et qui ont cru en moi

Stairway to heaven – Led Zeppelin

Je tiens tout d'abord à remercier vivement mon jury. Merci à mes rapporteurs, Christian Chabannon et Philippe Brunet-de-la-Grange, d'avoir pris le temps de lire avec attention mon manuscrit, et pour tous leurs retours constructifs. Merci à mes examinateurs, Olivier Hérault et Emmanuelle Six, ainsi qu'au président de mon jury Olivier Kosmider, d'avoir accepté de faire le déplacement pour assister à ma soutenance. Merci également à Adlen Foudi, Anna Campalans et Marie-Clotilde Alves-Guerra d'avoir accepté de faire partie de mes comités de suivi de thèse. Vous m'avez permis de me poser les bonnes questions pour choisir les directions à faire prendre à mon projet.

Je voudrais adresser une pensée particulière à la Ligue Nationale Contre le Cancer et tous ses donateurs, qui ont financé ma bourse de thèse : merci d'avoir eu confiance en notre projet et de nous avoir donné les moyens de le réaliser.

Toute ma reconnaissance va à Françoise, qui m'a accueillie dans son laboratoire. Merci pour tes conseils scientifiques et rédactionnels toujours pertinents, pour la confiance que tu as eu en moi, pour tes encouragements et pour les moments de discussions (en particulier autour de spécialités culinaires !).

J'aimerais aussi remercier Paul-Henri Romeo : merci de m'avoir hébergée quelques temps dans votre institut et pour votre soutien et votre confiance. Encore désolée de ne pas avoir fait de 4ème année (peut-être est-il encore temps de déposer un dossier ?!).

Enfin, un immense merci à Marie-Laure, ma directrice de thèse. Même si on m'appelle toujours Piou-piou, j'ai beaucoup évolué depuis mon arrivée en stage de Master 2, et c'est principalement grâce à toi. Même si j'étais ta première thésarde, tu as su cumuler différentes casquettes : chef, quand il fallait m'aider à me recadrer ; mentor, la plupart du temps, merci pour tout ce que tu m'as appris et transmis (et pas seulement en hématologie !) ; et amie, souvent avec supplément nourriture (restos chez Oscar ou à la Quincaillerie, raclettes, pancakes et j'en passe) ! Merci vraiment pour tout.

A tous ceux qui ont partagé un bout de ma vie de tous les jours au labo

A nos héros du quotidien – Soprano

Merci à toi Laurent : je ne sais pas ce que j'aurais fait sans toi ! Merci pour ces longues heures partagées en salle de culture, les roulements devant le Canto, pour tes coups de main ponctuels et ton aide quotidienne sur à peu près tout et n'importe quoi au labo (hein factotum !) : fournitures, informatique, manips... Merci aussi pour les cafés quotidiens, tes goûters Lu que tu me fournissais toujours en cas de petit creux, pour tes « bon allez » de motivation, et pour ta gentillesse et ton amitié de manière générale.

Je voudrais remercier individuellement tous les membres présents et passés du LSHL. Ils m'ont chacun apporté des choses différentes au cours de ma thèse, et m'ont tous aidés à leur manière. Un

grand merci Rima, pour ton soutien et ton enthousiasme sans faille pour mes diverses expériences. Merci Guillaume pour ton aide et pour les moments papote en salle de culture. Merci Julien, pour tes conseils toujours pertinents et tes encouragements. Merci Irina, pour ta gentillesse. Merci Benjamin, pour ta bonne humeur et ton humour au quotidien. Gracias Verónica, lo siento hablo solo poco español, pero gracias por tu sonrisa y tu conversación. Merci à mes collègues thésards : Charly, pour tous les instants musique, les crises de rire quotidiennes, les discussions de remontage de moral, et désolée pour tous les soirs où j'essaie de te mettre dehors ; Alba, pour avoir été mon guide pendant mes premiers mois et pour ton optimisme à toute épreuve ; Lucine et Sara, pour avoir partagé avec moi les aléas de la thèse et m'avoir précédé dans les démarches administratives ; Merci Kaludia pour ta bonne humeur et bon courage pour ta thèse ! Merci aussi aux stagiaires que j'ai pu côtoyer ou encadrer et qui m'ont permis de mieux appréhender le rôle d'encadrante, notamment Edouard et Fatima : j'espère que je ne vous aurai pas traumatisés… Et bienvenue à Laura !

Un énorme merci à Vilma et Caroline pour votre aide précieuse sur l'expérimentation animale et votre disponibilité. Sans vous, j'aurais passé beaucoup plus d'heures à disséquer, prélever, injecter mes souris. Merci aussi pour votre bonne humeur sans faille et votre soutien, vous êtes des rayons de soleil !

Christophe, merci pour ta présence quotidienne et ta gentillesse. Tu as toujours eu le mot juste pour me remonter le moral et répondu présent pour m'aider et me conseiller. N'hésite pas à m'appeler quand tu iras chercher un petit labrador à la SPA !

Merci aux membres du LRTS, qui m'ont souvent vu débarquer à la recherche d'un anticorps, d'une boîte de cônes ou d'un partenaire de café. Merci pour votre gentillesse, votre aide au quotidien. Un merci particulier à Daniel, qui m'a beaucoup aidée notamment pour les microarrays Affymetrix ; et à Marion, Anaïs et Honorine, avec qui nous avons partagé nos joies, nos peines, nos agacements, nos longues heures devant les cytomètres et microscopes, et pour Marion la dure période de la rédaction : sans vous, ça n'aurait pas été pareil !

Je remercie chaudement toutes les plateformes qui nous permettent de travailler et aux personnes qui les gèrent. En particulier, j'ai passé beaucoup de temps pendant ma thèse à trier des cellules en cytométrie en flux. Un grand merci donc à la plateforme de cytométrie et en particulier à Nathalie Déchamps : merci d'avoir passé autant d'heures devant le trieur pour moi, et d'avoir rendu ça agréable par ta conversation ! Merci également à Véronique Ménard, qui se met toujours en quatre et avec le sourire pour nous aider avec la plateforme d'irradiation (même si ça implique d'aller à l'autre bout de la planète faire une dosimétrie impossible !). Enfin, merci au CIGEX et en particulier à Didier Busso et Guillaume Piton de m'avoir aidée pour le clonage et la production de mes lentivirus, toujours avec gentillesse et bienveillance, les résultats étaient top ! Merci également au personnel de Charles Rivers et d'Animalliance pour avoir pris soin de mes animaux.

Je salue au passage tous les étudiants en thèse de l'IRCM : il est indispensable de ne pas se sentir seul pendant son doctorat ! Merci pour les sorties au bar, la SLF et ses pizzas, le parc Astérix et les conversations Whatsapp !

Merci de manière générale à tous les chercheurs, ingénieurs, techniciens, post-docs et étudiants de l'iRCM, dont beaucoup m'auront aidée ponctuellement par un conseil, un tube de réactif pour faire un test, ou simplement un sourire et un mot gentil. Une pensée particulière pour Anna Campalans, sans qui les expériences de marquage 8-oxo-dG seraient encore à l'état de tests !

A ceux dont j'ai croisé la route

Fireflies – Owl city

Pendant ma thèse, j'ai eu l'occasion de sortir un peu de l'enceinte confinée du CEA de Fontenay-aux-Roses pour donner des cours à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris. Merci à Pascal Houzé, qui m'a accueillie avec bienveillance dans son unité d'enseignement. Je tiens à remercier les équipes d'enseignement avec qui j'ai travaillé, notamment l'équipe de Chimie-Physique : Mathieu Lazerges, Philippe Espeau, Yohann Corvis, Lyes, Monique et José. Merci de m'avoir invitée au repas de Noël ! Et l'équipe de Chimie Analytique : Annabelle Dugay, Nathalie Dembélé-Mahé, Béatrice Nicolaï, Ivo Rietveld, Anne Neudorffer, Antoine, Pauline, Judith, Lien, Minh, Oura et Tarik. Merci aussi à tous les étudiants que j'ai pu encadrer pendant cette période, j'espère avoir réussi à leur faire passer quelques concepts !

J'ai également participé pendant ma thèse au concours « Ma Thèse en 180 secondes ». Même si la finale a dû être annulée, pour les raisons sanitaires que nous connaissons tous, j'ai passé un excellent moment à préparer ce concours et j'ai surtout appris énormément de choses qui me seront utiles dans tous les domaines. Merci donc à l'équipe de communication de l'Université de Paris qui nous a encadrés : Cécile Drai, Samia Serri, Thomas Stoll et Pierre-Yves Clausse ; à Odile Blanchet et Clara Ann Marchetti de la compagnie de théâtre Les Faits d'Âmes ; et à tous mes « concurrents », que je ne vois pas comme des rivaux mais des partenaires qui ont rendu cette expérience inoubliable.

Je voudrais remercier aussi toutes les personnes qui m'ont fait grandir pendant mon parcours, et qui m'ont permis d'arriver là où je suis aujourd'hui. Mes professeurs, au lycée (en particulier M. Aubert), en prépa, et à l'ESPCI. Je ne peux pas tous les citer, mais un merci particulier à Pascale Dupuis-Williams et à Jérôme Vial, mes tuteurs lors de mes stages. Merci également à mes différents encadrants de stage, Michel Nogré et Laetitia Danino lors mon stage au LFB ; et Anthony Genot et Yannick Rondelez lors de mon stage au Japon. Ces expériences m'ont formée et participent à la personne que je suis devenue aujourd'hui.

A ceux qui sont toujours là

Lean on me – Bill Withers

Je voudrais également remercier mes amis, mon « clan ». Beaucoup d'entre eux étaient en thèse et nous avons traversé ensemble les différentes étapes, de la recherche de financements à la rédaction, en passant par les manips qui refusent de marcher.

D'abord Bibi, je n'ai pas besoin de t'expliquer pourquoi je te remercie. Il y a maintenant plus de 7 ans, un coup de foudre amical a eu lieu, et depuis on ne se quitte plus, tu es l'une des personnes les plus importantes de ma vie. Merci d'être toujours là pour m'écouter me plaindre quand j'ai eu une dure journée, pour me faire rire avec tes histoires, pour nos questionnements métaphysiques sur le monde qui nous entoure… Merci pour tout en fait, tu m'es indispensable !

Merci à Axel et Sarah pour tous les moments passés ensembles, les vacances partagées, les week-ends à se casser la tête sur Time Stories et autres jeux d'énigmes, les parties de WOW… Bref, tout ce qu'on a pu vivre ensemble depuis maintenant plusieurs années d'une belle amitié.

Merci aux « fiiiiiilles », Barbara, Sarah, Anne-Claire, Marie, Claire, Maureen, pour les réunions de crise ou simplement les apéros, qui font du bien au cœur et à la tête !

Une pensée particulière pour ma famille PCéenne, Bertille, Quentin et Florian, sur qui je sais que je peux toujours compter ; ainsi qu'à tous les « BH et associés », dont j'ai vu pour la plupart les soutenances progressivement défiler, jusqu'à ce que ce soit mon tour : Domitille, Reda, Virgile, Caroline, JB et Noemi (et le petit Camille), Antoine. Merci aussi aux anciens « Polaroïdes » : on est davantage contemporains dans nos thèses, courage, c'est bientôt fini : Régis et Ludy, Johanne et Thomas, William et Constance, Louis, Guillaume et Cécilia. Merci à vous tous pour tous les moments de bonheur partagés ensemble et pour votre soutien dans les moments plus difficiles.

Hey look Ma' I made it – Panic at the disco!

Je ne remercierai jamais assez ma famille : Maman, Papa, Clara et mon cher beauf' Flo ; mes grands-parents ; et Valérie, ma marraine, ma fée. Merci d'être constamment à mes côtés et de m'avoir soutenue à tous les moments de ma vie. Aujourd'hui une étape supplémentaire de mon parcours s'achève, c'est grâce à vous tous que j'en suis là, je vous aime.

A toi qui est un peu tout ça à la fois

The scientist – Coldplay

Fabien enfin, mon chaton, tu te doutais que ton tour arriverait. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir supporté ces années de thèse, les soirées au labo plutôt qu'avec toi, la rédaction, les (nombreuses !) relectures de chaque petit truc que j'écrivais, la fatigue, les doutes et les angoisses. Je sais que ça n'a pas été facile pour toi non plus, mais même si tu n'as pas toujours compris, tu as toujours accepté et été là pour moi. Tu es mon pilier, je ne sais pas comment j'aurais fait sans toi. Je t'aime.

… et à mes boules de poils

Comment ne pas remercier Shimi, qui a accompagné mes longues heures de rédaction par ses ronronnements et ses câlins ; Léna, toujours contente de me voir, et que j'avais plaisir à aller promener dans la forêt pour sortir un peu la tête de la grisaille parisienne ; et Agumi, souris miraculée, qui m'aura accompagnée presque tout au long de ma thèse, malgré son grand âge !

Table des matières

REMERCIEMENTS 1
TABLE DES MATIÈRES 5
LISTE DES ABRÉVIATIONS 8
LISTE DES FIGURES 11
LISTE DES TABLEAUX 11
AVANT-PROPOS 13

INTRODUCTION 15
Chapitre 1 : L'hématopoïèse et les cellules souches hématopoïétiques 16
1. L'hématopoïèse 16
a. Généralités sur le système hématopoïétique 16
b. Hématopoïèse primitive 17
c. Hématopoïèse adulte 18
2. La cellule souche hématopoïétique 23
a. Description historique et fonctionnelle 23
b. Description phénotypique 27
c. Actualités sur la caractérisation des CSH et l'arbre hématopoïétique 30
d. Microenvironnement et régulation des propriétés de la CSH 32
Chapitre 2 : Métabolisme, stress oxydant et signalisation redox dans la CSH 43
1. Métabolisme et mitochondrie dans la CSH 43
a. Les différentes voies métaboliques 43
b. Métabolisme particulier de la CSH 46
2. Les espèces réactives de l'oxygène ou ROS 49
a. Génération biochimique, liens avec la mitochondrie et voies de détoxification 49
b. Effets des ROS sur les cellules et sur les CSH 51
c. Facteurs influant sur les ROS dans les CSH 57
d. Mesure des ROS 62
Chapitre 3 : Utilisation des CSH en biothérapie 63
1. Thérapie cellulaire et génique en hématologie 63
a. Thérapie cellulaire et génique : définition 63
b. Modification génétique et vecteurs utilisés 65
c. Les maladies hématologiques traitées par thérapie cellulaire et génique 68
d. Différentes cellules utilisées en hématologie 72
2. Protocoles de maintien et d'expansion des CSH ex vivo 75

a. Cytokines, facteurs de croissance et « gold standard » actuel pour la thérapie génique et cellulaire ... 76
b. Autres molécules de signalisation ... 79
c. Mimer le microenvironnement physique de la niche ... 81
d. Perfusion continue, changements de milieu et agitation ... 88
e. Régulation de voies liées au maintien des CSH et manipulation génétique ... 89
f. Petites molécules ... 92
g. Régulation épigénétique ... 93

RÉSULTATS ... 97
Projet 1 : Impact des faibles doses de radiations ionisantes sur les cellules souches hématopoïétiques humaines ... 98
1. Contexte scientifique ... 98
2. Objectifs ... 99
3. Résultats : article publié (Henry E et al Haematologica 2020) ... 99
4. Editorial rédigé par T. Suda et M. Yamashita ... 126
5. Résumé ... 130
Projet 2 : Amélioration du maintien des propriétés des cellules souches hématopoïétiques pendant la culture *ex vivo* grâce aux antioxydants ... 131
1. Contexte scientifique ... 131
2. Objectifs ... 131
3. Résultats : article en préparation (Henry E et al) ... 132
4. Résultats complémentaires obtenus sur les CSH murines ... 159
a. CFU-C ... 159
b. Transplantations *in vivo* ... 161
c. Activation de p38MAPK ... 162
5. Résumé ... 163

DISCUSSION ... 164
Résumé ... 165
Discussion et perspectives ... 166
Utilisation de différents types cellulaires ... 166
Métabolisme, faibles doses d'irradiation et antioxydants ... 168
ROS et faibles doses d'irradiation : un message qui ne passe pas ? ... 169
Différents types de radiations ionisantes, différentes réponses ? ... 170
Utilisation d'antioxydants en clinique ... 171
Tempol : cycle cellulaire, auto-renouvèlement et application thérapeutique ... 172
Epigénétique, héritage à long-terme et expansion des CSH ... 174

Expansion clonale et transformation leucémique, des chemins à ne pas emprunter 175
Comment obtenir un milieu de culture des CSH idéal ? 176
Usage des antioxydants en dehors de la clinique et protocoles 177
Remarques finales 178

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 180
ANNEXES 230
Annexe 1 : Effets similaires et différentiels des faibles et fortes doses d'irradiations sur les cellules souches hématopoïétiques 230
Annexe 2 : Effet combiné du G-CSF et du Plerixafor sur la reconstitution hématopoïétique en souris NSG de $CD34^+$ issues du sang périphérique de patients mauvais mobilisateurs 248
Annexe 3 : Les cellules souches hématopoïétiques expriment JAM-C à leur surface 258
RÉSUMÉ 269

Liste des abréviations

3'4'-DMF : 3’,4’-dimethoxyflavone
5-AZA : 5-azacytidine
5-FU : 5-fluorouracile
8-oxo-dG : 8-oxo-deoxyguanine
AAV : adeno-associated virus
Ad5 : adenovirus serotype 5
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP/ATP : adenosine di/triphosphate
AGM : aorte-gonade-mesonephros
AhR : aryl hydrocarbone receptor
AKT : AKT serine/threonine protein kinase
ANGPL : angiopoïétine-like
ARE : antioxidant response element
ARN/RNA : acide ribonucléique
ATG7 : autophagy related 7
ATRA : all-trans retinoic acid
B220 : B cell CD45R isoform of 220 kDa
BaEV : baboon envelope
BCL2 : B cell CLL/lymphoma 2
BER : base-excision repair
BFU-E : burst forming unit erythroid
BIO : 6-bromoindirubin 3’-oxime
BMI1 : BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger
BMP : bone morphogenic protein
BMPRIA : bone morphogenic protein receptor type 1A
BRCA2 : breast cancer susceptibility protein 2
BSA : bovine serum albumin
BSO : L-buthionine-S,R-sulfoximine
BTK : Bruton tyrosine kinase
CAFC : Cobblestone area forming cell
CAR : CXCL12-abundant reticular
CaR : calcium-sensing receptor
CAS9 : CRISPR-associated endoribonuclease 9
CAT : catalase
CBP : CREB binding protein
CCR5 : C-C motif chemokine receptor 5
CFU-C : colony-forming unit in culture
CFU-E : colony-forming unit erythroid
CFU-G : colony-forming unit granulocyte
CFU-GEMM : colony-forming unit granulocyte, erythroid, macropahge and megacaryocyte
CFU-GM : colony-forming unit granulocyte macrophage
CFU-M : colony-forming unit macrophage
CFU-S : colony-forming unit in spleen
cKIT : receptor tyrosine kinase
CLEC9A : C-type lectin domain family 9 member A
CLP : common lymphoid progenitor
CMP : common myeloid progenitor
cMYB : MYB proto-oncogene
cMYC : MYC proto-oncogene
COX : cyclooxygénase
CRISPR : cluster regularly interspaced short palindromic repeats
CSH : cellules souches hématopoïétiques
CSM : cellules stromales mésenchymateuses
CSPH : cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques
Cu : cuivre
CXCL12 : CXC motif chemokine ligand 12
CXCR4 : CXC motif chemokine receptor 4
DHE : dihydroéthidine
DHFR : dihydrofolate reductase
DIP : déficit immunitaire primitif
DL1 : delta-like ligand 1
DNA-PKC : DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DNMT : DNA methyltransferase
DP : double-positive
DPI : diphenylene iodonium
EGF : epidermal growth factor
EGFP : enhanced fluorescent green protein
EGR1 : early growth response 1
ELP : early lymphoid progenitor
EPCR : endothelial protein C receptor
EPO : érythropoïétine

ERCC1 : excision repair cross complementation group 1
ERK : extracellular signal regulated kinase
ES : embryonic stem cells
ESL1 : E-selectin ligand 1
EVI1 : ecotropic virus integration site 1
EZH2 : enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
FAO : fatty acid oxidation
FBXW7 : F-box and WD repeat domain containing 7
FGF : fibroblast growth factor
FLT3/FLK2 : fms-like tyrosine kinase 3/fetal liver kinase 2
FLT3L : FLT3 ligand
FOXO : forkhead box O
GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphatedeshydrogenase
GATA2 : GATA binding protein 2
G-CSF : granulocyte colony stimulating factor
GFI1 : growth factor independant 1 transcriptional repressor
GFP : green fluorescent protein
GLRX : gluaredoxine
GLS : glutaminase
GLUT1 : glucose transporter type 1
GM-CSF : granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GMP : granulocyte-monocyte progenitor
GPRC5C : G protein coupled receptor family C group 5 member C
GPX : glutathione perodixdase
GRP78 : glucose regulated protein 78
GSH : forme réduite du glutathion
GSK-3β : glycogen synthase kinase 3 beta
GSSG : forme oxydée du glutathion
H2AX : histone 2AX
H2B : histone 2B
H_2-DCFDA : diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2',7'
HAT : histone acetyltransferase
HDAC : histone deacetylase
HIF : hypoxia inducible factor
HRE : hypoxia response element
huAEC : human artherial endothelial cells
IFNα : interféron α
IgG : immunoglobuline G
IL : interleukine
ILGF : interleukine-like growth factor
iPS : induced pluripotent stem cells
JAG1 : jagged1
KLF4 : Kruppel-like factor 4
KO : knock-out
LAL : leucémie aïgue lymphoblastiques
LAM : leucémie aigüe myéloïde
LC3B : microtubule associated protein light chain 3 beta
LDHA : lactate dehydrogenase
LEPR : leptin receptor
LIF : leukemia inhibitory factor
Lin : lineage
LMC : leucémie myéloïde chronique
LLC : leucémie lymphoïde chronique
LMPP : lympho-myeloid pluripotent progenitors
LSK : Lin-SCA1+cKIT+
LTC-IC : long-term culture initiating cell
LT-HSC : cellules souches hématopoïétiques long-terme
M-CSF : macrophage colony stimulating factor
MDM2 : mouse double minute 2
MDR1 : multidrug resistance protein 1
MEIS1 : myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog
MEK : mitogen activated protein kinase kinase
MEP : megakaryocyte-erythrocyte progenitor
MFN2 : mitofusin 2
miRNA/miR : micro-ARN
MLP : multi-lymphoid progenitors
MO : moelle osseuse
MOZ : monocytic leukemia zinc finger protein
MPP : multipotent progenitor
mRNA : ARN messager
MTCH2 : mitochondrial carrier 2
mTOR : mammalian target of rapamycin

mTORC1 : mammalian target of repamycin complex 1
NAC : N-acétylcystéine
NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
NER : nucleotide-excision repair
NFκB : nuclear factor kappa B
NHEJ : non-homologous end joining
NK : natural killer
NOD : non obese diabetic
NOG : NOD/SCID/*Il2r*^{gtm1Sug}
NOX : NAD(P)H oxidases
NQO1 : NAD(P)H déshydrogénase quinone 1
NSG : NOD/SCID/*Il2rg*$^{-/-}$
OCT3/4 : octamer-binding transcription factor 3/4
ORP1 : oxysterol binding protein related 1
PBX1 : PBX homeobox 1
PcG : polycomb group
PCL : polycaprolactone
PDGF : platelet-derived growth factor
PDK : pyruvate dehydrogenase kinase
PGE2 : prostaglandine E2
PKM2 : pyruvate kinase M2
PLGA : poly(lactic-co-glycolic) acid
PPAR : peroxisome-proliferating activated receptor
PRC : protein regulator of cytokinesis
PRDX : peroxiredoxines
PRKDC : protein kinase DNA-activated catalytic subunit
PTEN : phosphatase and tensin homolog
PTH : hormone para-thyroïde
PTPMT1 : protein tyrosine phosphatase mitochondrial 1
RAG2 : recombination activating gene 2
RAR : acide rétinoïque
RB1CC1 : RB1-inducible coiled-coil 1
REDD1/DDIT4 : DNA-damage inducible transcript 4
RISP : mitochondrial complex III subunit Rieske iron-sulfur protein
ROS : reactive oxygen species
RUNX1 : RUNX family transcription factor 1
SAβGAL : senescence associated beta galactosidase
SCA1 : stem cell antigen 1
SCF : stem cell factor
SCL/TAL1 : stem cell leukemia protein/TAL bHLH transcription factor 1
SCO : sang de cordon ombilical
shRNA : short-hairping RNA
SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise
SIN : self-inactivated
siRNA : silencing-RNA
SIRPα : signal regulatory protein alpha
SIRT1 : sirtuin 1
SLAM : signaling lymphocytic activation molecule
SOD : superoxide dismutase
SOX2 : SRY-box transcription factor 2
SP : simple positive
SR1 : stemRegenin-1
SRC : SCID-repopulating cells
ST-HSC : cellules souches hématopoïétiques à court terme
TALEN : transcription activator-like effector nucleases
TEL : transfert d'énergie linéique
TGFβ : transforming growth factor beta
THY : thymocyte differentation antigen
TPO : thrombopoïétine
TSA : trichostatine
TSC1 : tuberous sclerosis 1 protein
TXNIP : thioredoxin-interacting protein
VCAM1 : vascular cell adhesion protein 1
VEGF : vascular endothelial growth factor
VHL : von Hippel-Lindau tumor suppressor
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VLA4 : very late antigen 4
VPA : acide valproïque
VSV-G : vesicular-stomatitis-virus-G
WT : wild type
YFP : yellow fluorescent protein
ZNHIT1 : zinc finger HIT-type containing 1

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse primitive embryonnaire murine 18
Figure 2 : Divisions symétriques et asymétriques en fonction du potentiel d'auto-renouvèlement et de reconstitution hématopoïétique 19
Figure 3 : Représentation schématique de la différenciation hématopoïétique « classique » 22
Figure 4 : Résumé des tests fonctionnels utilisés pour la caractérisation des CSPH 27
Figure 5 : Arbre hématopoïétique murin et marqueurs des CSPH 28
Figure 6 : Arbre hématopoïétique humain et marqueurs des CSPH 30
Figure 7 : Différentes vues de l'arbre hématopoïétique selon les époques 32
Figure 8 : Composants cellulaires et non-cellulaires de la niche hématopoïétique 36
Figure 9 : Différentes hypothèses concernant la ou les niche(s) hématopoïétique(s) 37
Figure 10 : HIF1α, dégradation en normoxie et stabilisation en hypoxie pour jouer le rôle de facteur de transcription 39
Figure 11 : Schéma de la phosphorylation oxydative dans la respiration cellulaire 44
Figure 12 : Voies principales du métabolisme énergétique 45
Figure 13 : Métabolisme et devenir de la CSH 49
Figure 14 : Génération et détoxification des ROS 50
Figure 15 : Impact des ROS sur le destin des CSH 53
Figure 16 : Différentes voies régulant ou régulées par les ROS 56
Figure 17 : Différentes méthodes de thérapie génique 65
Figure 18 : Composition des vecteurs lentiviraux de troisième génération 68
Figure 19 : Différentes stratégies de thérapie génique et cellulaire pour les maladies hématologiques 72
Figure 20 : Cinétique de l'hématopoïèse post-transplantation 73
Figure 21 : Nombre de CFU-C obtenues à partir de CSH murines cultivées deux jours après traitements antioxydants par rapport à la condition non traitée 160
Figure 22 : Nombre de CFU-C obtenues à partir de CSH murines WT et REDD1 KO cultivées 2 jours après traitements antioxydants par rapport à la condition non traitée 160
Figure 23 : Chimérisme obtenu lors de transplantations en série de LSK cultivées 2 jours après traitements antioxydants 161
Figure 24 : Diminution de l'activation de p38MAPK après culture de 48h et traitement antioxydant 162
Figure 25 : Chimérisme obtenu après transplantation primaire de 250 000 cellules $CD34^+$ de sang périphérique mobilisé cultivées deux jours en présence ou non de Tempol 167
Figure 26 : Courbe de radiosensibilité des CSH humaines à court et à long-terme 170
Figure 27 : Nombre de CFU-C obtenues à partir de CSH irradiées aux rayons X (accélérateur de particules LINAC) ..... **Erreur ! Signet non défini.**

Liste des tableaux

Tableau 1 : caractéristiques de différents types de virus utilisés en thérapie génique 67

« Ce ne sont pas nos capacités qui déterminent ce que nous sommes, ce sont nos choix »

Albus Dumbledore, Harry Potter et la chambre des secrets

Avant-Propos

Le système hématopoïétique est une machinerie très efficace, qui renouvèle des centaines de milliards de cellules par jour pour continuer d'assurer ses fonctions essentielles, comme le transport de l'oxygène, du fer, ou la lutte contre les ıкections. A l'âge adulte, la moelle osseuse est l'organe central de ce phénomène et elle contient les cellules qui assurent la production de toutes les cellules hématopoïétiques : les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces cellules possèdent les propriétés fondamentales de multipotence et d'auto-renouvèlement, qui leurs permettent de se différencier dans tous les lignages du système hématopoïétique tout en conservant un nombre constant de cellules souches tout au long de notre vie.

Identifier les facteurs qui régulent ces propriétés *in vivo* est encore aujourd'hui une thématique centrale en hématologie. Ces cellules sont en effet très sensibles aux stress (infections, stress génotoxique ou hémorragie par exemple) et les paramètres impliqués dans leur maintien sont très nombreux. Il est ainsi nécessaire de préserver les fonctions des CSH afin de prévenir leur défaillance, qui est source de nombreuses pathologies innées ou acquises, par exemple au cours du vieillissement. Ainsi, comprendre par quels facteurs extrinsèques et intrinsèques les CSH parviennent à maintenir leur état quiescent et indifférencié et leur capacité de multipotence, sans pour autant induire une absence d'activation voire une transformation leucémique, est crucial non seulement d'un point de vue fondamental mais également dans un but thérapeutique.

Les CSH sont en effet d'un intérêt clinique majeur, en particulier pour les protocoles cliniques de greffe de moelle osseuse et ceux de biothérapies cellulaires et géniques. Les cellules souches ainsi que les progéniteurs hématopoïétiques sont en effet utilisés pour traiter un certain nombre d'hémopathies. Aujourd'hui, plusieurs sources de CSH sont disponibles : moelle osseuse, sang périphérique après mobilisation, ou encore sang de cordon ombilical. Selon les applications, il est également possible de modifier génétiquement les CSH pour atteindre le but recherché (correction d'une maladie génétique notamment). Cependant deux limitations existent à ces techniques : le nombre de cellules souches et de progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) dans les échantillons prélevés ; et le maintien de leurs propriétés pendant les étapes de manipulation *ex vivo*, plus ou moins longues et techniques selon les cas, afin d'obtenir une efficacité de traitement maximale. Les connaissances acquises sur les mécanismes de fonctionnement de la CSH *in vivo* sont alors fondamentales pour des applications cliniques dans le but de les préserver *ex vivo*.

En particulier, un facteur central dans la régulation des CSH est la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species). Ces molécules doivent être très finement régulées dans toutes nos cellules : un excès de ROS a en effet des effets néfastes sur de nombreuses macromolécules (lipides, ADN…). Cependant, elles ont aussi un rôle de messager dans la transmission de signaux pour des processus biologiques et sont au cœur de plusieurs réseaux de signalisation cellulaires et moléculaires. Dans la CSH, le taux de ROS est particulièrement peu élevé et le contrôle de ce niveau joue un rôle crucial dans le maintien de leurs propriétés. De plus, l'exposition des CSH à différents stress (prolifération massive, irradiation, manipulation *ex vivo*) induit une augmentation du taux de ROS.

Nous avons abordé l'implication des ROS dans la régulation des fonctions des CSH selon deux axes. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à un facteur connu pour induire l'augmentation des ROS : l'irradiation. L'effet des fortes doses d'irradiation a été bien caractérisé. Cependant, les conséquences des plus faibles doses n'ont pas souvent fait l'objet d'études, notamment parce qu'il a longtemps été admis que les radiations ionisantes ne jouaient un rôle qu'au-delà d'un certain seuil. Nous avons montré que les faibles doses d'irradiation avaient aussi un effet non négligeable sur les propriétés des CSH à long-terme, via une augmentation transitoire de ROS menant à une activation de la voie p38MAPK. Il est alors possible de protéger les CSH des effets néfastes des faibles doses d'irradiation par un traitement antioxydant.

Par ailleurs, d'autres facteurs extérieurs peuvent induire l'augmentation des ROS. En particulier, il est admis que la manipulation des CSH *ex vivo* favorise l'augmentation des ROS et diminue le potentiel des CSH. Ceci est dû au moins en partie à la perte du microenvironnement hypoxique des CSH une fois extraites de la moelle osseuse ou du sang. Ainsi, nous avons proposé d'utiliser la même technique que dans le cas des faibles doses, c'est-à-dire un traitement antioxydant, pour protéger les cellules pendant ces manipulations. Cela pourrait avoir des applications notamment pendant l'étape de transduction lentivirale pour la thérapie génique dans le but d'améliorer les protocoles de greffe de cellules génétiquement modifiées. Nous avons ainsi montré que l'antioxydant Tempol permettait d'améliorer les capacités fonctionnelles des CSH après culture, via des changements métaboliques induits par la diminution des ROS.

Ces deux études complémentaires permettent de mieux comprendre l'impact de différents facteurs extérieurs sur les ROS et leur implication dans le maintien ou la perte des propriétés des CSH. De plus, le Tempol est un antioxydant encore peu utilisé en clinique, dont les propriétés pourraient être intéressantes pour l'amélioration des protocoles utilisant des CSH en clinique.

INTRODUCTION

Introduction

Chapitre 1 : L'hématopoïèse et les cellules souches hématopoïétiques

1. *L'hématopoïèse*

a. Généralités sur le système hématopoïétique

On dit souvent de façon naïve que le sang est composé de 3 types de cellules : les globules rouges, responsables du transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone entre nos poumons, notre cœur et nos différents organes ; les globules blancs, qui composent notre système immunitaire ; et les plaquettes, qui nous permettent de cicatriser. En réalité, le paysage cellulaire qui compose notre système sanguin est beaucoup plus complexe, avec de multiples sous-types cellulaires. De plus, le système hématopoïétique ne se limite pas à notre sang, mais est composé de nombreux organes : moelle osseuse, thymus, rate, ganglions, etc.

Pour donner un aperçu global des cellules composant le système sanguin, on peut détailler plus finement la vision simple donnée ci-dessus. Les globules rouges sont appelés érythrocytes et représentent 99% des cellules circulantes dans le sang. Ce sont des cellules énucléées permettant le transport de l'oxygène des poumons vers les différents organes, grâce à l'hémoglobine, et en retour du dioxyde de carbone produit par nos cellules vers les poumons pour l'évacuer. Les plaquettes, ou thrombocytes, présentes dans le sang, sont formées à partir de morceaux de cytoplasme des mégacaryocytes, grosses cellules de la moelle osseuse. Enfin, parmi les globules blancs, prenant en charge l'immunité du corps dans son ensemble, deux grandes branches existent :

- les cellules lymphoïdes, comprenant en particulier les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules NK (Natural Killer), ainsi que des cellules plus récemment identifiées appelées lymphocytes de l'immunité innée (ILC pour Innate Immunity Cells) (pour revue Castellanos and Longman, 2019). Chacune de ses familles possède encore plusieurs sous-types (lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, cellules mémoires, etc) qui ont chacun un rôle particulier à la fois dans l'immunité acquise et l'immunité innée.
- les cellules myéloïdes, en particulier les granulocytes et les monocytes. Ces cellules font partie de l'immunité innée. Les granulocytes sont des cellules polynucléaires et comprennent différents sous-types cellulaires : neutrophiles, basophiles, éosinophiles. Les monocytes présents dans le sang se différencient eux en macrophages et en cellules dendritiques une fois installés dans les tissus.

Tous ces types cellulaires sont nécessaires au maintien de l'homéstasie et participent activement à de nombreux processus biologiques. La production de ces cellules se fait grâce à un processus complexe nommé l'**hématopoïèse**, qui commence dès les premières semaines *in utero* et se déroule en continu tout au long de la vie pour permettre le renouvèlement des cellules matures à faible temps de vie. Les fonctions plus précises de ces cellules et le processus de leur différenciation progressive seront abordés plus en détails dans les parties suivantes.

b. Hématopoïèse primitive

Au stade embryonnaire, l'hématopoïèse démarre au sein du sac vitellin et se caractérise par des vagues successives assez bien décrites (Lacaud and Kouskoff, 2017) (Figure 1). Ces vagues permettent la synthèse successive de différents types de progéniteurs et cellules matures, utiles à la fois pour la vie intra-utérine et pour la mise en place des populations cellulaires à l'âge adulte. Chez la souris, la première vague intervient à 7,5 jours et permet la génération d'érythrocytes primitifs, trouvés seulement à ce stade de la vie et permettant l'acheminement de l'oxygène dans l'embryon avant la formation des érythrocytes définitifs. Après la formation d'îlots sanguins dans le sac vitellin, une deuxième vague permet ensuite la génération de macrophages (pour revue Boisset and Robin, 2012).

Pendant les 10 premiers jours, cette hématopoïèse est globalement indépendante de la présence de cellules souches hématopoïétiques (CSH), telles que décrites dans les parties suivantes. Leur génération a lieu aux alentours du 9 ou 10ème jour. Le lieu exact ainsi que la provenance ontogénique des CSH est encore controversé mais semble se situer dans la région aorte-gonade-mesonephros (AGM). Elles proviennent de cellules particulières appelées hémangioblastes, dérivées de cellules endothéliales spécialisées, après une transition endothélio-hématopoïétique (Choi et al., 1998). A ce stade, les CSH sont encore incapables de reconstituer le système hématopoïétique d'un hôte. Elles doivent passer par un stade de maturation et migrer dans le foie fœtal, à partir du 11ème jour, avant d'acquérir tout leur potentiel et de coloniser progressivement la moelle osseuse, en préparation de l'hématopoïèse après la naissance et à l'âge adulte. L'hématopoïèse chez le fœtus s'effectue alors principalement à partir du foie fœtal et de la moelle osseuse fémorale et tibiale, puis via les CSH présentes dans la moelle osseuse après la naissance. Cependant, un endothélium hémogénique serait encore présent chez le fœtus et le nouveau-né, et pourrait prendre en charge une partie de l'hématopoïèse à ce stade la vie, selon des modèles murins et aviaires (Yvernogeau et al., 2019).

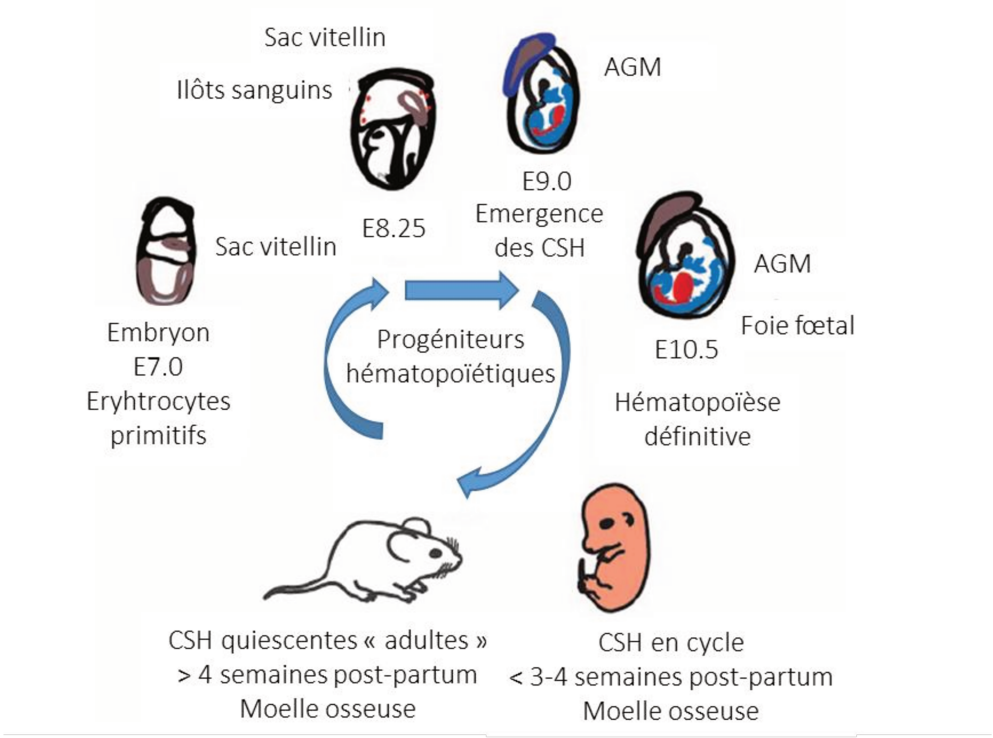


Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse primitive embryonnaire murine

Adapté de Ng and Alexander, 2017

c. Hématopoïèse adulte

A l'âge adulte, l'hématopoïèse est classiquement représentée sous forme d'un arbre, partant des cellules les plus indifférenciées et multipotentes, qui se transforment au cours de leurs divisions successives en cellules matures effectrices des fonctions essentielles du système sanguin, au terme d'un processus de différenciation bien contrôlé au cours duquel elles se spécifient en perdant leur multipotence (Figure 3). Celle-ci démarre au cœur de notre moelle osseuse (MO), puis la différenciation se poursuit dans les différents organes hématopoïétiques selon les cellules produites.

i. La cellule souche hématopoïétique

La cellule souche hématopoïétique, générée *in utero* au cours du développement embryonnaire, se trouve à l'apex de l'arbre hématopoïétique adulte. La définition intrinsèque d'une CSH dépend de deux propriétés fondamentales :

- La multipotence : il s'agit de la capacité à se différencier en tous les types de cellules du système hématopoïétique. Par définition, une CSH est autant capable de donner une cellule de la lignée lymphoïde, comme un lymphocyte T ou B, qu'une cellule de la lignée myéloïde, comme un granulocyte, ou encore un mégacaryocyte ou un érythrocyte.

- L'auto-renouvèlement : pour être qualifiée de CSH, une cellule doit être capable de s'auto-renouveler indéfiniment *in vivo*, soit par des divisions symétriques, une CSH « mère » donnant deux CSH « filles » ; soit par des divisions asymétriques, une CSH « mère » donnant naissance à une CSH « fille » et à un progéniteur hématopoïétique commençant à s'engager dans une voie de différenciation. Cette propriété permet de conserver un stock plus ou moins constant de CSH tout au long de notre vie et dépend de différents facteurs intrinsèques et extrinsèques détaillés dans la partie 2 de ce chapitre (Figure 2).

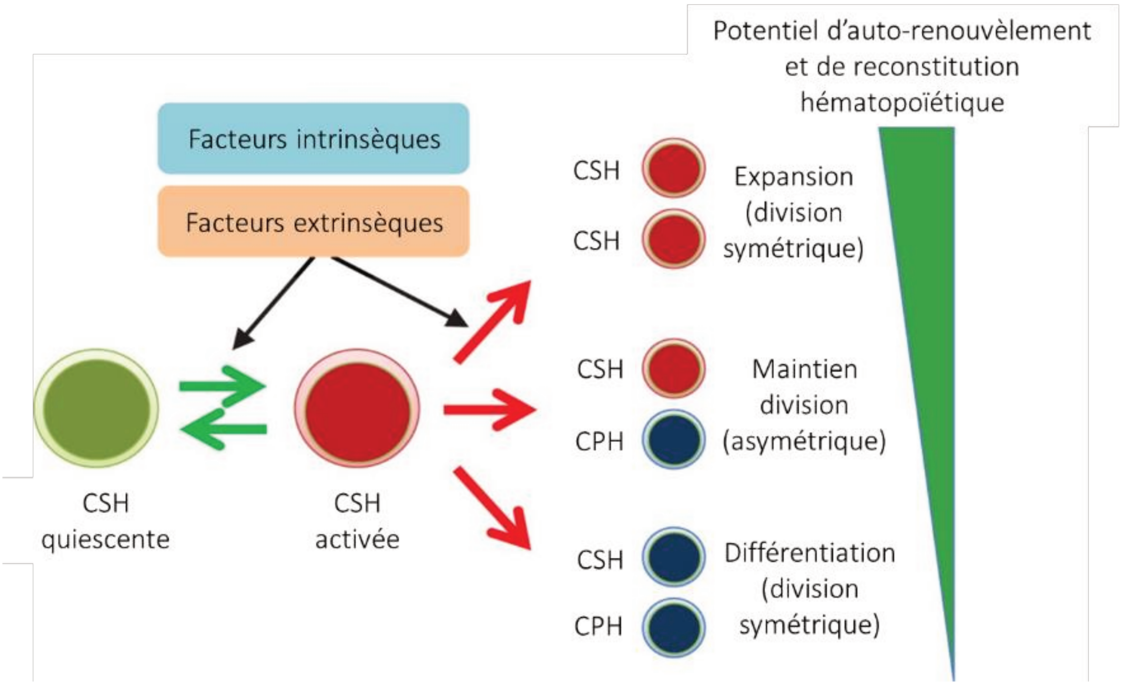


Figure 2 : Divisions symétriques et asymétriques en fonction du potentiel d'auto-renouvèlement et de reconstitution hématopoïétique

Adapté de Nakamura-Ishizu et al., 2014

Nous aborderons avec plus de détails la régulation de ces deux propriétés ainsi que la découverte, la caractérisation fonctionnelle et le phénotype des CSH dans la partie 2 de ce chapitre.

ii. Les progéniteurs hématopoïétiques

Les progéniteurs hématopoïétiques sont des cellules correspondant à des étapes de différenciation intermédiaires entre la CSH et les cellules matures. Ils conservent les propriétés de multipotence ou pluripotence des CSH, ce qui leur permet encore de se différencier en plusieurs types cellulaires selon les signaux reçus, mais leur auto-renouvèlement est beaucoup plus limité et s'amenuise jusqu'à disparaître au cours de la différenciation.

Chez la souris, le modèle initial de différenciation hématopoïétique postule que la CSH se différencie en progéniteur multipotent (MPP pour multipotent progenitor). Le MPP poursuit alors sa différenciation en s'engageant dans deux lignag es distincts pour générer d'une part le progéniteur

lymphoïde commun (CLP pour common lymphoïd progenitor), responsable du lignage lymphoïde (lymphocytes B et T, cellules NK) (Kondo et al., 1997), et d'autre part le progéniteur myéloïde commun (CMP pour common myeloid progenitor) (Akashi et al., 2000) grâce à la présence ou l'absence, respectivement, du marqueur de surface IL7gR nécessaire à la formation des lymphocytes. Le CMP peut alors s'engager ensuite soit dans la lignée érythro-mégacaryocytaire via le progéniteur MEP (pour megakaryocyte-erythrocyte progenitor) (Tn et al., 2002) soit dans la lignée myéloïde/granulo-monocytaire via le progéniteur GMP (granulocyte-monocyte progenitor). Ces progéniteurs engagés se différencient alors en cellules matures.

Cette vision de l'arbre hématopoïétique dit « classique » (Figure 3) a constitué un modèle d'étude jusqu'au début des années 2000, jusqu'à ce que des précisions soient apportées par l'étude systématique de marqueurs de surface caractéristiques de différentes sous-populations (pour revue Cheng et al., 2020). Ainsi, chez la souris, la population des MPP a été subdivisée en différentes sous-populations (MPP1, MPP2, MPP3, MPP4), dont la multipotence diminue graduellement (Cabezas-Wallscheid et al., 2014; Kiel et al., 2005a; Pietras et al., 2015; Wilson et al., 2008). Nous reviendrons sur la définition de ces populations dans la partie 2.b. de ce chapitre. Par ailleurs, il a été démontré qu'un sous-type de progéniteurs multipotents conservant à la fois un potentiel lymphoïde et un potentiel myéloïde existait avant la subdivision en CLP et CMP : l'ELP (pour early lymphoid progenitor) (Igarashi et al., 2002) ou LMPP (pour lymphoid primed pluripotent progenitor (Adolfsson et al., 2005; Mansson et al., 2007). L'identification de cette population est basée sur l'expression du marqueur FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3) au sein de la population $Lin^{-}SCA1^{+}cKIT^{+}$ (LSK) chez la souris. Dans cette population, le potentiel myéloïde est amoindri mais reste présent. Le phénotype de surface de ces cellules correspond également à la population des MPP4, appellation la plus largement utilisée aujourd'hui. Cependant, la question du potentiel mégacaryocytaire dans ces LMPP est débattue dans la communauté. En effet, une équipe a montré l'absence de ce potentiel dans la population $Flt3^{+}$ des LMPP (Lai and Kondo, 2006), tandis qu'une autre a révélé la capacité de ces cellules à générer des plaquettes (Boyer et al., 2011; Forsberg et al., 2006). Très récemment, il a été prouvé grâce à une technique de code-barre via le transposon « sleeping-beauty » que la lignée mégacaryocytaire émergeait de façon majoritairement indépendante des autres, très « tôt » dans la différenciation et grâce à une contribution directe des CSH (Rodriguez-Fraticelli et al., 2018). La question de l'existence et du positionnement du CMP dans cette hiérarchie reste largement débatue.

L'existence d'une population LMPP (ou MLP pur multi-lymphoid progenitors chez John Dick) a été démontrée chez l'homme un peu plus tard (Goardon et al., 2011; Haddad, 2004). De plus, l'équipe de John Dick a mené un travail minutieux de caractérisation de différentes populations phénotypiques chez l'homme afin d'aider à la clarification des modèles proposés (Doulatov et al., 2010). Tout cela a mené à un modèle de l'arbre hématopoïétique plus ou moins consensuel permettant d'isoler des sous-populations au potentiel spécifique sur la base de marqueurs phénotypiques (pour revue Doulatov et al., 2012), mais qui est aujourd'hui discuté (Karamitros et al., 2018; Notta et al., 2016). Ces actualités seront discutées plus en détails dans la partie 2.d. du chapitre.

iii. Les cellules matures

Comme décrit dans le premier paragraphe de ce chapitre, le système hématopoïétique comprend de nombreuses cellules différenciées, matures et effectrices. Nous allons décrire rapidement, de façon non exhaustive quelques exemples de voies de différenciation permettant d'obtenir ces cellules matures, dans le but de montrer que l'hématopoïèse ne se limite pas à la moelle osseuse.

La plupart des cellules sanguines de la lignée myéloïde se différencient dans la MO, puis migrent vers les organes périphériques où elles exercent ensuite leurs fonctions. Ces cellules n'entrent dans la circulation et ne colonisent la périphérie qu'une fois matures et certaines ont une durée de vie très courte (une douzaine d'heures pour les neutrophiles à quelques jours pour les mégacaryocytes). Elles doivent donc être renouvelées, ce qui nécessite une production continue de plusieurs milliards de cellules quotidiennement.

Cependant, toutes les cellules ne subissent par leur différenciation au sein de la MO. Un bon contre-exemple est celui des lymphocytes T. La différenciation lymphocytaire T n'a pas lieu dans la MO, mais dans un organe bien spécifique : le thymus. Les progéniteurs doivent donc être capables de quitter la MO pour coloniser le thymus (Zlotoff et al., 2010). Chez l'homme, plusieurs propositions ont été faites concernant le phénotype de ces cellules : MLP (Doulatov et al., 2010), LMPP (Goardon et al., 2011), ou encore d'autres populations exprimant différents antigènes de surface (Haddad et al., 2006; Six et al., 2007). Chez la souris, la population capable de coloniser le thymus est également très hétérogène, comprenant notamment les MPP et les CLP, mais semble reposer sur un ensemble de cellules exprimant les marqueurs CD135 et/ou CD27 (Saran et al., 2010; Serwold et al., 2009). Une fois dans le thymus, ces cellules reçoivent des signaux via la voie Notch qui sont primordiaux pour la différenciation en lymphocyte T (pour revue Vanderbeck and Maillard, 2020). Les précurseurs T passent alors par différents stades dits double-négatifs (DN), où ils n'expriment ni le CD4 ni le CD8, puis par une forme double-positive (DP) où ils expriment les deux, avant de se spécifier en lymphocytes T simple-positifs (SP) auxiliaires ($CD4^+$) ou cytotoxiques ($CD8^+$). Au cours de cette maturation, des réarrangements du récepteur des lymphocytes T ou TCR (T cell receptor) via des recombinaisons VDJ ont lieu afin de donner naissance à un répertoire de lymphocytes T variés capables de reconnaître tout un panel d'antigènes. Des sélections positives et négatives ont ensuite lieu afin d'éliminer les lymphocytes T inadaptés (par exemple ceux reconnaissant le soi). Enfin, ces lymphocytes T alors matures mais encore naïfs migrent vers les organes périphériques (ganglions, rate, muqueuses…). Ce n'est qu'une fois en périphérie qu'ils pourront rencontrer les antigènes et subir si nécessaire des phases d'activation et de prolifération. Il est intéressant de noter que la maturation des lymphocytes T se fait de manière conséquente chez l'enfant, puis le thymus involue progressivement au cours du vieillissement (Haynes et al., 2000). Enfin, il existe de nombreux autres sous-types de lymphocytes T, non détaillés ici.

Les lymphocytes B sont eux générés dans la MO, notamment grâce à l'activation par l'IL7 de certains facteurs de transcription, comme Ikaros, PAX5 ou encore EBF1 chez la souris. Par le même mécanisme de recombinaison VDJ que les lymphocytes T, le récepteur BCR (B cell receptor) des lymphocytes B est réarrangé, les lymphocytes immatures passent par des étapes de sélection, puis migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, où l'activation, la maturation vers des plasmocytes et leur

prolifération permettront la sécrétion des immunoglobulines. Enfin, des cellules comme les NK pourraient également être différenciés dans d'autres organes que la MO (Scoville et al., 2017).

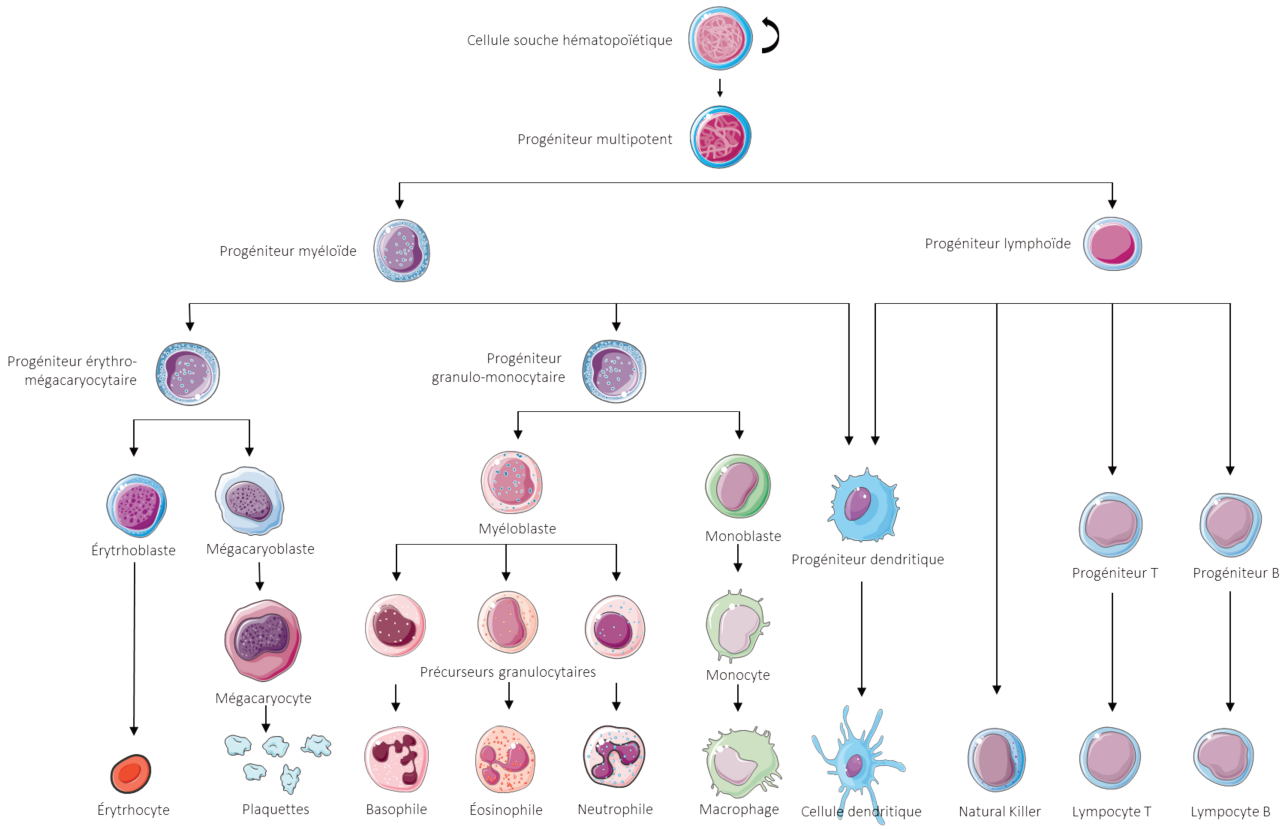


Figure 3 : Représentation schématique de la différenciation hématopoïétique « classique »

Réalisée à partir des ressources Servier Medical Art

Enfin, la différenciation des cellules le long de l'arbre hématopoïétique est un processus progressif qui prend du temps. La différenciation vers une cellule mature est donc plus ou moins longue selon la cellule de laquelle on part (CSH, progéniteur…) et vers laquelle on souhaite arriver. Ainsi, dans la souris adulte, des CSH marquées par un rapporteur fluorescent donnent en premier lieu des mégacaryocytes en 4 à 8 semaines, puis des cellules myéloïdes vers 12 semaines, et enfin des cellules lymphoïdes (Upadhaya et al., 2018). Les progéniteurs hématopoïétiques déjà engagés, comme les CLP, sont également plus rapides pour donner naissance à des lympocytes T mature que des progéniteurs plus primitifs comme les MPP Les cinétiques de différenciation vers les cellules matures sont encore mal définies, malgré une utilité potentielle en clinique pour mieux comprendre la dynamique de reconstitution hématopoïétique selon le type d'échantillon utilisé lors des transplantations de CSH (voir Chapitre 3).

2. *La cellule souche hématopoïétique*

Comme présenté précédemment, la cellule souche hématopoïétique est au sommet de l'arbre hématopoïétique et permet la génération de toutes les cellules du système hématopoïétique. Sa définition fonctionnelle et phénotypique est en constante évolution depuis sa découverte dans les années 50 (pour revue Eaves, 2015). De plus, la régulation physiologique des propriétés fondamentales des CSH (auto-renouvèlement, quiescence, capacités de différentiation) est de mieux en mieux caractérisée.

a. Description historique et fonctionnelle

i. Historique de la description des cellules souches

L'hypothèse de l'existence d'une cellule unique à l'origine de toutes les cellules sanguines et d'un micro-environnement spécifique date de plus d'un siècle (Maximow, 1909). Dans les années 50, il est observé qu'une injection de cellules de MO permet de protéger les receveurs des effets de l'irradiation et d'obtenir un chimérisme dans les cellules lymphoïdes et myéloïdes (Ford et al., 1956; Jacobson et al., 1951). C'est en 1961 que Till et McCulloch démontrent que les cellules de la MO sont capables de générer des colonies spléniques dans des souris irradiées, contenant différents types de cellules (granulocytes, érythrocytes, mégacaryocytes) obtenues de façon clonale (Becker et al., 1963; Till and McCulloch, 1961). Ces cellules sont nommées CFU-S (pour colony-forming unit in spleen). La capacité d'auto-renouvèlement de ces cellules est ensuite démontrée par la présence de CFU-S dans les colonies spléniques, mais révèle une hétérogénéité dans cette population (Siminovitch et al., 1963). En particulier, des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes (dont des progéniteurs T) sont retrouvés dans la population CFU-S (Arcangeli et al., 2005; Lancrin et al., 2002). La greffe de MO en tant que traitement pour les pathologies hématologiques commence alors à être utilisée, les premiers essais réalisés par Georges Mathé remontant aux années 60 (Mathé et al., 1963; Mathé et al., 1963). La pluripotence totale, notamment la capacité à donner naissance à la lignée lymphoïde, des CFU-S est ensuite démontrée (Abramson et al., 1977). Par la suite, il a été prouvé que les CFU-S ne sont pour la majorité pas les cellules responsable de la prise de greffe à long-terme et la différence entre les progéniteurs, capables de reconstituer le système hématopoïétique à court-terme, et les CSH, responsables de l'hématopoïèse à long-terme, est établie (Jones et al., 1989, 1990). Ceci étant dit, les deux types de cellules sont nécessaires au succès d'une greffe.

ii. Tests fonctionnels utilisés

Différents tests *in vitro* et *in vivo* permettent d'évaluer les capacités de différenciation, de multipotence et d'auto-renouvèlement des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques. Chaque test est spécifique de certaines de ces propriétés et de certaines sous-populations plus ou moins indifférenciées. Par ailleurs, il est important de noter qu'il n'existe pas toujours de corrélation entre un

phénotype de surface observé (décrit dans la partie 2.b.) et la fonctionnalité d'une CSH. Ainsi, seuls les tests fonctionnels peuvent être utilisés comme preuve de présence de cellules souches et/ou de progéniteurs hématopoïétiques (pour revue Coulombel, 2004).

Les tests *in vitro* reposent soit sur la culture en milieu semi-solide, soit sur la co-culture sur un stroma médullaire : cellules adhérentes allogéniques irradiées ou lignées immortalisées (MS5, AFT024, etc). Selon le type de test et le temps passé en culture, la fonctionnalité de différentes populations de cellules souches et progéniteurs peut être évaluée.

CFU-C ou CFC

Le test le plus couramment utilisé pour tester la clonogénicité des CSPH *in vitro* est le test dit de « colony-forming unit in culture » ou CFU-C/CFC. Cet essai consiste en la culture d'une population d'intérêt, plus ou moins enrichie en CSH, dans un milieu semi-solide, le plus couramment de la méthylcellulose enrichie d'un cocktail de cytokines permettant la différenciation en les différents types de cellules de la lignée myéloïde (érythrocytes, granulocytes, mégacaryocytes, macrophages…) (Broxmeyer, 1984). Chaque cellule souche ou progéniteur donnera alors naissance à une colonie, au bout de 7 jours pour des cellules murines et de 10-12 jours pour des cellules humaines. Selon le type de la colonie (BFU-E ou CFU-E pour la lignée érythrocytaire, CFU-G pour les granulocytes, CFU-M pour les macrophages, et CFU-GM et CFU-GEMM pour les colonies mixtes, comprenant plusieurs types cellulaires) et leur nombre, on peut estimer un nombre de CSPH dans la population de départ. Il est également possible de réaliser des cultures en série afin d'évaluer la capacité d'auto-renouvèlement des CSPH (Rizo et al., 2008).

CAFC

Parmi les tests *in vitro,* un test historique est celui du « Cobblestone area-forming cell » ou CAFC. Celui-ci consiste en la culture pendant plusieurs semaines des cellules d'intérêt sur un stroma médullaire. Certaines cellules vont alors former des amas optiquement denses situés très proches des cellules du stroma : ce sont les cellules les plus immatures (Breems et al., 1994). Les cellules plus différenciées se placent elles au-dessus du stroma. L'identification de ces zones dites « Cobblestone » et leur numération permet ainsi d'estimer une quantité de cellules immatures.

LTC-IC

Ce type de test est également réalisé par une culture sur un stroma médullaire. LTC-IC signifie « long-term initiating cell in culture ». La population étudiée est cultivée pendant plusieurs semaines sur le stroma, avant de réaliser un test CFU-C sur les cellules récupérées. La capacité à toujours pouvoir générer des colonies après la culture est indicative de l'immaturité des cellules. Ce type de test se réalise souvent en dilution limite, pour estimer une fréquence de LTC-IC dans une population donnée. De plus, il est possible de réaliser des tests dits « extended » ou secondaires, où les cellules $CD34^+$ sont triées à nouveau au bout de plusieurs semaines de culture sur le stroma avant une deuxième étape de culture en dilution limite (Hao et al., 1996).

Ces tests *in vitro* permettent d'évaluer des capacités d'immaturité, de clonogénicité et de différenciation/multipotence. Cependant, dans ces conditions de culture, seule la différenciation myéloïde est visible. En effet, il faut des conditions de culture très particulière pour obtenir des cellules de la lignée lymphoïde. De plus, même si le test de LTC-IC est un bon substitut *in vitro* pour évaluer le potentiel d'auto-renouvèlement (Petzer et al., 1996), la preuve définitive concernant les capacités

intrinsèques des CSH ne peut être apportée que par des tests *in vivo* de transplantations en série, décrits dans les paragraphes suivants.

CFU-S

Dans la partie précédente, nous avons décrit la découverte des cellules à l'origine de colonies spléniques, nommées « Colony-forming Unit in Splen » (CFU-S). Si initialement ces cellules ont été identifiées comme les CSH, aujourd'hui il a été décrit qu'elles sont en réalité des progéniteurs hématopoïétiques multipotents. En effet, les colonies formées comportent tous les types de cellules myéloïdes, des lignages érythroïde, mégacaryocytaire, granulocytaire et macrophagique (Magli et al., 1982; Till et al., 1964). Pour réaliser ce test, les cellules sont injectées par voie intraveineuse dans la souris, qui sont sacrifiées ente 8 et 12 jours plus tard. Sur la rate sont alors visibles des nodules, appelés colonies, contenant la progénie clonale des progéniteurs ayant colonisé la rate. Les colonies visibles après 8 jours, ou pré-CFU-S (Hodgson and Bradley, 1979) sont moins primitives que les colonies apparaissant après 12 jours, avec un potentiel d'auto-renouvèlement moindre, visible lors de la transplantation en série des CFU-S. Enfin, le nombre de cellules transplantées corrèle avec le nombre de colonies observées sur la rate.

Transplantations primaires, en compétition et en série

Le seul test permettant de connaître la quantité de cellules souches dans un échantillon est la transplantation *in vivo*, principalement réalisée dans la souris (mais qui peut aussi se faire dans des modèles de primates non-humains par exemple). Après injection intraveineuse, la reconstitution hématopoïétique peut être évaluée à différents temps. 16 heures après greffe, il est déjà possible d'évaluer la capacité de nichage des cellules dans la moelle osseuse. Pendant les semaines qui suivent, plusieurs vagues de différenciation hématopoïétique ont lieu. Enfin, après 12 à 16 semaines, on est capable de rendre compte de la capacité de reconstitution hématopoïétique à long-terme des cellules greffées et en particulier de la fréquence de CSH notamment grâce à la réalisation de transplantations en dilution limite. Pour comparer les capacités de reconstitution de deux échantillons différents, des transplantations en compétition sont également possibles. Enfin, pour évaluer la capacité d'auto-renouvèlement des CSH, on réalise des transplantations dites « en série », en forçant la prolifération et la différenciation des CSH par plusieurs transplantations successives. Sur les CSH murines, il est possible d'aller jusqu'à 6 ou 7 transplantations successives avant d'attendre l'épuisement des CSH (Harrison and Astle, 1982). Avec des CSH humaines, il est plus rare d'arriver à obtenir une transplantation tertiaire. Ce manque d'auto-renouvèlement peut être attribué soit à des capacités plus faibles des CSH humaines, soit à un microenvironnement murin moins adapté pour maintenir les propriétés des CSH, comme nous allons l'expliquer dans le paragraphe suivant sur les modèles de transplantation utilisés.

Pour les CSH murines, le modèle de référence est la transplantation syngénique utilisant les deux allèles du gène CD45. En effet, la protéine CD45 est exprimée par toutes les cellules du système hématopoïétique (sauf les érythrocytes) et existe sous deux isoformes, CD45.1 et CD45.2 différenciables par des marquages avec des anticorps spécifiques. Ainsi, cela permet de différencier les cellules du donneur des cellules du receveur. Pour les CSH humaines, il est nécessaire de se placer dans un modèle de souris immunodéficientes, afin d'éviter le rejet de la greffe de cellules humaines par la souris receveuse. Plusieurs modèles ont été utilisés au cours des années, chacun ayant ses avantages et ses inconvénients (pour revue Doulatov et al., 2012; Goyama et al., 2015). Aujourd'hui, un des modèles de référence, celui utilisé au laboratoire, est la souris NSG, pour NOD/SCID-*Il2rg*$^{-/-}$ (Ito et al., 2002). Ces

souris sont dérivées du modèle historique NOD/SCID (NOD pour non-obese diabetic et SCID pour severe combined immunodeficiency) et sont porteuses de deux mutations leur conférant une immunodéficience multiple : une mutation sur le gène *Prkdc* (protein kinase DNA-activated catalytic subunit), nommée *Prkdc*^{scid}, empêchant la recombinaison VDJ permettant le réarrangement des récepteurs des lymphocytes B et T ; et une mutation sur le gène *Il2rg*, codant la chaîne γ commune aux récepteurs de différentes interleukines (IL2, IL4, IL7, IL9, IL15…) nécessaire à la signalisation cytokinique permettant la génération des lymphocytes T, B et Natural Killers (NK). De plus, le fond génétique NOD présente différentes caractéristiques qui diminuent l'efficacité de l'immunité innée : absence de la protéine C5 du complément et présence d'un allèle spécifique du gène *Sirpα* (pour signal regulatory protein alpha) qui diminue les capacités de phagocytose des macrophages envers les cellules humaines (pour revue Doulatov et al., 2012; Takenaka et al., 2007). Les cellules capables de reconstituer le système hématopoïétique de ces souris sont alors nommées « SCID repopulating cells » ou SRC, Cependant, malgré sa capacité de greffe élevée, ce modèle (comme d'autres) présente des inconvénients : nécessité de réaliser une irradiation myéloablative pour libérer de l'espace dans la moelle osseuse des souris, biais de différenciation en faveur des lymphocytes B, etc. Pour pallier ces limitations, d'autres modèles dits « humanisés », plus adaptés au nichage et à la différenciation des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH) humaines, sont en développement ces dernières années (pour revue Doulatov et al., 2012; Saito et al., 2020). Différentes stratégies peuvent être utilisées :

- mutations supplémentaires : par exemple, mutation sur le gène *Kit*, récepteur du Stem Cell Factor (SCF), qui induit une moins bonne survie des CSH murines et libère de l'espace dans la MO (souris NSG-W41) (Cosgun et al., 2014).
- production de cytokines humaines dans la niche murine : on peut citer l'exemple des souris MISTGR, porteuses d'une mutation sur *Rag2* (recombination activating gene 2) plutôt que sur *Prkdc*, ce qui diminue la radiosensibilité, et qui expriment, sous le contrôle de leurs propres promoteurs murins, les cytokines et facteurs de croissances humains IL3, M-CSF (macrophage colony stimulating factor), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) et TPO (thrombopoïétine) (Rongvaux et al., 2014).
- création de niches humanisées par exemple sous formes d'ossicules (pour revue Dupard et al., 2020).

Cependant, aucun modèle ne récapitule pour l'instant totalement l'hématopoïèse humaine. C'est néanmoins la seule méthode actuelle suffisamment efficace pour estimer les capacités des cellules souches humaines. Aujourd'hui, la tendance est à la limitation de l'utilisation animale en faveur de systèmes biosynthétiques (Bourgine et al., 2018). Il reste tout de même difficile de récapituler la complexité du système hématopoïétique « vivant » par des modèles *in vitro*.

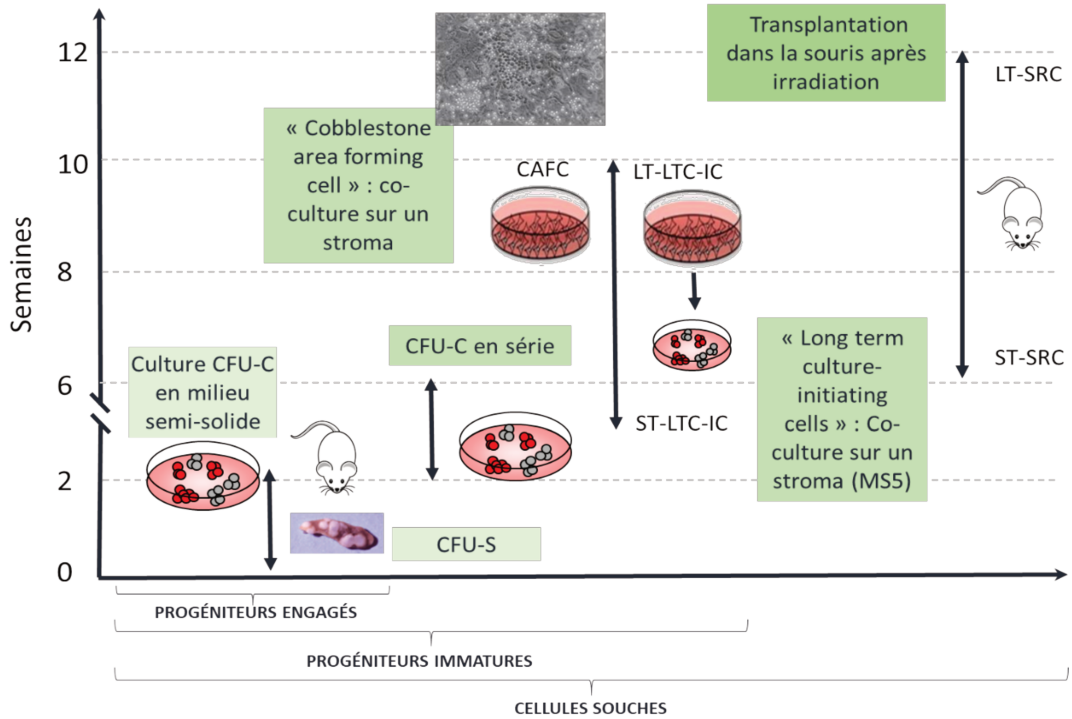


Figure 4 : Résumé des tests fonctionnels utilisés pour la caractérisation des CSPH

b. Description phénotypique

L'avènement de la cytométrie en flux a permis l'exploitation de l'expression de protéines à la surface des cellules comme marqueurs de populations enrichies en CSH. Si de nos jours il n'est toujours pas possible d'isoler une population pure de CSH par cette méthode, elle permet néanmoins d'obtenir des fractions enrichies en cellules possédant les propriétés fonctionnelles des CSH.

i. Les CSH murines

La caractérisation phénotypique des CSH murines a été faite en grande partie grâce à l'équipe d'Irvin Weissmann. La première isolation des CSH s'est faite grâce à l'absence des marqueurs de surface spécifiques d'un lignage déjà différencié (Lin^-, comprenant notamment l'absence des marqueurs CD11b, CD49b, Ly6C/G, CD3, CD4, CD8, CD19, B220) et de la présence des protéines THY1.1 (thymocyte differentiation antigen 1.1) (CD90.1), SCA1 (stem cell antigen 1) (Spangrude et al., 1988) et cKIT (receptor tyrokine kinase) (Ikuta and Weissman, 1992; Okada et al., 1991). L'expression de THY1 a progressivement été perdue, les profils d'expression étant différents selon les fonds génétiques de souris utilisés, et la population résultante est communément appelée LSK pour $Lin^-SCA1^+cKIT^+$. Par la suite, l'absence du CD34 a été ajoutée (Ema et al., 2005; Osawa et al., 1996), correspondant à environ 10% des cellules LSK, puis celle du Flt3 ou Flk2 (fetal liver kinase 2) (Christensen and Weissman, 2001). En effet, les cellules possédant ce marqueur sont quasiment dépourvues de capacités de clonogénicité *in vitro* et *in vivo* (CFU-C et CFU-S) ainsi que de reconstitution hématopoïétique à long-terme. C'est en 2005 que les marqueurs SLAM (signaling lymphocytic activation molecule) ont commencé à être utilisés

pour identifier une population encore plus enrichie en cellules souches, notamment grâce à la présence du CD150 et l'absence du CD48 (Kiel et al., 2005a). Actuellement, la population enrichie en CSH murines majoritairement utilisée est donc caractérisée par un phénotype de surface LSK/CD150$^+$CD48$^-$Flt3$^-$CD34$^-$ (Figure 5). Cette population contiendrait jusqu'à 25% de CSH. Cependant, l'expression de ces marqueurs n'est pas toujours une donnée fiable pour déterminer la fonctionnalité des CSH. Par exemple, l'expression du marqueur cKit est diminuée lors de stress comme la culture, la chimiothérapie ou l'irradiation, et ne permet alors pas la purification de CSH conservant des propriétés fonctionnelles. Ainsi, de nouveaux marqueurs des CSH, plus robustes, peuvent être utilisés en remplacement ou complément, comme l'EPCR (endothelial protein C receptor) (Rabe et al., 2020; Umemoto et al., 2018)

Il est intéressant de souligner que le débat reste ouvert sur la nomenclature des différentes populations de progéniteurs, dont l'expression des différents marqueurs de surface présentés dans le paragraphe précédent varie en fonction de la différenciation progressive (Morita et al., 2010; Oguro et al., 2013; Pietras et al., 2015; Wilson et al., 2008). Ainsi, certains groupes dénominent la population LSK/CD150$^+$CD48$^-$CD34$^+$ comme des CSH « court-terme » (ST-HSC pour short-term hematopoietic stem cells), ayant une capacité d'auto-renouvèlement réduite par rapport aux CSH « long-terme » (LT-HSC pour long-term hematopoietic stem cells) à la capacité d'auto-renouvèlement a priori infinie et n'exprimant pas le CD34. Des CSH « intermédiaires » ont également été proposées (Benveniste et al., 2010). A l'inverse, d'autres équipes considèrent ces cellules comme des MPP, étant donné que la notion d'auto-renouvèlement limité dans le temps semble contradictoire avec la définition même de la CSH. Selon les écoles, la subdivision en différentes populations de MPP se fait ensuite au sein de la population LSK selon l'expression de différents marqueurs de surface, et en particulier CD150, CD48 et Flt3. Les MPP3 et 4, tout en restant multipotents, sont fortement biaisés respectivement vers la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde (Pietras et al., 2015).

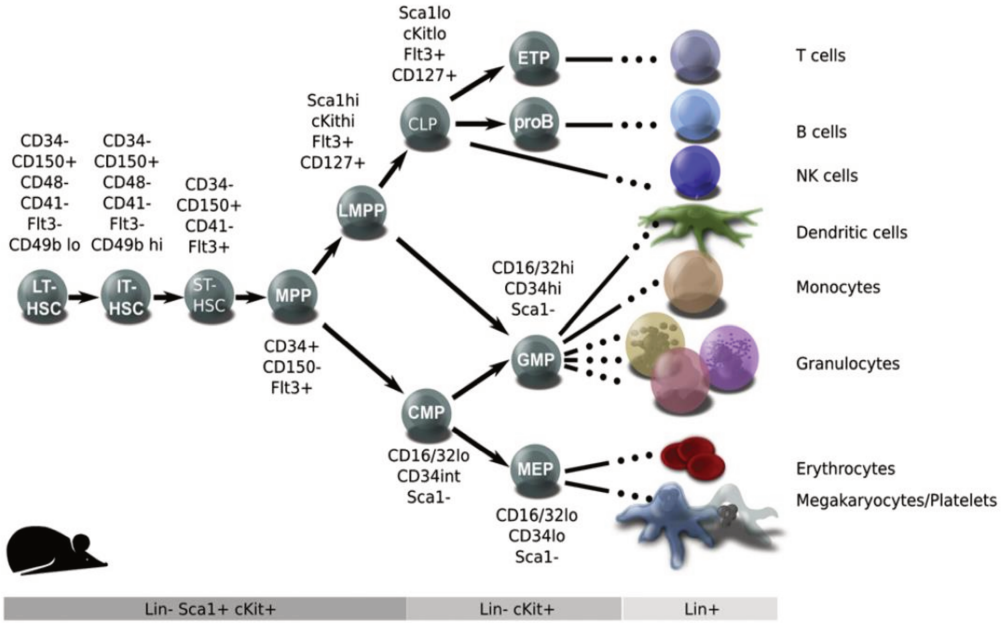


Figure 5 : Arbre hématopoïétique murin et marqueurs des CSPH

Tiré de Doulatov et al., 2012

Enfin, de nouvelles caractéristiques phénotypiques sont étudiées pour purifier encore les fractions de cellules enrichies en « vraies » CSH. Celles-ci sont par exemple liées à la « dormance » ou à l'état métabolique. En effet, il a très tôt été montré que les CSH possédant les capacités d'auto-renouvèlement et de multipotence les plus fortes semblent se concentrer dans les fractions de cellules se divisant le moins (Spangrude and Johnson, 1990). Cela a été confirmé à plusieurs reprises (Passegué et al., 2005; Wilson et al., 2008), et ce malgré des études contradictoires montrant que les CSH ne retenaient pas le BrDU (Kiel et al., 2007). Il semble en effet que seule une petite portion des CSH isolées grâce aux marqueurs de surface présente ces propriétés de dormance. Ces cellules dormantes sont ainsi phénotypiquement indistinctes : en effet, il n'existe pas de différence entre des CSH se divisant très peu (une fois tous les 145 jours) et se divisant plus régulièrement (une fois par mois) (Wilson et al., 2008). Aujourd'hui, des modèles encodés génétiquement comme H2B-GFP (histone 2B couplée à la green fluorescent protein) ou GPRC5C-EGFP (G protein coupled receptor family C group 5 member C couplée à la enhanced green fluorescent protein) permettent de mieux identifier ces populations (Cabezas-Wallscheid et al., 2017; Foudi et al., 2009; Wilson et al., 2008). Une autre manière d'isoler des CSH est de s'appuyer sur la « Side Population » (SP) en cytométrie en flux, caractérisée par l'efflux plus important du Hoescht 33342 (Goodell et al., 1996, 1997; Rossi et al., 2011). En combinaison avec certains marqueurs de surface (LSK/CD34$^+$), la transplantation de cellules uniques purifiées avec cette méthode a permis d'obtenir une prise de greffe à long terme (12 semaines) dans 96% des souris receveuses (Matsuzaki et al., 2004).

ii. Les CSH humaines

Le premier marqueur à avoir été isolé pour purifier les CSH humaines avec des capacités de prise de greffe est le marqueur CD34 identifié par l'anticorps monoclonal MY10 (Civin et al., 1984), rapidement utilisé en clinique (Krause et al., 1996). Cette population contient des progéniteurs et des cellules souches et est présente dans tous les réservoirs de CSH (foie fœtal, sang de cordon ombilical, moelle osseuse). De la même manière que chez la souris, ces cellules sont majoritairement dépourvues de marqueurs de lignage (Lin$^-$). Par la suite, une deuxième protéine de surface a été mise en évidence en tant que marqueur de la population souche, le CD90 ou THY1. Son expression, bien que faible, corrèle avec une augmentation significative du pourcentage de reconstitution hématopoïétique en souris NOD/SCID. Cette population Lin$^-$CD34$^+$CD90$^+$ contient moins de 1% des cellules de sang de cordon ombilical, de moelle osseuse adulte et de foie fœtal voire moins de 0,1% des cellules de la moelle osseuse fœtale, mais ces cellules possèdent des capacités fonctionnelles de clonogénicité importantes, évaluées par tests *in vitro* (Baum et al., 1992; Craig et al., 1993). Ces résultats ont également été confirmés *in vivo* par d'autres équipes en modèle murin immunodéficient (Murray et al., 1995; Péault et al., 1993). En parallèle, des études ont remarqué que la faible expression du CD38 était corrélée à l'immaturité des cellules CD34$^+$ (Bhatia et al., 1997; Hao et al., 1995). Enfin, c'est en 2007 que le phénotype des CSH le plus couramment utilisé aujourd'hui est établi : Lin$^-$CD34$^+$CD38$^{low/-}$CD45RA$^-$CD90$^+$ (Majeti et al., 2007). En particulier, l'expression des marqueurs CD45RA et CD90 permet de différencier les CSH des MPP chez l'homme. L'enrichissement en CSH dans cette fraction est estimé à 1/10 pour le sang de cordon ombilical, dans un modèle *in vivo* de transplantation en série en nouveau-né NOG,

variante du modèle NSG présentant une mutation sur le gène *Il2rg*. Ces marqueurs sont aujourd'hui la référence pour la purification des CSH (Figure 6).

Cependant, une recherche continuelle pour l'amélioration de la pureté des fractions isolées a toujours lieu. Quelques marqueurs ont ainsi été ajoutés à ce panel, comme le CD49f (Notta et al., 2011), le CD133 (Radtke et al., 2015), CLEC9A (C-type lectin domain family 9 member A) (Belluschi et al., 2018) ou l'EPCR comme chez la souris (Fares et al., 2017; Martin and Park, 2017). Ce marqueur semble par ailleurs avoir des propriétés fonctionnelles importantes pour les CSH (Gur-Cohen et al., 2015). Ces marqueurs sont notamment utiles lorsque la purification des CSH par la méthode habituelle n'est pas possible. En particulier, il a été démontré que certaines conditions de culture induisent un biais dans l'expression du CD38, qui ne corrèle alors plus avec la fonctionnalité des CSH (Dorrell et al., 2000; von Laer et al., 2000). Pour éviter d'utiliser ce marqueur peu fiable, l'addition de plusieurs autres antigènes peut permettre un meilleur suivi des CSH par cytométrie en flux au cours d'une culture. Enfin, la technique de la « Side Population » est également applicable aux CSH humaines (Brunet de la Grange et al., 2013).

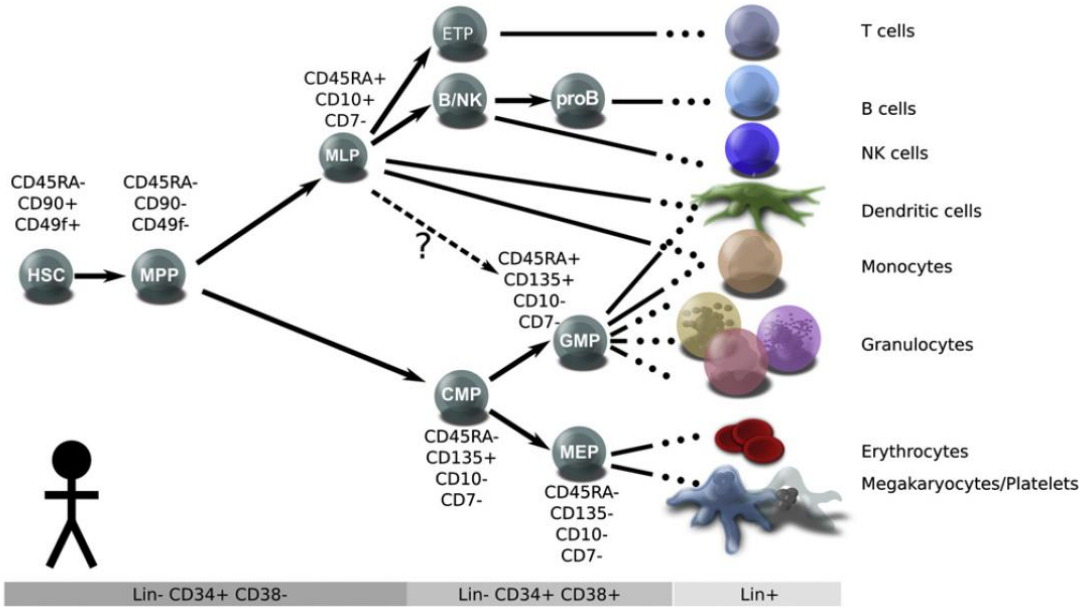


Figure 6 : Arbre hématopoïétique humain et marqueurs des CSPH

Tiré de Doulatov et al., 2012

c. Actualités sur la caractérisation des CSH et l'arbre hématopoïétique

Récemment, suite à la démocratisation des techniques de type single-cell RNASeq, les dogmes concernant les CSH commencent à être questionnés (pour revue Cheng et al., 2020; Jacobsen and Nerlov, 2019; Laurenti and Göttgens, 2018).

En particulier, de nombreuses études en cellule unique ont permis de mettre en lumière une certaine hétérogénéité dans la population qualifiée de CSH. Notamment, il existerait des cellules capables de s'auto-renouveler et conservant une multipotence virtuelle, mais déjà engagées dans une

voie préférentielle de différenciation. Ce phénomène est connu depuis les années 2000 grâce à un travail de transplantation en série qui a révélé des biais lymphoïdes ou myéloïdes dans des populations de CSH s'auto-renouvelant à long-terme (Dykstra et al., 2007; Muller-Sieburg et al., 2004). Des CSH biaisées vers le lignage mégacaryocytaire ont également pu être isolées (Carrelha et al., 2018; Haas et al., 2015; Rodriguez-Fraticelli et al., 2018; Sanjuan-Pla et al., 2013; Yamamoto et al., 2013). L'hétérogénéité observée ne semble par ailleurs pas être aléatoire car elle peut se propager lors de transplantations en série, indiquant une programmation intrinsèque des CSH vers un lignage particulier (Dykstra et al., 2007; Muller-Sieburg et al., 2002), potentiellement due à une régulation épigénétique (Yu et al., 2016). Les mécanismes régulant ces biais de différenciation ne sont cependant pas complètement élucidés, même si des études transcriptomiques à l'échelle de la cellule unique permettent désormais de mieux caractériser ces populations de CSH distinctes (pour revue Jacobsen and Nerlov, 2019 ; Pei et al., 2020).

Néanmoins, il faut garder à l'esprit que des expériences de transplantation en cellule unique sont extrêmement difficiles à réaliser et que l'hématopoïèse de stress induite par les modèles de transplantation en série ne peut pas donner une appréciation exacte de l'hématopoïèse basale en condition physiologique. Ainsi, l'étude des CSH se fait depuis des décennies dans des modèles de transplantation qui ne miment pas les conditions normales de différenciation, d'expansion et d'auto-renouvellement des CSH. Il est donc difficile de savoir ce que fait réellement une CSH lorsqu'elle n'est pas contrainte à une prolifération et une différenciation vers tous les lignages dans le cadre d'une transplantation et de faire la différence entre son potentiel et son destin réel. L'émergence de nouvelles techniques de barcoding *in situ* ouvre de nouvelles portes à l'étude de l'hématopoïèse à l'état basal. Des équipes ont ainsi étudié l'hématopoïèse à l'état d'équilibre grâce à différents modèles génétiques permettant le suivi de la progénie des CSH *in vivo*. Plusieurs équipes ont ainsi montré qu'à l'âge adulte, les CSH ne participent que très peu à l'hématopoïèse, les cellules matures générées provenant principalement des MPP ou des CSH « court-terme » (Busch et al., 2015; Sun et al., 2014). Les CSH « long-terme » n'interviendraient que très tôt dans la vie d'un individu, pendant le stade fœtal et juste après la naissance (Pei et al., 2017). De façon contradictoire, d'autres équipes ont rapporté une contribution importante des CSH « long-terme » à tous les lignages hématopoïétiques (Sawai et al., 2016; Säwen et al., 2018). Cet apparent paradoxe pourrait être dû aux différences dans les modèles génétiques utilisés et ne permet pas de tirer une conclusion absolue sur la contribution des CSH à l'hématopoïèse en conditions basales.

Par ailleurs, un autre axe de réflexion est la notion de continuité dans la différenciation hématopoïétique. Ainsi, le modèle classique des branches, où l'acquisition ou la perte de certains marqueurs permet de dessiner des catégories aux frontières bien définies et aux propriétés différentes, ne représenterait pas fidèlement la réalité de la différenciation hématopoïétique. Celle-ci se ferait plutôt selon un continuum progressif, dont la linéarité n'est pas certaine, générant un ensemble assez hétérogène (Figure 7 et pour revue Cheng et al., 2020; Laurenti and Göttgens, 2018).

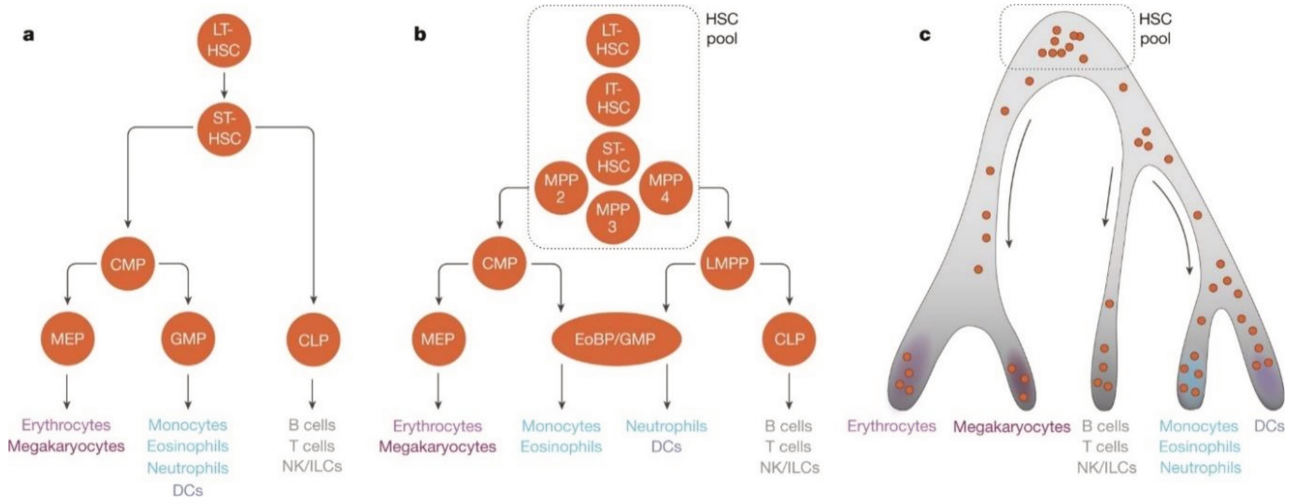


Figure 7 : Différentes vues de l'arbre hématopoïétique selon les époques

a. Arbre hématopoïétique « classique », décrit depuis plus d'une vingtaine d'année, établissant une ségrégation claire entre les lignées lymphoïde et myéloïde.
b. Arbre hématopoïétique revisité par l'introduction de plusieurs populations intermédiaires au potentiel plus large
c. Arbre hématopoïétique « continu » : les séparations sont moins nettes entre les populations et l'hypothèse de l'hétérogénéité au sein des populations est abordée

Tiré de Laurenti and Göttgens, 2018

d. Microenvironnement et régulation des propriétés de la CSH

Pour maintenir leurs propriétés fondamentales de quiescence et d'auto-renouvèlement, les cellules souches hématopoïétiques ont besoin d'un microenvironnement très particulier : la niche hématopoïétique. En condition physiologique, les CSH y sont maintenues quiescentes et indifférenciées mais peuvent également s'activer en cas de besoin (hémorragie, infection), selon les signaux qu'elles reçoivent.

i. La niche hématopoïétique : composants cellulaires et non-cellulaires

Les premières expériences ayant montré que la MO aurait une fonction essentielle sur le maintien et la différenciation des CSH remontent aux années 1970 (Trentin, 1971; Wolf and Trentin, 1968). Les cellules stromales issues de la MO permettent en effet de supporter la différenciation des CSH. Schofield, dans un article publié en 1978, propose alors que les CFU-S ne peuvent conserver leurs propriétés de cellules souches dans l'environnement de la rate, au contraire de la MO (Schofield, 1978). C'est la première introduction du concept de **niche hématopoïétique**. Cependant, jusqu'aux années 2000, la structure exacte de ce microenvironnement est restée assez obscure. Elle est aujourd'hui de mieux en mieux caractérisée (Figure 8) (pour revue Morrison and Scadden, 2014; Pinho and Frenette, 2019; Wei and Frenette, 2018).

Les CSH se trouvent majoritairement dans la moelle osseuse dite « rouge », principalement à l'intérieur des os longs ou plats comme le fémur ou le bassin chez la souris, et dans les os du crâne, de la cage thoracique, du bassin et de la colonne vertébrale chez l'homme, sauf chez le jeune enfant où une grande majorité des os sont concernés. La MO est un tissu très hétérogène comportant de nombreux types cellulaires de différents lignages ainsi que des composants non cellulaires, comme la matrice extracellulaire ainsi que des facteurs de croissances, cytokines, etc. Dans cette MO se trouvent des microenvironnements très particuliers appelés niches, qui récapitulent un certain nombre de propriétés leurs permettant de maintenir les CSH dans leur état de quiescence. De nombreuses études ont étudié la niche hématopoïétique murine, contrairement à la niche hématopoïétique humaine, cependant un certain nombre de propriétés semblent partagées par ces deux microenvironnements (van Pel et al., 2016). Au sein de la MO, différents types cellulaires et composants non-cellulaires peuvent participer au maintien d'un certain nombre de propriétés de la CSH (Figure 8).

Les ostéoblastes

Les cellules présentes à la surface de la matrice osseuse, notamment les ostéoblastes, ont très vite été identifiées comme des composants de la niche (Calvi et al., 2003). Leur rôle pourrait être lié à une signalisation via la production de thrombopoïétine (Yoshihara et al., 2007). Par ailleurs, la signalisation via l'hormone parathyroïde (PTH) impliqué dans la différenciation ostéoblastique (Zhang et al., 2003), ou l'inactivation de gènes tels que *Bmpria* (bone morphogenic protein receptor type 1A) (Visnjic et al., 2004) impliquent une augmentation du nombre d'ostéoblastes qui induit une expansion des CSH *in vivo*. Cet effet serait médié par l'interaction des CSH avec la molécule d'adhésion N-cadhérine. De plus, les ostéoblastes permettent un maintien des CSH *in vitro* (Taichman et al., 1996). Les ostéoclastes semblent aussi impliqués dans la construction de la niche via la régulation de la différenciation ostéoblastique (Mansour et al., 2012). Cependant, le rôle des ostéoblastes reste controversé, plusieurs études ayant montré que leur déplétion n'induisait pas d'effet sur le nombre de CSH (Kiel et al., 2007; Zhu et al., 2007). De la même façon, une augmentation du nombre d'ostéoblastes n'a pas plus d'impact sur le nombre de CSH (Lymperi et al., 2008). Enfin, plusieurs équipes ont montré que les CSH n'étaient pas nécessairement localisées à proximité des ostéoblastes (Nombela-Arrieta et al., 2013), indiquant que l'effet de ces cellules, s'il existe, est probablement indirect.

Les cellules stromales mésenchymateuses et cellules périvasculaires

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM), caractérisées par leurs capacités de différenciation en trois lignages distincts (adipocytaire, ostéogénique et chondrogénique) sont des acteurs majeurs de la niche. Différentes populations isolées à partir de MO adulte ou fœtale et purifiées entre autres grâce aux marqueurs CD146, CD105 et CD51 ont en effet permis la génération de niches ectopiques permettant le recrutement de cellules endothéliales et hématopoïétiques, sous la peau (Sacchetti et al., 2007) et au niveau de la capsule rénale (Chan et al., 2009). D'autres études s'appuyant sur un marquage Nestin-GFP, caractérisant des CSM périvasculaires, sont venues préciser ces données (Acar et al., 2015; Kunisaki et al., 2013; Méndez-Ferrer et al., 2010). En particulier, les cellules exprimant le plus ce marqueur, plus rares, semblent être les plus proches des CSH *in vivo*. Par ailleurs, des sous-types de cellules possédant un potentiel mésenchymateux (adipo-ostéogénique), recoupant partiellement la population Nestin$^+$ comme les cellules réticulées abondantes en CXCL12 (CXC motif chemokine ligand 12) ou CAR pour CXCL12-abundant reticular cells, ou les cellules exprimant le récepteur à la leptine LEPR$^+$ (leptine receptor) se sont révélées fondamentales pour la régulation des

CSH dans la niche (Ding et al., 2012; Omatsu et al., 2010; Zhou et al., 2014). Ces cellules expriment deux facteurs indispensables au maintien des CSH dans la niche, le CXCL12, qui se lie au récepteur CXCR4 (CXC motif chemokine receptor 4) présent sur les CSH (Sugiyama et al., 2006) et le SCF, ligand de cKIT. Cependant, la suppression de l'expression de CXCL12 dans les CSM exprimant LEPR par un système Cre n'induit pas de différence dans le nombre de CSH. En revanche, cette même suppression dans des CSM plus rares exprimant NG2 (neural/glial antigen 2) (Asada et al., 2017) ou PRDX1 (Greenbaum et al., 2013) induit une déplétion des CSH dans la moelle osseuse. L'ensemble de ces études démontre que différents types de CSM et de cellules périvasculaires peuvent contribuer différentiellement au sein de la (ou des) niches hématopoïétiques. Enfin, d'autres cellules différenciées à partir des CSM comme les adipocytes peuvent également jouer un rôle dans la niche hématopoïétique. Le nombre de CSH est en effet moins important dans les zones les plus riches en adipocytes ; de plus la sécrétion d'adiponectine semble avoir un impact négatif sur les CSH (Naveiras et al., 2009).

Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales, notamment celles présentes au niveau de l'endothélium vasculaire, sont aussi impliquées dans le maintien des CSH. Ce constat est cohérent avec la différenciation hématopoïétique primaire à partir de l'endothélium au niveau de l'embryon. Tout comme les ostéoblastes, les cellules endothéliales permettent le maintien *ex vivo* en culture des CSH (Chute et al., 2006). De plus, elles expriment la molécule d'adhésion E-selectin, qui permet le maintien des CSH dans la niche grâce à l'interaction avec plusieurs ligands, par exemple CD44 ou ESL1 (E-selectin ligand 1) (Winkler et al., 2012) ; ainsi que VCAM1 (vascular cell adhesion protein 1), interagissant avec VLA4 (very late antigen 4) sur les CSH (Papayannopoulou et al., 1995). Les cellules endothéliales participent également au maintien des CSH via la sécrétion de SCF (Ding et al., 2012) et de CXCL12 (Ding and Morrison, 2013). La supression de l'expression de ces facteurs spécifiquement dans les cellules endothéliales induit en effet une diminution du nombre de CSH, même si celle-ci est moindre que dans le cas des cellules stromales périvasculaires.

Les cellules hématopoïétiques différenciées

Certaines cellules hématopoïétiques différenciées sont très importantes pour la régulation des CSH au sein de la niche. En particulier, plusieurs études ont démontré l'implication des mégacaryocytes. Leur déplétion induit la prolifération des CSH et il a été montré qu'ils régulent directement la quiescence des CSH, via la sécrétion de plusieurs facteurs : CXCL4 (Bruns et al., 2014), TGFβ (transforming growth factor beta) (Zhao et al., 2014), et TPO (Nakamura et al., 2012). Il a également été montré que les cellules myéloïdes participent à la rétention des CSH dans la niche. C'est en particulier vrai pour les macrophages (Chow et al., 2011; Winkler et al., 2012). En effet, la déplétion des macrophages exprimant le CD169 induit une mobilisation des CSH dans la circulation sanguine. Les monocytes et les neutrophiles jouent quant à eux un rôle dans la régulation des CSH via la signalisation par le G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) et la sécrétion de prostaglandine E2 (PGE2) (Christopher et al., 2011; Kawano et al., 2017).

Cellules neurales

Des cellules neurales peuvent également être impliquées dans les propriétés de la niche (pour revue Fielding and Méndez-Ferrer, 2020). La MO est en effet innervée par le système nerveux sympathique qui est impliqué dans la régulation des CSH, en particulier lors de la mobilisation par le G-CSF (Katayama et al., 2006; pour revue Maryanovich et al., 2018) et par les cellules de Schwann via une

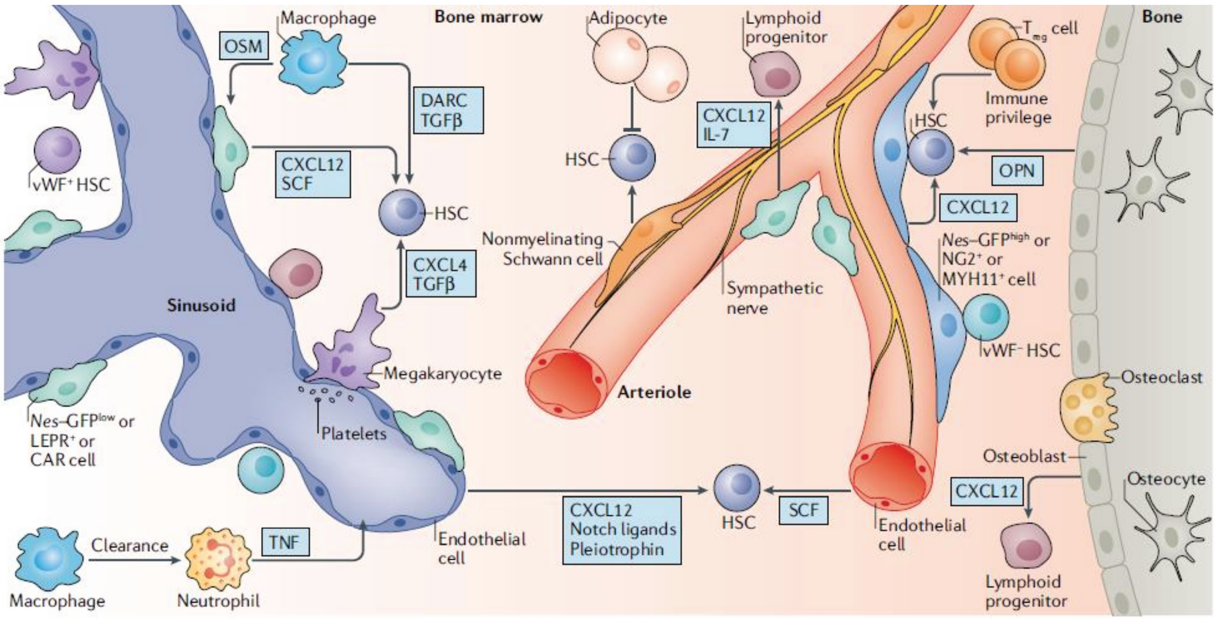
signalisation par le TGFβ (Yamazaki et al., 2011). Une autre preuve de la communication entre le système nerveux et la niche hématopoïétique est la régulation de la mobilisation sanguine des CSH par le rythme circadien (Méndez-Ferrer et al., 2008; pour revue Méndez-Ferrer et al., 2009).

Composants non-cellulaires

Certaines protéines importantes pour la régulation des CSH dans la niche sont exprimées par plusieurs des types cellulaires présentés. Par exemple, CXCL12 et SCF, déjà introduits précédemment, sont exprimés par différents sous-types de CSM. La famille des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF pour fibroblast growth factor) est aussi impliquée, ces facteurs étant sécrétés par les mégacaryocytes et différentes cellules stromales. On peut citer également JAMB, ligand de JAMC, exprimé par les cellules endothéliales, les ostéoblastes et les CSM et qui est fondamental pour le maintien des CSH dans la niche (Arcangeli et al., 2011). D'autres facteurs comme l'angiopoïétine (Arai et al., 2004), le TGFβ (précédemment cité et Yamazaki et al., 2009), ou le BMP4 (bone morphogenic protein 4), qui régule à la fois le nombre et la fonction des CSH dans le microenvironnement (Goldman et al., 2009) ont aussi été étudiées pour leur implication dans la niche hématopoïétique. Très récemment, le rôle des BMP sur l'auto-renouvèlement des CSH a été confirmé (Warsi et al., 2020). D'autres types de molécules sont également importants dans la régulation des CSH au sein de la niche, comme les ions Ca^{2+}. Il a en effet été montré que la concentration extracellulaire d'ions calcium était détectée par les CSH grâce aux récepteurs au calcium CaR (calcium-sensing receptor) et que cette signalisation était fondamentale pour le maintien des CSH dans la niche (Adams et al., 2006). Une étude plus récente a par ailleurs démontré que les CSH arboraient un faible taux de calcium intracellulaire obtenu grâce à un efflux important par les pompes à calcium (Luchsinger et al., 2019).

Pour terminer concernant les facteurs non-cellulaires, de nombreux constituants de la matrice extracellulaire, collagène, fibronectine, laminine ou encore ostéopontine permettent l'adhésion des CSH grâce à l'interaction avec différentes intégrines présentes à la surface des CSH (Nilsson et al., 1998). D'autres molécules comme l'acide hyaluronique sont aussi impliquées dans le nichage et le maintien des CSH, notamment grâce à sa liaison avec la protéine CD44 (Avigdor et al., 2004).

Compte-tenu de tous ces résultats, la situation exacte de la niche hématopoïétique dans la MO ainsi que l'implication précise des différents types de cellules citées reste débattue au sein de la communauté scientifique, notamment concernant la différence entre les zone endostéales, principalement composées d'ostéoblastes, et péri-vasculaires ou sinusoïdales, constituée plutôt de cellules stromales et endothéliales (pour revue Kiel and Morrison, 2008). Néanmoins, chez l'homme, il a été montré que les CSH localisées dans la partie endostéale de la zone trabéculaire osseuse avaient un potentiel de reconstitution supérieur (Guezguez et al., 2013). Il se pourrait également que les CSH se situent dans des zones associant ces deux caractéristiques (Lo Celso et al., 2009). Par ailleurs, malgré les différences anatomiques des différents os et la nature spatialement hétérogène de la MO, il a été montré que toutes les CSH issues de ce microenvironnement semblent partager les mêmes propriétés : fonctions, phénotype, transcriptome (Kiel et al., 2005b).



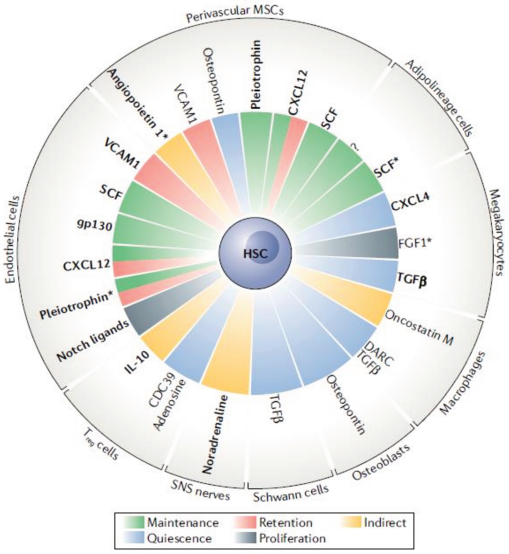


Figure 8 : Composants cellulaires et non-cellulaires de la niche hématopoïétique

Différents types cellulaires constituent la niche hématopoïétique, à proximité des sinusoïdes, des artérioles et/ou de l'endosteum. Les facteurs sécrétés ou exprimés par ces cellules permettent la régulation de différentes propriétés des CSH : rétention dans la niche, quiescence, prolifération…

Adapté de Pinho and Frenette, 2019

Ce constat n'est cependant pas partagé par des études plus récentes, utilisant notamment des techniques d'imagerie 3D, qui suggèrent que différents types de niches hématopoïétiques pourraient abriter des populations distinctes de CSH (Itkin et al., 2016; Kunisaki et al., 2013; Pinho et al., 2018). On ne parlerait donc plus d'une niche mais de niches hématopoïétiques. Par exemple, la zone endostéale pourrait être un lieu important de nichage et plus particulièrement après irradiation (Lévesque et al., 2010; Xie et al., 2009), tandis que la zone périvasculaire pourrait être davantage une zone de « trafic » entre la circulation et la moelle osseuse, contenant une population de CSH activées en prolifération (Itkin et al., 2016) (Figure 9). Cela corrèlerait également avec la vision actuelle d'une hétérogénéité dans la population des CSH.

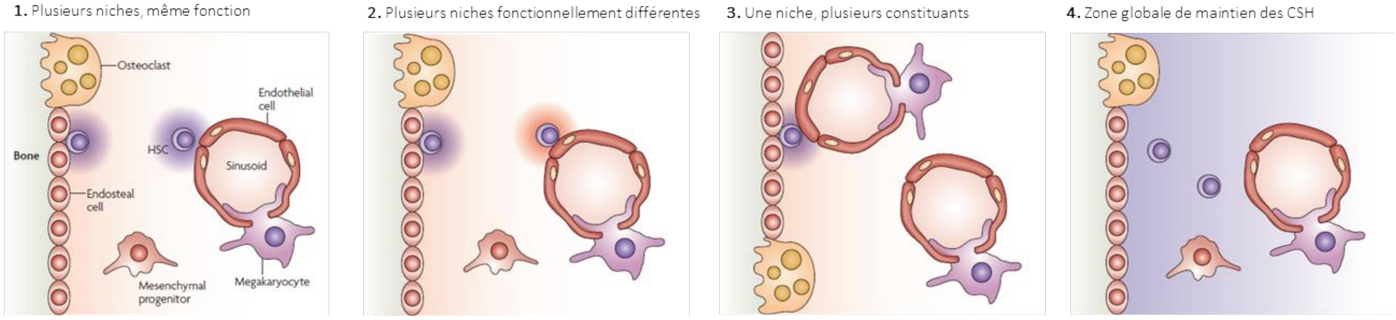


Figure 9 : Différentes hypothèses concernant la ou les niche(s) hématopoïétique(s)

Adapté de Kiel and Morrison, 2008

ii. Niche et hypoxie

Une caractéristique majeure de la (ou des) niche(s) hématopoïétique(s) est son caractère hypoxique (pour revue Morikawa and Takubo, 2016). Le terme « **hypoxie** » fait référence au pourcentage d'oxygène dans l'air, de 21%, considéré comme normoxique, mais peut également s'appliquer vis-à-vis d'autres tissus du corps humain. La saturation en oxygène de la MO est en effet particulièrement faible, comparée par exemple au sang périphérique (Harrison et al., 2002). Grâce à des simulations mathématiques, Chow *et al.* ont proposé un modèle de gradients d'oxygène dans la MO et ont postulé que les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques se situent dans les zones les moins riches en oxygène (Chow et al., 2001a, 2001b). Les CSH au plus fort potentiel de reconstitution hématopoïétique sont localisées dans les zones de la MO les moins irriguées en oxygène, identifiées grâce à la perfusion moindre en marqueur Hoescht (Parmar et al., 2007; Winkler et al., 2010). Ces cellules apparaissent positives lors du marquage au pimonidazole, caractéristique de l'hypoxie (Parmar et al., 2007; Takubo et al., 2010). Par ailleurs, les CSH au potentiel de reconstitution le plus fort présentent également le taux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) le plus bas (Jang and Sharkis, 2007) et un potentiel mitochondrial faible (Simsek et al., 2010). Ces deux caractéristiques corrèlent avec une localisation dans un environnement hypoxique. Nous reparlerons plus en détails de ces deux spécificités dans le chapitre 2. Il est important de préciser que cette hypoxie est physiologique, contrairement à la baisse de la saturation en oxygène lors d'ischémie par exemple. L'utilisation du terme hypoxie est d'ailleurs débattue, certains lui préférant le terme de normoxie puisqu'il s'agit de l'état « normal » de la MO, et caractérisant d'hyperoxiques des conditions à plus fort pourcentage d'oxygène (culture *ex vivo* à l'air libre par exemple) (pour revue Ivanovic, 2009).

L'hypoxie régule le devenir des CSH principalement par la stabilisation des facteurs inductibles par l'hypoxie, ou HIF (hypoxia inducible factor). Ces protéines sont des hétérodimères composés de deux unités. L'unité α est un senseur de l'hypoxie, dégradé dans le cytosol en conditions non hypoxiques. En hypoxie, l'unité α se dimérise avec l'unité β, ce qui permet la stabilisation de la protéine et sa translocation dans le noyau où elle agit en tant que facteur de transcription après reconnaissance des séquences de réponse à l'hypoxie (HRE pour hypoxia response element) dans les promoteurs des gènes cibles (Figure 10). Trois formes de l'unité α ont été identifiées, HIF1α, HIF2α, et HIF3α. HIF1α

semble être la forme majoritairement retrouvée dans les tissus et la plus active (Wenger, 2002). La stabilisation d'HIF1α est ainsi considérée comme un marqueur de l'hypoxie.

HIF1 régule la transcription de nombreux gènes codant des protéines impliquées par exemple dans le métabolisme du glucose (GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphatedeshydrogenase), GLUT1 (glucose transporter type 1), LDHA (lactate dehydrogenase), PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1)), l'érythropoïèse (érythropoïétine, transferrine), ou la régulation vasculaire (VEGF (vascular endothelial growth factor 1) et ses récepteurs par exemple) (pour revue Semenza, 2010). Dans les CSH murines, il a été montré que les facteurs HIF et en particulier HIF1 jouent un rôle fondamental pour le maintien de leurs propriétés, à la fois au stade embryonnaire et à l'âge adulte (pour revue Imanirad and Dzierzak, 2013). En particulier, dans les CSH adultes, la délétion bi-allélique conditionnelle de HIF1 dans les cellules hématopoïétiques ne provoque pas d'effet majeur *in vitro* mais induit une perte de l'auto-renouvèlement, observée grâce à des transplantations en série (Takubo et al., 2010). Cet effet est médié par $p16^{Ink4a}$, impliqué dans la sénescence des cellules. Par ailleurs, à ce jour deux cibles de HIF1 ont principalement été identifiées chez les CSH murines. La première est le gène *Vegfa*, codant la protéine VEGFα. Une signalisation intracrine par cette protéine est absolument nécessaire au maintien du nombre et des capacités clonogéniques et de reconstitution des CSH (Gerber et al., 2002). De plus, elle est impliquée dans la construction de la niche ostéoblastique (Chan et al., 2009). Rehn *et al.* ont conçu un modèle génétique dans lequel le site HRE de *Vegfa* était muté afin de prévenir la liaison d'HIF et donc la régulation de l'expression de *Vegfa* par l'hypoxie (Rehn et al., 2011). Il en résulte différents phénotypes : létalité pré-natale partielle, anémie, défauts d'ossification dans la niche. Concernant les CSH, leur fréquence est accrue mais leurs capacités de reconstitution hématopoïétique sont sévèrement réduites en modèle de transplantation en compétition. Enfin, d'autres acteurs que l'hypoxie peuvent également avoir un impact sur les CSH via une stabilisation de HIF1 et une transcription accrue de *Vefga*, comme la présence de facteurs de croissance tels que la TPO (Kirito et al., 2005). La perte de la régulation de l'expression de VEGFα par l'hypoxie a dont un impact majeur sur les fonctions des CSH.

La régulation par l'hypoxie et HIF du couple CRIPTO-GRP78 (glucose regulated protein 78) est également bien caractérisée dans les CSH (Miharada et al., 2011, 2012). Les cellules positives pour ce récepteur GRP78 se trouvent en effet dans la niche endostéale, ont un marquage au pimonidazole moins important et un plus faible potentiel mitochondrial, ce qui est caractéristique de l'hypoxie. Dans cette niche, CRIPTO, le ligand de GRP78, est exprimé. Enfin, la délétion de HIF1α a un impact majeur sur ce couple, puisqu'il diminue la fréquence des CSH positives pour GRP78 ainsi que l'expression de CRIPTO, indiquant une régulation par l'hypoxie.

Chez l'homme néanmoins, Rouault-Pierre *et al* ont montré que HIF2 jouait un rôle beaucoup plus important que HIF1 pour le maintien des CSH (Rouault-Pierre et al., 2013). En effets, les auteurs démontrent qu'une sous-expression de HIF2α induit une diminution du nombre de colonies érythroïdes générées *in vitro* ainsi qu'une plus forte perte du potentiel de reconstitution hématopoïétique *in vivo* à court et à long terme en souris NSG. D'après le transcriptome des cellules HIF2α, cet effet est dû à une augmentation du stress oxydant et de l'apoptose et à des défauts mitochondriaux.

Ainsi, l'hypoxie est un composant fondamental permettant le maintien des CSH. Ce facteur est très finement lié au métabolisme des CSH, dont nous reparlerons en détails dans le chapitre 2.

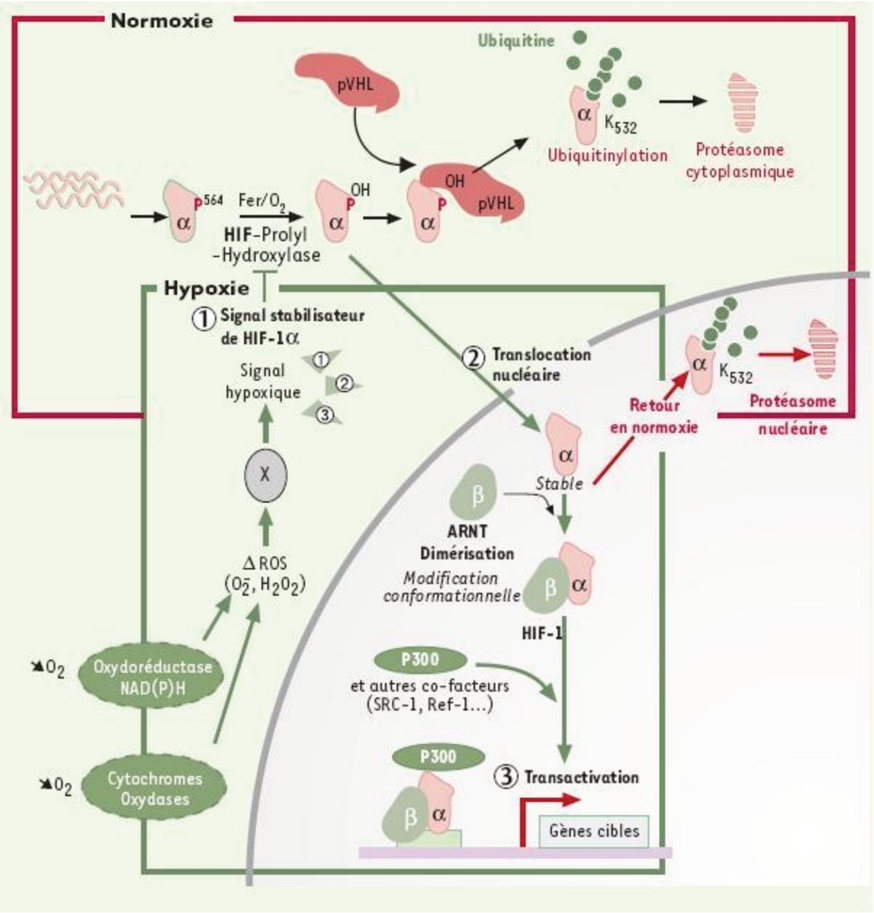


Figure 10 : HIF1α, dégradation en normoxie et stabilisation en hypoxie pour jouer le rôle de facteur de transcription

Schéma par Audrey Bergeron

iii. Facteurs intrinsèques

Les CSH elles-mêmes ont un programme cellulaire, métabolique et génétique qui leur permet de maintenir leurs propriétés. De nombreux acteurs tels que des facteurs de transcription, des régulateurs du cycle cellulaire ou encore le type de métabolisme de la cellule jouent un rôle important dans la régulation du devenir de la CSH : maintien en quiescence, prolifération, entrée en différenciation…

Cycle cellulaire

Les CSH sont connues pour être principalement quiescentes, voire « dormantes ». Cependant elles doivent être capables d'entrer en cycle pour se différencier. De nombreux acteurs intracellulaires permettent de réguler cet équilibre (pour revue Hao et al., 2016; Wang and Ema, 2016; Wilson et al., 2009). Une majorité de CSH sont au stade G0 de la division cellulaire et cette proportion monte jusqu'à 100% dans les CSH isolées grâce au marquage génétique H2B-GFP. De plus, les CSH ne se divisent qu'un nombre très réduit de fois pendant la vie d'un individu, une fois tous les 145 jours pour une CSH

dormante et tous les 36 jours pour une CSH activée dans un modèle murin (Wilson et al., 2008). Le maintien en quiescence se fait grâce à de nombreux régulateurs du cycle cellulaire, de la famille des inhibiteurs de kinase dépendant de la cycline (CDKN pour cyclin-dependent kinase inhibitors) de la famille CIP/KIP comme $p21^{Cip1/Waf1}$ (Cheng et al., 2000), $p27^{Kip1}$, $p57^{Kip2}$ (Matsumoto et al., 2011; Zou et al., 2011), mais aussi de la famille INK4 (inhibitors of CDK4) comme $p16^{Ink4a}$ (Oguro et al., 2006) ou $p18^{INK4c}$ (Yu et al., 2006; Yuan et al., 2004), ou encore de $p19^{Arf}$ (Oguro et al., 2006). Un autre acteur bien connu pour être impliqué dans la prolifération et la croissance cellulaire, le complexe mTORC1 (mammanlian target of rapamycin complex 1) est aussi fondamental pour le maintien en quiescence des CSH. La délétion de régulateurs négatifs de cette voie, comme FBXW7 (F-box and WD repeat domain containing 7), TSC1 (tuberous sclerosis 1 protein) ou encore PML (promyelocytic leukemia protein), induit une prolifération accrue des CSH menant finalement à un épuisement (Laurenti et al., 2008; Matsuoka et al., 2008; Thompson et al., 2008). Dans le cas de FBXW7, cet effet est médié par une apoptose dépendante de p53 et pourrait également impliquer d'autres acteurs comme cMYC (MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor). Traiter les cellules déficientes pour TSC1 et PML à la rapamycine, un inhibiteur de la voie mTor, permet cependant de restaurer leurs capacités. Il est à noter il semble exister une réversibilité entre des CSH quiescentes, vraisemblablement au plus haut potentiel de reconstitution, et des CSH cyclantes, activées, par exemple après un signal de stress extérieur comme la chimiothérapie (Wilson et al., 2008). Cependant, la « qualité » des CSH en termes de capacités à long-terme est fortement dépendante du nombre de fois où elles ont dû entrer en cycle (Bernitz et al., 2016). Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre 2.

Facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines nécessaires à la régulation de l'expression d'autres gènes. Des facteurs de transcription comme PBX1 (PBX homeobox 1) (Ficara et al., 2008), SCL/TAL1 (stem cell leukemia protein/TAL bHLH transcription factor 1) (Lacombe et al., 2010; Reynaud et al., 2005), EGR1 (early growth response 1) (Min et al., 2008), GFI1 (growth factor independant 1 transcriptional repressor) (Hock et al., 2004), KLF4 (Kruppel like factor 1) (pour revue Park et al., 2019) ou encore EVI1 (ecotropic virus integration site 1) (Goyama et al., 2008; Kataoka et al., 2011; Kustikova et al., 2013) permettent de maintenir les CSH dans un état quiescent et/ou de préserver leur capacités d'autorenouvèlement à long-terme. D'autres facteurs comme RUNX1 (RUNX family transcription factor 1) ou GATA2 (GATA binding protein 2) sont d'une importance capitale à certains stades de l'hématopoïèse embryonnaire et fœtale, mais ont une implication plus mitigée à l'âge adulte (Dakic et al., 2005; Ling et al., 2004; Okuda et al., 1996). L'implication des trois grandes voies Notch, Wnt et Hedgehog ne semble pas clairement établie dans le maintien des propriétés des CSH, malgré un rôle majeur dans l'hématopoïèse de manière générale. Enfin, d'autres voies liées au stress oxydant, comme AKT (AKT serine/threonine protein kinase) et FOXO (forkhead box O), sont extrêmement importantes pour le maintien des CSH et seront discutées dans le chapitre suivant.

Voies de la réparation de l'ADN

Les voies de la réparation de l'ADN sont impliquées dans les processus de réponse au stress, mais sont également utiles pour préserver l'intégrité de l'ADN lors des processus réplicatifs par exemple lors de l'auto-renouvèlement des CSH. Ainsi, les protéines de ces voies jouent un rôle important dans le maintien des propriétés des CSH en conditions basales. Celles-ci peuvent être impliquées dans la jonction d'extrémités non-homologue (ou non-homologous end joining, NHEJ), comme DNA-PKc (DNA-

dependent protein kinase catalytic subunit) (Zhang et al., 2011), la Ligase IV (Rossi et al., 2007), ou Ku70/80 (Qing et al., 2014; Rossi et al., 2007) ; dans la recombinaison homologue, comme BRCA2 (breast cancer susceptibility protein 2) (Navarro et al., 2006) ; ou encore la réparation par excision de nucléotide, comme ERCC1 (excision repair cross complementation group 1) (Prasher et al., 2005). L'absence de ces protéines mène, dans la plupart des cas, à une diminution du nombre de CSH, et les CSH restantes présentent des défauts de reconstitution hématopoïétique, en particulier en compétition contre des CSH de souris sauvage. Enfin, les voie ATM (ataxia telangiectasia mutated) (Ito et al., 2004) et p53 (Asai et al., 2011; Liu et al., 2009), bien connues dans la réparation de l'ADN via divers mécanismes, sont également cruciales dans la régulation des CSH. En particulier, la délétion d'ATM provoque un épuisement des CSH via une perte de la quiescence et une augmentation de l'expression de p16 et p19, ainsi qu'une élévation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), dont nous parlerons plus spécifiquement dans le chapitre 2 (Ito et al., 2004).

Micro-ARN

Le rôle des microARN (miARN) dans la régulation des cellules est de plus en plus étudié, et cela est vrai également dans les CSH (pour revue Montagner et al., 2014). Les miARN sont des ARN non-codants de petite taille (typiquement moins de 25 nucléotides) qui permettent la régulation de l'expression des gènes au niveau de l'ARN messager (ARNm) : en se liant à des sites dans la région 3' non traduite de l'ARNm, les miARN provoquent le blocage de sa traduction ou sa dégradation, menant à une quantité réduite de protéine produite. Plusieurs miARN ont été identifiés comme des régulateurs des CSH chez la souris grâce à un modèle n'exprimant pas l'enzyme Dicer qui permet la synthèse des miARN, notamment miR-99b, let-7e et miR-125a. En particulier, il a été montré que l'expression de miR125-a est associée à une augmentation du nombre de CSH *in vivo* (Guo et al., 2010). Un certain nombre de miARN sont exprimés à la fois dans les CSH humaines et murines, montrant une bonne conservation inter-espèces (O'Connell et al., 2010). Par des expériences de reconstitution hématopoïétique après l'induction d'une surexpression de certains miARN par transduction rétrovirale, les auteurs ont montré que ces miARN jouent un rôle dans le maintien de l'hématopoïèse et des CSH à long-terme. Certains d'entre eux confèrent un avantage aux CSH comme miR-125b, miR155 ou miR-126 (également chez l'homme, avec une implication dans la voie PI3K/AKT (phosphatidylinositol 3-kinases), Lechman et al., 2012) ; à l'inverse, d'autres comme miR-196b, miR-181c ou let-7e, ont un effet néfaste. Chez l'homme, il a été montré que miR-29a, exprimé dans la population CD133$^+$, est impliqué dans la voie Wnt (Bissels et al., 2011). Chez la souris, ce même miARN permet le maintien des progéniteurs immatures (Han et al., 2010).

Régulateurs épigénétiques

Comme pour les miARN, la régulation épigénétique, c'est-à-dire l'altération de façon stable et transmissible de l'expression génétique sans modification de l'ADN, est de plus en plus sur le devant de la scène concernant la régulation de divers processus biologiques. Plusieurs familles de modifications sont contenues dans ce terme : méthylation de l'ADN, modifications des histones, remodelage de la chromatine. Ces dernières années, l'étude de ces modifications s'est développée pour mieux comprendre la régulation des propriétés des CSH (pour revue Sharma and Gurudutta, 2016). L'expression des gènes réuglant les CSH semble ainsi être une conséquence de modifications épigénétiques liées à la méthylation de l'ADN et à l'acétylation des histones (Cabezas-Wallscheid et al., 2014).

La famille des DNA méthyltransférases (DNMT) est impliquée dans la méthylation de l'ADN ; il a été montré que certaines de ces protéines, notamment DNMT1 (Trowbridge et al., 2009) et DNMT3a et DNMT3b (Challen et al., 2011, 2014), étaient cruciales pour le maintien de l'auto-renouvèlement et des capacités de différenciation des CSH.

Au niveau des histones, plusieurs familles de modification existent. Les histones acétyltransférases, ou HAT, sont également nécessaires à l'hématopoïèse normale (pour revue Sun et al., 2015). En effet, ces protéines peuvent réguler l'expression de gènes nécessaires au maintien des propriétés des CSH. Par exemple, p300 cible cMYB et permet la différenciation des CSH (Oike et al., 1999) ; CBP (CREB binding protein) favorise au contraire l'auto-renouvèlement au détriment de la différenciation via GFI1β (Chan et al., 2011) ; MOZ (monocytic leukemia zinc finger protein) provoque une surexpression de $p16^{Ink4a}$ et la sénescence des CSH (Thomas et al., 2006). La méthylation et déméthylation des histones sont également cruciales. Les zones méthylées sont souvent le signe de régions qui ont été soit activées, soit réprimées. Les gènes du groupe Polycomb (PcG) sont suspectés d'être impliqués dans la régulation de l'auto-renouvèlement des CSH, en particulier via la modification des histones. Il a notamment été montré que BMI1 (BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger), de la famille du PcG PRC1 (protein regulator of cytokinesis 1), joue un rôle central dans le maintien des CSH. Les souris *Bmi1*$^{-/-}$ subissent en effet une pancytopénie progressive due à un défaut d'auto-renouvèlement des CSH (Rizo et al., 2008, 2009). Des défauts importants de prolifération et d'auto-renouvèlement sont également visibles dans les CSH murines fœtales (Lessard and Sauvageau, 2003). De plus, des membres de PRC2, comme la famille des histones déactélysases (HDAC) (pour revue Wang et al., 2020) ou EZH2 (Kamminga et al., 2006) sont également cruciaux. En particulier, la surexpression de EZH2 (enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit) permet de conserver un potentiel de reconstitution hématopoïétique beaucoup plus long au cours de transplantations en séries par rapport à des CSH murines non modifiées, vraisemblablement via une stabilisation de la chromatine. Ainsi, le remodelage de la chromatine est aussi un élément à prendre en compte. Par exemple, un article récent indique que la perte de ZNHIT1 (zinc finger HIT-type containing 1), une protéine de type doigt de zinc impliquée dans le remodelage de la chromatine, induit un épuisement des CSH (Sun et al., 2020). Ce phénotype pourrait être dû à des modifications dans l'accessibilité des amplificateurs de gènes jouant un rôle dans la quiescence des CSH, comme PTEN (phosphatase and tensin homolog) ou KLF4.

Pour conclure, la régulation des CSH a lieu grâce à de nombreux acteurs internes et externes, dont les modes d'actions sont finement entrecroisés. Dans cette partie, j'ai volontairement omis de mentionner le rôle central du métabolisme et de molécules qui lui sont associées, comme les ROS, dans le maintien des propriétés des CSH. Nous allons maintenant aborder de façon plus précise leur rôle et leur régulation dans le deuxième chapitre de cette introduction.

Chapitre 2 : Métabolisme, stress oxydant et signalisation redox dans la CSH

1. *Métabolisme et mitochondrie dans la CSH*

a. Les différentes voies métaboliques

i. Principes généraux du métabolisme

Pour vivre, une cellule, comme tout organisme, a besoin d'énergie. De nombreux mécanismes lui permettent de dégrader des nutriments pour fournir à la cellule cette énergie, qu'elle pourra réutiliser pour synthétiser les molécules qui lui sont nécessaires. Ces mécanismes se divisent en deux catégories :

- le catabolisme, qui permet la transformation des nutriments (carbohydrates, comme le glucose ou le fructose, lipides, protéines) en plus petites molécules utilisables par la cellule, par des processus tels que la glycolyse, la lipolyse et la protéolyse respectivement.
- l'anabolisme, qui permet la synthèse de molécules utiles à l'organisme à partir des petites molécules obtenues, par exemple la synthèse de protéines complexes à partir d'acides aminés.

Au cours des réactions qui interviennent dans ces mécanismes, chaque molécule créée devient un substrat pour la réaction suivante. Ces processus reposent principalement sur des réactions d'oxydo-réduction et sont régis par un ensemble d'enzymes spécifiques. Les réactions sont le plus souvent unilatérales. Un rare contre-exemple est la glycolyse, qui peut être réversible.

Les réactions mises en jeu permettent également la libération et le stockage d'énergie. Plusieurs duos de molécules sont impliqués, dont principalement les couples ADP/ATP (adenosine diphosphate/triphosphate) et NAD(P)+/NAD(P)H (nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)). Ces molécules sont également des co-facteurs dans nombre de réaction biochimiques, et sont successivement consommées et régénérées au cours des différents processus métaboliques. L'ATP est le réservoir principal d'énergie de la cellule : la décomposition d'ATP en une molécule d'ADP et un ion phosphate libère en effet de l'énergie par la cassure d'une liaison chimique. L'ADP relâché peut ensuite être de nouveau phosphorylé lors d'une autre réaction. D'autre couples redox de co-facteurs, par exemple FAD/FADH2 (flavine adénine dinucléotide) sont aussi impliqués dans les échanges redox au sein des cellules et sont indispensables au bon fonctionnement métabolique.

ii. Voies métaboliques principales

Chez l'être humain, la majorité des cellules se repose principalement sur la respiration cellulaire pour produire leur énergie. Cet ensemble de processus biochimiques qui se déroule dans la matrice mitochondriale permet la production d'un très grand nombre de molécules d'ATP. Il se décompose en 2 grandes étapes : le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique), qui permet de transformer l'acétyl-CoA fourni par des voies métaboliques plus précoces en relâchant du $C0_2$ et en fournissant de l'ATP, du NADPH et du $FADH_2$. Ces deux dernières molécules sont ensuite recrutées par la chaîne respiratoire mitochondriale pour entrer dans le processus de **phosphorylation oxydative** au niveau de la membrane mitochondriale (Figure 11). Ces co-enzymes sont alors réduites. Les électrons libérés sont ensuite acheminés via les complexes I ou II respectivement jusqu'au complexe IV grâce à la co-enzyme Q et au cytochrome C où ils sont finalement récupérés par l'oxygène moléculaire, accepteur final des électrons ensuite réduit en H_2O. Ce cheminement provoque l'expulsion d'ions H^+, provoquant un gradient électrochimique de pH et de charges, mesurable sous le nom de polarisation mitochondriale. Le retour de ces protons dans la matrice mitochondriale par des pompes à protons nommées ATP synthase est à l'origine de la génération d'ATP : 3 protons permettent alors de synthétiser une molécule d'ATP. 36 molécules d'ATP peuvent être générées par un cycle complet. Dans ce processus, l'oxygène est un élément indispensable, car sans lui l'acceptation des électrons ne peut pas se faire. L'ensemble de ces étapes est donc dit « aérobie », faisant référence à la nécessité de la présence d'oxygène.

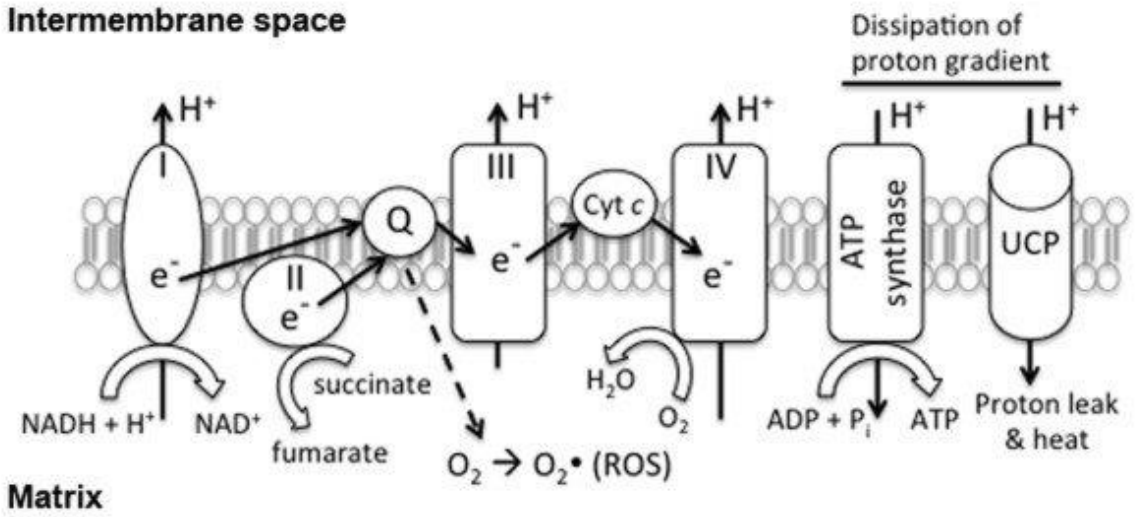


Figure 11 : Schéma de la phosphorylation oxydative dans la respiration cellulaire

Tiré de Ho et al., 2012

L'acétyl-CoA nécessaire à la première étape du cycle de Krebs peut être apporté par différentes voies. La principale est la glycolyse, qui permet la transformation de glucose en pyruvate dans le cytosol des cellules. Ce pyruvate est alors majoritairement impliqué dans la réaction de décarboxylation oxydative menant à l'acétyl-CoA au sein de la matrice mitochondriale. D'autres voies peuvent également permettre la synthèse d'acétyl-CoA, par exemple la β-oxydation des acides gras (ou fatty acid oxidation, FAO), via la formation d'acyl-CoA. Cette réaction permet en outre la production de NADH et de $FADH_2$ (Figure 12).

Enfin, d'autres voies peuvent permettre d'alimenter le cycle de Krebs en apportant des substrats à d'autres endroits du cycle. On peut citer par exemple la voie de la glutamine, transformée en glutamate par la glutaminase (GLS). La lyse de cette molécule permet ensuite la production d'α-keto-glutarate, impliqué dans le cycle de Krebs quelques étapes après l'acétyl-CoA. Elle peut également être utilisée pour la synthèse du glutathion, protéine antioxydante majeure dans nos cellules (Altman et al., 2016) (Figure 12).

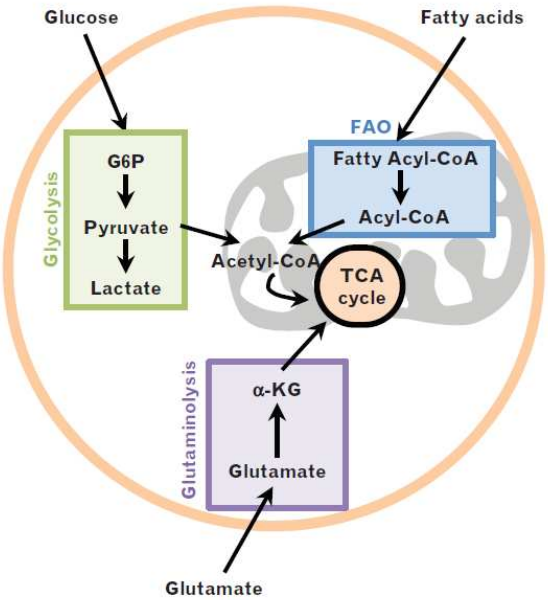


Figure 12 : Voies principales du métabolisme énergétique

Tiré de Oburoglu et al., 2016

Cependant, en cas d'absence d'oxygène, certains mécanismes doivent être mis en place par la cellule afin de pallier le manque d'énergie. Ces processus sont alors dits « anaérobie ». En particulier, le pyruvate produit par la glycolyse peut entrer dans une réaction dite de **fermentation lactique**, permettant la production de lactate et de 2 molécules d'ATP. Cette réaction est donc bien moins efficace que la phosphorylation oxydative pour la génération d'énergie, mais présente l'avantage d'être très rapide et de produire d'autres molécules (chaînes carbonées, NADPH…) nécessaires pour la synthèse de biomasse (acides aminés, nucléotides, lipides…). Cet avantage est par exemple exploité par les cellules cancéreuses même en présence d'oxygène, ce qu'on appelle l'effet Warburg (Cairns et al., 2011). Celles-ci peuvent alors proliférer rapidement car elles possèdent tout l'arsenal de molécules nécessaires à la synthèse de cellules filles.

Enfin, mentionnons qu'il existe de nombreuses autres voies métaboliques, par exemple les voies des pentoses phosphates, autre voie de dégradation du glucose, ou des corps cétoniques, utiles à l'inverse en cas de déficit en glucose et qui permettent également la synthèse d'énergie ou de métabolites.

b. Métabolisme particulier de la CSH

Phosphorylation oxydative et glycolyse

Les cellules souches hématopoïétiques résident naturellement dans un milieu hypoxique, comme présenté précédemment. Ainsi, chez l'homme, il a été montré que les cellules $CD34^+$ avaient une plus faible consommation d'oxygène, suggérant une diminution de la phosphorylation oxydative (Piccoli et al., 2005). De nombreuses études ont donc été réalisées principalement sur la souris afin de détailler l'état métabolique des CSH. Ainsi, les CSH reposent davantage sur la glycolyse anaérobie que sur la phosphorylation oxydative pour générer leur énergie (Simsek et al., 2010; Suda et al., 2011). Cela est mesurable en particulier par diverses méthodes telles que la mesure de la consommation d'oxygène, de la production d'ATP, de l'utilisation du glucose, de la production de lactate et de la polarisation mitochondriale via différentes sondes (Simsek et al., 2010; Vannini et al., 2016). Ce mécanisme glycolytique est gouverné au moins en partie par les protéines PDK (pyruvate dehydrogénase kinase), dont la suppression (en particulier pour PDK2 et PDK4) diminue la quiescence et les capacités de reconstitution hématopoïétique des CSH murines (Takubo et al., 2013). A l'inverse, les auteurs montrent que leur surexpression permet de restaurer la glycolyse et les propriétés souches des CSH dans un modèle de souris déficientes pour HIF1α et présentant une glycolyse altérée et un niveau élevé de ROS. PDK est en effet une cible d'HIF1α, acteur clé dans la régulation métabolique déjà évoqué précédemment (Kim et al., 2006). Des résultats similaires ont été observés pour des CSH déficientes pour le gène *Mtch2* (mitochondrial carrier 2), régulateur du métabolisme. Une augmentation de la masse mitochondriale est également observée, suggérant un mécanisme compensatoire (Maryanovich et al., 2015). Le rôle des protéines PKM2 (pyruvate kinase M2) et LDHA (cible de HIF1α), impliqués dans la fermentation lactique du pyruvate au cours de la glycolyse anaérobie, ont également été étudiés (Wang et al., 2014). Une diminution de la production de lactate est observée en parallèle d'une augmentation de la respiration cellulaire. L'abrogation de la glycolyse anaérobie est quasiment totale dans les cellules *Ldha*$^{-/-}$, mais seulement partielle dans les cellules *Pkm2*$^{-/-}$. En conséquence, la délétion de PKM2 impacte principalement les progéniteurs, tandis que le déficit en LDHA diminue plus fortement les propriétés fonctionnelles et les capacités de reconstitution hématopoïétique des CSH. Par ailleurs, les progéniteurs qui commencent à s'engager dans la différenciation ont une polarisation mitochondriale plus élevée et donc un recours plus important à la phosphorylation oxydative, prouvant qu'une faible activité mitochondriale permet d'identifier la sous-population des cellules souches avec un potentiel de reconstitution hématopoïétique à long-terme (Vannini et al., 2016).

Cependant, malgré une préférence pour la glycolyse dans les CSH, la suppression totale de la voie de phosphorylation oxydative, via la disparition de composants des complexes de la chaîne de respiratoire comme RISP (mitochondrial complex III subunit Rieske iron-sulfur protein), est délétère pour les CSH adultes et fœtales dans un modèle murin (Ansó et al., 2017). Celles-ci présentent une capacité d'auto-renouvèlement et de prolifération préservée, mais possèdent des défauts de différenciation menant à une pancytopénie et une létalité rapide. De même, des souris présentant une délétion dans l'ADN mitochondrial menant à une pathogénicitié liée à des défauts de respiration mitochondriale ont été étudiées (Inoue et al., 2010). Celles-ci arborent le même type de phénotype, avec un maintien de la prolifération aux dépends de la différenciation des CSH, sans induire d'apoptose. De plus, la déplétion de protéines telles que PTPMT1 (protein tyrosine phosphatase mitochondrial 1),

fortement exprimée dans les CSH, augmente d'un facteur 40 le nombre de CSH grâce à un switch vers la glycolyse mais empêche la différenciation hématopoïétique (Yu et al., 2013). Ainsi, la possibilité d'utiliser les voies métaboliques aérobies est fondamentale pour les propriétés de différenciation des CSH et la viabilité du système hématopoïétique. D'ailleurs, le choix des voies métaboliques utilisées est intrinsèquement lié à la différenciation dans les différents lignages. Par exemple, la voie de la glutamine est essentielle pour la différenciation érythrocytaire (Oburoglu et al., 2014). De plus, l'inhibition de GLS, la protéine responsable de la transformation de la glutamine en glutamate, a un rôle dans la régulation des CSH, prévenant leur activation et leur prolifération (Sommerkamp et al., 2020). Enfin, la fusion mitochondriale via MFN2 (mitofusin 2) permet le maintien de CSH programmées pour la différentiation lymphoïde (Luchsinger et al., 2016).

Masse mitochondriale

La question de la masse mitochondriale a également été soulevée. Des équipes ont montré une diminution de la masse mitochondriale dans les CSH, corrélant avec une augmentation de la capacité de reconstitution hématopoïétique et l'expression de marqueurs de surface chez l'homme comme chez la souris (Mantel et al., 2010; Piccoli et al., 2005; Romero-Moya et al., 2013). Cependant, d'autres équipes ont proposé que ces observations sont principalement dues à un efflux plus important des sondes fluorescentes utilisées pour marquer les mitochondries (de Almeida et al., 2017; Takihara et al., 2019). Ils ont montré grâce à l'utilisation de drogues permettant le blocage de cet efflux, comme le verapamil, ou de souris mitoDendra-2, génétiquement modifiées pour exprimer un marqueur fluorescent dans les mitochondries, que les CSH ayant une meilleure reconstitution hématopoïétique auraient au contraire une masse mitochondriale plus élevée, corrélant avec l'expression de marqueurs d'immaturité tels que l'EPCR. Néanmoins, l'utilisation d'autres souches de souris comme R26-mito-EGFP a bien confirmé la baisse de la masse mitochondriale dans les populations les plus enrichies en cellules souches (Vannini et al., 2016). Cette question est donc encore débattue.

Voie de la FAO

Des études récentes suggèrent que la voie métabolique de la FAO pourrait également être impliquée dans les propriétés des CSH via les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes PPAR (peroxisome-proliferating activated receptor), famille de protéines impliquées dans cette voie dont il existe 3 sous-types : PPARα, PPARγ et PPARβ/δ. Cependant, la manière dont celles-ci interviennent n'est pas clairement établie. En effet, un premier article Ito *et al.* ont démontré que l'absence de PPARδ dans les CSH murines, qui y est le sous-type le plus représenté, ou l'inhibition de la FAO induit un défaut d'auto-renouvèlement et de reconstitution hématopoïétiques ; en revanche, l'activation pharmacologique de PPARδ donne lieu à une augmentation des capacités fonctionnelles de CSH (Ito et al., 2012). Cette même équipe a également étudié une sous-population enrichie en CSH fonctionnelles grâce à l'expression de TIE2 (tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains 2), un récepteur de l'angipoïétine-1 particulièrement exprimé par les CSH : ces cellules montrent une augmentation de l'expression des protéines PPAR, en particulier PPARδ, ainsi que de la FAO (Ito et al., 2016). A l'inverse, dans des CSH murines déficientes pour PTPMT1, il a été montré que l'ACC, une enzyme régulant négativement la FAO, était moins exprimée, indiquant une possible action négative de la FAO sur la CSH (Yu et al., 2013). L'équipe de Broxmeyer (Guo et al., 2018) a montré que l'inhibition de PPARγ dans les CSH humaines permet un meilleur maintien de leurs propriétés *in vitro* médié par une augmentation du métabolisme glycolytique via le gène *FBP1* (fructose biphosphatase 1).

Rôle de LKB1

Trois équipes se sont penchées sur le rôle de LKB1 (serine/threonine kinase 11) dans les CSH (Gan et al., 2010; Gurumurthy et al., 2010; Nakada et al., 2010). LKB1 est une protéine kinase impliquée dans la régulation du métabolisme et du cycle cellulaire, majoritairement via l'activation d'AMPK (AMPK-activated protein kinase), qui est au cœur de la régulation du métabolisme lipidique et glucidique. La délétion de *Lkb1* dans le système hématopoïétique murin induit, après une augmentation transitoire, une déplétion des CSH conduisant à une pancytopénie et à la mort des animaux. Les cellules déficientes en LKB1 ont un potentiel de reconstitution réduit, cyclent davantage que les cellules de souris sauvages (wild type, WT) mais montrent une diminution de la polarisation mitochondriale, une augmentation de l'autophagie, une production d'ATP réduite et une augmentation de l'apoptose. Cependant, il n'est pas clairement défini si l'apoptose est une conséquence des défauts mitochondriaux, ou l'inverse. Ces effets sont partiellement dépendants d'AMPK, mais sont indépendants de l'axe mTOR-ROS. En effet, ni l'utilisation de l'antioxydant NAC ni de la rapamyine, un inhibiteur de mTOR, ne permet de restaurer les fonctionnalités des CSH *Lkb1*$^{-/-}$. Enfin, l'expression des gènes *Ppar* est dérégulée dans les cellules *Lkb1*$^{-/-}$, en lien avec les articles précédemment cités.

Autophagie

Le rôle de l'autophagie et plus spécifiquement de la mitophagie semble être un facteur clé du maintien du métabolisme particulier des CSH. Il a été montré que la suppression de protéines impliquées dans l'autophagie comme RB1CC1 (RB1-inducible coiled-coil 1) (Liu et al., 2010) et ATG7 (autophagy related 7) (Mortensen et al., 2010) induisent des défauts hématopoïétiques majeurs. Par ailleurs, une augmentation des ROS et de la masse mitochondriale est observée dans les sous-populations de CSPH. Dans le cas de souris *Atg7*$^{-/-}$ il se produit une réduction globale du nombre de CSPH. Le facteur de transcription FOXO3 est aussi impliqué dans la régulation de l'autophagie dans les CSH, en particulier en conditions de stress ou au cours du vieillissement (Warr et al., 2013). D'ailleurs, dans des souris déficientes (knock-out, KO) pour *Atg12*, on observe un phénotype de vieillissement des CSH, lié à une augmentation de l'activité mitochondriale (Ho et al., 2017). La perte du mécanisme d'autophagie induit aussi une perte des propriétés fondamentales des CSH (clonogénicité, quiescence) et un biais myéloïde important. Enfin, il a été montré que la mitophagie était induite par la voie PPAR-FAO et que son inhibition avait un effet important sur les CSH purifiées grâce à l'expression du marqueur TIE2, limitant les divisions d'auto-renouvèlement et les capacités de reconstitution hématopoïétique (Ho et al., 2017).

Ces résultats montrent dans l'ensemble que le métabolisme et le statut de la mitochondrie doivent être très finement régulés dans la CSH, car ils jouent un rôle fondamental dans la conservation d'un équilibre entre quiescence, prolifération et différenciation (Figure 13).

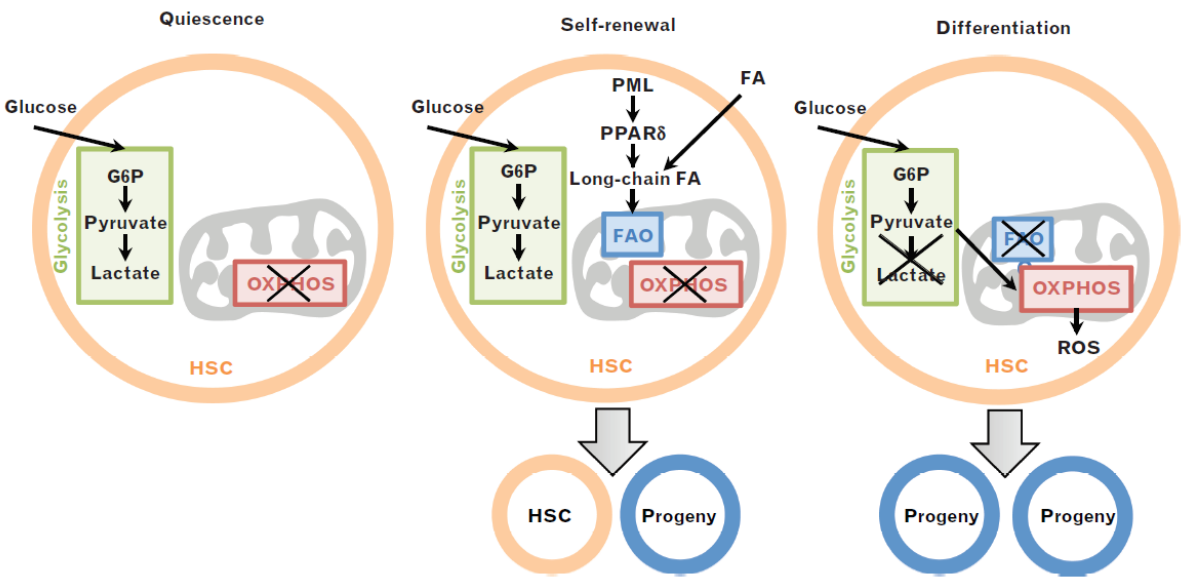


Figure 13 : Métabolisme et devenir de la CSH

Tiré de Oburoglu et al., 2016

2. *Les espèces réactives de l'oxygène ou ROS*

Les **espèces réactives de l'oxygène**, ou **ROS** (pour reactive oxygen species) sont des molécules contenant au moins un atome d'oxygène et des électrons de valence non appariés, les rendant hautement réactives. On peut citer comme exemple le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, l'ozone O_3, ou l'acide hypochlorique HOCl ; et des radicaux libres tels que le radical hydroxyle $HO^{\bullet}$, l'oxygène singulet $^1O_2^{\bullet}$, ou encore des ions comme l'anion superoxide O_2^-. Un certain nombre de ROS est naturellement produit par les cellules, notamment en tant que sous-produits du métabolisme, mais peuvent aussi être générés par des causes exogènes (irradiation, rayonnement ultraviolets, etc). Les ROS jouent de nombreux rôles au niveau cellulaire, et sont d'une importance cruciale dans la régulation des propriétés et du devenir des CSH.

a. Génération biochimique, liens avec la mitochondrie et voies de détoxification

L'éventualité de l'existence d'une relation entre l'oxygène et la génération de radicaux libres dans les cellules est une idée qui a émergé dans les années 1950. Une équipe new-yorkaise a montré que différents agents antioxydants comme le glutathion ou le β-mercaptoéthanol permettaient à des souris de mieux survivre à une pression en oxygène élevée (5 bar) (Gerschman et al., 1954)

.

Les deux principales sources physiologiques de ROS sont (Figure 14) :

- La respiration mitochondriale (pour revue Murphy, 2009) et voir Figure 10), dans laquelle O_2^- est un « déchet » et représente environ 0,1 à 0,2% du dioxygène consommé par la cellule (Tahara et al., 2009). La production de ROS est corrélée au potentiel mitochondrial.
- La famille de NADPH oxidases NOX (pour revue Bedard and Krause, 2007; Nauseef, 2008), catalyseurs qui jouent un rôle actif dans la génération de ROS par le transfert d'électrons aux molécules de dioxygène.

D'autres sources sont également impliquées dans la génération de ROS mais sont moins bien caractérisées : sources enzymatiques (oxyde nitrique synthase, cyclooxygénases, lipoxygénases, ou encore cytochrome p450 monooxygénase) ou autres organelles (réticulum endoplasmique, peroxysome) (pour revue Holmström and Finkel, 2014).

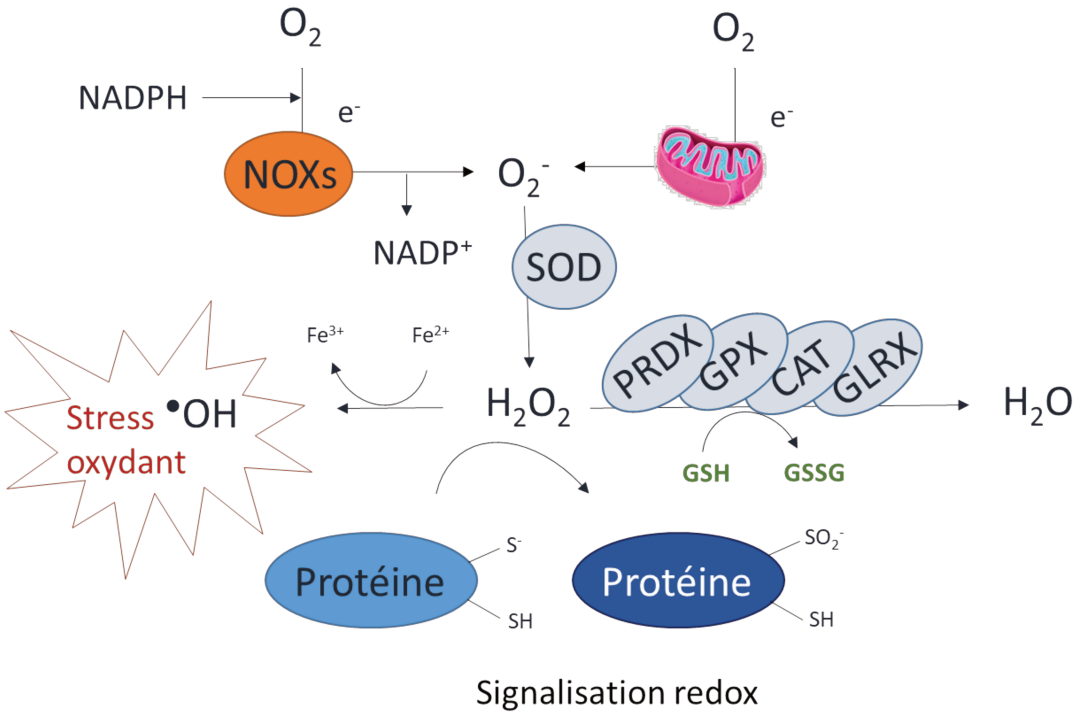


Figure 14 : Génération et détoxification des ROS

Adapté de Schieber and Chandel, 2014

L'O_2^- généré par ces sources est très rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 par l'enzyme superoxide dismutase (SOD). L'H_2O_2 est ensuite détoxifié par différentes familles d'enzymes (entre autres peroxiredoxines PRDX, glutathione peroxidases GPX, glutaredoxines GLRX, catalase CAT) pour être transformée en eau (Figure 14). Un des systèmes principaux de détoxification du peroxyde d'hydrogène est le système enzymatique de la glutaredoxine. Celui-ci est constitué de la glutaredoxine, du glutathion et de la NADPH. Le glutathion est un élément principal du maintien de l'équilibre redox dans les cellules (pour revue Wu et al., 2004). Cela fonctionne notamment grâce à la présence d'un groupe thiol cystéine qui peut être présent sous une forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG). La catalase est également une voie essentielle de la transformation du H_2O_2 dans les cellules (pour revue Percy,

1984). Enfin, des molécules comme l'acide urique et les vitamines A (obtenue à partir du rétinol et du β-carotène), C (acide ascorbique) et E (tocophérol) interviennent également comme antioxydants.

La molécule d'H_2O_2 peut être vue comme une épée à double-tranchant : elle est utile pour la signalisation intracellulaire (pour revue Dröge, 2002; Holmström and Finkel, 2014) ; mais son accumulation peut être également le signe d'un dysfonctionnement de la cellule et créer des dommages importants au niveau de l'ADN, des lipides, etc.

b. Effets des ROS sur les cellules et sur les CSH

i. Mécanismes généraux d'action des ROS

Signalisation

Il a été montré sur plusieurs types cellulaires qu'une augmentation de ROS était visible en réponse à différents facteurs de croissance, comme le facteur de croissance épidermique EGF (epidermial growth factor) ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes PDGF (platelet-derived growth factor) (Bae et al., 1997; Sundaresan et al., 1995). Celle-ci précède la signalisation par la phosphorylation de la tyrosine, qui est par ailleurs inhibée par l'ajout d'antioxydants comme la catalase ou la N-acétyl-cystéine (NAC).

Différents mécanismes de signalisation ont donc été identifiés pour expliquer les effets de la molécule H_2O_2, par exemple l'oxydation de résidus cystéines sur des protéines servant de senseurs (Finkel, 2011) et des protéines tyrosine phospahatases (PTP) (Meng et al., 2002), dont l'activation ou l'inactivation régule la phosphorylation des tyrosines sur les protéines cibles.

De nombreuses protéines sont des cibles des ROS qui permettent la signalisation dans la cellule (pour revue Zhang et al., 2016). Des exemples de protéines sensibles aux modifications des cystéines par les ROS sont NFκB (nuclear factor kappa B); les protéines de la famille des MAPK (mitogen-activated protein kinases) comme ERK (extracellular signal-regulated kinase) ou p38 ; la voie AKT avec la famille FOXO (pour revue de Keizer et al., 2011), p53 ou mTOR (mammalian target of rapamycin) ; ou encore la voie KEAP1-NRF2 (Kelch-like ECH associated protein 1 et nuclear factor erytroid 2 related factor 2) (Taguchi et al., 2011). La signalisation induite leur permet alors de jouer leur rôle de facteur de transcription. Par exemple, NRF2 est normalement séquestré par KEAP1 afin d'être dégradé par le protéasome 26S. En présence d'espèces oxydantes, la liaison entre KEAP1 et NRF2 est rompue par l'oxydation de résidus cystéines gouvernant l'activité de KEAP1 ou de façon plus limitée par la phosphorylation directe de NRF2 par des kinases activées par le stress oxydant (pour revue Zhang et al., 2016). Ainsi, après translocation dans le noyau et reconnaissance des motifs des éléments de réponse antioxydante (ARE), l'expression de différents gènes antioxydants est réalisée.

Tous ces mécanismes sont à l'origine de divers comportements dans de nombreux types cellulaires (différenciation, prolifération, senescence, apoptose). En particulier, dans les CSH, le rôle des ROS est d'une importance cruciale dans le maintien de leurs propriétés.

Dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides

En cas de mauvais détoxification du peroxyde d'hydrogène généré, celui-ci peut être converti en radical hydroxyle $OH^{\bullet}$ en présence d'ions ferreux. Cette espèce très réactive est à l'origine de dommages sur différentes macromolécules dans la cellule (pour revue Kohen and Nyska, 2002). Un premier exemple est la peroxydation des lipides, qui peut porter atteinte notamment à la membrane cellulaire. Cela a lieu sous la forme d'une réaction en chaîne à partir de la soustraction d'un hydrogène sur un groupe méthyl du lipide, qui fragilise les double-liaisons et permet de créer un peroxyde $ROO^{\bullet}$ en réaction avec l'oxygène présent. Cette espèce très réactive peut ensuite provoquer la soustraction d'un nouvel hydrogène sur un lipide voisin et provoquer la réaction en chaîne. Le même type de réaction peut également intervenir sur les protéines, et les dommages peuvent aller jusqu'à un changement de la structure tertiaire ou à une dégradation des protéines concernées. Ces effets peuvent mener par exemple à des pertes d'activité enzymatique ou à des changements dans les mécanismes énergétiques pouvant avoir un impact important sur le devenir de la cellule. Enfin, un effet particulièrement important des ROS reste les dommages à l'ADN. Ceux-ci peuvent être de plusieurs types. Un premier résultat bien connu est l'oxydation de la guanine à la position C8, qui devient le produit d'oxydation 8-oxo-2-deoxyguanine (8-oxo-DG). D'autres effets peuvent inclure l'oxydation de la thymine, des modifications de bases et des cassures simple et double-brin, entre autres.

ii. Statut particulier des ROS dans la CSH

Une des caractéristiques des CSH est leur taux de ROS particulièrement bas, démontré par exemple chez la souris dans la population LSK/$CD34^{-}$ (Jang and Sharkis, 2007). Cependant il n'est pas clair s'il s'agit d'une simple conséquence de l'environnement hypoxique et de la faible activité mitochondriale, ou d'un système régulateur à part entière de la CSH, les ROS étant aussi des molécules de signalisation. De nombreuses études s'accordent néanmoins sur le fait que les ROS ont une importance cruciale dans la régulation des propriétés des CSH, à la fois pour le maintien de la quiescence et de l'auto-renouvèlement et de leur capacité de différenciation (pour revue Bigarella et al., 2014; Ludin et al., 2014; Prieto-Bermejo et al., 2018; Sardina et al., 2012) (Figure 15). En particulier, les $CD34^{+}$ dérivées de cellules souches pluripotentes sont particulièrement sensibles au taux de ROS et présentent des défauts de prolifération et de clonogénicité (Rönn et al., 2017). Les fractions conservant leurs capacités fonctionnelles arboraient d'ailleurs le taux de ROS le plus bas. Le stress oxydant est également un indicateur du vieillissement des CSH, et augmente progressivement au cours de transplantations en série, induisant des dommages à l'ADN et diminuant les capacités de reconstitution hématopoïétique des CSH (Yahata et al., 2011). De façon intéressante, chez la souris le contrôle de l'activité des CSH par le rythme circadien est intrinsèquement lié à la modulation du taux de ROS (Golan et al., 2018). Limiter l'augmentation de ROS grâce à des traitements antioxydants à base de NAC permet de restaurer les capacités des CSH dans ce contexte. Plusieurs acteurs moléculaires ont été identifiés dans la régulation des ROS dans les CSH et participent activement à la modulation de leur devenir (Figure 16).

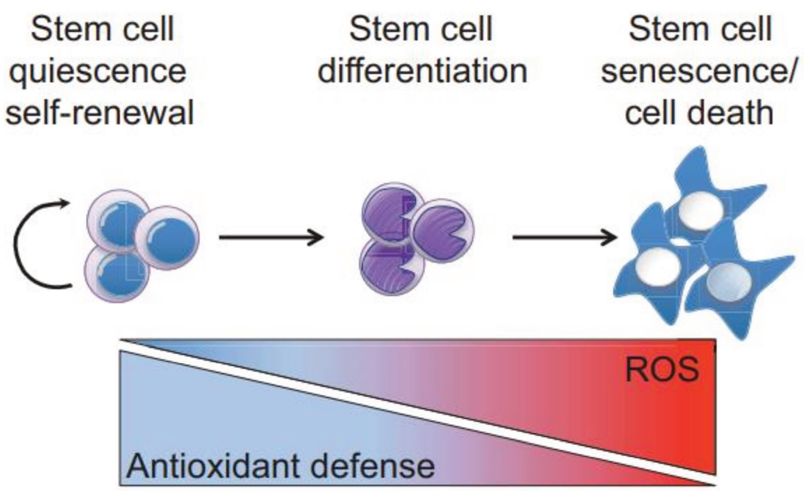


Figure 15 : Impact des ROS sur le destin des CSH

Tiré de Bigarella et al., 2014

Voie FoxO-AKT

L'impact de la quantité de ROS sur les CSH a été étudié grâce à plusieurs modèles de souris déficientes pour des protéines impliquées dans la régulation de l'équilibre redox. La voie PTEN/PI3K/AKT est fondamentale. De plus, la famille de protéines FOXO, en aval de cette voie, joue un rôle critique dans la régulation des propriétés des CSH via les ROS. La délétion simultanée de *FOXO1*, *FOXO3* et *FOXO4* provoque une perte des capacités de repopulation des CSH murines via une augmentation du cycle, de l'apoptose et du niveau de ROS (Tothova et al., 2007). En parallèle, une équipe a montré que la suppression de seulement *FOXO3* induisait le même phénotype (Miyamoto et al., 2007). Par ailleurs, les auteurs observent une augmentation de la phosphorylation de p38MAPK. L'élévation des ROS conduit également à des syndromes myléoprolifératifs dus à une augmentation de la population de progéniteurs via une signalisation par la voie AKT/mTOR (Yalcin et al., 2010) ainsi qu'à une augmentation des dommages oxydatifs au niveau de l'ADN et des troubles des mécanismes de réparation par excision de base (Bigarella et al., 2017). Ces phénotypes sont réversibles après traitement par l'antioxydant NAC, démontrant que les effets observés sont dus à une augmentation des ROS. En revanche, la suppression de l'expression des deux isoformes AKT1 et AKT2 provoque une perte du maintien des CSH à long-terme lors de transplantations en compétition et en série, liée à une diminution des ROS et à un blocage du cycle en G0, empêchant la prolifération et la différenciation des CSH (Juntilla et al., 2010). Un traitement au L-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO), un pro-oxydant, permet d'améliorer la clonogénicité des cellules *Akt1/2*$^{-/-}$. Ainsi, un taux minimum de ROS semble nécessaire à la fonctionnalité des CSH, renforçant l'idée d'un rôle physiologique de signalisation de ces molécules. Enfin, les sirtuines peuvent moduler l'activité des facteurs de transcription FOXO en situation de stress oxydatif (Kobayashi et al., 2005). La déficience en *Sirt1* (sirtuin 1) dans la CSH provoque un vieillissement prématuré des cellules en compromettant leur quiescence et en induisant un biais de différenciation myéloïde (Rimmelé et al., 2014). Ce mécanisme est dépendant de FOXO3. De plus, des dommages à l'ADN de type cassure double-brin ainsi qu'une diminution de l'expression des enzymes antioxydantes sont observés, indiquant une implication probable des ROS.

Voie p38MAPK

Par la suite, le lien entre ROS et p38MAPK, observé par Miyamoto K *et al.*, a été détaillé plus précisément. En particulier, le groupe de Toshio Suda a généré une souris déficiente pour le gène *Atm*, un acteur central de la réponse aux dommages à l'ADN et au stress oxydant (Ito et al., 2004, 2006). Les auteurs montrent que l'inactivation de ce gène induit une myéloaplasie due à des défauts d'auto-renouvèlement. Comme avec les protéines FoxO, ces effets sont dus à une élévation des ROS dans les cellules. Ceci provoque une activation des voies $p16^{INK4a}$ et p38MAPK. L'inhibition soit de l'augmentation des ROS par l'antioxydant NAC, soit de l'activation de p38MAPK par la drogue SB203580 permet de restaurer la fonctionnalité des CSH. Le traitement par le SB203580 montre également des effets bénéfiques dans le cadre d'une augmentation des ROS après des transplantations en série. Il est finalement démontré qu'une augmentation pharmacologique des ROS, par exemple par un traitement à la BSO, a un impact majeur sur les capacités de reconstitution hématopoïétique des CSH. De plus, une augmentation de l'expression mitochondriale de BID (BH3 interacting domain death agonist) et des ROS mitochondriaux est observée dans les cellules déficientes pour *atm* (Maryanovich et al., 2012). L'inhibition de la phosphorylation de BID induit un phénotype similaire à celui des CSH $atm^{-}/^{-}$: défauts de reconstitution hématopoïétique, élévation des ROS, entrée en cycle et surexpression des gènes associés ($p16^{INK4a}$, $p19^{ARF}$, cyclines…). Comme précédemment, ces effets sont réversibles après traitement par le NAC. Ainsi, quelle que soit la cause de l'augmentation des ROS, leur inhibition permet systématiquement de restaurer les capacités des CSH. Enfin, récemment, une équipe a identifié un lien entre p190-B, un inhibiteur de la famille des Rho-GTPase ayant une implication dans l'auto-renouvèlement des CSH (Xu et al., 2009), élévation des ROS, et activation du TGFβ et de p38MAPK (Hinge et al., 2017). Cette cascade pourrait être à l'origine de divisions asymétriques des CSH au détriment de divisions symétriques d'auto-renouvèlement. L'inhibition de TGFβ permet d'éviter la perte de fonctionnalité due aux ROS lors de la transplantation.

Voie NRF2

La voie NRF2 est connue pour être impliquée dans la régulation du stress oxydant pour un grand nombre de types cellulaires y compris dans le système hématopoïétique (pour revue Hu et al., 2019). Par exemple, le taux de ROS est anormalement élevé dans le foie et les reins de souris déficientes pour *Nrf2* (Hirayama et al., 2003). Il a donc été proposé que cette voie soit également impliquée dans le maintien des CSH, compte-tenu du rôle crucial des ROS dans ces cellules. Chez la souris, une déficience en *Nrf2* provoque une hyperprolifération des CSPH au détriment de leur quiescence et leur auto-renouvèlement (Tsai et al., 2013). Ainsi, les cellules issues de souris $Nrf2^{-/-}$ ne sont pas capables de générer des CFU-C secondaires et les souris $Nrf2^{-/-}$ traitées au 5-FU meurent plus rapidement que les souris WT traitées. Cependant, une sur-activation de NRF2 via la suppression de son régulateur *Keap1* induit également une perte de la quiescence et des capacités de reconstitution hématopoïétique des CSH (Murakami et al., 2017). Ceci indique que la présence de NRF2 est vitale mais qu'une trop grande activation (par exemple due à la présence de ROS) peut également mener à l'épuisement des CSH. De façon intéressante, Tsai *et al.* démontrent également un lien entre NRF2 et CXCR4, qui est sous-régulé dans les cellules déficientes pour *Nrf2*. Celles-ci sont alors moins efficaces pour se nicher dans la MO. Ceci est à corréler avec une étude récente montrant l'implication du couple CXCR4-CXCL12 dans la régulation des ROS (Zhang et al., 2016b). En effet, chez les CSH $Cxcr4^{-/-}$ un taux élevé de ROS, une accumulation de dommages à l'ADN et une sur-activation de la voie p38MAPK sont observés. Ces cellules ont alors une capacité de repopulation limitée. De façon intrigante, il a été montré que NRF2

jouait un rôle régulateur sur les CSH indépendamment du taux de ROS (Merchant et al., 2011). En effet, les CSPH *Nrf2*$^{-/-}$ n'ont pas un taux de ROS plus élevé des CSPH normales, même si elles sont plus sensibles au stress oxydant. De plus, un traitement au NAC ne permet pas de restaurer les défauts fonctionnels des CSPH déficientes pour *Nrf2*. En revanche, le G-CSF a un effet bénéfique sur la fonctionnalité de ces cellules, malgré une augmentation des ROS après traitement. De la même façon, Murakami *et al.* n'observent pas de différence dans le taux de ROS entre les CSPH *Keap1*$^{-/-}$ et WT. Ainsi, à l'état basal, NRF2 ne permet pas le maintien des CSH via une régulation des ROS malgré son implication globale dans la régulation du stress oxydant. Les mécanismes d'action précis de cette protéine doivent donc être élucidés.

p53, mTOR et mitonchondries

Il a été montré dans plusieurs types cellulaires que p53 régule la quantité de ROS, y compris dans des organes du système hématopoïétique (Sablina et al., 2005). Son rôle au niveau des CSH a donc été étudié. Le rôle du gène codant MDM2 (mouse double minute 2), une E3 ubiquitine ligase régulant négativement p53, a été caractérisé. Les souris *Mdm2*$^{-/-}$ présentent une létalité embryonnaire. L'expression d'un allèle hypomorphe de *p53*, p53515C codant la protéine p53R172P, permet de préserver la viabilité intra-utérine des souris, mais celles-ci subissent une défaillance hématopoïétique 13 jours après la naissance (Abbas et al., 2010). Il a été montré que la stabilisation de p53R172P dans ce contexte génère une augmentation des ROS et un arrêt du cycle cellulaire, induisant la senescence puis à la mort des cellules du compartiment hématopoïétique. Un traitement antioxydant ou une culture en hypoxie permet de restaurer partiellement ce phénotype. Dans des souris déficientes pour la protéine interagissant avec la thioredoxine TXNIP (thioredoxin-interacting protein), une élévation des ROS, une moins bonne survie après exposition au stress oxydant et des défauts de reconstitution hématopoïétique sont observés (Jung et al., 2013). Le mécanisme régissant ces effets repose sur la régulation de p53 par TXNIP : le niveau de p53 corrèle avec celui de TXNIP. De plus, une élévation des ROS est aussi visible dans les CSH *p53*$^{-/-}$. Le phénotype est annulé par l'introduction de TXNIP ou de p53 dans les cellules *Txnip*$^{-/-}$. Enfin, les auteurs démontrent que l'interaction de TXNIP avec p53 prévient la régulation de p53 par MDM2 et accroît la stabilité de p53. L'absence de TXNIP empêche donc la régulation des ROS par p53. La suppression de TSC1, protéine régulatrice de mTOR, induit au contraire une entrée en cycle rapide, corrélée à une génération de mitochondries et à une augmentation des ROS (Chen et al., 2008). Ce phénotype provoque des défauts dans l'auto-renouvèlement des CSH et dans l'hématopoïèse, restauré encore une fois par un traitement antioxydant ou par la rapamycine. Ainsi, une augmentation anormale des ROS peut être liée à différents phénotypes. De façon intéressante, une diminution des ROS ne permet pas de réguler les propriétés d'auto-renouvèlement et de différenciation des CSH dans les souris déficientes pour *Atg7*, montrant une intrication entre autophagie, réseau mitochondrial et voies régulées par les ROS (Cao et al., 2016).

MEIS1

L'expression de la protéine MEIS1 (myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog) est inversement corrélé avec le degré de différenciation des cellules hématopoïétiques (Pineault et al., 2002), mais son rôle exact dans le maintien des CSH est longtemps resté inconnu. Sa suppression n'implique d'ailleurs pas de phénotype visible à l'état basal. En revanche, les CSH sont moins nombreuses dans la MO des souris *Meis1*$^{-/-}$, présentent des capacités réduites de clonogénicité *in vitro* et ne sont pas quiescentes (Unnisa et al., 2012). Ces défauts sont liés à une augmentation des ROS ainsi

qu'à une diminution de l'expression des gènes liés à l'hypoxie. Un traitement au NAC ou une sous-régulation de la protéine VHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor) pour assurer la signalisation liée à l'hypoxie permettent de restaurer les capacités des CSH *Meis1*$^{-/-}$.

BMI1

La délétion de *Bmi1* induit chez la souris des défauts hématopoïétiques importants, notamment au niveau de la CSH et des lymphocytes T (Lessard and Sauvageau, 2003; Liu et al., 2009). Ce phénotype est notamment dû à une augmentation des ROS et à des déficiences dans la respiration mitochondriale. Cela provoque également une activation des voies de réparation de l'ADN. Un traitement au NAC permet une amélioration du phénotype au niveau des thymocytes. Par ailleurs, une surexpression de *Bmi1* permet une meilleure résistance au stress oxydatif des CSH murines, sans pour autant modifier la quantité absolue de ROS (Nakamura et al., 2012). Cependant, la mesure des ROS étant difficile (voir partie 2.d.), ces résultats sont à interpréter avec prudence.

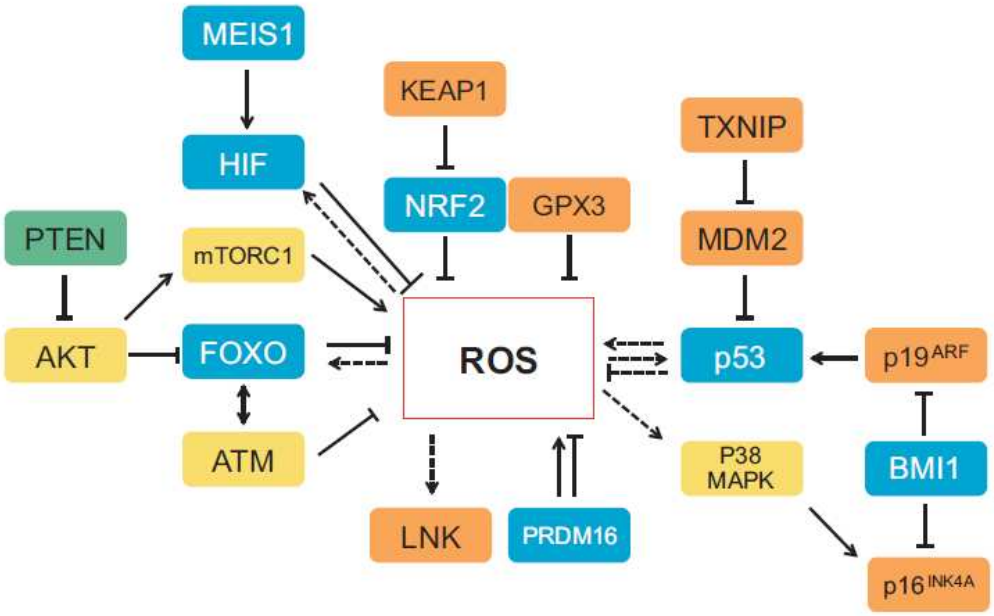


Figure 16 : Différentes voies régulant ou régulées par les ROS

Tiré de Bigarella et al., 2014

Pour terminer, limiter les ROS de manière générale (même sans induction d'une génération excessive) permet de mieux préserver les capacités des CSH. Si les CSH expriment à l'état basal des protéines provoquant la génération de ROS, notamment les différentes isoformes de la famille des oxydases NADPH (NOX1, NOX2 et NOX4) et les protéines associées (Piccoli et al., 2007), l'expression de protéines et molécules antioxydantes est également fondamentale pour conserver l'équilibre redox. Ainsi, l'effet de la surexpression d'enzymes permettant la détoxification des ROS, comme la SOD ou la catalase (cf début du chapitre 2) a été étudiée (Miao et al., 2013). Les CSH sur-exprimant la catalase possèdent de meilleure capacité de reconstitution hématopoïétique *in vivo*. Cet effet est plus léger sur des cellules sur-exprimant la SOD. De la même façon, la surexpression de GPX3 donne un avantage pour la repopulation en compétition aux CSH murines, tandis que son inhibition par un shRNA les défavorise

(Herault et al., 2012). Il est intéressant de noter que la surexpression de gènes contribuant à l'auto-renouvèlement des CSH, comme *Prdm1* (PR/SET domain 1) ou *Hoxb4* (homeobox B4), induit l'augmentation de l'expression de *Gpx3*. Un mimétique du glutathion, NOV-002, permet de réduire le stress oxydant dans un contexte de traitement au cyclophosphamide (Diaz-Montero et al., 2012). Pour les CSH humaines, un des modèles de référence pour la transplantation est la souris NOD/SCID. Or il a été montré que cette souris présente un taux de ROS plus élevé dans sa MO (Hu et al., 2014). Un traitement *in vivo* au NAC de ces souris au moment de la greffe permet aussi une meilleure reconstitution hématopoïétique par les cellules $CD34^+$. Cependant, de façon surprenante, le taux de ROS intrinsèque des cellules greffées ne diminue pas dans ce contexte.

Pour conclure, le stress oxydant est aussi un facteur central dans de nombreuses pathologies de type inflammatoire et dans les cancers, y compris hématologiques. Cependant, nous ne traiterons pas en détails ce point qui reste hors du sujet principal de cette thèse.

c. Facteurs influant sur les ROS dans les CSH

Un certain nombre de paramètres peuvent influencer la génération de ROS dans les CSH et déterminer le devenir des cellules (pour revue Lee et al., 2018). Nous aborderons ici trois points principaux : la signalisation externe par diverses molécules ; le vieillissement et le stress réplicatif ; et les radiations ionisantes.

i. Signalisation extrinsèque et traitements médicamenteux

Différents signaux extérieurs peuvent influer sur la quantité de ROS dans les CSH dans un but particulier, par exemple pour les mobiliser dans la circulation sanguine en situation de stress. De nombreux acteurs peuvent être à l'origine de ce type de mobilisation *in vivo* : interféron-α (IFNα) (Essers et al., 2009), G-CSF (Wright et al., 2001) ou encore des hémorragies (Cheshier et al., 2007). Dans le cas du G-CSF, le mécanisme régissant cet effet implique une augmentation de l'expression de cMET (MET proto-oncogene) corrélée à une accumulation de ROS (Tesio et al., 2011). Celle-ci est due à une inhibition de FOXO3 par mTOR et l'inhibition de cette voie ou des ROS limite la mobilisation des CSH. Pour l'IFNα, une activation de la voie AKT est également visible (Essers et al., 2009), suggérant une possible implication des ROS.

A l'inverse, la signalisation via FGF2 (fibrobalst growth factor 2) permet une expansion *in vivo* des CSH via une diminution des ROS tout en augmentant le cycle cellulaire (Itkin et al., 2012). Une sur-régulation de l'expression de cKIT en surface des CSH est également visible. D'autres acteurs de la niche permettent également de conserver un taux de ROS peu élevé, dont l'hypoxie précédemment citée. Par exemple, les monocytes et macrophages présents à proximité des CSH dans la niche hématopoïétique expriment la cyclooxygénase COX2, enzyme impliquée dans la synthèse de la PGE2, et inhibent la voie AKT tout en provoquant l'expression de CXCL12 par les cellules stromales (Ludin et al., 2012). Ainsi, ce mécanisme participe à la préservation d'un faible niveau de ROS.

Des traitements comme le 5-fluorouracile (5-FU), molécule utilisée en chimiothérapie, ont également un impact majeur sur les CSH, qui passe en partie par une modulation des ROS. En effet, la quantité de ROS augmente dans les CSH murines après un traitement au 5-FU et atteint son apogée 9 jours après injection (Baumgartner et al., 2018). Ce phénotype correspond à une expansion des CSH visant à répondre à la myéloaplasie induite par le traitement. A contrario, il est intéressant de noter, dans le contexte de traitement au 5-FU, que dans de souris déficientes pour *Mek* (mitogen activated protein kinase kinase), impliquée en amont de la voie ERK-PI3K-AKT responsable de la régulation des ROS, une diminution du nombre de CSH est observée dans la MO ainsi qu'une augmentation encore plus importante des ROS. A l'inverse des cellules WT, une augmentation de la masse et du potentiel mitochondriaux est également observé. Enfin, les effets sont annulés par un traitement au NAC.

ii. Vieillissement et stress réplicatif

Le vieillissement du système hématopoïétique et plus particulièrement des CSH se caractérise par un biais myéloïde et une perte des capacités de reconstitution hématopoïétique et de nichage (pour revue Lee et al., 2019). Cependant, le nombre de CSH est au contraire augmenté dans la MO de sujets âgés chez la souris comme chez l'homme (Rossi et al., 2005; Rundberg Nilsson et al., 2016; Sudo et al., 2000). De nombreux facteurs sont à l'origine de ce phénotype, comme des changements transcriptomiques (Rossi et al., 2005) et épigénétiques (Beerman et al., 2013), ainsi que l'accumulation de dommages à l'ADN de type cassures double-brin. Ces dommages pourraient trouver leur origine dans une accumulation de stress due à la réplication répétée des CSH (Flach et al., 2014; Walter et al., 2015).

Une des hypothèses sur l'origine du vieillissement repose en effet sur une accumulation de stress oxydant. Des défauts oxydatifs au niveau de l'ADN de 8-oxo-dG sont retrouvés dans de nombreux organes de souris et de rats âgés (Hamilton et al., 2001). Dans le système hématopoïétique, il a plus récemment été démontré une augmentation du niveau de plusieurs espèces de ROS dans les CSH de souris âgées par rapport à des souris jeunes, avec une augmentation de la proportion de ROS générées par la xanthine oxydase au cours du vieillissement (Porto et al., 2015). Les dommages à l'ADN, la sénescence ainsi que l'apoptose sont aussi accrus. Walter *et al.* ont également montré une augmentation du potentiel mitochondrial, du niveau de ROS et des lésions 8-oxo-dG dans les CSH ayant subi des entrées en cycle après stimulation externe (Walter et al., 2015). Une surexpression de SOD2 ou de CAT permet d'éviter les cassures double-brin, positionnant les ROS comme une des causes des dommages à l'ADN observés dans les cellules. Ces observations corrèlent avec celles de l'équipe de Toshio Suda (Ito et al., 2006), qui démontrent une élévation des ROS dans les CSH âgées et après transplantations répétées, inhibée après traitement au NAC. De même, dans les CSH humaines, une accumulation de ROS et de dommages à l'ADN est observée après transplantation en souris immunodéficiente (Yahata et al., 2011). Ce phénotype se retrouve également dans les CSH des patients ayant reçu une greffe et dans les patients âgés. Ces effets sont aggravés par une inhibition de la glutathione synthetase tandis qu'un traitement au NAC permet d'améliorer la fonctionnalité des CSH en diminuant les cassures double-brin de l'ADN.

Aussi, de façon intéressante, il semble possible de restaurer les fonctionnalités des CSH âgées chez la souris, par exemple en régulant la voie TXNIP-p38MAPK à l'origine d'une partie des effets du

vieillissement observés et connue pour être impliquée dans la régulation des ROS (Jung et al., 2016). En effet, l'introduction d'un peptide inspiré du domaine d'interaction de TXNIP et p38MAPK permet d'inhiber la voie p38MAPK et d'améliorer les propriétés des CSH *in vitro* et *in vivo*. De même, l'expression de *Sirt3*, également impliquée dans la régulation du stress oxydant, diminue avec l'âge, et sa surexpression permet également de « rajeunir » les CSH (Brown et al., 2013).

iii. Irradiation

Un élément majeur qui est connu pour induire une génération excessive de ROS est l'irradiation. Les radiations ionisantes sont particulaires, comme les protons ou les noyaux lourds retrouvés dans les radiations spatiales, ou électromagnétiques (rayons X ou γ par exemple). Elles peuvent avoir différentes énergies (exprimées en eV), différentes valeurs de transfert d'énergie linéique (TEL, en $keV.\mu m^{-1}$) et différentes efficacités biologiques relatives, qui mettent en avant le fait que les dégâts biologiques peuvent être radicalement différents pour une même dose selon le type de rayonnement. La dose reçue correspond à une quantité d'énergie absorbée par unité de masse et peut être exprimée en Gray (Gy) ou en Sievert (Sv) : ces deux unités correspondent dans le système d'unités internationales à des $J.kg^{-1}$ mais diffèrent par leur utilisation. Le Sv prend en compte l'efficacité biologique relative sur l'homme et est donc le plus couramment utilisé en épidémiologie ou dans les réglementations par exemple, tandis qu'en radiobiologie le Gy est l'unité de référence.

Les radiations ionisantes affectent les cellules de deux façons : directe, par déposition d'énergie sur les macromolécules présentes, en particulier dans le cas de hauts TEL ou de fortes doses ; ou indirecte, via l'ionisation de l'eau, qui a son tour provoque la production de radicaux libres, dont les ROS, qui induisent également des dégâts (pour revue Azzam et al., 2012; Desouky et al., 2015). L'ADN est souvent la macromolécule la plus touchée, avec différents types de dommages précédemment présentés, le plus grave étant la cassure double-brin. Différents mécanismes de réparation sont alors mis en place, comme la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ), la recombinaison homologue (HR), la réparation par excision de base (EBR) ou de nucléotide (NER) ou encore la voie ATM, qui peut ensuite réguler l'action de différentes protéines telles que p53, p21 ou $p16^{Ink4a}$, impliquée principalement dans la sénescence. L'augmentation des ROS induit l'activation de la voie p38MAPK et de façon subséquente de p16 (Desouky et al., 2015). Tout cela peut résulter soit en la réparation des dommages, parfois à l'origine de mutations, soit en la sénescence ou l'apoptose de la cellule. Dans la suite de ce paragraphe, nous nous focaliserons uniquement sur les dommages induits par les ROS après irradiation des CSH.

Fortes doses de radiations ionisantes

Une irradiation totale d'une souris à 6,5 Gy (dose sublétale) avec du ^{137}Césium (irradiation γ) provoque une augmentation des ROS qui mène à une augmentation des dommages oxydatifs (8-oxo-dG) et des cassures double-brin (identifiées par un marquage γH2AX) dans les CSH (Wang et al., 2010). Un impact sur la clonogénicité est observé, vraisemblablement dû à une sénescence des CSH, médiée par les inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes p16, p19 et $p21^{Cip1/Waf1}$, mais pas à une apoptose. Les auteurs montrent que l'augmentation des ROS est due à une augmentation de l'expression de NOX4 de la famille des NADPH oxydases, une des deux sources principales de ROS. Une inhibition des ROS par

le NAC ou de NOX4 par le diphenylene iodonium (DPI) permet d'atténuer les effets délétères dus à l'irradiation. Ces observations concernant NOX4 sont ensuite confirmées par le même groupe, qui ajoute que le nombre d'aberrations chromosomiques est également réduit par le traitement au DPI (Pazhanisamy et al., 2011). Un traitement avec un antioxydant analogue de SOD permet d'obtenir le même résultat. Le même type d'observations est partagé par un autre groupe qui a montré que les défauts fonctionnels des CSH après ce genre d'irradiation était dû à une augmentation des ROS induisant une senescence par l'expression de $p16^{Ink4a}$, $p19^{Arf}$ et de SA-β-gal (senescence associated beta galactosidase) (Shao et al., 2014). Différents types de protection contre les radiations ont été proposés pour les CSH, la plupart étant basées sur une action antioxydante. On peut citer par exemple la metformine (Xu et al., 2015), le resveratrol (Zhang et al., 2013), l'astaxanthine (Xue et al., 2017) ou encore le propofol (Han et al., 2019). De façon étonnante, de plus faible doses d'irradiation (4 Gy) induisent davantage d'apoptose que de sénescence, avec une activation préférentielle des voies p53 et $p21^{Cip1/Waf1}$ (Meng et al., 2003b, 2003a). En revanche, un traitement avec un agent chimiothérapeutique, le busulfan, récapitule les effets observés avec une irradiation à 6,5 Gy (sénescence et signalisation via $p16I^{nk4a}$, $p19^{Arf}$ et SA-β-gal).

La voie p53 est particulièrement impliquée dans la réaction à l'irradiation, à la fois dans les CSH humaines et murines. Il a été postulé que certaines mutations de p53 conféraient une résistance à l'irradiation (Lee and Bernstein, 1993). Deux équipes ont donc caractérisé l'impact de l'absence de p53 en réponse à l'irradiation respectivement dans les CSH murines (Mohrin et al., 2010) et humaines (Milyavsky et al., 2010). Dans ces études, l'irradiation est réalisée *ex vivo*, ce qui peut induire des différences par rapport aux résultats précédents. Ainsi, la clonogénicité des CSH murines semble améliorée comparée à celle des progéniteurs hématopoïétiques après une irradiation entre 2 et 4 Gy, et les cellules sont protégées de l'apoptose via un arrêt de la croissance et une réparation par NHEJ médiés par p53. En revanche, les CSH humaines de phénotype $Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}CD45RA^{-}CD90^{+}$ subissent davantage d'apoptose, ont de moins bonnes capacités clonogéniques et présentent un retard dans la réparation des cassures double-brin et une conservation plus longue du marquage γH2AX par rapport aux progéniteurs. L'inhibition de p53 permet alors d'améliorer la fonctionnalité des CSH humaines et murines *in vitro* et *in vivo*. Cependant, cela repose sur des mécanismes différents selon l'espèce : diminution de l'apoptose chez l'homme et augmentation de la prolifération chez la souris. Si l'implication des ROS n'est pas étudiée dans ces articles, il n'est pas impossible qu'elles participent au phénotype observé, compte-tenu du rôle de p53 dans la régulation du stress oxydant.

Le rôle de la voie NRF2 a également été étudié en ce qui concerne la réponse à l'irradiation. Ainsi, l'expression de nombreux gènes régulés par NRF2 est modifiée après irradiation de CSH humaines à 2 Gy. En particulier, l'expression de la protéine NQO1 (NAD(P)H déshydrogénase quinone 1) semble inversement corrélée à la survie des CSH irradiées (Kato et al., 2010). Une sur-activation de NRF2 (pharmacologique ou par inhibition de son régulateur KEAP1) permet également de mieux protéger le système hématopoïétique de souris irradiées (Kim et al., 2014).

Faibles doses de radiations ionisantes

Le rôle des faibles doses de radiations ionisantes est un domaine moins étudié que les fortes doses. En effet, il a longtemps été considéré que les faibles doses étaient inoffensives (modèles de radiosensibilité linéaires ou à seuil) voire avaient des propriétés bénéfiques (modèle hormétique) (pour revue Doss, 2013). Cependant, des études ont récemment montré une augmentation de l'incidence de tumeurs cérébrales et hématologiques sur des enfants soumis à de nombreux scanners (Pearce, 2011; Pearce et al., 2012). Nous sommes ainsi fréquemment exposés à de faibles doses de radiations ionisantes à cause de l'imagerie médicale ou du voyage en avion par exemple. Les études concernant les faibles doses de radiations ionisantes ont donc été plus nombreuses ces dernières années, révélant des effets inattendus sur les CSH. Principalement, une augmentation des ROS semble être une caractéristique générale de la réponse aux faibles doses d'irradiation, y compris dans d'autres types cellulaires (pour revue Kawamura et al., 2018 et voir Annexe 1).

L'exposition des astronautes à de faibles doses de radiations ionisantes à haut TEL ont en particulier été étudiés. Par exemple, l'irradiation par des ions ^{56}Fe modifie le paysage épigénétique des CSH murines, en augmentant la méthylation de l'ADN et diminuant l'expression de la méthyltransférase DNMT3B 4 semaines après une irradiation entre 100 et 400 mGy (Miousse et al., 2014). Cependant, à cette dose et pour ce type d'irradiation, aucun effet classique de l'irradiation (dommages à l'ADN, augmentation des ROS) ne peut être observé. Plus récemment, deux études portant sur les effets à court (2 semaines) et long (3 mois) termes de l'irradiation au ^{16}O, particules avec une très haute énergie ont été étudiés (Chang et al., 2016; Wang et al., 2017). Les effets immédiats de cette irradiation sont une diminution de la fréquence et du nombre des CSPH et de leur fonctionnalité, démontrée par des tests *in vitro* (CFU-C, CAFC), à toutes les doses testées. De façon intéressante, pour les doses les plus faibles (100 mGy), les effets sont plus longs à apparaître. Pour ce type d'irradiation, une augmentation persistente de la production de ROS et des cassures double-brin (foci γH2AX) est bien visible. En revanche l'apoptose n'est pas accrue. De façon surprenante, dans le cas d'une irradiation au ^{137}Ce, une irradiation de type γ de moindre énergie et moindre TEL, après 3 mois aucune différence n'est visible quelle que soit la dose d'irradiation par rapport à des cellules non irradiées. Toujours chez la souris, une irradiation à 20 mGy au ^{60}Co, d'énergie intermédiaire, induit une baisse conséquente des capacités fonctionnelles des CSH dès la culture primaire en test CFU-C (Rodrigues-Moreira et al., 2017). Cette radiosensibilité semble être exceptionnellement forte à cette dose particulière. De plus, une augmentation transitoire des ROS et de la translocation nucléaire de NRF2 sont visibles, ainsi que de l'autophagie. Une deuxième vague d'augmentation des ROS a ensuite lieu après environ une semaine et le stress oxydant semble persister plusieurs mois *in vivo*. En revanche, les dommages à l'ADN habituellement vus après irradiation à forte dose sont absents (foci γH2AX) et aucune activation des voies de réparation ATM et p53 n'est visible. De plus, le cycle cellulaire n'est pas modifié et il n'y a aucune élévation de l'apoptose. De façon intéressante, et en lien avec l'effet des fortes doses, une déficience en *Nrf2* accentue l'hyper-radiosensibilité tandis qu'une déficience en *Keap1*, stabilisant NRF2, l'annule. Enfin, un traitement antioxydant au NAC limite l'augmentation de l'autophagie.

d. Mesure des ROS

La question de la mesure des taux intracellulaires de ROS est souvent sujette à débat au sein de la communauté scientifique (pour revue Vlaski-Lafarge and Ivanovic, 2015). De nombreuses sondes fluorescentes commerciales ont été développées au cours du temps : dihydroéthidine (DHE), le diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2',7' (H_2-DCFDA), MitoSOX, CellRox, etc. Elles reposent principalement sur des réactions chimiques d'oxydation, qui créent une espèce intermédiaire radicale capable d'être à nouveau oxydée pour devenir fluorescente ou capturée par les agents antioxydants présents.

Cependant, ces sondes présentent plusieurs désavantages, notamment le fait d'être particulièrement instables. Il est donc dans l'idéal nécessaire de les manipuler sous atmosphère protégée (par exemple sous atmosphère d'argon) afin d'éviter leur oxydation par le dioxygène présent dans l'air ambiant. Par ailleurs, la variété d'espèces mesurées et la spécificité sont différentes selon chaque sonde. Par exemple, il est impossible de mesurer directement la quantité de H_2O_2 avec le H_2-DCFDA (Karlsson et al., 2010). La détection dépend en effet de la présence de catalyseurs métalliques qui peuvent ne pas être spécifiques de la présence de ROS (par exemple due au cytochrome C relâché lors de l'apoptose) et fausser la mesure. De plus, les mécanismes d'oxydoréduction qui permettent d'activer la fluorescence de la sonde peuvent eux-mêmes biaiser la mesure (Folkes et al., 2009). La DHE et le MitoSOX, qui est la version adressée à la mitochondrie de la DHE, sont plus spécifiques de l'espèce $O_2^{\bullet}$. Enfin, la fluorescence de ces sondes après oxydation est le plus souvent irréversible, ce qui rend difficile les mesures dynamiques.

Des sondes à base de boronate, qui ne reposent pas sur une oxydation directe de la sonde par les ROS, peuvent aussi être utilisées. La méthode de détection consiste en l'oxydation d'un groupe bloqueur du fluorophore, qui est alors libéré pour provoquer la fluorescence. Ces sondes sont moins sujettes à des réactions complexes d'oxydation à l'origine des difficultés rencontrés avec les sondes classiques précedemment présentées (Winterbourn, 2014).

Récemment, de nouvelles méthodes ont été mises au point pour tenter de mesurer de façon plus fiable les ROS. Notamment, des protéines fluorescentes GFP ou YFP (yellow fluorescent protein) sensibles à l'environnement redox (roGPF et rxYFP, respectivement) ont été développées et peuvent être encodées génétiquement (Dooley et al., 2004; Meyer and Dick, 2010). Une fusion à une protéine réagissant directement avec une espèce particulière impliquée dans un couple redox, par exemple GRX1 qui réagit avec la forme oxydée du glutathion, ou ORP1 (oxysterol binding protein related 1) qui réagit directement avec H_2O_2, permet d'obtenir une spécificité pour ce couple et d'accélérer la cinétique de réaction avec la sonde. Ainsi, des mesures dynamiques précises et réversibles deviennent possibles. Ces sondes ont notamment été utilisées avec succès pour déterminer la quantité mitochondriale de H_2O_2 dans les CSH murines (Cabezas-Wallscheid et al., 2017) ou l'état d'oxydation du glutathion dans d'autres types de cellules souches (Fernandez-Antoran et al., 2019).

Chapitre 3 : Utilisation des CSH en biothérapie

1. *Thérapie cellulaire et génique en hématologie*

a. Thérapie cellulaire et génique : définition

i. La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste à greffer un ou plusieurs types de cellules pour restaurer la fonction d'un organe ou d'un tissu. Les cellules greffées ont le plus souvent un potentiel souche et sont pluri- ou multipotentes, ce qui permet de renouveler en continu les différents types de cellules différenciées nécessaires à restaurer la fonction défectueuse. Elles peuvent provenir d'un donneur compatible adulte (CSM, CSH…) ou être prélevées sur un embyron (cellules souches embryonnaires ou ES). L'avantage de cette dernière méthode est le plus faible potentiel immunogénique des ES, ce qui n'implique donc pas un traitement immunosuppresseur à vie pour éviter les risques de rejet. La greffe est alors appelée allogénique. Elles peuvent également être prélevées sur le patient dans le cas de cellules souches saines ; ou obtenues à partir de ses propres cellules matures reprogrammées génétiquement en cellules souches pluripotentes (Induced Pluripotent Stem cells, iPS) grâce à un cocktail de facteurs définis par Yamanaka en 2006 : OCT3/4 (octamer-binding transcription factor 3/4), SOX2 (SRY-box transcription factor 2), cMYC et KLF4 (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ces cellules peuvent être ensuite différenciées en différents types de cellules souches multipotentes grâce à des cocktails de facteurs de croissance pour devenir plus spécifiques de l'organe concerné (pour revue Hirschi et al., 2014). Dans ces deux derniers cas, la greffe est alors autologue.

De nombreux essais cliniques sont actuellement en cours afin de tester l'efficacité et l'inocuité de différentes thérapies cellulaires, surtout sur les iPS. En effet, ces cellules, du fait de leur reprogrammation génétique forcée, pourraient être plus prônes à la transformation cancéreuse. Certaines thérapies cellulaires sont déjà autorisées par les autorités de santé et utilisées (par exemple Holoclar, dont l'autorisation de mise sur le marché date de 2015), tandis que d'autres sont autorisées et largement utilisées depuis des dizaines d'années : la greffe de cellules souches cutanées cultivées *in vitro* pour le traitement des grands brûlés ; et la greffe de cellules souches hématopoïétiques pour le traitement de pathologies hématologiques.

ii. La thérapie génique

Les maladies génétiques sont héréditaires et dues à la présence de mutations sur un ou plusieurs gènes ou de leur mauvaise traduction et/ou transcription. Ceci mène à la production de protéines dysfonctionnelles ou à leur absence. La thérapie génique consiste alors à compenser ces phénomènes dans les cellules du patient pour obtenir des protéines fonctionnelles (pour revue Anguela and High, 2019). L'avantage indéniable de cette méthode par rapport à une thérapie cellulaire est l'absence de risques de rejet par le patient, puisqu'il s'agit de ses propres cellules.

La première approche est de suppléer le gène muté, en introduisant une copie fonctionnelle thérapeutique à l'aide d'un vecteur. Nous reviendrons sur les différents vecteurs dans la partie suivante. Cette copie sera capable, une fois intégrée dans les cellules du patient (au sein de son génome ou pas), de permettre la synthèse de la protéine intègre, respectivement à la place ou en plus de la protéine manquante ou mutée. Ceci permettra de restaurer la fonctionnalité des cellules au sein de l'organe concerné. Deux possibilités existent pour permettre l'acheminement de la copie du gène : soit injecter le vecteur dans l'organe cible, avec une perte substantielle de matériel dans les tissus ; soit dans les cellules souches de l'organe visé, lorsqu'elles sont facilement accessibles. C'est notamment le cas des CSH, facilement mobilisables dans le sang ou récupérables par un prélèvement de moelle osseuse. Cette technique permet d'utiliser moins de vecteur et d'éviter l'intégration du gène dans des cellules non spécifiquement visées (Figure 17a).

Une deuxième possibilité est de modifier l'expression d'un ARN messager produit à partir du gène muté pour permettre une traduction en protéine adaptée. Il est par exemple possible de restaurer la traduction d'un exon manquant, ou de sauter les séquences porteuses de la mutation pour obtenir une protéine plus courte mais efficace dans sa fonctionnalité. Ces méthodes utilisent généralement des petits oligonucléotides anti-sens. Il est également envisageable de réprimer la production d'une protéine mutée ou exprimée en excès par des ARN interférents comme des miRNA ou des silencing-ARN (siRNA), oligonucléotides d'une vingtaine de base bloquant la traduction de l'ARN messager ; ou encore par des ARN en épingle à cheveux (shRNA pour short-hairpin RNA) (Figure 17b). Cela nécessite cependant un contrôle parfait de la complémentarité et de la spécificité entre le siRNA et mRNA visé, pour éviter une interaction non-spécifiques avec d'autres ARN messagers présents dans la cellule. Différentes méthodes de transport de ces oligonucléotides sont également étudiées : vecteurs viraux, aptamères, peptides, nanoparticules…

Plus récemment, de nouvelles techniques d'édition du génome sont apparues. Celles-ci permettent de réparer directement les mutations dans le gène concerné, de façon plus ciblée par différentes méthodes (pour revue Khan, 2019). Le plus généralement, cela nécessite une nucléase, qui permet de réaliser une cassure double brin sur l'ADN au niveau de la mutation, comme les protéines à doigt de zinc (zinc-finger) ou TALEN (transcription activator-like effector nucleases). On peut alors laisser l'ADN se réparer seul par NHEJ, en supposant qu'une mutation interviendra sur la zone à réparer ; ou introduire une séquence d'ADN dont les extrémités sont complémentaires à celles de l'ADN coupé pour favoriser la recombinaison homologue, qui intégrera la séquence au génome. Cependant ces protéines peuvent être difficiles à synthétiser en obtenant une bonne spécificité. Un outil, découvert en 2012 (Jinek et al., 2012), est actuellement en pleine expansion et très prometteur : CRISPR-CAS9 (cluster regularly interspaced short palindromic repeats et CRISPR-associated endoribonuclease 9). Cette technique simple à mettre en œuvre permet de cibler la zone de l'ADN à couper non pas grâce à une protéine mais grâce à une séquence d'ARN, liée à la nucléase CAS9. Par ailleurs, il est désormais possible d'utiliser des protéines Cas permettant également l'édition de génome : on remplace une base par une autre plutôt que de couper l'ADN, ce qui permet des réparations très précises de mutations ponctuelles (Figure 17c).

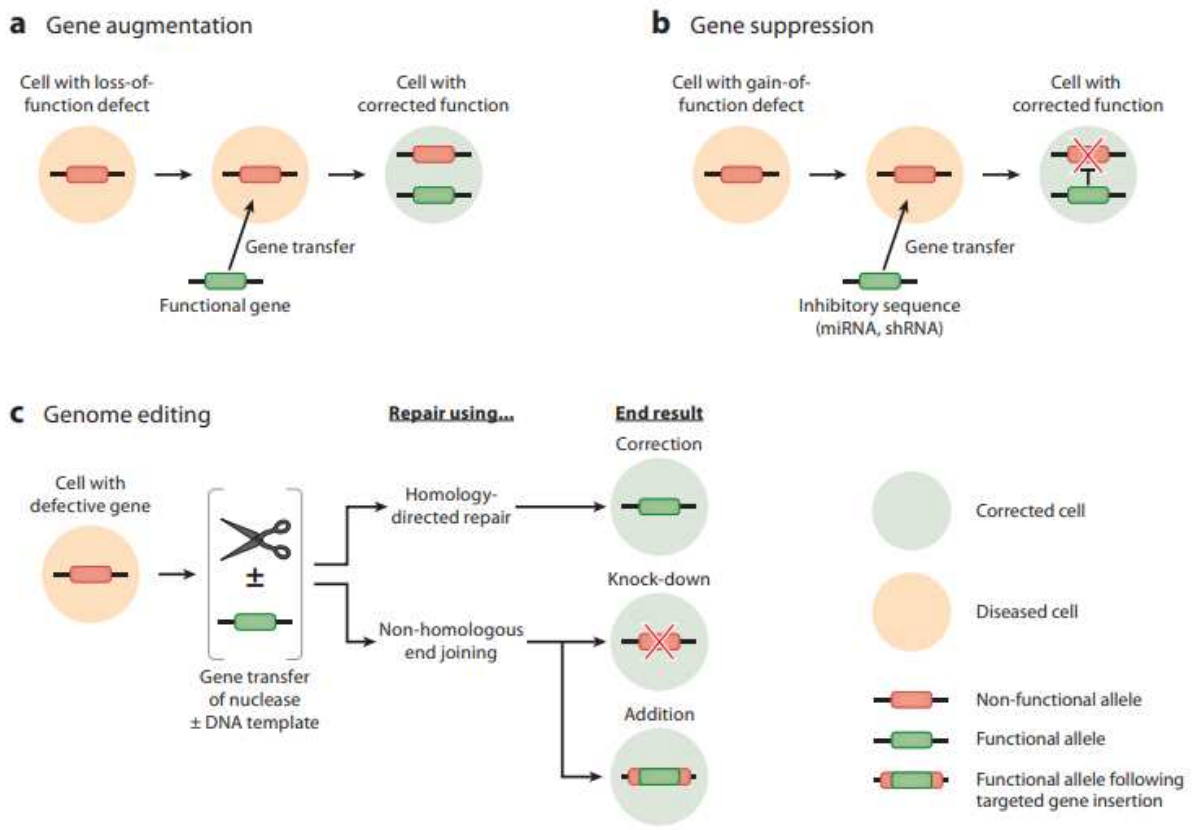


Figure 17 : Différentes méthodes de thérapie génique

Tiré de Anguela and High, 2019

b. Modification génétique et vecteurs utilisés

i. Vecteur non viraux

Un certain nombre de vecteurs non-viraux ont été proposés pour transporter du matériel génétique et pallier aux limitations des virus (pour revue Ramamoorth and Narvekar, 2015). Le gène d'intérêt peut être délivré sous différentes formes : oligonucléotides, plasmides, ARN… Plusieurs méthodes existent alors pour amener le matériel génétique dans les cellules d'intérêt :

- Méthode physiques : on utilise une force physique pour amener le matériel génétique à traverser la membrane cellulaire. Plusieurs techniques existent : électroporation, c'est-à-dire l'application d'un champ électrique pour créer des pores de façon réversible ; sonoporation, soit l'utilisation d'ultrasons pour perméabiliser la membrane ; photoporation ou perméabilisation par laser ; hydroporation, c'est-à-dire utilisation d'une pression hydrodynamique ; magnétofection, soit couplage à des billes magnétiques et utilisation d'un aimant ; etc.
- Méthode chimiques : nanoparticules inorganique à base de phosphate de calcium, de silice, d'or, ou encore de nanotubes de carbones ou de fullerènes (molécules de carbone

solubles) ; vecteurs lipidiques, sous forme de liposomes, émulsions ou nanoparticules ; peptides ; polymères ; etc.

Chacune de ces méthodes possède des avantages et des inconvénients et sera donc plus ou moins adaptées selon les applications. En hématologie, les méthodes virales, principalement à base de rétrovirus et de lentivirus, sont les plus utilisées.

ii. Vecteur viraux

Pour délivrer le matériel génétique nécessaire à la thérapie génique, plusieurs méthodes ont été proposées par la communauté scientifique. Les vecteurs les plus couramment utilisés sont des vecteurs viraux, car ils présentent des propriétés particulières leur permettant d'entrer dans la cellule et d'y exprimer leur génome, voire de l'intégrer dans le génome de la cellule hôte. Ils peuvent donc être spécifiquement conçus pour exprimer le ou les gène(s) d'intérêt et permettent son introduction aisée dans le noyau des cellules d'intérêt où il sera transcrit puis traduit en protéine.

Trois caractères fondamentaux des virus ont été énoncés en 1953 par André Lwoff : (1) le génome viral est constitué uniquement d'ADN ou d'ARN ; (2) les virus se reproduisent par réplication et transmettent leur matériel génétique et (3) ils reposent sur le parasitisme cellulaire pour leur reproduction. Ces trois caractéristiques en font de très bons candidats pour délivrer une séquence génétique choisie, après avoir éliminé toute pathogénicité du virus par ingénierie génétique. Le génome viral est alors remplacé par le transgène d'intérêt, et la réplication du virus peut être supprimée. Différents types de virus ont été utilisés pour des essais de thérapie génique, chacun ayant des avantages et des inconvénients (pour revue Lundstrom, 2018) (Tableau 1) :

- Vecteurs viraux à ADN (adénovirus, herpesvirus, virus adéno-associés) (pour revue Lundstrom, 2018)

Les adénovirus expriment leur génome sous forme d'ADN bicaténaire, et sont non-intégratifs, c'est-à-dire que le génome viral n'est pas intégré dans l'ADN de la cellule hôte mais est maintenu sous forme d'épisome. Ainsi la modification génétique ne sera pas présente dans la progénie des cellules infectées et l'expression du transgène thérapeutique est transitoire, tant que les cellules infectées sont présentes. Pour les adénovirus, il existe plus d'une cinquantaine de sérotypes connus infectant l'homme. Le plus couramment utilisé pour la thérapie génique est l'Ad5. Cependant, les adénovirus ont tendance à engendrer une réponse inflammatoire. Ce problème a été résolu par l'utilisation de virus adéno-associés (AAVs), qui présentent moins de toxicité mais sont plus limités en terme de taille de transgène tranporté.

- Vecteurs viraux à ARN (rétrovirus, lentivirus) (pour revue Lundstrom, 2018)

Les rétrovirus sont des virus à ARN. Ils présentent une alternative attrayante aux adénovirus du fait de leur capacité à intégrer leur génome à l'ADN de la cellule hôte après rétro-transcription. Ainsi le transgène sera exprimé de façon stable et transmis à la progénie des cellules modifiées. Cependant, selon le type de virus, par exemple dans les γ-rétrovirus, cette intégration peut se faire de façon aléatoire, ce qui pose des problèmes de sécurité. L'intégration peut en effet être mutagène : si celle-ci

se fait par exemple proche d'un oncogène, elle peut en favoriser l'expression et la survenue de cancers. Les γ-rétrovirus ont été particulièrement utilisés au début de la thérapie génique, mais sont progressivement remplacés par les **lentivirus**, sous-classe particulière de rétrovirus, dont le site d'intégration est mieux maîtrisé. Le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) en fait partie. Un autre avantage est leur capacité à traverser les pores nucléaires de cellules en dehors de la phase de division, donc à infecter des cellules quiescentes. Cette particularité est utile dans le cas de thérapie géniques sur les CSH, qui sont par nature quiescentes. Ainsi, malgré la prédominance des rétrovirus notamment dans le domaine de la recherche, les lentivirus sont actuellement de plus en plus utilisés dans les essais cliniques (pour revue Milone and O'Doherty, 2018).

Le principal point faible d'un virus reste cependant son immunogénicité (sauf dans le cas des AAV) notamment dans le cadre de thérapie génique *in vivo*, où il est injecté dans le corps du patient, par exemple en intraveineuse ou dans l'organe ciblé, et risque d'être éliminé par le système immunitaire.

	RETROVIRUS	LENTIVIRUS	ADENOVIRUS	AAV
GENOME VIRAL	ARN	ARN	ADN	ADN
DIVISION CELLULAIRE REQUISE	Oui	Phase G1	Non	Non
LIMITE DE TAILLE	8 kb	8 kb	8-30 kb	5 kb
REPONSE IMMUNITAIRE	Faible	Faible	Importante	Faible
INTEGRATION AU GENOME	Oui	Oui	Faible	Faible
EXPRESSION A LONG-TERME	Oui	Oui	Non	Oui
AVANTAGES	Expression persistante dans les cellules en division	Expression persistante dans les tissus transduits	Très efficaces pour transduire une grande variété de tissus	Peu de réponse inflammatoire, non pathogène

Tableau 1 : caractéristiques de différents types de virus utilisés en thérapie génique

iii. Particularités sur la transduction lentivirale et les CSH

Pour la thérapie génique utilisant les CSH, l'usage de vecteurs rétroviraux a très longtemps été la norme. Cependant, ce type de transduction implique une entrée en cycle des cellules, obtenue après stimulation par des cytokines et des facteurs de croissance. Néanmoins, nous avons détaillé dans les chapitres précédents que la sortie de quiescence des CSH induisait une perte de leurs propriétés. Ainsi, la mise au point des vecteurs lentiviraux, qui permettent une transduction plus facile des cellules en phase G0 ou G1 du cycle cellulaire, permet d'éviter un épuisement trop rapide des CSH.

Différents protocoles ont été proposés pour obtenir le meilleur compromis entre qualité de la transduction et maintien des propriétés des CSH, jouant en particulier sur la présence ou non de sérum animal, sur les concentrations des cytokines et sur la durée de pré-stimulation et de transduction

(Millington et al., 2009; Uchida et al., 2011). Au laboratoire, nous réalisons en routine une transduction de 48 à 72 heures, après une éventuelle pré-stimulation de 24 heures dans un milieu commercial de remplacement de sérum de veau fœtal pour la culture des CSH (BIT 9500, StemCell Technologies) supplémenté avec les facteurs de croissance suivants : SCF (100 ng/mL), FLT3L (100 ng/mL), IL3 (60 ng/mL) et TPO (10 nM) (Brunet de la Grange et al., 2006). L'addition d'autres molécules (cyclosporine, rapamycine, retronectine etc) a également été explorée (Petrillo et al., 2018, 2019).

Par ailleurs, la sécurité de la transduction lentivirale est une préoccupation majeure pour le développement de ce type de thérapie génique (Neschadim et al., 2007). Dans les dernières générations, les différents composants du virus sont introduits via différents plasmides afin de maximiser la sécurité de la méthode. Les dernières générations de lentivirus utilisent une enveloppe exprimant la protéine VSV-G (vesicular-stomatitis-virus-G) qui permet de cibler un grand nombre de types cellulaires ; cependant, d'autres types d'enveloppes, exprimant par exemple des glycoprotéines retrouvées sur les enveloppes de rétrovirus de babouins (BaEV), pourraient être plus adaptés pour la transduction lentivirale des CSH quiescentes (Girard-Gagnepain et al., 2014).

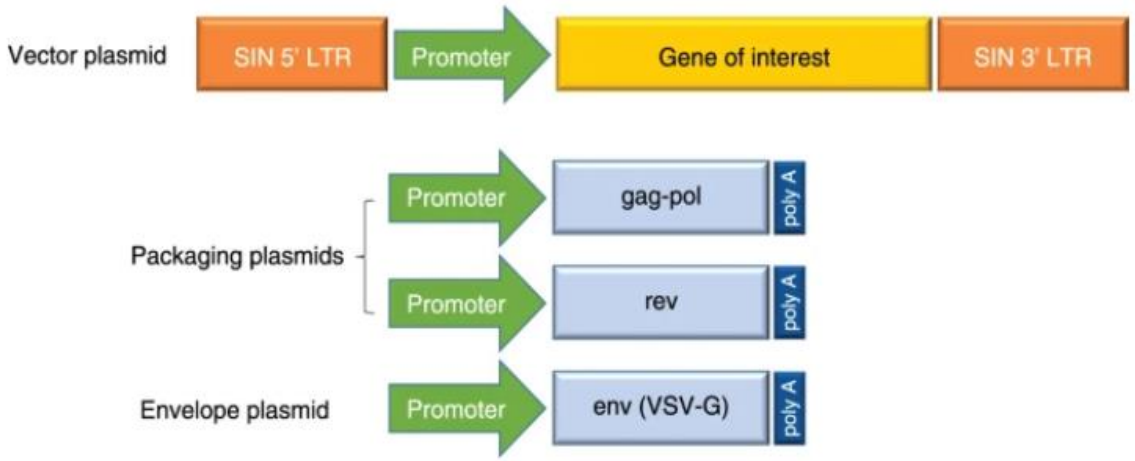


Figure 18 : Composition des vecteurs lentiviraux de troisième génération

Les différents composants permettant la synthèse virale gag, pol et rev sont encodés dans deux plasmides différents ; les protéines de l'enveloppe sont encodés dans un troisième. Enfin, le plasmide vecteur est contient des séquences dites « self-inactivating » (SIN) pour éviter toute recombinaison.

Tiré de Milone and O'Doherty, 2018

c. Les maladies hématologiques traitées par thérapie cellulaire et génique

Un certain nombre de maladies du système sanguin et immunitaire nécessite une réinitialisation totale du système pour éliminer toutes les cellules malades et redémarrer avec des cellules saines. C'est particulièrement vrai lorsque les cellules les plus immatures et notamment les CSH sont touchées par des mutations, car elles les transmettent à toute leur progénie, empêchant l'intégralité du système hématopoïétique de fonctionner. Un certain nombre de maladies peuvent ainsi être traitées par

thérapie cellulaire et génique (pour revue (Tsuruta, 2013). Nous allons décrire rapidement quelques-unes d'entre elles, sans entrer de façon précise dans leur description clinique.

i. Les cancers hématologiques

Les cancers du système hématopoïétique peuvent se déclarer à tout niveau de la chaîne de différenciation. On distingue de manière générale trois grands types de cancers hématologiques :

- Les leucémies, qui indiquent le plus souvent une prolifération de cellules anormales dans la moelle qui se disséminent également dans le sang.
- Les lymphomes, cancers du système lymphatique, pour lesquels l'accumulation de globules blancs cancéreux se fait surtout au niveau des organes lymphoïdes : ganglions, rate et foie, dont la taille augmente.
- Les myélomes, tumeurs spécifiques des plasmocytes.

Ces trois familles sont ensuite subdivisées en sous-groupes, tels que les leucémies aiguës, lymphoïdes (LAL) ou myéloïdes (LAM) ; ou chroniques, lymphoïdes (LLC) et myélo-monocytaires (LMC). Les traitements sont souvent spécifiques de chaque sous-type de cancer, mais reposent globalement sur des séances de chimiothérapies, d'immunothérapie et parfois de radiothérapie. Pour certains types, notamment les leucémies aiguës il est fréquent de proposer une thérapie cellulaire de greffe de moelle osseuse, donc de CSH, allogénique. Cela permet de pouvoir être agressif dans les traitements et de diminuer les risques de rechutes dues à des cellules tumorales résiduelles. Les CSH greffées colonisent la moelle et se différencient en cellules saines, permettant alors de prendre le relais du système hématopoïétique du patient éliminé par les traitements. En l'absence de donneur compatible, une autogreffe peut être envisagée, mais présuppose que le cancer ne trouve pas son origine dans une mutation génétique héritée ou acquise affectant aussi les CSH, au risque de greffer des cellules pouvant provoquer une rechute. Certains lymphomes peuvent être traités par autogreffe de moelle osseuse en seconde intention, en cas d'échec des chimiothérapies. Ces thérapies sont plus rares pour les myélomes, les autres traitements permettant le plus souvent d'obtenir une rémission.

Différents stades pré-cancéreux existent également, comme les syndromes myélodysplasiques ou myéloprolifératifs. Ces affections peuvent également être traitées par thérapie cellulaire à base de CSH, en cas de suspicion de transformation leucémiques rapide et d'agressivité.

Par ailleurs, les cancers hématologiques ont été parmi les premiers à être traités par cellules T-CAR (chimeric antigen receptor), en particulier les leucémies aigües et lymphomes touchant la lignée lymphocytaire B. Ces cellules T-CAR sont dirigées contre un marqueur spécifique des cellules B, le CD19, permettant d'éliminer tous les blastes anormaux (pour revue Pettitt et al., 2018). Deux médicaments ont été approuvés aux Etats-Unis : Kymriah et Yescarta. Ces thérapies sont prometteuses, néanmoins dans la grande majorité des cas, le recours à la greffe de CSH est l'option privilégiée, car mieux maîtrisée.

ii. Les maladies génétiques du système sanguin

Des mutations génétiques peuvent altérer les fonctions essentielles de différentes cellules du système hématopoïétique. Les déficits immunitaires primitifs (DIP) font partie des maladies génétiques touchant le système hématopoïétique. Celles-ci se caractérisent par une atteinte d'un ou de plusieurs composants de l'immunité acquise ou innée, humorale ou cellulaire, affaiblissant les défenses du patient et l'exposant à de fréquentes infections, voire provoquant des réactions auto-immunes importantes. Plus de 300 gènes ont été identifiés dans différents formes de DIP. Les syndromes sont nombreux et variables, dépendant du type de cellules touchées (pour revue Picard et al., 2015). On peut citer quelques exemples comme l'agammaglobulinémie liée à l'X (gène *BTK*, Bruton tyrosine kinase), provoquant un déficit en lymphocytes B et plasmocytes impliquant une déplétion totale en immunoglobulines ; la lymphohistiocytose hémophagocytaire (qui peut également se déclarer après des infections virales ou à cause d'une maladie auto-immune), provoquant une suractivation de nombreuses cellules du système immunitaire (NK, lymphocytes T, macrophages) ; certaines formes impliquent une déplétion à la fois des lymphocytes T, B et des cellules NK sont souvent regroupées sous l'acronyme SCID (déficit immunitaire combiné sévère), comme le syndrome de Wiskott-Aldrich (gène WAS), l'ADA-SCID (déficience du gène *ADA*, adenosine desaminase), ou d'autres déficits dus aux gènes *JAK3* (Janus kinase 3), *ARTEMIS* ou *DCLRE1C* (DNA cross-link repair 1C), *RAG1/2*, etc. Ce sont également les premières maladies à avoir été traitées avec succès par la thérapie génique, en particulier le SCID lié à l'X (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2010), l'ADA-SCID (pour revue Ferrua and Aiuti, 2017) et le syndrome de Wiskott-Aldrich (Ferrua et al., 2019).

Parmi les maladies génétiques du système sanguin les plus connues traitables par thérapie génique se trouvent également différentes formes d'anémie et d'hémoglobinopathies (pour revue Motta et al., 2019). La drépanocytose, ou anémie à hématies falciformes, est la plus courante. C'est une maladie autosomique récessive, causée par une mutation présente sur les deux allèles du gène HBB, responsable de la synthèse de la β-globine, l'un des deux composants de l'hémoglobine. Le remplacement d'un seul acide aminé sur la protéine conduit au phénotype. Les globules rouges sont alors caractérisés par une forme particulière dite en « faucille » et éliminés précocement par le corps, causant une anémie hémolytique. La β-thalassémie est une forme légèrement différente : dans ce cas, la β-globine est fonctionnelle mais présente en très petite quantité voire absente. Pour ces deux maladies, des transfusions plus ou moins fréquentes permettent d'atténuer les symptômes. L'anémie de Fanconi est une maladie génétique plus rare, présentant une hétérogénéité phénotypique et génétique : une vingtaine de gènes, appartenant à une même voie métabolique régulant la réparation de l'ADN, ont à ce jour été identifiés comme pouvant être à l'origine de la maladie, et les recherches se poursuivent. Celle-ci provoque souvent des malformations congénitales, et une progressive aplasie médullaire prédisposant à des myélodysplasies voire à des leucémies myéloïdes aiguës. Ces différentes maladies font également l'objet de recherches intensives (Dussiot et al., 2014; Guillem et al., 2019) et d'essais cliniques pour un traitement par thérapie génique (Cavazzana-Calvo et al., 2010; Ribeil et al., 2017; Río et al., 2018; Sii-Felice et al., 2018; Thompson et al., 2018).

Cette liste est évidemment non exhaustive et il existe autant de maladies du système hématopoïétique que de mutations dans les gènes impliqués dans l'hématopoïèse. Dans tous ces exemples, la thérapie cellulaire sous forme de greffe de moelle osseuse a longtemps été le seul

traitement efficace pour traiter les formes les plus graves mettant en danger la vie des patients. Cependant, les nouveaux traitements de thérapie génique présentent de très bons résultats.

iii. Le SIDA

En 2013, une rémission pendant plusieurs mois de deux patients atteints du SIDA (syndrôme d'immunodéficience acquise) ayant subi des greffes de moelle osseuse laisse espérer que la thérapie cellulaire puisse être un traitement envisageable pour cette maladie. Des hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène. Le réservoir de VIH (virus de l'immunodéficience humaine) non éliminé par la trithérapie se trouverait en effet dans la moelle osseuse et en particulier dans les CSPH (McNamara and Collins, 2011). En éliminant la moelle osseuse pour réaliser la greffe, puis par une réaction du greffon contre l'hôte, on permettrait l'élimination des particules virales à l'origine des rechutes lors de l'arrêt des rétroviraux. Malheureusement, le VIH a finalement été détecté dans leur corps quelques mois plus tard, indiquant soit que la déplétion médullaire n'était pas assez agressive (trop de réservoir encore présent), soit que d'autres réservoirs existent dans l'organisme, comme le foie ou le cerveau. Très récemment, lors d'une conférence internationale, une équipe américaine a présenté des résultats sur la « guérison », ou tout du moins la rémission à long-terme sans traitements, de patients atteints du SIDA après avoir également subi une greffe de moelle osseuse suite à une leucémie. Les greffons étaient tous les deux porteurs d'une mutation sur le gène *CCR5* (C-C motif chemokine receptor 5), qui joue un rôle crucial sur l'entrée du VIH dans les lymphocytes T. Les personnes porteuses de cette mutation sont ainsi naturellement « résistantes » à l'infection par le VIH. Chez ces deux patients, l'arrêt total des anti-rétroviraux n'a pas donné lieu à une résurgence de la maladie plusieurs années après la greffe.

La greffe de moelle osseuse restant dans tous les cas une thérapie risquée, avec un traitement immunosuppresseur lourd, des recherches sont donc menées sur une thérapie génique visant le récepteur CCR5, de manière à inhiber son expression dans les lymphocytes T des patients. Une équipe a notamment réussi à éditer le gène ex vivo dans les lymphocytes T grâce à aux nucléases à doigt de zinc (Tebas et al., 2014). Cette approche semble sans risque. D'autres ont choisi des approches d'ARN interférent ou de siRNA (Anderson and Akkina, 2007; Kim et al., 2010). Fin 2018, une équipe chinoise a par ailleurs fait naître des jumelles dont le génome a été édité par CRISPR-CAS9. La mutation, obtenue par NHEJ, est inédite, et ses conséquences exactes sont inconnues. Cet événement a provoqué un tollé, car ni la technologie ni les effets d'une telle mutation ne sont pour l'instant suffisamment connus. Ces nouvelles pistes pourraient néanmoins mener dans les années à venir à des traitements définitifs du SIDA.

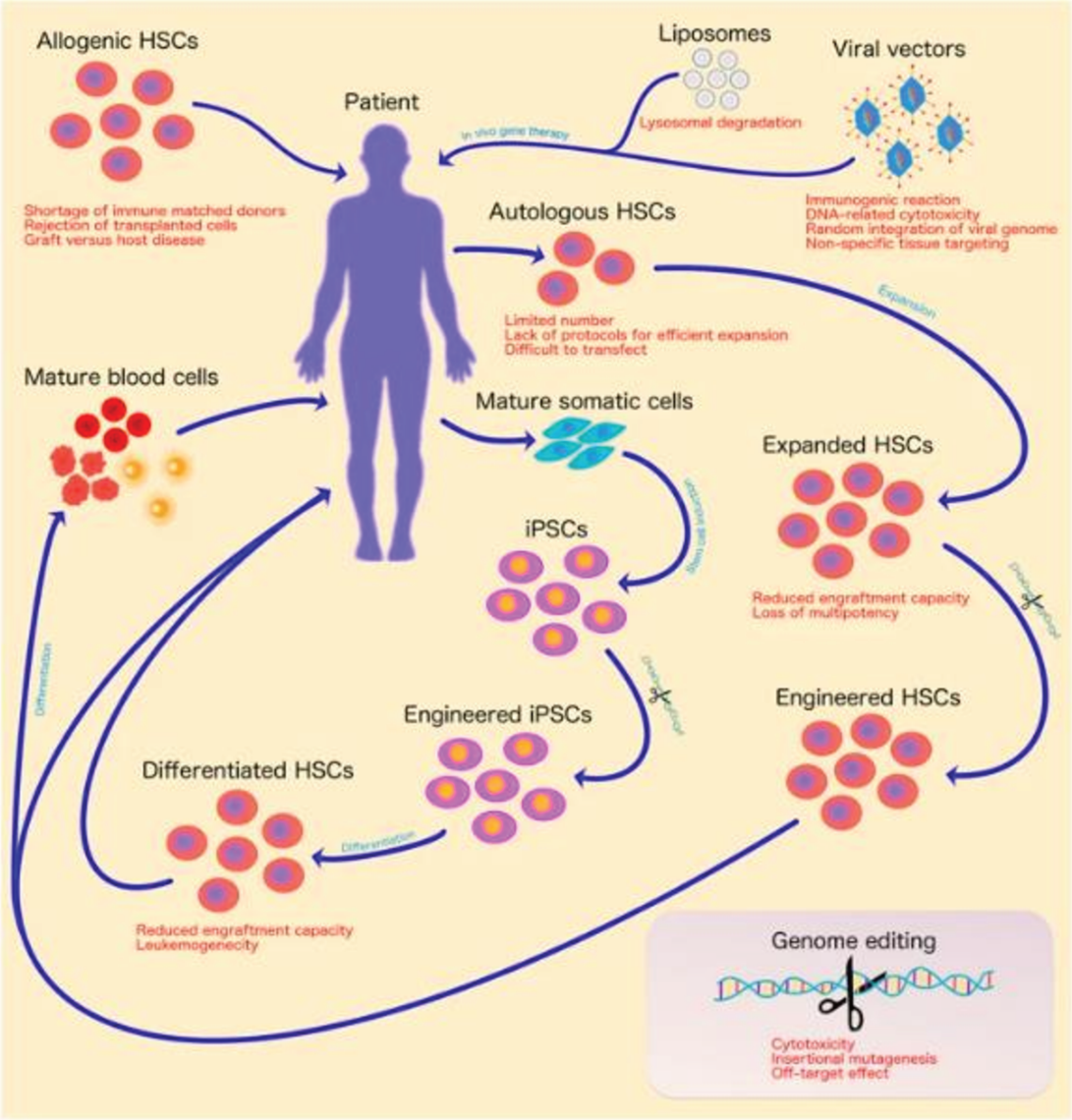


Figure 19 : Différentes stratégies de thérapie génique et cellulaire pour les maladies hématologiques

Tiré de Al-Saif, 2019

d. Différentes cellules utilisées en hématologie

Les cellules souches hématopoïétiques sont les seules cellules capables de maintenir l'hématopoïèse à long-terme dans le corps du receveur. Néanmoins, la cinétique de reconstitution du système hématopoïétique à partir de la CSH est assez longue, entre plusieurs semaines et plusieurs mois. Il faut donc compenser la cytopénie induite par les traitements aplasiants ou myéloablateurs nécessaires à la réalisation de la greffe. Les CSH ne sont ainsi jamais greffées dans leur forme la plus purifiée, mais accompagnée de progéniteurs et de cellules déjà engagées dans la différenciation. Plusieurs sources de CSH existent, que la greffe soit autologue ou allogénique (pour revue Horwitz, 2007).

Les cellules transplantées sont de phénotype CD34⁺. Ces cellules contiennent les CSH mais aussi des progéniteurs hématopoïétiques qui soutiendront transitoirement l'hématopoïèse (Scala and Aiuti, 2019; Scala et al., 2018). Les CSH interviennent dans le maintien de l'hématopoïèse à long-terme (Figure 20). Le temps de récupération hématopoïétique corrèle avec la quantité de CD34⁺ transplantées (Kiss et al., 1997). Différentes sources de CSH existent.

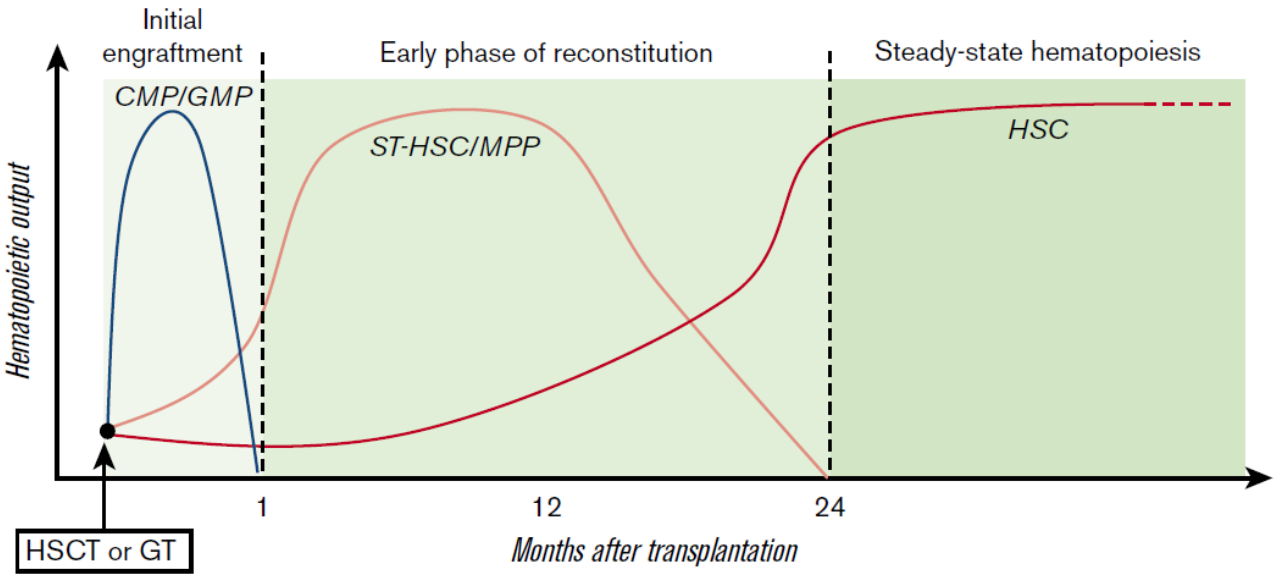


Figure 20 : Cinétique de l'hématopoïèse post-transplantation

Tiré de Scala and Aiuti, 2019

i. La moelle osseuse

La plus ancienne méthode pour obtenir des CSH est le prélèvement de moelle osseuse, qui se pratique depuis les années 70. Georges Mathé est le premier à tenter une greffe de moelle osseuse en 1958 pour traiter des patients irradiés, puis des leucémies (Mathé and Bernard, 1959; Mathé et al., 1959). La méthode est réellement développée au Fred Hutchinson Institute (Seattle, USA) par le Dr Donall Thomas, récompensé par un Prix Nobel de Médecine (Thomas, 2005). Elle a l'avantage de limiter les réactions du greffon contre l'hôte car elle est pauvre en lymphocytes T.

Le prélèvement se fait principalement dans la crête iliaque postérieure. Si la quantité nécessaire n'est pas suffisante, il peut être complété par des prélèvements dans la crête iliaque antérieure voire dans le sternum. En moyenne, il est considéré que 1 à 2.10^8 cellules nucléées par kg est nécessaire pour réaliser la greffe, ce qui correspond à environ 700 à 1500 mL de MO. Le don est cependant limité à 15 mL par kg pour le donneur. Le don de moelle osseuse est sans danger, mis à part les risques liés à l'anesthésie. Après filtration, les globules rouges et le plasma peuvent être éliminés pour limiter au maximum les réactions de rejet. La MO récupérée peut alors être infusée au patient par simple voie intraveineuse : les CSH iront se nicher au sein de la MO du receveur, déplétée de ces cellules par les traitements aplasiants subis en préparation de la greffe (Hatzimichael and Tuthill, 2010).

ii. Le sang périphérique

Un très petit nombre de CSH sont circulantes dans le sang périphérique. Le nombre n'est cependant pas suffisant pour permettre une greffe, à moins de réaliser de nombreuses cytaphérèses. Il existe des traitements pour augmenter le nombre de CSH circulantes. Dans le cadre d'une greffe autologue, les chimiothérapies aplasiantes permettent déjà la mobilisation des CSH dans la circulation. Il est également possible, à la fois pour les greffes autologues et allogéniques, de traiter le donneur avec du G-CSF. Ce facteur de croissance permet à la fois la mobilisation et l'expansion des CSH en agissant au niveau de la niche hématopoïétique, vraisemblablement par un effet indirect sur les composants de la niche (pour revue Bonig and Papayannopoulou, 2012). Cependant, il induit également une maturation des CSH vers le lignage myéloïde. Plus récemment, d'autres molécules comme l'AMD3100 (ou plerixafor), un inhibiteur de la molécule CXCR4 qui permet le maintien des CSH dans la niche ont été proposées (pour revue Allen and Conry-Cantilena, 2019; Russell et al., 2013). Celle-ci peut être utilisée seule ou encore en combinaison avec le G-CSF pour améliorer la mobilisation et la qualité des cellules mobilisées (Liles et al., 2005), notamment pour les patients mauvais mobilisateurs (Arcangeli et al., 2020; Broxmeyer et al., 2005; Mohty et al., 2017; Mombled et al., 2020 et voir Annexe 2)

Après le traitement, le prélèvement se fait par cytaphérèse : les composants du sang sont séparés dans un processus de flux continu pour ne conserver que les globules blancs, parmi lesquels se trouvent les CSH, jusqu'à obtenir environ $2{,}5.10^6$ cellules de phénotype $CD34^+$ au total.

Il a été montré que les cellules issues de sang périphérique étaient capables de reconstituer plus rapidement le système hématopoïétique par rapport à des cellules de MO, ce qui constitue un avantage important compte tenu des risques de complication liés à la cytopénie. Ainsi, les CSH mobilisées dans la circulation constituent désormais la source principale de CSH utilisées en clinique, grâce à leur facilité de collection et la rapidité de reconstitution. Cependant, la survenue de réactions du greffon contre l'hôte semble être plus courante (Mohty et al., 2002).

iii. Le sang de cordon ombilical

La première greffe de CHS issues de sang de cordon ombilical (SCO) a été réalisée en 1988 par le Dr Broxmeyer à l'hôpital Saint-Louis sur un patient atteint d'anémie de Fanconi (Gluckman et al., 1989). Le donneur était alors la sœur du patient. Par la suite, des essais ont été réalisés avec succès avec des donneurs compatibles, non nécessairement liés aux patients (Kurtzberg et al., 1996).

Tout comme les ES, ces cellules souches, plus immatures que les CSH adultes, sont moins immunogéniques et poseraient moins de problèmes de rejet. Elles possèdent également un fort potentiel de reconstitution (Holyoake et al., 1999). Par ailleurs, le prélèvement consiste en la récupération du sang contenu dans le cordon ombilical, autrement éliminé, ce qui est beaucoup plais aisé à mettre en œuvre que le prélèvement chez l'adulte. La mise en banque systématique des cellules $CD34^+$ extraites du SCO donne ainsi accès à un plus grand nombre d'échantillons disponibles pour le don et augmente donc les chances de trouver une compatibilité avec le patient.

Les CSPH issues de sang de cordon sont néanmoins parfois peu nombreuses (Brunstein and Wagner, 2006), ce qui constitue une limitation majeure car le nombre de CSH transplantées corrèle avec le succès de la greffe (Pawliuk et al., 1996). La transplantation à partir de sang de cordon se limite donc souvent aux cas pédiatriques, nécessitant un moins grand nombre de cellules. Des méthodes de double-transplantation avec des échantillons provenant de deux donneurs différents ont été proposées, mais cette méthode comporte des risques plus importants de réaction du greffon contre l'hôte et des délais dans la reconstitution des neutrophiles et des plaquettes (pour revue Munoz et al., 2014). De plus, cette méthode ne semble pas apporter de bénéfice évident en termes d'amélioration de survie d'après un essai clinique de phase III (Wagner et al., 2014a). De nombreuses techniques sont à l'étude depuis quelques années, surtout sur les CSH de sang de cordon ombilical, pour tenter de les amplifier sans perdre leur potentiel fonctionnel et leurs propriétés fondamentales, dont nous reparlerons plus en détails dans la partie 2 de ce chapitre. Ce domaine est très compétitif et donne actuellement lieu à des essais cliniques prometteurs.

Il convient pour terminer de mentionner que les recherches se portent actuellement sur l'obtention de CSH à partir d'ES ou d'iPS à la fois en thérapie génique et cellulaire (pour revue Focosi et al., 2014; Park et al., 2015). Cette méthode serait beaucoup plus simple en termes de prélèvements, mais des réserves sont émises sur sa sécurité et sa faisabilité à grande échelle.

2. *Protocoles de maintien et d'expansion des CSH* ex vivo

Faire proliférer les CSH sans induire leur différenciation *ex vivo* est un challenge. Pourtant, le nombre de CSH injectées corrèle avec la qualité de la prise de greffe et le taux de survie des patients. Or l'accès à un grand nombre de CSH d'un même donneur compatible est souvent limité. Des essais ont été réalisés pour transplanter des CSH issues de deux donneurs différents, notamment avec des CSH de sang de cordon, mais ce type de protocole est fortement dépendant de la disponibilité d'échantillons compatibles. De plus, cela induit des risques d'effets secondaires beaucoup plus importants. Il serait donc intéressant de pouvoir augmenter le nombre à la fois de cellules souches et de progéniteurs d'un même échantillon, afin d'accélérer la récupération tout en maintenant un potentiel de greffe à long-terme intact. Si *in vivo*, les CSH prolifèrent efficacement sans perte de fonctionnalité (Iscove and Nawa, 1997), *in vitro* le maintien de leurs propriétés reste encore un défi pour la communauté scientifique. Depuis une vingtaine d'années, différentes méthodes ont été proposées afin d'augmenter le nombre de CSPH fonctionnelles, majoritairement dans un but de greffe, mais peu sont effectivement utilisées en clinique malgré des essais de phase I/II prometteurs (pour revue Kumar and Geiger, 2017; Norkin et al., 2013 ; Pineault and Abu-Khader, 2015).

La qualité des CSH obtenues après expansion est évaluée par différents tests fonctionnels, décrits plus en détails dans le chapitre 1 (Coulombel, 2004). Pour rappel, la première est la caractérisation immunophénotypique des CSH grâce à l'expression de surface de leurs différents marqueurs caractéristiques. Ces indications n'apportent néanmoins pas d'informations sur les capacités fonctionnelles des CSH obtenues. Des méthodes *in vitro* basées sur la formation de colonies à court ou long-terme (CFU-C et LTC-IC respectivement) permettent d'identifier la présence de différents types de progéniteurs dans les populations étudiées. La culture en série, forçant les cellules à proliférer et donc

à s'auto-renouveler et/ou se différencier, peut permettre d'identifier des sous-populations ayant des capacités d'auto-renouvèlement. La seule méthode permettant d'obtenir des informations définitives concernant les capacités des CSH est la transplantation *in vivo*.

a. Cytokines, facteurs de croissance et « gold standard » actuel pour la thérapie génique et cellulaire

Les premières tentatives d'expansion *in vitro* se sont principalement appuyées sur l'adjonction de cytokines et facteurs de croissance habituellement trouvés dans la niche hématopoïétique dans le milieu de culture : Stem Cell Factor (SCF), Flt3-ligand (FLT3L), thrombopoïétine (TPO), interleukines (IL3, IL6, IL11) ou encore G-CSF et GM-CSF. Ces molécules étant impliquées dans la prolifération et l'auto-renouvèlement des CSH *in vivo*, le but est donc de se rapprocher au maximum de ce microenvironnement *ex vivo*. De manière générale, les milieux de culture utilisés en pré-clinique pour l'expansion des CSH sont dépourvus de sérum.

En 1997, Miller et Eaves (Miller and Eaves, 1997) ont observé une augmentation d'un facteur 3 du nombre de cellules capables de reconstituer le système hématopoïétique murin après culture dans un milieu sans sérum supplémenté en SCF, FLT3L et IL11. Une autre équipe a confirmé ces résultats en précisant les cinétiques d'action de chaque facteur de croissance et ajoutant que l'IL3 a un impact négatif sur l'expansion des CSH murines (Yonemura et al., 1997). Ce constat n'est pas partagé par Bryder et Jacobsen, qui observent au moins 5 divisions cellulaires sans perte de potentiel (Bryder and Jacobsen, 2000) ; cependant cet effet est inversé en présence de sérum de veau fœtal. De même, Ema *et al.* montrent que l'IL3 ajouté au SCF permet d'augmenter le nombre de divisions subies par une unique CSH (LSK $CD34^-$), environ moitié des cellules filles conservant le potentiel de générer des colonies *in vitro* (Ema et al., 2000). Cela suggère qu'il s'agit de divisions asymétriques. L'IL3 reste cependant moins efficace que la TPO. Enfin, il est intéressant de noter que les cellules ne s'étant pas divisées semblent avoir le même potentiel de reconstitution hématopoïétique que des cellules s'étant divisées, ce dernier point étant évalué par transplantation de seulement une ou deux cellules.

Chez l'homme, il a rapidement été montré qu'un potentiel de reconstitution hématopoïétique, y compris en transplantation secondaire, était conservé après une semaine de culture dans un milieu contenant SCF, IL3 et IL6 (DiGiusto et al., 1996). Différents groupes ont également montré par des expériences de xénogreffe (souris NOD/SCID) en dilution limite avec des cellules $CD34^+$ $CD38^{low}$ issues de sang de cordon qu'une expansion d'un facteur 2 à 4 était possible après culture dans des milieux contenant les facteurs de croissances SCF, FLT3L, G-CSF, IL3 et IL6 pendant 4 jours (Bhatia et al., 1997) voire jusqu'à 8 jours (Conneally et al., 1997). Les cytokines et facteurs de croissance étaient cependant introduits à des concentrations différentes dans les deux cas. Par ailleurs, la concentration de chaque cytokine semble d'être d'une importance cruciale : si on utilise des tests *in vitro*, de plus faibles concentrations permettent une expansion maximale (facteur 280) des CFU-C tandis qu'une concentration 30 fois supérieure est nécessaire pour l'expansion des LTC-IC (facteur 80) (Zandstra et al., 1997).

D'autres combinaisons ont été proposées, comme un cocktail SCF, FLT3L, TPO, IL6 et IL6R permettant une expansion de $CD34^+$ de sang de cordon d'un facteur 4,2 après 7 jours de culture, évaluée par des expériences de reconstitution *in vivo* en dilution limite (Ueda et al., 2000). De plus longs temps de culture (3 semaines) ont permis une expansion d'un facteur 6 sur des cellules adultes de MO et de sang périphérique mobilisé (Gammaitoni et al., 2003). Dans ces deux dernières études, l'IL6 est apparu indispensable à l'expansion, en supplément du SCF, du TPO et du FLT3L, les cocktails en manquant ou l'ayant remplacé par de l'IL3 étant beaucoup moins efficaces et permettant au mieux un maintien des CSH avec un potentiel de reconstitution hématopoïétique. Cependant, et contrairement aux résultats obtenus sur cellules murines, l'IL3 a été prouvée bénéfique pour l'expansion des CSH et progéniteurs de sang de cordon, avec une augmentation nette de la quantité de CFU, de LTC-IC et de chimérisme en souris NOD/SCID (Rossmanith et al., 2001). Néanmoins, la prise de greffe n'est étudiée qu'après 6 semaines, on ne peut donc statuer que sur les effets à court-terme sur les progéniteurs immatures et non sur les bénéfices à long-terme sur le maintien des propriétés des CSH. Dans un autre article, les auteurs confirment que l'effet de l'IL3 est majeur à court-terme (jusqu'à 6 semaines), mais on observe à long-terme (12 semaines) que celui-ci est nocif pour les capacités de reconstitution hématopoïétique des CSH (Piacibello et al., 2000). Deux équipes ont également montré l'importance de la thrombopoïétine pour l'expansion des CSH de sang de cordon avec un potentiel de différenciation mégakaryocytaire accru (van Hensbergen et al., 2006; Mattia et al., 2008). En effet, cultiver les CSH avec uniquement de la TPO est bénéfique pour la différenciation rapide en plaquettes par rapport à un cocktail cytokinique classique. Par ailleurs, la différenciation dans les autres lignages ne semble pas affectée à 6 (van Hensbergen et al., 2006) et 12 semaines (Mattia et al., 2008). Globalement, de nombreux groupes se sont intéressés à la détermination de conditions optimales de culture (présence et concentration de cytokines) permettant l'expansion des CSH (Duchez et al., 2012; Kobari et al., 2000; Kusadasi et al., 2000; Qiu et al., 1999). Par exemple, la dose de SCF (Du et al., 2012) et de TPO (Kobayashi et al., 2019; Wilkinson et al., 2019) sont des facteurs qui doivent être finement régulé. L'IL6 semble également avoir un impact important, en particulier quand elle est ajoutée à des milieux déjà optimisés (Duchez et al., 2015). Très récemment, un groupe a déterminé une composition permettant d'obtenir la meilleure expansion, d'un facteur 129 après 9 jours de culture : SCF et FLT3L à 200 ng/mL, TPO à 20 ng/mL, IL3 à 15 ng/mL et G-CSF à 10 ng/mL (Zhang et al., 2019). L'IL6 n'a cependant pas été testé dans cet article. Les résultats obtenus ont été évalués par les tests *in vitro* et *in vivo* classiques, avec un suivi à long-terme des greffes jusqu'à 24 semaines ; mais également par des greffes autologues sur un modèle de primate non-humain. Le temps de reconstitution hématopoïétique est alors significativement réduit.

Plusieurs tests sur des patients ont été conduits avec différents cocktails de cytokines afin d'évaluer la rapidité et la pérennité de la reconstitution hématopoïétique dans ces conditions, ainsi que la sécurité. Dans les années 2000, une combinaison de SCF, TPO, FLT3L et IL3 à 100 ng/mL dans un milieu sans sérum est utilisée sur des CSH de sang de cordon ombilical avant co-infusion dans les patients avec un deuxième échantillon de CSH non cultivées (Fernández et al., 2001). Il n'apparaît cependant pas de bénéfice évident sur la rapidité de reconstitution des neutrophiles et la progénie des cellules ayant subi l'expansion disparaît progressivement du corps des patients, indiquant une incapacité à greffer à long-terme. Une stratégie différente, à base de SCF, G-CSF et MGDF (facteur de croissance et de développement des mégacaryocytes) à 100 ng/mL est proposée (Boiron et al., 2006; Reiffers et al., 1999; Shpall et al., 2002). Deux groupes sont comparés : l'un avec une co-infusion de

cellules cultivées et de cellules fraîches, comme précédemment ; le deuxième avec uniquement les cellules cultivées. La neutropénie est alors plus rapidement contrôlée que dans les groupes de patients transplantés de façon standard avec des CSH fraîches. En revanche, le maintien à long-terme d'une progénie issue des cellules cultivées n'est pas estimé. Enfin, il est important également d'étudier les procédures de transport et de transplantation dans le cadre d'essai cliniques. Par exemple, il a été montré une très bonne expansion des CSH avec un milieu de grade clinique contenant SCF, FLT3L, TPO et G-CSF (Duchez et al., 2012). Cependant, la survie des CSPH après un transport de 48 heures à +4°C est beaucoup plus faible qu'espérée (Duchez et al., 2013). Un changement de milieu, remplaçant l'albumine par un milieu de culture par le transport, permet alors d'améliorer cette partie du protocole.

Concernant la thérapie génique, ces cocktails de cytokines ont également rapidement été utilisés dans les milieux de culture pour permettre la transduction d'un nombre suffisant de CSH. En effet, même si la transduction lentivirale peut se faire dans des cellules quiescentes, elle reste quand même plus efficace dans des cellules en division. De plus l'utilisation d'autres types de virus (γ-rétrovirus par exemple) rend également nécessaire la division cellulaire. Dans ce cadre, il apparaît indispensable de favoriser la prolifération des CSH sans induire leur différenciation et en conservant leur capacité de repopulation à long-terme. Un premier test a été réalisé afin de déterminer l'efficacité de greffe de cellules transduites puis cultivées pendant 1 à 4 semaines dans un milieu contenant SCF, TPO, FLT3L et IL6 (Piacibello et al., 2002). Il a permis de démontrer que l'expansion n'affectait pas la qualité de la transduction et permettait de réaliser jusqu'à des transplantations tertiaires, prouvant le maintien des capacités d'auto-renouvèlement des CSH cultivées. Des conditions « optimales » pour la transduction lentivirale, permettant à la fois une transduction efficace et le moins de perte de capacités de greffe possibles, ont été établies ensuite (Uchida et al., 2011). Elles consistent en une pré-stimulation de 24 heures suivie d'une transduction de 24 heures, le tout dans un milieu sans sérum contenant SCF, TPO et FLT3L.

Pour conclure, l'utilisation de facteurs de croissances pour l'expansion et la transduction des CSH est la méthode la plus communément utilisée. Cependant, les avis diffèrent sur les combinaisons et concentrations exactes de chaque composé, même si certains (SCF, TPO, FLT3L) se retrouvent dans quasiment tous les cocktails. De plus, malgré des tests cliniques encourageants concernant la limitation de la neutropénie et de la thrombocytopénie, il semble que la culture et l'expansion aient un impact non négligeable sur les propriétés des CSH. Le nombre de CSH diminue en effet en présence de SCF et de TPO, malgré une observation de division asymétriques permettant un minimum d'auto-renouvèlement (Ema et al., 2000). Une autre équipe a mis en avant que des divisions multiples des CSH s'opéraient en culture et que seulement une proportion d'entre elles conservent leurs propriétés de reconstitution hématopoïétique multi-lignages (Glimm and Eaves, 1999). Compte-tenu des informations connues sur la perte des propriétés des CSH après divisions, ces observations amènent à se questionner sur l'intégrité des CSH obtenues et à rechercher des méthodes complémentaires pour les amplifier sans altérer leurs propriétés.

b. Autres molécules de signalisation

i. Prostaglandine E2

Les prostaglandines sont des molécules lipidiques jouant un rôle dans de nombreux processus biologiques (Smyth et al., 2009). L'implication de la prostaglandine E2 (PGE2) sur la régulation des CSH est suspectée depuis les années 1970 (Fehér and Gidáli, 1974). Plus récemment, un regain d'intérêt a émergé dans la communauté scientifique sur une possible utilisation dans le cadre de l'expansion des CSH (pour revue Hagedorn et al., 2014). Il a en effet été montré sur le zebrafish que des composés chimiques régulant cette molécule de signalisation avaient un effet sur le nombre de CSH et sur l'hématopoïèse (North et al., 2007). De plus, dans ce modèle la PGE2 régule directement la voie Wnt-β-caténine, qui pourrait être impliquée dans la régulation des CSH (Goessling et al., 2009). Par la suite, il a été montré par plusieurs équipes qu'un analogue de la prostaglandine E2, le dmPGE2 permettait, après seulement 2 heures de traitement sur des LSK murines, d'augmenter la fréquence de CFU-S (North et al., 2007), la capacité de reconstitution hématopoïétique primaire et le nichage via une surexpression de CXCR4 (Hoggatt et al., 2009). Cependant, lors de transplantation en série, cette méthode ne permet pas d'améliorer le potentiel à long-terme des CSH (Hoggatt et al., 2013).

Des essais précliniques ont néanmoins été réalisés sur des $CD34^+$ de sang de cordon et de primates non-humains, montrant qu'un traitement de quelques minutes à quelques heures avec du dmPGE2 permet d'obtenir une meilleure prise de greffe en souris NSG ou en primate non-humain (Goessling et al., 2009). Ces éléments ont été assez convaincants pour proposer un essai clinique de phase I. Dans cet essai, les conditions optimales (par exemple de concentration et de durée) pour le traitement au dmPGE2 ont été évaluées après analyse transcriptomique ; puis des patients ont été greffés avec soit deux unités de sang de cordon non manipulées, soit une unité non manipulée et une unité traitée au dmPGE2 (Cutler et al., 2013). Les résultats ont montré que cette méthode était sans danger, permettait une reconstitution hématopoïétique à long-terme avec une tendance à une réduction de la durée de neutropénie et à une greffe préférentielle de l'échantillon traité au dmPGE2 chez les patients concernés. Il est à noter que dans ces approches, ce n'est pas l'expansion à proprement parler des CSH après plusieurs jours de culture qui est recherchée, mais plutôt la potentialisation des CSH.

Enfin, plusieurs équipes ont montré un effet bénéfique du dmPGE2 dans des protocoles de thérapie génique à base de lentivirus (Genovese et al., 2014; Heffner et al., 2018). Le traitement au dmPGE2 ou au PGE2 permet alors non seulement une meilleure transduction mais également une meilleure reconstitution hématopoïétique, sur des cellules de sang de cordon, de moelle osseuse et de sang périphérique mobilisé. De façon intéressante, le PGE2 est également utilisé dans le cadre de la différenciation et de l'expansion des CSH à partir d'iPS (Gori et al., 2012).

ii. Facteurs de croissance des fibroblastes (FGF)

Les différentes isoformes du facteur de croissance des fibroblastes FGF (FGF1 et FGF2 ou bFGF) ont également été testées dans un but d'expansion des CSH. Il a été montré que les CSH murines capables de reconstitution à long-terme exprimaient le récepteur au FGF (FGFR) et le perdaient au cours de la différenciation (de Haan et al., 2003). Ainsi, la culture dans un milieu enrichi en FGF1 permet l'expansion de CSPH conservant toutes les propriétés de reconstitution hématopoïétique, y compris en transplantation en série. De plus, ce facteur permet une expansion des CSH murines efficace avant une transduction rétrovirale (Crcareva et al., 2005). Le FGF-2 a également été proposé, celui-ci étant impliqué dans la prolifération *in vivo* des CSH (Itkin et al., 2012). Ainsi, chez la souris, la combinaison du FGF1 et du FGF2 permet d'obtenir des capacités de reconstitution hématopoïétique supérieures à celles de cellules fraîches (Yeoh et al., 2006). Cependant, la présence de cellules totales de la MO en plus des CSPH (LSK) semble requise pour obtenir l'expansion des cellules conservant des propriétés de reconstitution hématopoïétique, suggérant un effet non-autonome cellulaire du FGF. Chez l'homme, le FGF4 seul ne permet pas d'obtenir une prolifération des $CD34^+$, mais l'expansion est plus efficace quand il est couplé avec le SCF et le FLT3L (Rogers et al., 2008). Le FGF seul permet néanmoins de mieux maintenir le pourcentage de $CD34^+CD38^-$ au cours de la culture. Cependant, le CD38 n'étant pas un marqueur fiable lors de la culture *in vitro*, les résultats peuvent être discutés.

iii. Facteurs de croissance angiopoïétine-like (ANGPL), insuline-like (ILGF), et liant l'insuline (IGFBP)

Le rôle de différentes molécules agissant sur les récepteurs de l'angiopoïétine et de l'insuline est également étudié. Il a été montré que les cellules du foie fœtal produisaient les protéines ANGPL2, ANGPL3 (Zhang et al., 2006) et ILGF2 (Zhang and Lodish, 2004) chez la souris. *Ex vivo*, l'addition de ces protéines au milieu de culture a permis l'expansion des CSH murines, mesurée par des expériences de dilution limite *in vivo* en comparaison avec des CSH cultivée en milieu contenant seulement les facteurs de croissance « classiques » comme SCF, TPO ou encore FGF1 (Zhang and Lodish, 2004; Zhang et al., 2006). Les auteurs ont également testé d'autres protéines de la famille angiopoïétine-like et identifié ANGPL5 et ANGPL7 comme de potentiels candidats pour l'expansion des CSH *ex vivo.* Chez l'homme, une combinaison de ANGPL5 et IGLF2 a été proposée par le même groupe et permet d'obtenir des taux de chimérisme bien plus importants que des cellules cultivées avec uniquement les cytokines classiques (Zhang et al., 2008).

Il a ensuite été montré que les ANGPL1, 2, 3, 4, 6 et 7 ne pouvaient pas à elles seules supporter la croissance des CSH murines *ex vivo*, même si elles favorisent leur survie (Akhter et al., 2013). Cependant, l'addition de l'une d'elle à un milieu contenant d'autres facteurs de croissance, notamment SCF, TPO, ILGF2 et FGF1 permet d'améliorer l'expansion des CSH d'un facteur d'environ 3 à 4. Une autre étude s'est penchée plus précisément sur le rôle de l'ANGPL3 dans deux milieux contenant des cytokines différentes (SCF, TPO et FLT3L ou SCF, TPO, ILGF2 et FGF1). Dans les deux cas, l'ANGPL3 a permis une amélioration d'environ un facteur 3 de l'expansion (Farahbakhshian et al., 2014). La plus forte

expansion, supérieure à 10, a été obtenue par une combinaison avec l'ILGF1 et 2 et à faible dose (15 à 20 ng/mL), avec une validation de la fonctionnalité des cellules *in vivo* en souris NSG (Fan et al., 2014).

Il est également possible de faire sécréter ces facteurs de croissance au niveau de l'environnement de culture plutôt que de les ajouter manuellement. Par exemple, une équipe a utilisé le milieu surnageant d'une culture d'une lignée cellulaire tumorigénique sécrétant l'IGFBP2, supplémenté avec d'autres facteurs de croissance (SCF, TPO, FGF1, ANGPL3) pour promouvoir l'expansion des CSPH murines (Huynh et al., 2008). De façon intéressante, ce type de culture induit l'expression de plusieurs gènes de la famille *Hox*, et en particulier *Hoxb4*. Les CSM utilisées en tant que stroma sont également connues pour sécréter des facteurs tels que IGFBP2 ou la neurotrophine 3 (Celebi et al., 2012). Cependant, l'utilisation de ces facteurs de croissance est moins efficace que la co-culture avec les CSM. Dans une autre étude, des $CD34^+$ de sang de cordon cultivées en présence d'IGFBP2 et de CSM ont été co-transplantées avec des $CD34^+$ fraîches (Ong et al., 2012). Le chimérisme 4 mois après transplantation était alors significativement plus élevé qu'avec une infusion de cellules fraîches uniquement. Cependant, les cellules retrouvées à long-terme proviennent majoritairement de la fraction non cultivée, indiquant un possible effet néfaste de l'expansion sur les CSH.

iv. Rôle de l'albumine

La culture des CSH se fait le plus souvent dans un milieu dépourvu de sérum. Ainsi, des suppléments sont utilisés comme sources de protéines, comme la BSA (bovine serum albumin). Cependant, son utilisation peut être la source de contaminants. Ainsi, des alternatives ont été proposées. Par exemple, un supplément à base de protéines recombinantes a été utilisée (Ieyasu et al., 2017). Ce faisant, les auteurs ont identifié l'hémopexine comme un facteur essentiel au maintien des CSH murines *in* et *ex vivo*. Elle permet en particulier la diminution des ROS dans les CSH. Une autre stratégie est le remplacement de la BSA par de l'alcool polyvinylique (Wilkinson et al., 2019). Le protocole détaillé a été publié et semble permettre une expansion d'un facteur de 236 à 899 des CSH murines après une culture d'au moins un mois (Wilkinson et al., 2020). Chez l'homme, l'utilisation d'albumine de sérum humain permet de mieux préserver le pourcentage de cellules $CD34^+$ mais inhibe la prolifération par rapport à du sérum de veau fœtal (Antarianto et al., 2019).

c. Mimer le microenvironnement physique de la niche

Mise à part la présence de cytokine et de facteurs de croissance, d'autres facteurs ont été étudiés pour rapprocher au maximum les conditions de culture du microenvironnement spécifique de la niche hématopoïétique. L'hypothèse est que cet environnement permet de donner les signaux nécessaires au CSH pour maintenir leurs propriétés, notamment la quiescence et l'auto-renouvèlement.

i. Hypoxie

Une méthode historique a été la culture en hypoxie, qui est une des caractéristiques importantes de la niche hématopoïétique (cf chapitre 1). Dès les années 90, il a été montré que des cellules de moelle osseuse de souris cultivées en hypoxie (3% d'oxygène) proliféraient moins mais avaient de meilleures capacités clonogéniques que des cellules cultivées à 18% d'oxygène (air ambiant) (Cipolleschi et al., 1993). Le nombre de cellules nécessaire pour reconstituer le système hématopoïétique d'une souris irradiée était également inférieur pour des cellules cultivées en hypoxie. Sur des cellules $Lin^{-}CD34^{+}CD38^{-}$ humaines cultivées dans un milieu enrichi en facteur de croissances tel que développé dans la première partie, il a été montré qu'une culture de 4 jours en hypoxie (1,5 % d'oxygène) permettait de mieux conserver le phénotype de surface des cellules (Danet et al., 2003). De plus, l'hypoxie augmente non seulement le nombre de SRC par rapport aux cellules cultivées en normoxie (facteur 5,8), mais également par rapport à des cellules fraîches non cultivées (facteur 4,2). Cependant, des cultures plus longues (plus de 6 jours) provoquent la perte totale de SRC quel que soit la condition de culture. L'hypoxie n'est donc pas suffisante pour protéger les CSH pendant des périodes plus longues. De façon intéressante, la culture en hypoxie ne modifie pas les capacités clonogéniques des cellules, suggérant que ce facteur n'impacte pas les progéniteurs. Elle permet par ailleurs de stabiliser la protéine HIF1α, induisant un métabolisme glycolytique mesuré par la production de lactate, et provoque la sécrétion de VEGF dans le milieu accompagnée de l'expression de récepteurs angiogéniques à la surface des cellules. Cependant, une autre équipe a montré que des cultures plus longues (7 jours) de cellules $CD34^{+}$ étaient possibles à 3% d'oxygène. Cela permet de favoriser à la fois le maintien des SRC et la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques (Ivanovic et al., 2004). Les auteurs montrent également que de plus faibles concentrations d'oxygène que 3% ne permettent pas une prolifération aussi efficace. Cela concorde avec les observations de Cipolleschi *et al*. (Cipolleschi et al., 1993) et de Shima et al (Shima et al., 2009). Dans cette dernière étude, une concentration de 1% d'oxygène pendant 6 jours supprime la prolifération des cellules $CD34^{+}$ via une sur-régulation de l'inhibiteur du cycle cellulaire $p21^{Cip1}$, et n'induit pas d'effet sur la capacité clonogénique *in vitro*, mais maintient des CSH avec un potentiel de reconstitution hématopoïétique. Ainsi, les résultats observés semblent dépendre d'un équilibre fin entre concentration d'oxygène et temps passé en culture. Il est également important de signaler que les cocktails cytokiniques sont différents dans chacune de ces études : ce paramètre peut également influer grandement sur les résultats obtenus, et notamment les temps de culture optimaux. Par ailleurs, de très faibles concentrations en oxygène (0,1%) semblent permettre un retour à la quiescence plus important pour des CSH mises en culture pendant plus de 3 jours, après une première entrée en cycle (Hermitte et al., 2006). Il est important de noter, par ailleurs, que la présence d'IL3 semble indispensable pour maintenir une bonne viabilité dans ces conditions d'extrême hypoxie.

Les résultats exposés précédemment (meilleure reconstitution et diminution du cycle cellulaire) ont été confirmés sur des CSH murines et les mécanismes ont été décryptés (Eliasson et al., 2010). Il est observé que $p27^{Kip1}$, $p57^{Kip2}$ et $p21^{Cip1}$ sont surexprimés lors de la culture en hypoxie dans les LSK, tandis que seule $p21^{Cip1}$ l'est dans les CSH $CD34^{-}$. La protéine HIF1α est impliquée dans ce processus et son inhibition diminue l'expression de $p27^{Kip1}$ et de $p57^{Kip2}$, mais pas de $p21^{Cip1}$. La stabilisation forcée d'HIF1α en normoxie, par la molécule FG-4497 ou par transduction avec un vecteur permettant

l'expression d'une protéine HIF1α mutée constitutivement active, suffit à inhiber la prolifération des cellules. Enfin, plus récemment, il a été montré que dès la collection des CSH de sang de cordon ou de moelle osseuse, la saturation en oxygène de l'air ambiant avait un effet drastique sur les propriétés des CSH humaines de sang de cordon et murines de moelle osseuse, limitant leur capacité de reconstitution hématopoïétique (Mantel et al., 2015). Ainsi cela induit probablement une sous-estimation du nombre de CSH initialement disponibles dans l'échantillon. Cet effet est médié par une réaction de stress et une augmentation des ROS, lié à la voie p53 et au pore de transition de perméabilité mitochondriale (mitochondrial permeability transition porte ou MPTP). Les auteurs proposent donc de placer les cellules en hypoxie dès la collection, ou de les traiter avec de la cyclosporine A, inhibiteur du MPTP via la cyclophiline D, pour les préserver avant même une expansion éventuelle. Cependant, une addition plus tardive de cette molécule (ne serait-ce que 15 minutes après la collection) ne protège plus les CSH et induit même une augmentation des ROS par rapport à des cellules non traitées. L'usage de la cyclosporine A semble donc assez délicat. Le même groupe a récemment confirmé ces résultats sur des CSH murines de sang périphérique mobilisé (Aljoufi et al., 2020).

ii. Cellules stromales

D'autres équipes se sont penchées sur l'aspect de l'environnement cellulaire et des liaisons avec les cellules environnantes de la niche, en complément du milieu enrichi en cytokines. Ainsi, de nombreuses propositions sont liées à la culture sur un stroma dit médullaire, c'est-à-dire composé de cellules présentes dans la moelle osseuse et plus précisément dans la niche hématopoïétique ; sur la structure 3D de la niche ; et sur d'autres facteurs stimulés dans la niche, différents des facteurs de croissance déjà exposés précédemment.

Une possibilité est donc de co-cultiver les CSH avec d'autres types de cellules présentes dans la niche hématopoïétique. Il a été montré très tôt que la présence d'autres cellules pendant la culture *in vitro* de CFU-S permettait une expansion de cette population (Dexter et al., 1977). De plus, il a été observé que des cellules hématopoïétiques CFU-S et CFU-GM étaient retrouvées pendant plus de 2 mois lorsque les cellules étaient cultivées sur des lignées stromales, en particulier les lignées MS1 et MS5, encore utilisées aujourd'hui (Issaad et al., 1993; Itoh et al., 1989). Plus intéressant encore, des cellules capables de reconstituer le système hématopoïétique pouvaient être récupérées après au moins 4 semaines de culture en système LTC sur un stroma médullaire (Fraser et al., 1992). Ainsi plusieurs équipes se sont intéressées à la possibilité de co-cultiver des CSH avec un stroma pour favoriser leur prolifération et/ou leur maintien. Des screennings de différentes lignées isolées à partir de foie fœtal ont par exemple été testées (Moore et al., 1997; Wineman et al., 1996). Les lignées permettant le maintien des propriétés de reconstitution hématopoïétique à long-terme des CSH sont très rares : Moore et al n'en identifient qu'une, AFT024, une lignée stromale murine, mais celle-ci produit de meilleurs résultats que les cultures en milieu liquide enrichi en cytokines. Ce constat est partagé par d'autres équipes (Breems et al., 1994). Une lignée de cellules endothéliales porcines a permis de réaliser des greffes en modèle de primates non-humains à partir de $CD34^+$ co-cultivées pendant 10 jours, avec ajout de cytokines (Brandt et al., 1999). Très vite, ces systèmes de co-culture ont été appliqués aux CSH humaines : une lignée dérivée d'embryons murins, AGM-S3, permet le maintien de SRC à partir d'une population $CD34^+CD38^-$ pendant 4 semaines (Xu et al., 1998) ; la lignée MS5, présentée précédemment,

permet aussi le maintien des CSH humaines ($CD34^+$ $CD38^{low/-}$) pendant 10 jours en synergie avec des cytokines (Bennaceur-Griscelli et al., 1999). D'autres lignées murines, comme AC6.21 (Shih et al., 1999), HESS-5 (Kawada et al., 1999; Shimakura et al., 2000), AFT024 (Nolta et al., 2002), FBMD1 (Kusadasi et al., 2001) ou encore la lignée OP9 (Weisel et al., 2009) ont montré des résultats similaires, avec un maintien de la fonctionnalité des CSPH après co-culture, souvent en présence d'un cocktail de cytokines humaines contenant au moins SCF, TPO et FLT3L. Cependant, une équipe a rapporté que la lignée OP9 permettait uniquement le maintien, et non l'expansion, des CSPH de phénotype $CD34^+CD38^-CD90^+$ après 2 semaines de culture (Magnusson et al., 2013).

Ces méthodes de co-culture en présence de cellules xénogéniques peuvent être problématiques pour une application clinique, malgré leur utilité notamment pour la réalisation de cultures à long-terme en laboratoire et de tests de LTC-IC. Ainsi, des techniques de culture sur un stroma humain ont été développées, notamment à partir de cellules stromales mésenchymateuses (CSM). Il a tout d'abord été montré que la culture sur des cellules de stroma médullaire humain permettait de faire proliférer davantage les cellules $CD34^+$, avec une augmentation du potentiel de reconstitution *in vivo* à 8 semaines post-transplantation après 2 à 4 semaines de culture (Yamaguchi et al., 2001). Une équipe a ensuite comparé ce type de stroma dérivé de MO avec des CSM purifiées grâce au marqueur STRO1, dans un milieu contenant SCF, bFGF, LIF (leukemia inhibitory factor) et FLT3L (Gonçalves et al., 2006). Ce choix de facteurs de croissance ne permet pas l'expansion de CSH sans la présence d'un stroma, mais les auteurs indiquent qu'il est optimal pour la culture sur CSM (da Silva et al., 2005). Dans cette étude, des $CD34^+$ de MO sont cultivées jusqu'à 14 jours sur les deux types de stroma : les MSC permettent préférentiellement l'expansion en nombre de ces cellules ainsi que le maintien du phénotype immature (expression de CD34 et CD38). La fonctionnalité est évaluée avec des tests de CFU-C et une transplantation en modèle de mouton fœtal, où les observations sont confirmées. De façon intéressante, des CSM allogéniques sont plus efficaces pour l'expansion de cellules de phénotype $CD34^+$ $CD38^-$ par rapport à des CSM autologues. D'autres conditions optimales de co-culture avec des CSM ont été étudiées de façon systématique, notamment d'autres facteurs de croissance tels que ANGPL5 ou ILGFB2 (Walenda et al., 2011). La combinaison choisie intègre du SCF et FGF comme la précédente mais nécessite de la TPO. Elle ne permet pas l'expansion des SRC après 1 semaine de culture sans stroma, comme précédemment, tandis que l'expansion en co-culture avec les CSM et les cytokines permet uniquement de maintenir la capacité de repopulation hématopoïétique à 8 semaines post-transplantation (donc à moyen-terme) par rapport à des cellules fraîches, mais ne l'améliore pas malgré une expansion en nombre. Une autre équipe s'intéressant à la combinaison de cytokines idéale (parmi SCF, TPO, FLT3L, bGFG, LIF) pour co-cultiver les CSH humaines avec des MSC a démontré une meilleure expansion avec le trio SCF, TPO et FLT3L, donc sans bFGF ni LIF (Andrade et al., 2010). Ces résultats ne sont cependant pas confirmés par des expériences *in vivo*. Ces données ont été complétées en réalisant une co-culture de cellules de sang de cordon avec des CSM purifiées dans un milieu contenant ces facteurs de croissance additionnés du G-CSF (Fei et al., 2007). Cette méthode permet également une augmentation des CFU-C et du chimérisme à 6 semaines post-greffe, ce qui ne nous permet pas de statuer sur la fonctionnalité à long-terme.

Une équipe a proposé un mécanisme expliquant les résultats observés sur l'expansion et l'amélioration des prises de greffe à court-terme, via une augmentation de la migration due à VCAM1 (Perdomo-Arciniegas and Vernot, 2011). Cependant l'expression de son récepteur CD49d/VLA4 n'est

pas différentiellement régulée sur les CSH. L'utilisation de cellules endothéliales de veine ombilicale (HUVEC) a également permis d'obtenir de bons résultats, même si moins importants qu'avec des cellules stromales de MO, et de façon intéressante la séparation du stroma et des CSPH par une membrane semi-perméable a augmenté leur expansion (Köhler et al., 1999). Très récemment, une équipe a proposé une méthode exploitant des cellules endothéliales artérielles de cordon ombilical huAEC (human arterial endothelial cells), modifiées génétiquement pour exprimer E4ORF1, protéine qui permet leur survie *in vitro* (Li et al., 2020a). Ceci permet une expansion plus importante des $CD34^+$ et des CSH phénotypiques ainsi qu'une amélioration des capacitées de reconstitution hématopoïétique en souris NSG après 12 semaines, notamment comparé aux HUVEC. La contribution de cellules stromales à l'efficacité de transduction rétrovirale a également été analysé (Moore et al., 1992; Nolta et al., 1995). Ainsi, la transduction de CSH humaines adultes, issues de prélèvements de MO ou de sang périphérique mobilisé, semble mieux fonctionner avec le support de cellules stromales.

L'ensemble de ces résultats, encourageants malgré un manque de consensus sur les conditions optimales, ont permis la mise en place d'un essai clinique (de Lima et al., 2012). Dans cet essai, comme dans les exemples précédents, le temps de récupération du taux de neutrophiles est évalué chez des patients ayant reçu soit deux échantillons de SCO non manipulés, soit un échantillon non manipulé et un échantillon co-cultivé avec des CSM dans un but d'expansion. Ce dernier permet de diminuer le temps de récupération et d'améliorer le taux de greffe après 26 jours, et démontre la sécurité de cette méthode. Enfin, une niche constituée de CSM humaines différenciées en ostéoblastes a également été proposée, et permet une expansion au moins des progéniteurs, comme démontré par l'utilisation de tests de fonctionnalité *in vitro* : CFU-C et LTC-IC (Tan et al., 2010). Ce système a pour particularité d'être en 3D dans une matrice osseuse. Cet environnement spatial pourrait également contribuer aux effets observés, nous reviendrons sur ce point dans le paragraphe iii.

Il est important de noter que dans un certain nombre des études présentées, sauf mention contraire, la capacité de reconstitution hématopoïétique est évaluée à des temps relativement courts après la greffe (moins de 12 semaines), ce qui ne permet pas de juger de l'action des conditions de culture sur les propriétés des CSH. Un groupe a ainsi montré que ce type de culture (CSM humaines ou lignées stromales murines) ne permettait pas l'expansion de cellules conservant un potentiel érythro-myéloïde, considérées par les auteurs comment étant le meilleur indicateur des CSH (Radtke et al., 2016).

iii. Voies Notch et Wnt

Le rôle du récepteur NOTCH a été étudié dans le maintien *ex vivo* des CSH. Celui-ci pourrait être impliqué dans la régulation des propriétés des CSH au sein de la niche hématopoïétique ainsi qu'à plusieurs stades de la différenciation hématopoïétique (pour revue Lampreia et al., 2017). Deux études ont montré l'utilité de ligands synthétiques Delta1-IgG (immnoglobuline-G) dans la prolifération de précurseurs hématopoïétiques avec des capacités de reconstitution lymphoïdes et myéloïdes à court-terme (Ohishi et al., 2002; Varnum-Finney et al., 2003). Des compléments à ces observations ont été apportés par l'étude de l'effet différentiel de faibles et fortes concentrations de ce ligand, avec une reconstitution hématopoïétique améliorée à 10 semaines post-transplantation en modèle de souris

NOD/SCID (Delaney et al., 2005). Cette même équipe a réalisé un essai clinique comparatif et prouvé que la transplantation d'une unité de CSH de SCO cultivées *ex vivo* en présence du ligand Delta1-ExtIgG en complément d'une unité fraîche diminuait le délai de neutropénie comparé à deux unités de CSH de CB fraîches (Delaney et al., 2010) ; puis a par la suite confirmé ces résultats et prouvé la sécurité de cette méthode (Milano et al., 2011; Summers et al., 2014). Ces expériences démontrent le bénéfice lié à la prolifération des progéniteurs mais ne permettent pas de déterminer l'effet de la régulation de la voie Notch sur les CSH possédant un potentiel de reconstitution hématopoïétique à long-terme. Ce point a été montré dans un système de culture sur un stroma de cellules OP9-DL4 et OP9-DL1, exprimant deux ligands de NOTCH (Benveniste et al., 2014). Après plusieurs semaines de culture, la stimulation de la voie Notch permet un maintien des CSH phénotypiques humaines et conservant un potentiel de reconstitution hématopoïétique. L'inhibition de cette voie par l'expression de dnMAML, une version dominante négative de MAML (mastermind-like transcriptional factor) empêchant la transmission des signaux induits par NOTCH, abroge les effets de ces deux ligands de Notch. Il est intéressant de noter que dans cet article, l'effet positif des ligands de Notch est bénéfique lors de l'expansion *in vitro* mais n'est pas nécessaire pour l'expansion *in vivo*. Enfin, des cellules stromales exprimant deux ligands de NOTCH, JAG1 (Jagged canonical notch ligand 1) et DL1 (delta-like canonical notch ligand 1), ont également été utilisées sur des CSH murines et humaines, combinant les effets de la présence de cellules stromales (respectivement lignée murine NIH3T3 et CSM humaines primaires) et de la stimulation de Notch. Les deux ligands permettent alors une meilleure expansion tout en améliorant le pourcentage de CSH phénotypiques, DL1 fonctionnant encore mieux que JAG1 (Raevskaya et al., 2017). Les ligands utilisés sont dans les deux cas les ligands humains. Il est intéressant de noter que les effets de JAG1 avaient déjà été étudiés sur les CSH murines grâce à un système d'immobilisation du ligand sur le substrat de culture (Toda et al., 2011).

D'autre part, l'activation de la voie Wnt-β-caténine couplée à la répression de la voie mTor dans un milieu dépourvu de cytokines permet d'augmenter le nombre de CSH murines et humaines après 7 jours de culture, même si la fréquence reste identique à des cellules cultivées dans des conditions classiques (Huang et al., 2012). Cette méthode présente l'avantage d'utiliser des molécules approuvées cliniquement. De plus, les auteurs démontrent que la voie Wnt est requise pour le maintien des CSH *ex vivo*. L'inhibition de GSK-3β (glycogen synthase kinase 3 beta), aussi impliquée dans la voie Wnt, par le 6-bromoindirubin 3'-oxime (BIO) diminue la vitesse de divisions et permet d'augmenter le chimérisme en souris NOD/SCID, mais pas la fréquence de SRC (Ko et al., 2011). Le BIO ne modifie pas l'expression de gènes cibles de WNT, mais augmente l'expression de gènes régulant NOTCH ainsi que p57.

Des activateurs d'autres récepteurs sont aussi utilisés. Par exemple, le NR-101 est un analogue de la TPO, capable de provoquer une signalisation via son récepteur C-MPL. L'expansion obtenue après incubation avec cette molécule est meilleure que celle obtenue avec de la TPO, et semble liée à une stabilisation de HIF1α et à une activation de ses gènes cibles (Nishino et al., 2009). L'acide all-trans rétinoïque ATRA (all trans retinoic acid) et l'AGN193109, deux agonistes des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR), ont été comparé sur des CSPH murines (LSK) (Purton et al., 2000). L'ATRA permet une préservation des capacités fonctionnelles *in vitro* (CFU-C) et *in vivo* (CFU-S, reconstitution hématopoïétique à court et long-terme), au contraire de l'AGN193109 qui semble favoriser la différenciation.

iv. Culture en 3D et matériaux utilisés

In vivo, les CSH évoluent dans un environnement en trois dimensions où de nombreux composants non cellulaires interviennent. Ainsi, la culture dite en "2D" sur des supports en plastique pourrait également être une des raisons qui expliquent la perte de propriétés des CSH. Il est en effet apparu assez tôt que la composition du matériau de culture était fondamentale pour une bonne expansion des CSH (Laluppa et al., 1997). Ainsi, plusieurs équipes ont tenté d'améliorer ce paramètre, en utilisant des composants non-cellulaires de la niche *in vitro* voire en créant une structure 3D. Par exemple, la culture sur un matériau élastique, comme la tropoélastine, permet d'améliorer l'expansion des CSH murines, telle que mesurée par l'expression des marqueurs de surface, la faculté à générer des colonies et les capacités de reconstitution hématopoïétique, et cet effet est additif avec l'ajout de cytokines (Holst et al., 2010). La même observation est effectuée sur des cellules humaines de SCO cultivées dans une matrice 3D en polymère non-tissé, favorisant les interactions cellules-cellules et cellules-matrice (Li et al., 2001). Des nanofibres aminées ont également été utilisées (Chua et al., 2006). Dans ce cas spécifique, il a été montré que l'espacement de ces fibres avait une importance cruciale pour l'expansion des $CD34^+$ et leur fonctionnalité *in vitro* et *in vivo*. D'autres types de matériaux ont été étudiés : en particulier, une équipe a comparé deux polymères biocompatibles et biodégradables, le PCL (polycaprolactone) et le PLGA (poly(lactic-co-glycolic) acid) avec des matrices de collagène et de fibrine. Si seul le PLGA ne permet pas une expansion satisfaisante des CSH, la matrice de fibrine reste la plus efficace en termes d'expansion, de maintien du phénotype immature et de reconstitution hématopoïétique en souris NSG (Ferreira et al., 2012).

Différents revêtements ont aussi été comparés en culture 2D, dont la fibronectine, l'héparine, le tropocollagène, l'acide hyaluronique, des fibrilles de collagène ou encore le protéoglycane sulphate d'héparane (Franke et al., 2007). La fibronectine a semblé être la plus efficace pour permettre l'adhésion des CSH $CD133^+$, devant l'héparine, le sulphate d'héparane et les fibrilles. Les autres matériaux étaient moins efficaces. Plusieurs autres études ont confirmé les propriétés de la fibronectine pour le maintien des CSH *ex vivo*. La culture en présence du domaine carboxyl-terminal de la fibronectine, activateur des intégrines VLA4 et VLA5, permet une meilleure transduction rétrovirale et une meilleure reconstitution hématopoïétique des $CD34^+$ de moelle osseuse (Dao et al., 1998). Une deuxième étude a comparé l'effet d'une structure 3D en polymère recouvert de fibronectine immobilisée, comparée à une structure 2D du même matériau et à une structure 3D où la fibronectine est solubilisée dans le milieu de culture. La première méthode permet une expansion plus importante des $CD34^+$ ainsi qu'une meilleure préservation des CFU-C et de meilleures prises de greffe en souris NOD/SCID (Feng et al., 2006).

Enfin, l'utilisation d'hydrogels est également en développement pour mimer le microenvironnement spatial de la niche. Une équipe a utilisé cette technique pour co-cultiver en 3D des CSM isolées à partir de placenta avec des cellules $CD34^+$ (Sharma et al., 2012). Dans ce modèle, il a été observé une meilleure rétention des propriétés phénotypiques et fonctionnelles des CSH, en particulier leur quiescence. De plus, un gradient hypoxique s'est naturellement créé dans cet environnement, ce qui permet de se rapprocher encore plus des propriétés de la niche hématopoïétique. Enfin, très récemment, un groupe a publié des résultats très intéressants sur un hydrogel dit « zwitterionique » (Bai et al., 2019). Sa structure chimique lui confère des propriétés hydrophiles, au contraire des supports de culture habituellement hydrophobes. Ce matériau ainsi que la structure 3D ont permis d'obtenir une

très bonne expansion des CSH conservant leurs propriétés de reconstitution hématopoïétique sur 25 jours, comparé à d'autres types de polymère ou à la culture en 2D même en présence de l'hydrogel. Par ailleurs, les auteurs ont observé une diminution des ROS lors de la culture par rapport aux $CD34^+$ contrôles, qui pourrait expliquer les résultats obtenus.

v. Combinaison de différentes méthodes

Afin de coller au maximum au microenvironnement de la niche hématopoïétique, une stratégie est de combiner plusieurs constituants cités précédemment. Ainsi, on obtient un environnement récapitulant au mieux les conditions idéales de maintien des CSH. Une équipe a par exemple combiné la culture 3D dans un moule en résine à l'hypoxie et à la présence de cellules stromales (Miyoshi et al., 2011). En normoxie, la culture 3D permet alors l'expansion en l'absence de cytokines, même en absence de cellules de stromales. En hypoxie, l'expansion est plus efficace avec les cellules stromales et de toute façon meilleure qu'en normoxie. Cependant, aucun test fonctionnel n'est réalisé dans cette étude.

d. Perfusion continue, changements de milieu et agitation

Un élément qui peut également jouer un rôle dans la qualité du maintien des CSH est l'accumulation de facteurs sécrétés par les cellules en différenciation durant le temps de culture. Différentes méthodes ont été proposées pour éviter cela. Des systèmes de bioréacteurs à perfusion continue ont été mis au point pour la culture de cellules mononucléées de moelle osseuse non purifiées, permettant l'augmentation des CFU-C, en particulier des CFU-GM, et des LTC-IC (Koller et al., 1993; Palsson et al., 1993). Cependant, cette croissance est limitée à environ deux semaines. La possibilité de remettre en culture les cellules dans un nouveau bioréacteur après la première phase d'expansion a alors été démontrée (Palsson et al., 1995). Un bioréacteur produit par Aastrom a ensuite été utilisé dans un essai clinique de phase I (Jaroscak et al., 2003). Si aucun effet secondaire négatif n'a été observé, cette méthode ne semble pas apporter de bénéfice concernant la rapidité de récupération des neutrophiles et des plaquettes. Il est à noter que dans ces travaux, les milieux utilisés contiennent du sérum xénogénique et le facteur de croissance EPO (érythropoïétine), ce qui peut influer grandement sur les résultats. Des changements fréquents de milieux sont également proposés, en particulier dans le cadre d'une co-culture avec des cellules stromales (Koller et al., 1995). Plus récemment, une méthode automatisée de dilution afin de réduire la signalisation induite par les facteurs sécrétés dans le milieu a été mise au point (Csaszar et al., 2012). Cette méthode donne également des résultats intéressants en termes de potentiel *in vitro* (nombre de CFU-C, fréquence de LTC-IC) et *in vivo* (fréquence de SRC). Pour terminer, en plus des changements de milieu réguliers, l'agitation semble également contribuer au maintien des CSH. En effet, une expansion plus importante des cellules $CD34^+$ $CD38^-$ est observée lorsqu'elles sont agitées continuellement (Choi et al., 2010). Cependant, la fonctionnalité des cellules n'est pas testée dans ce travail.

e. Régulation de voies liées au maintien des CSH et manipulation génétique

i. HOXB4

HOXB4 est une protéine exprimée par les CSPH humaines et murines (Civin et al., 1984; Hills et al., 2011; Sauvageau et al., 1994). Il a été montré dès la fin du 20ème siècle que la surexpression de HOXB4 induite par transduction rétrovirale permettait d'améliorer les capacités clonogéniques (CFU-C et CFU-S) et de reconstitution hématopoïétique à long-terme des cellules de MO murines (Antonchuk et al., 2001; Sauvageau et al., 1995). Par ailleurs, la surexpression de HOXB4 ne provoque pas une expansion des CSH *in vivo* plus importante que celles normalement observées, indiquant une conservation des mécanismes permettant de réguler le nombre de CSH sans transformation maligne (Thorsteinsdottir et al., 1999). Ces résultats ont été ensuite confirmés sur les CSPH humaines par un autre groupe (Amsellem et al., 2003). Dans cette étude, afin d'éviter tout effet secondaire lié à l'intégration virale de *HOXB4*, les auteurs ont pris le parti de cultiver des cellules $CD34^+$ sur un stroma (MS5) sécrétant HOXB4. Grâce à la capacité de cette protéine à traverser les membranes des cellules et à être transloquée dans le noyau, cette signalisation externe joue le même rôle qu'une expression intrinsèque. Après plusieurs semaines de culture à partir de $CD34^+CD38^{low}$, un plus grand nombre de cellules $CD34^+$, de CFU-C et de LTC-IC est obtenu. Concernant la reconstitution hématopoïétique en modèle de souris NOD-SCID, la fréquence de SRC était bien plus élevée dans les échantillons co-cultivés avec les MS5 exprimant HOXB4 que dans les échantillons contrôles en co-culture sur des MS5 transduites pour exprimer la protéine fluorescente EGFP, 7 semaines après transplantation. Même si cela ne permet pas de statuer sur les propriétés des CSH, on peut cependant dire qu'au moins la fréquence des progéniteurs hématopoïétiques a été améliorée. Une stratégie similaire a été utilisée par d'autres équipes, reposant sur l'exposition à la protéine recombinante HOXB4 couplée au domaine du virus VIH permettant la pénétration cellulaire (TAT) (Huang et al., 2010; Krosl et al., 2003). De la même façon que précédemment, une amélioration des capacités phénotypiques et fonctionnelles des CSH est observée. Une équipe travaillant sur l'activation d'un autre gène, *OCT4*, via la molécule OAC1, a observé une sur-expression de HOXB4 dans les échantillons traités et dans lesquels l'expansion et les capacités fonctionnelles étaient améliorées (Huang et al., 2016). La suppression de *HOXB4* par un siRNA a annulé l'effet de OAC1. Ainsi, OCT4 et HOXB4 pourraient être liés dans la régulation de l'expansion des CSH humaines *ex vivo*. L'analyse de la réponse transcriptomique des CSH adultes et embryonnaires murines surexprimant *Hoxb4* a été effectuée afin de définir les mécanismes d'action à l'origine des effets fonctionnels (Schiedlmeier et al., 2007). Celle-ci révèle différentes voies régulées dans les deux types de cellules et liées à l'auto-renouvèlement, à la quiescence et à la différenciation, telles que les voies Wnt et Notch, le cycle cellulaire, et les voies liées à la signalisation cytokiniques, en particulier TGFβ, TNFα et FGF. D'ailleurs, l'inhibition du FGF empêche l'action bénéfique de la surexpression d'*Hoxb4* sur les capacités fonctionnelles des CSH. Enfin, d'autres gènes de la famille *HOX*, comme *HOXC4,* pourraient également avoir des effets similaires à *HOXB4* dans l'expansion des CSH *ex vivo* (Auvray et al., 2012; Daga et al., 2000).

ii. p38MAPK

Nous avons explicité l'implication de la protéine p38MAPK (codée par le gène *MAPK14*) dans le maintien des CSH dans le chapitre 2. La régulation de cette voie a également été proposée comme facteur permettant une meilleure expansion des CSH. Grâce à une librairie de shARN et à un screening sur des $CD34^+$ de sang de cordon ombilical cultivées *ex vivo* pendant 5 jours dans un milieu contenant les trois cytokines SCF, FLT3L et TPO, le gène *MAPK14* a été identifié comme un important régulateur du devenir des CSH dans ces conditions (Baudet et al., 2012). L'inhibition pharmacologique de ce gène par plusieurs molécules différentes ou par un shARN lentiviral permet d'améliorer la fréquence et le nombre des cellules $CD34^+$ $CD90^+$ malgré une diminution nette de la croissance. De façon intéressante, la quantité intracellulaire de ROS était également diminuée. Enfin, la reconstitution hématopoïétique en souris NSG à long-terme est également meilleure après inhibition de p38MAPK par la molécule SB203580. Ce type de screening a également permis d'obtenir d'autres shRNA ayant une action importante sur l'expansion des CSH mais sans réguler le gène pour lequel il était destiné (Talkhoncheh et al., 2018). Cependant, le transcriptome des cellules après expansion avec ce shRNA comparée à un shRNA contrôle ont également mis en avant une régulation de MAPK14. Les résultats fonctionnels observés par Baudet *et al* ont été confirmés par une autre équipe sur des cellules $CD133^+$ cultivées pendant 7 jours (Zou et al., 2012). L'effet bénéfique de l'inhibition de p38MAPK serait à attribuer à une diminution de la sénescence et à une régulation positive de CXCR4. Cependant, aucun impact sur la prolifération n'a été observé. La baisse de la croissance observée par Baudet *et al.* pourrait être attribuée à une action plus spécifique de MAPK14 sur les progéniteurs plus différenciés que sur les cellules souches, la population de départ étant différente dans les deux études.

iii. Facteurs liés au métabolisme

Les CSH arborant un état métabolique particulier, le rôle de différents acteurs du métabolisme dans le cadre d'une expansion *ex vivo* a été abordé. L'alexidine dihydrochloride, un inhibiteur de la phosphatase mitochondriale PTPMT1 impliquée dans la différenciation des CSH, permet une reprogrammation métabolique vers la glycolyse et une amélioration du maintien des CSH murines *ex vivo* (Liu et al., 2015). Cet effet est médié par une sur-activation d'AMPK et l'utilisation de metformine pour activer cette voie induit le même type d'effet. La protéine NOV (ou CCN3) a également été identifiée comme essentielle aux fonctions des CSH de sang de cordon (Gupta et al., 2007). Une incubation pendant un court temps (8 heures) avec NOV permet d'améliorer la fréquence de SRC sans divisions supplémentaires (ni de différenciation ni d'auto-renouvèlement). On parle ainsi plutôt de recrutement que d'expansion (Gupta et al., 2020). Cet effet est médié par une diminution des ROS et l'expression de cMYC au profit d'un profil glycolytique. Enfin, il a été montré qu'un fort taux d'acides gras, principalement apportés par du sérum ou de l'albumine, était également un facteur permettant de mieux préserver les CSH *ex vivo* (Kobayashi et al., 2019). Cependant, nous avons précisé précédemment que leur utilisation pouvait présenter des défauts.

iv. Signalisation liée au cuivre

Plusieurs équipes ont évalué le rôle de la quantité de cuivre (Cu) sur les CSH humaines. En effet, plusieurs syndromes hématopoïétiques sont liés à des déficiences en Cu. Ainsi, des chélateurs du Cu ont été utilisés afin de rendre compte de son implication, en particulier dans le maintien des CSH *ex vivo*. Dans une première étude utilisant le chélateur tétraéthylènepentamine sur des cellules $CD34^+$, il a été montré que de faibles concentrations de Cu pendant 3 semaines de culture retardaient la différenciation des CSH et améliorait la production de CFU. Des concentrations élevées de Cu, obtenues par ajout de ceruloplasmine ou directement de Cu, avaient l'effet inverse (Peled et al., 2002). Il a ensuite été démontré que cette méthode permet également une amélioration de la prise de greffe en souris NOD/SCID (Peled et al., 2004). Ces résultats ont mené à la mise en place d'un essai clinique de phase I/II (de Lima et al., 2008). Dans cet essai, une fraction d'une unité CSPH de sang de cordon purifiée grâce à l'antigène CD133 est cultivée 3 semaines en présence du tétraéthylènepentamine et co-infusée avec l'autre fraction de la même unité non cultivée. Si le temps moyen de récupération du nombre de neutrophiles et de plaquettes n'est pas amélioré par rapport aux procédures standards, le taux de survie semble néanmoins meilleur.

v. Autres gènes et voies

Une autre approche utilise des protéines de fusion TAT-MYC et TAT-BCL2 (B cell CLL/Lymphoma 2) de façon similaire à TAT-HOXB4 précédemment explicitée (Bird et al., 2014). Ces protéines permettent l'expansion significative des CSH issues de diverses sources : CSH murines de moelle osseuse et CSH humaines de sang de cordon, de sang périphérique mobilisé par G-CSF et de moelle osseuse adulte. Il est à noter que cette expansion est plus difficile à obtenir sur les CSH humaines adultes. Cependant, ces voies étant souvent associées à une transformation maligne, ces résultats sont à interpréter avec prudence malgré les précautions prises concernant l'absence d'intégration au génome. Sur le même principe, une autre équipe a proposé une surexpression de *Fbxw7α* (Iriuchishima et al., 2011). Cela induit une quiescence accrue des CSH murines via une diminution de cMYC, de NOTCH1 et de S6 phosphorylée, un effecteur de la voie mTor. Il est intéressant de noter que l'hypoxie agit selon des mécanismes similaires (suppression de cMYC via FBXW7α). La voie NFκB a également été étudiée dans le contexte de l'expansion des CSH (Talkhoncheh et al., 2018). L'inhibition d'IKKβ (inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta), protéine centrale dans la signalisation de la voie canonique de NFκB permet d'augmenter le nombre et la fréquence de CSH phénotypiques à partir de $CD34^+$ sans modifier la prolifération globale des cellules cultivées, avec un effet fonctionnel *in vitro* (CFU-C) et *in vivo*. Ce bénéfice est lié à une diminution de la signalisation inflammatoire mais est limité à de courtes durées en culture.

Enfin, il convient de rester prudent quant aux possibilités de modification génétiques à visée d'expansion des CSH. En effet, l'activation du gène *MDR1* (multidrug resistance protein 1) et/ou *DHFR* (dihydrofolate reductase) par transduction rétrovirale dans les CSH murines et humaine permet d'obtenir une expansion importante en 12 à 15 jours, mais provoque chez les souris greffées des syndromes myéloprolifératifs (Bunting et al., 1998, 1999, 2000). Ainsi, la sûreté de telles méthodes peut être questionnée en vue d'une application clinique.

f. Petites molécules

Ces dernières années, plusieurs équipes se sont concentrée sur la recherche de petites molécules pharmacologiques qui pourraient permettre d'obtenir une expansion optimale des CSH pour revue (Zarrabi et al., 2018). Certaines d'entre elles ont déjà été mentionnées dans les paragraphes pour leur action sur certaines voies de régulation des CSH, comme le SB203580, inhibiteur de p38MAPK ou encore OAC1, inducteur d'OCT4. Cependant, d'autres molécules, souvent identifiées par screening et dont les mécanismes ne sont parfois pas entièrement élucidés, sont actuellement très étudiées.

i. StemRegenin1 (SR1)

En 2010, une équipe a identifié un dérivé de la purine, nommé StemRegenin 1 (SR1) comme un bon candidat pour l'expansion des CSH (Boitano et al., 2010). La culture est réalisée dans un milieu contenant un cocktail classique de cytokines (SCF, FLT3L, TPO et IL6) supplémenté avec cette molécule pendant 3 semaines. Les cellules cultivées avec le SR1 ont un potentiel clonogénique plus élevé, maintiennent un phénotype immature et présentent une fréquence de SRC plus élevée en souris NSG. Les auteurs ont exploré le mécanisme d'action du SR1 et démontré qu'il agissait comme un antagoniste du récepteur des hydrocarbures aromatiques AhR (aryl hydrocarbone receptor), qui joue un rôle de facteur de transcription. Cet effet est réversible à l'arrêt du traitement et ne semble pas fonctionner sur les CSH murines. Il est à préciser cependant que la suppression totale des AhR induit chez la souris un épuisement des CSH (Singh et al., 2014). Un essai clinique a par la suite était mis en place pour évaluer l'intérêt thérapeutique du SR1 (Wagner et al., 2014b, 2016). Comme précédemment, deux unités de $CD34^+$ de sang de cordon, une fraîche et une cultivée 15 jours en présence de SR1, sont transplantées aux patients. Le temps de récupération des neutrophiles semble alors amélioré et toutes les greffes ont été un succès. Des combinaisons du SR1 avec d'autres méthodes présentées sont alors proposées : co-culture sur un stroma exprimant DL1 pour stimuler la voie Notch (Dahlberg et al., 2014), permettant une amélioration significative dans la reconstitution myéloïde à court-terme sans altérer la prise de greffe à long-terme ; ou encore l'inhibition de p38MAPK et de mTOR (Li et al., 2020b). En revanche, une équipe étudiant des combinaisons de cytokines n'a pas observé d'amélioration significative de l'expansion des CSPH avec du SR1 comparé à son milieu « optimal » contenant SCF, FLT3L, TPO, IL3 et G-CSF (Zhang et al., 2019). Il se peut cependant que cela soit dû à la différence dans les cytokines choisies dans les deux cas. On peut également noter que le SR1, tout comme la PGE2, a aussi été utilisé pour l'expansion de CSH obtenues à partir d'iPS (Gori et al., 2012) et de cellules souches embryonnaires (Tao et al., 2017).

ii. UM171

La deuxième molécule en vogue est l'UM171, un dérivé de pyrimidoindole, identifié en 2014 par l'équipe de Guy Sauvageau (Fares et al., 2014). Par des transplantations en dilution limite, les auteurs démontrent une amélioration de la fréquence des SRC ainsi qu'une moins grande différenciation des cellules. Si le mode d'action de cette molécule est encore mal compris, il semblerait qu'il soit différent

de celui du SR1. En tout cas, les CSH maintenues en culture expriment spécifiquement le marqueur EPCR (Fares et al., 2017). Cependant, même si l'expression de cette protéine est nécessaire à la fonctionnalité des cellules, sa surexpression seule ne permet pas de mimer les effets de l'UM171. En complément de l'expansion, l'UM171 est ensuite testé dans un modèle de transduction lentivirale pour la thérapie génique (Ngom et al., 2018). Le protocole implique une pré-stimulation de 16 heures et une transduction de 6 heures suivie de 3 jours de culture. L'UM171, comparé à l'absence de traitement ou le SR1, permet une amélioration de la transduction et de la transplantabilité des cellules transduites. Cela est valable également sur d'autres types de virus, par exemple les γ-rétrovirus. Enfin, toujours dans un contexte de thérapie génique, un autre groupe a exploité la combinaison d'un traitement au PGE2 pendant une transduction de 38 heures avec une expansion grâce à l'UM171 de cellules $CD34^{+}CD38^{-}$ de sang périphérique mobilisé (Zonari et al., 2017). Ces cellules sont alors transplantées avec des progéniteurs hématopoïétiques non manipulés afin d'obtenir une récupération transitoire plus rapide. Cette molécule pourrait donc avoir de nombreuses applications cliniques. Des essais cliniques de phase I/II sont en cours et montrent des résultats préliminaires encourageants sur des patients atteints de leucémie aigüe, de myélodysplasie ou d'anémie idiopathique et nécessitant une greffe de CSH (Claveau et al., 2020; Cohen et al., 2017, 2020).

iii. Autres molécules et combinaisons

Une équipe a récemment proposé la combinaison des deux molecules précédentes, SR1 et UM171, avec un inhibiteur de p38MAPK (LY2228820) (Psatha et al., 2017). De façon intéressante, la reconstitution hématopoïétique en souris NSG est améliorée sans apparente expansion de cellules présentant un phénotype immature. Les auteurs attribuent cet effet à une diminution de l'expression de la voie RAP1/RAS/PI3K-AKT.

Jiang *et al.* ont de leur côté combiné 3 petites molécules différentes identifiées pour leur capacité à maintenir l'expression du gène CD34 pendant la culture, dont OAC1, utilisé pour inhiber l'axe OCT4-HOXB4 (Jiang et al., 2018). L'utilisation de cette combinaison avec les facteurs de croissance hématopoïétique SCF et TPO permet d'améliorer significativement la capacité à générer des colonies et la prise de greffe en souris NSG. Un autre antagoniste des AhR, le 3',4'-dimethoxyflavone (3'4'-DMF), déjà utilisé dans des traitements anticancéreux, a également été testé sur des cellules $CD34^{+}$ issues de sang de cordon (Kaur et al., 2013). Les résultats fonctionnels sont également très encourageants pour 7 jours de culture. De façon intéressante, après une culture en hypoxie, l'effet de cette molécule est invisible. Le screening de molécules permettant l'expansion des CSH est un domaine assez porteur et il est probable que de nouvelles petites molécules soient proposées pour cette application dans les années à venir.

g. Régulation épigénétique

Il est aujourd'hui admis que la régulation épigénétique contribue largement au devenir des CSH. Ainsi, plusieurs équipes ont choisi cette approche pour tenter d'améliorer l'expansion des CSH (pour revue (Iancu-Rubin and Hoffman, 2015).

i. Acide valproïque (VPA)

Une des molécules les plus étudiées est l'acide valproïque (VPA), un inhibiteur des HDAC habituellement utilisé dans le cadre de la leucémie. Il a été montré en 2005 que cette molécule avait également des effets sur l'hématopoïèse normale et en particulier la prolifération et l'auto-renouvèlement des CSH (Bug et al., 2005). Ces effets peuvent être imputés à une sous-régulation de $p21^{cip1}$, à une activation de la voie Wnt et à une surexpression d'HOXB4. Ainsi, son utilisation dans le cadre de l'expansion *ex vivo* a rapidement été proposée (De Felice et al., 2005). Cet agent a montré des effets très intéressants sur le maintien du phénotype immature (marqueur CD34) de CSH de sang de cordon, de moelle osseuse et de sang périphérique gardées en culture pendant plusieurs semaines dans des milieux contenant les cytokines classiques (FLT3L et TPO, plus ou moins SCF et IL3). De plus, le niveau d'acétylation des sites régulateurs de *HOXB4* et de *CD133* (marqueur des CSH) est spécifiquement augmenté. Par la suite, l'amélioration des capacités de reconstitution hématopoïétique a été démontrée, tout en confirmant les résultats obtenus pour HOXB4 (Seet et al., 2009). Ces observations ont été complétées par le fait que le VPA augmente également l'expression du CXCR4 via l'acétylation de l'histone H4. Cette méthode a finalement été évaluée par des tests fonctionnels *in vitro* et *in vivo* (Vulcano et al., 2012) : le VPA combiné à la TPO permet une amélioration de la clonogénicité en test CFU-C en série et une augmentation du chimérisme en souris NOD/SCID à long-terme. Cependant, 6 semaines post-transplantation, la reconstitution hématopoïétique est moindre après expansion avec cette combinaison qu'avec seulement de la TPO : cet effet peut être attribué à l'inhibition de la différenciation, induisant un délai dans la récupération des cellules matures, ce qui pourrait être problématique pour une application clinique visant à une diminution du temps passé en neutropénie. Il a également été montré que le VPA potentialise l'effet de l'IL3 (Liu et al., 2014). Enfin, dans un milieu de culture contenant SCF, TPO, IL3 et FLT3L, le VPA montre encore une fois son effet bénéfique *in vitro* et *in vivo*, y compris en transplantation secondaire en souris NSG (Chaurasia et al., 2014). Un essai clinique de phase I/II est en cours depuis 2019.

D'autres équipes ont caractérisé plus précisément les effets du VPA sur le phénotype des CSH. Ainsi, deux études ont montré que des progéniteurs n'exprimant pas les marqueurs des CSH (SCA1 pour les CSH murines et CD90 pour les CSH humaines) pouvaient acquérir à nouveau ces marqueurs et présentent des capacités fonctionnelles améliorées (Papa et al., 2018; Walasek et al., 2013). Cette « reprogrammation » cellulaire pourrait être à l'origine des effets du VPA. Par ailleurs, d'autres effets sur le métabolisme sont également observés. Par exemple, chez la souris, la voie de la glutathione est préférentiellement activée. Chez l'homme, le profil métabolique après expansion se rapproche de CSH de SCO fraîches avec une activité glycolytique augmentée et une diminution des ROS. Cette dernière étude a ensuite été complétée par le même groupe, afin de confirmer ces résultats sur des CSH adultes (Zimran et al., 2020). Là encore, le potentiel mitochondrial est diminué.

Enfin, le VPA a également été combiné avec différentes autres molécules. L'addition de lithium permet en effet d'améliorer encore plus la fonctionnalité *in vitro* (CAFC, CFU-C) et *in vivo* (radioprotection, reconstitution à long-terme) des CSH murines (Walasek et al., 2012). De plus, un profil transcriptomique caractéristique des CSH est mieux préservé, avec une expression plus importante d'un certain nombre de facteurs de transcription, par exemple GATA2 ou PPARG. Un autre groupe a testé une combinaison avec le 3'4'-DMF précédemment introduit, cette fois sur les CSH humaines, et n'a pas

observé d'effet synergique de l'addition des deux molécules par rapport à chacun des traitements seul (Kaur et al., 2013).

ii. 5-aza-2'-deoxycitidine et trichostatine

Une autre molécule inhibitrice des HDAC, la trichostatine (TSA), a également été testée notamment en combinaison avec le 5-aza-2'-deoxycitine (5-AZA), un agent hypométhylant. Le groupe de Ronald Hoffmann a extensivement travaillé sur cette méthode. L'expansion se décompose en deux phases, la première de 2 jours dans un milieu contenant SCF, FLT3L, IL3 et TPO, pendant laquelle le traitement au 5-AZA est réalisé ; la deuxième de 7 jours dans un milieu favorisant la différenciation avec SCF, GM-CSF, IL3, IL6 et EPO, comprenant le traitement au TSA. La prolifération de CSH de SCO est alors diminuée mais la proportion de cellules $CD90^+$ considérablement augmentée (Milhem et al., 2004). Le nombre de CAFC et de CFU-C est également comparable à des cellules fraîches. Concernant la fréquence de SRC en modèle de souris NOD/SCID, elle est même supérieure à celle de cellules fraîches (Araki et al., 2006). Comme dit précédemment, le traitement de $CD34^+$ de sang de cordon ombilical avec cette combinaison induit un ralentissement des divisions cellulaires. Cependant, après 5 à 10 divisions, les cellules cultivées avec uniquement des cytokines ne possèdent plus de potentiel de reconstitution hématopoïétique *in vivo*, contrairement à celles traitées avec 5-AZA + TSA (Araki et al., 2007). De plus, une sur-régulation de gènes impliqués dans l'auto-renouvèlement des CSH est observée. Ces études sont complétées par la suite avec une estimation de l'effet du traitement séquentiel au 5-AZA puis TSA sur des CSH de sang périphérique mobilisé (Saraf et al., 2015). Les mêmes résultats sont obtenus, et il est également observé une élévation de la transcription d'un certain nombre de gènes impliqués dans l'auto-renouvèlement, comme *HOXB4*, *GATA2* ou encore *EZH2*.

Il est à noter que l'addition de 5-AZA en plus du VPA ne semble pas induire de bénéfice évident par rapport à du VPA seul (Liu et al., 2014). La combinaison 5-AZA + TSA a aussi été comparée au traitement au VPA sur des CSH humaines de SCO (Mahmud et al., 2014). Au niveau des capacités de reconstitution hématopoïétique en souris NOD/SCID, la combinaison 5-AZA et TSA est bien meilleure que le VPA, avec une fréquence de SRC d'environ 1/3 000 contre 1/20 000 (qui est elle à peu près similaire à des CSH fraîches). Sur les CSH murines, le traitement au TSA a aussi été comparé au VPA. Si à l'inverse du VPA, le TSA induit une diminution de la prolifération, la fréquence et le nombre absolu de CFU-C sont néanmoins augmentés, ainsi que la proportion de cellules au phénotype immature (Obier et al., 2010).

Enfin, Tatetsu et al ont exploré les mécanismes d'action des inhibiteurs de HDAC et en particulier de la TSA (Tatetsu et al., 2019). Ils ont observé une augmentation de l'expression des gènes *HOXB4*, *SALL4* (Spalt-like transcription factor 4), et *GATA2*. Des shARN pour ces gènes ont ainsi été générés afin d'évaluer leur rôle dans le maintien des CSH par la TSA. Ainsi, la sous-expression de SALL4 induit la diminution de l'expansion la plus importante, indiquant son rôle crucial dans l'expansion des CSH induite par le TSA. Une autre équipe a proposé de surexprimer SALL4 dans des CSH de sang périphérique mobilisé, ce qui a permis d'obtenir également une bonne expansion (Aguila et al., 2011).

iii. Autres molécules

D'autres agents modificateurs de l'épigénétique ont été proposés. Le nicotinamide, une forme de vitamine B3, inhibe la différenciation des CSH en culture pendant 3 semaines dans un milieu contenant SCF, TPO, FLT3L et IL6, au profit de leur expansion (Peled et al., 2012). Cela se traduit par une amélioration du nombre de CFU-C, de SRC à court-terme (6 semaines) et de la migration et du nichage des cellules. Par ailleurs, les auteurs identifient SIRT1 comme la cible du nicotinamide. Cette méthode a fait l'objet d'un essai clinique sous le nom de « NiCord », dans lequel une unité de sang de cordon traitée pendant 3 semaines est co-infusée avec une unité fraîche. Il ressort de la phase I de cet essai que le NiCord permet un raccourcissement de la neutropénie et une prise de greffe à long-terme (Horwitz et al., 2014) ainsi qu'une diminution des infections post-greffe (Anand et al., 2017). Cependant, sur des cellules murines, le nicotinamide semble au contraire induire la différenciation pendant la culture (Matsui et al., 2012). La perte de SIRT1 aurait ainsi des effets sur la production de ROS et les voies FOXO et p53. A l'inverse, un activateur de SIRT1, le resveratrol, permet de l'inhiber. Par ailleurs, le resveratrol possède également de nombreuses autres cibles ainsi que des propriétés antioxydantes qui pourraient contribuer à son effet sur les CSH. Son effet sur les propriétés fonctionnelles des CSH après expansion dans un milieu contenant des facteurs de croissance (SCF, TPO, FLT3L et IL6) a d'ailleurs été confirmé sur les CSH humaines (Heinz et al., 2015).

Un inhibiteur de bromo-domaine et motif extra-terminal (BET), CPI203, a également été identifié par un screening comme permettant l'expansion des CSH humaines sans perte de viabilité (Hua et al., 2020). Les cellules obtenues possèdent un potentiel de reconstitution hématopoïétique en série. De plus, elles présentent une différenciation mégacaryocytaire accrue, qui pourrait se révéler particulièrement bénéfique dans un contexte clinique. Enfin, il a été montré qu'un faible taux de calcium permettait une expansion des CSH, via une sous-régulation de la calpaïne, un inhibiteur de la famille TET (ten-eleven translocation) (Luchsinger et al., 2019). Ainsi, la stabilisation des enzymes TET, via une culture en présence de peu de calcium ou d'un inhibiteur de la calpaïne, le PD150808, préserve les propriétés essentielles des CSH.

Toutes ces méthodes d'expansion sont prometteuses, en témoigne le grand nombre d'essais cliniques engagés afin de tester la faisabilité dans un contexte réel de thérapie cellulaire et génique. Cependant, des études complémentaires sont souvent nécessaires afin de déterminer le mécanisme d'action exact ainsi que les potentiels risques de ce type de méthodes. Pour conclure sur l'expansion, une étude très récente a testé différentes combinaisons de 7 molécules impliquées dans différentes voies régulant les CSH : SB431542 pour TGFβ, Purmorphamine pour SHh, PD0325901 pour Wnt/β-cathénine, Chir9901 pour ERK, bisperoxovanadium et pifitrhin-μ pour AKT et p53, et le nicotinamide pour la régulation épigénétique (Afzal et al., 2020). Cette étude comparative est faite en présence des facteurs de croissance SCF, TPO et FLT3L. Le meilleur cocktail défini grâce à ce travail est SB431542, Chir9901 et bisperoxovanadium. Ainsi, l'interaction entre les différentes molécules pourrait également avoir un impact important sur la qualité de l'expansion obtenue. De plus, il est important de mieux caractériser l'éventuel effet synergique de toutes les méthodes précédemment exposées. Il semble en effet qu'une étude comparative systématique soit nécessaire afin de déterminer les conditions optimales de culture et d'expansion des CSH.

RÉSULTATS

Résultats

Projet 1 : Impact des faibles doses de radiations ionisantes sur les cellules souches hématopoïétiques humaines

1. *Contexte scientifique*

Comme indiqué en introduction, l'impact des fortes doses de radiations sur le système hématopoïétique, et en particulier sur les cellules souches hématopoïétiques, est assez bien caractérisé. Il a longtemps été admis que des faibles doses de radiations (moins de 1 Gy) avaient un effet négligeable, compte-tenu de la nature soit linéaire, soit « à seuil » présupposée dans les modélisations de l'effet des radiations ionisantes.

Cependant, plus récemment, des études ont mis en évidence que des enfants exposés à de nombreux examens d'imagerie médicale de type CT-scan étaient davantage sujets au développement de tumeurs cérébrales ou de cancers hématologiques (Pearce et al., 2012). La dose moyenne reçue lors de ces examens est de quelques dizaines de mGy, bien en dessous donc des seuils de sécurité préconisés. Ainsi, il a été envisagé que de faibles doses de radiations ionisantes pouvaient avoir un impact non-négligeable sur certains tissus. Un réseau européen, RISK-IR, a donc été mis en place afin de caractériser leur effet.

Une équipe collaboratrice a travaillé sur l'effet de l'irradiation au ^{60}Co (irradiation γ) sur les CSH murines et mis en évidence un effet immédiat sur la clonogénicité après une irradiation *ex vivo* à 20 mGy, démontrant une hyper-radiosensibilité à faible dose (Rodrigues-Moreira et al., 2017). Cependant, quasiment aucun mécanisme habituel de réponse à l'irradiation n'est observé : pas de foyers γH2AX, pas d'activation d'ATM ni de p53. Seule une augmentation des ROS, transitoire et réversible par un traitement au NAC, est observable. Celle-ci induit la translocation nucléaire de NRF2 et une activation de l'autophagie ainsi qu'une diminution de l'activité mitochondriale. De façon intéressante, une deuxième vague de ROS est visible après plusieurs jours en culture et plusieurs mois post-transplantation *in vivo.* Enfin, l'irradiation à 20 mGy *in vivo* n'induit pas d'effet, sauf dans le cas d'une condition inflammatoire induite par l'interféron γ ou d'une mobilisation des CSH par le G-CSF. Ainsi, les faibles doses d'irradiation semblent donc avoir un effet quantifiable sur les CSH murines via un stress oxydant, provoquant des effets fonctionnels importants.

2. Objectifs

Les objectifs de ce travail sont d'une part de déterminer si de faibles doses de radiations ionisantes γ ont un effet sur les CSH humaines (similaire ou différent des CSH murines) ; et d'autre part, si tel est le cas, de caractériser les mécanismes à l'origine de ces effets. Le ^{60}Co a été longtemps utilisé en radiothérapie : ainsi, les zones en périphérie du traitement pourraient avoir été soumises à de faibles doses d'irradiation. De plus, d'autres molécules radioactives, comme l'iode injecté lors d'examens médicaux, produisent également des rayonnements γ. Cette étude pourrait donc permettre de préciser les potentiels effets de ce type d'interventions sur les CSH environnantes, et de proposer des solutions thérapeutiques pour les éviter.

3. Résultats : article publié (Henry E et al Haematologica 2020)

Ce travail a été réalisé lors de ma thèse, ainsi que par une post-doctorante, Inès Souissi-Sahraoui, avant mon arrivée. Il a donné lieu à une publication dans Haematologica que nous signons en co-premières auteures. L'article a été accepté en novembre 2019 et publié dans le numéro d'août 2020.

Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Display Reactive Oxygen Species-Dependent Long-Term Hematopoietic Defects After Exposure To Low Doses Of Ionizing Radiations

Elia Henry, Inès Souissi-Sahraoui, Margaux Deynoux, Andréas Lefèvre, Vilma Barroca, Anna Campalans, Véronique Ménard, Julien Calvo, Françoise Pflumio, Marie-Laure Arcangeli

Haematologica August 2020 105: 2044-2055; **Doi:**10.3324/haematol.2019.226936

Ferrata Storti Foundation

Haematologica 2020
Volume 105(8):2044-2055

Human hematopoietic stem/progenitor cells display reactive oxygen species-dependent long-term hematopoietic defects after exposure to low doses of ionizing radiations

Elia Henry,[*1,2,3,4] Inès Souissi-Sahraoui,[*1,2,3,4] Margaux Deynoux,[1,2,3,4] Andréas Lefèvre,[1,2,3,4] Vilma Barroca,[1,2,3,4] Anna Campalans,[3,4,5] Véronique Ménard,[3,4,6] Julien Calvo,[1,2,3,4] Françoise Pflumio,[#1,2,3,4] and Marie-Laure Arcangeli[#1,2,3,4]

[1]INSERM, U1274, Laboratory "Niche, Cancer and Hematopoiesis"; [2]CEA, DRF-JACOB-IRCM-SCSR-LSHL, UMR "Genetic stability, Stem Cells and Radiation"; [3]UMR "Genetic stability, Stem Cells and Radiation" Université de Paris; [4]UMR "Genetic stability, Stem Cells and Radiation", Université Paris-Saclay; [5]CEA, DRF-JACOB-IRCM-SIGRR-LRIG, UMR "Genetic stability, Stem Cells and Radiation" and [6]UMR "Genetic stability, Stem Cells and Radiation", F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

**EH and IS-S contributed equally as co-first authors.*

#FP and M-LA contributed equally as co-senior authors.

Correspondence:

MARIE-LAURE ARCANGELI
marie-laure.arcangeli@inserm.fr

Received: May 14, 2019.

Accepted: November 27, 2019.

Pre-published: November 28, 2019.

doi:10.3324/haematol.2019.226936

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: www.haematologica.org/content/105/8/2044

©2020 Ferrata Storti Foundation

Material published in Haematologica is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions: https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode. Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions: https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode, sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.

ABSTRACT

Hematopoietic stem cells are responsible for life-long blood cell production and are highly sensitive to exogenous stresses. The effects of low doses of ionizing radiations on radiosensitive tissues such as the hematopoietic tissue are still unknown despite their increasing use in medical imaging. Here, we study the consequences of low doses of ionizing radiations on differentiation and self-renewal capacities of human primary hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC). We found that a single 20 mGy dose impairs the hematopoietic reconstitution potential of human HSPC but not their differentiation properties. In contrast to high irradiation doses, low doses of irradiation do not induce DNA double strand breaks in HSPC but, similar to high doses, induce a rapid and transient increase of reactive oxygen species (ROS) that promotes activation of the p38MAPK pathway. HSPC treatment with ROS scavengers or p38MAPK inhibitor prior exposure to 20 mGy irradiation abolishes the 20 mGy-induced defects indicating that ROS and p38MAPK pathways are transducers of low doses of radiation effects. Taken together, these results show that a 20 mGy dose of ionizing radiation reduces the reconstitution potential of HSPC suggesting an effect on the self-renewal potential of human hematopoietic stem cells and pinpointing ROS or the p38MAPK as therapeutic targets. Inhibition of ROS or the p38MAPK pathway protects human primary HSPC from low-dose irradiation toxicity.

Introduction

Hematopoietic stem cells (HSC) give rise to all blood cell types over the entire life of an organism. In adult mammals, they are located in very specific microenvironments of the bone marrow (BM), allowing maintenance of HSC functions.[1] In humans, HSC are enriched in the $CD34^+$ $CD38^{low}$ $CD90^+$ $CD45RA^-$ cell population that also contains immature progenitors, hereafter called HSPC.[2,3] Hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) are multipotent and mainly slow cycling cells. They possess a self-renewal potential that allows them to sustain the continuous generation of blood cells. Quiescence and self-renewal are regulated by several extrinsic factors, such as cytokines, extracellular matrix proteins and adhesion molecules,[4,5] as well as intrinsic factors, such as transcription factors (TAL1,[6-8] GATA-2, etc.[9]), proteins implicated in DNA damage repair pathways,[10-12] and cell cycle regulators.[13-15] Mutations in genes involved in DNA repair induce BM failure with exhaustion of the

HSC pool, demonstrating that preserving genome integrity is crucial for HSC long-term maintenance (reviewed by Biechonski and Milyavsky).[16] For instance, *ku80*, *lig4* and *atm*-deficient mice exhibit defects in HSC maintenance and self-renewal.[10-12] *Atm*-deficient HSC harbor increased levels of reactive oxygen species (ROS) responsible for their loss of hematopoietic reconstitution capacity[10] that can be rescued by treatment with the antioxidant N-acetylcystein (NAC). Indeed, increased ROS in HSC induce their differentiation and their exhaustion[17,18] and quiescent HSC with the lowest level of ROS have the highest hematopoietic reconstitution potential compared to 'activated' HSC harboring higher ROS levels.[17] Interestingly, in mouse and human, ROS and DNA damage accumulate in HSC upon serial transplantation resulting in decreased self-renewal capacities. NAC-treated HSC are protected against the accumulation of oxidative DNA damage.[18,19]

Ionizing radiations (IR) represent the main source of DNA damage and ROS. Importantly, the human population is increasingly exposed to low doses of IR (LDIR, <100 mGy) due to the recurrent use of medical imaging.[20] Studies have shown that combinations of several computed tomography (CT) scans (thoracic or cranial) can increase the risk of developing cancer.[21] Indeed, having more than five CT scans (corresponding to a cumulative dose of 30 mGy) can lead to a 3-fold increase in the risk of developing pediatric leukemia. Moreover, a recent study showed that 20 mGy LDIR affects the fundamental properties of HSC in mouse.[22] In this context, it is crucial to study the consequences of LDIR exposure in human cells, in particular in human HSC. Here we show through combining *in vitro* and *in vivo* studies that a single acute 20 mGy LDIR decreases human HSPC serial clonogenic and reconstitution potentials, and that these effects are mediated through a ROS/p38MAPK-dependent signaling pathway.

Methods

Primary cells

Cord blood (CB) samples were collected from healthy infants with the informed written consent of the mothers according to the Declaration of Helsinki. Samples were obtained in collaboration with the Clinique des Noriets, Vitry-sur-Seine, and with the Cell Therapy Department of Hôpital Saint-Louis, Paris, France. Samplings and experiments were approved by the Institutional Review Board of INSERM (Opinion n. 13-105-1, IRB00003888). $CD34^+$ cells were purified by immuno-magnetic selection using a CD34 MicroBeads kit (Miltenyi Biotec, Paris, France). For each experiment, we used a pool of $CD34^+$ cells from different healthy infants to diminish individual variability.

Low dose of ionizing radiations

20 mGy LDIR was delivered with a dose rate of 20 mGy/minute (min) using a Cobalt 60 Irradiator (Alcyon). 2.5 Gy was delivered with a dose rate of 1 Gy/min.

Flow cytometry and cell sorting

$CD34^+CD38^{low}$ cells and $CD34^+CD38^{low}CD45RA^-CD90^+$ HSPC were isolated after labeling with human specific monoclonal antibodies (MoAbs, see *Online Supplementary Table S1* for details). Cell sorting was performed using either a Becton Dickinson (BD)-FACS-ARIA3 SORP or a BD-FACS-Influx (laser 488, 405, 355, 561 and 633, BD Bioscience). Flow cytometry experiments are described in the *Online Supplementary Methods.*

Transplantation assays

NOD.Cg-Prkdc(scid) Il2rg(tm1Wjl)/SzJ (NSG) mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) were housed in the pathogen-free animal facility of IRCM, CEA, Fontenay-aux-Roses, France. Adult 8-12-week old NSG mice received a 3 Gy sublethal irradiation using a GSRD1 γ-irradiator (source Cesium137, GSM) and were anesthetized with isoflurane before intravenous retro-orbital injection (i.v.) of human cells as described in the *Online Supplementary Methods*. All experimental procedures were carried out in compliance with French Ministry of Agriculture regulations (animal facility registration n.: A9203202, Supervisor: Michel Bedoucha, APAFIS #9458-2017033110277117v2) for animal experimentation and in accordance with a local ethical committee (#44).

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed on cell-sorted HSPC irradiated and incubated 30 min, 1 hour (h), or 3 h at 37°C in MyeloCult medium, as previously described.[22-24] Details of the methods used are available in the *Online Supplementary Methods.*

Drug treatments

$CD34^+$ cells or $CD34^+$ $CD38^{low}CD45RA^-CD90^+$ HSPC were treated with several drugs as described in the *Online Supplementary Methods.*

Colony forming unit-cell assay

Colony forming unit-cell assay (CFU-C) and serial platings were performed as previously described;[6] see *Online Supplementary Methods* for details. Depending on CB pool samples, 60-80 colonies were generated from 500 HSPC non-irradiated or irradiated at 20 mGy.

Primary and extended long-term culture initiating cell assays

Long-term culture initiating cell assay was performed as previously described[6] and is described in detail in the *Online Supplementary Methods.*

Intracellular flow cytometry

Ki67, cleaved caspase 3, phospho-p38MAPK (P-p38, phosphorylation on Thr180/Tyr182), phospho-ATM, p53 and phospho-p53 staining were performed as previously described[4] (Ki67) and according to the manufacturer's instructions, respectively. More details can be found in the *Online Supplementary Methods*.

Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester staining

$3x10^5$ $CD34^+$ cells were labeled with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (2.5 μM, Sigma, France) and cultured in StemSpan medium supplemented with cytokines (Stem Cell Technologies), as described in the *Online Supplementary Methods.*

Reactive oxygen species quantification and mitochondria activity assay

Reactive oxygen species quantification was performed with fresh $CD34^+$ cells using CellRox Orange reagent following the manufacturer's instructions (ref. C10443, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific). Mitochondrial activity assay was performed using mitotracker green (MTG) and TMRE products, according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific).

Statistical analysis

Mann and Whitney (M&W) and Kruskal and Wallis (K&W)

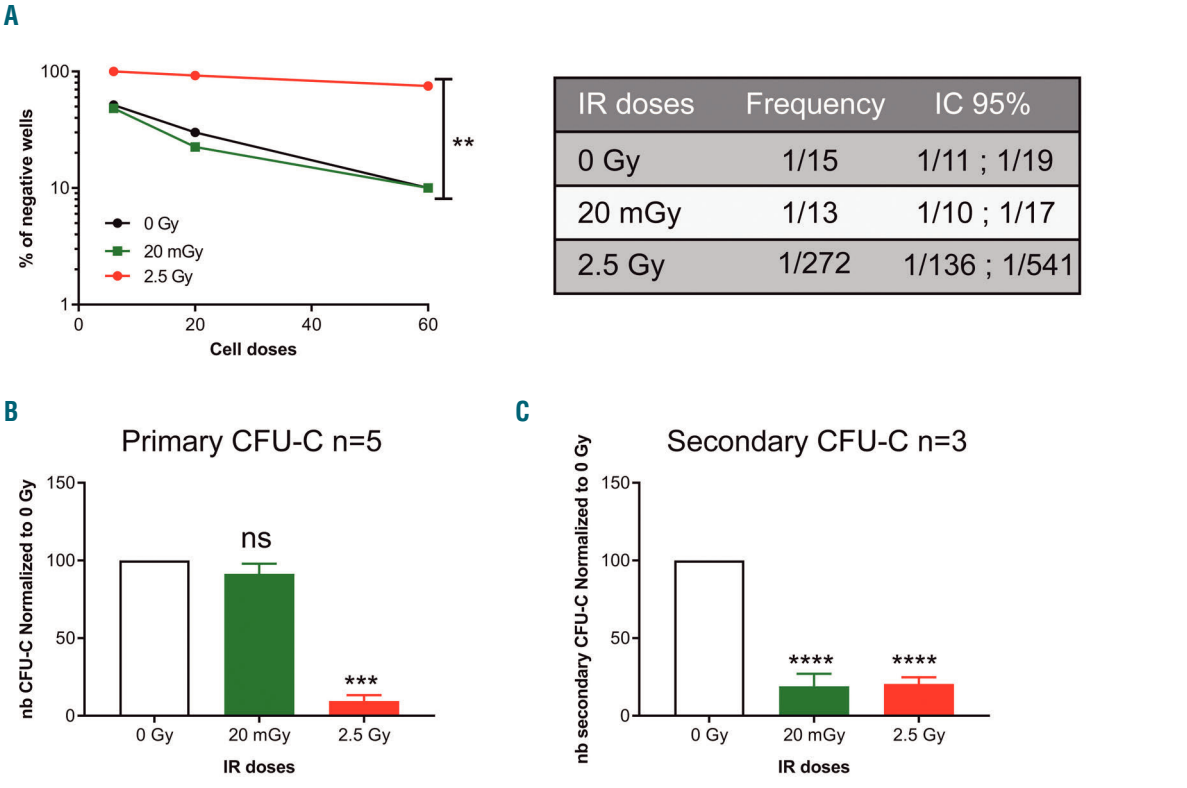


Figure 1. Low doses (LD) of ionizing radiations (IR) exposure of human hematopoietic stem progenitor cells (HSPC) leads to deficient serial colony forming unit-cell assay (CFU-C) and primary and extended long-term culture initiating cell (LTC-IC) potentials. CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC were sorted from pools of independent cord blood (CB) samples by cell sorting and exposed to the indicated IR doses prior to *in vitro* cultures. (A) LTC-IC assay in limiting dilution (pool of 2 experiments, 120 wells/IR dose). Irradiated CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC were seeded on MS5 stromal cells in limiting dilution for five weeks then plated in methylcellulose for 12 days. LTC-IC frequency was calculated using LCALC software. (B) Primary CFU-C assay (cumulative results from 4 independent experiments with HSPC isolated from 4 independent pools of CB samples). HSPC (500 cells/plate) were plated in CFU-C condition for 12-14 days and the number (nb) of CFU-C was quantified. Results are normalized to the non-irradiated conditions. (C) Primary CFU-C were pooled and replated in methylcellulose for 12-14 days. Shown are the nb of secondary CFU-C. Results are normalized to the sham-irradiated conditions (cumulative results from 3 independent experiments). Results are shown as mean±standard error of mean. $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$ (Mann-Whitney statistics).

non-parametric statistical analyses were used. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$.

Results

A 20 mGy dose of irradiation decreases serial replating capacity of human hematopoietic stem/progenitor cells

To understand the impact of HSPC exposure to LDIR, we first performed serial long-term culture initiating cell (LTC-IC) and CFU tests as surrogate assays to study human HSPC properties, i.e. self-renewal and differentiation capacities.[25-27] Human CD34$^+$CD38^{low}CD45RA$^-$CD90$^+$ HSPC were purified, irradiated and cultured with the MS5 stromal cell line in LTC medium for five weeks or plated directly in semi-solid methylcellulose cultures. In LTC-IC limiting dilution analyses, every single well was harvested independently at the end of the culture and plated in CFU-C assay. The LTC-IC frequency obtained after a 20 mGy irradiation of HSPC was similar to the LTC-IC frequency of sham-irradiated HSPC (1/15) suggesting that LDIR do not affect LTC-IC frequency. In contrast, a high (2.5 Gy) irradiation dose induced a drastic drop in LTC-IC frequency (1/272) (Figure 1A). In addition, 2.5 Gy-irradiated HSPC directly seeded in CFU-C conditions after IR produced very few colonies compared to control cells whereas 20 mGy-irradiated HSPC generated a similar number of CFU-C to sham-irradiated HSPC (Figure 1B and *Online Supplementary Figure S1A*). No difference in the quality of CFU-C was observed between sham and 20 mGy conditions (*Online Supplementary Figure S1B*). These primary LTC-IC and primary CFU-C assays show that 20 mGy LDIR do not alter HSPC frequency and clonogenicity *in vitro* and do not induce any myelo/erythroid differentiation bias in primary cultures (*Online Supplementary Figure S1B*). To characterize whether LDIR have deleterious effects on human HSPC self-renewal potential *in vitro*, serial replatings were performed for both CFU-C and LTC-IC assays.[25-27] We observed that 20 mGy and 2.5 Gy-irradiated CD34$^+$CD38^{low}CD45RA$^-$CD90$^+$ HSPC produced lower numbers of secondary colonies in contrast to sham-irradiated HSPC, showing that 20 mGy alters their serial clonogenic potential (Figure 1C and *Online Supplementary Figure S1C*). This result was also obtained after picking up and replating individual primary CFU-GM colonies (*Online Supplementary Figure S1D*). In the case of LTC-IC, secondary/extended cultures were initiated using cells expressing high CD34 surface expression (CD34^{hi}), purified after the initial five weeks of LTC-IC culture (*Online Supplementary Figure S1E*) and seeded for five additional weeks in LTC-IC conditions at limiting dilution. Of note, we were not

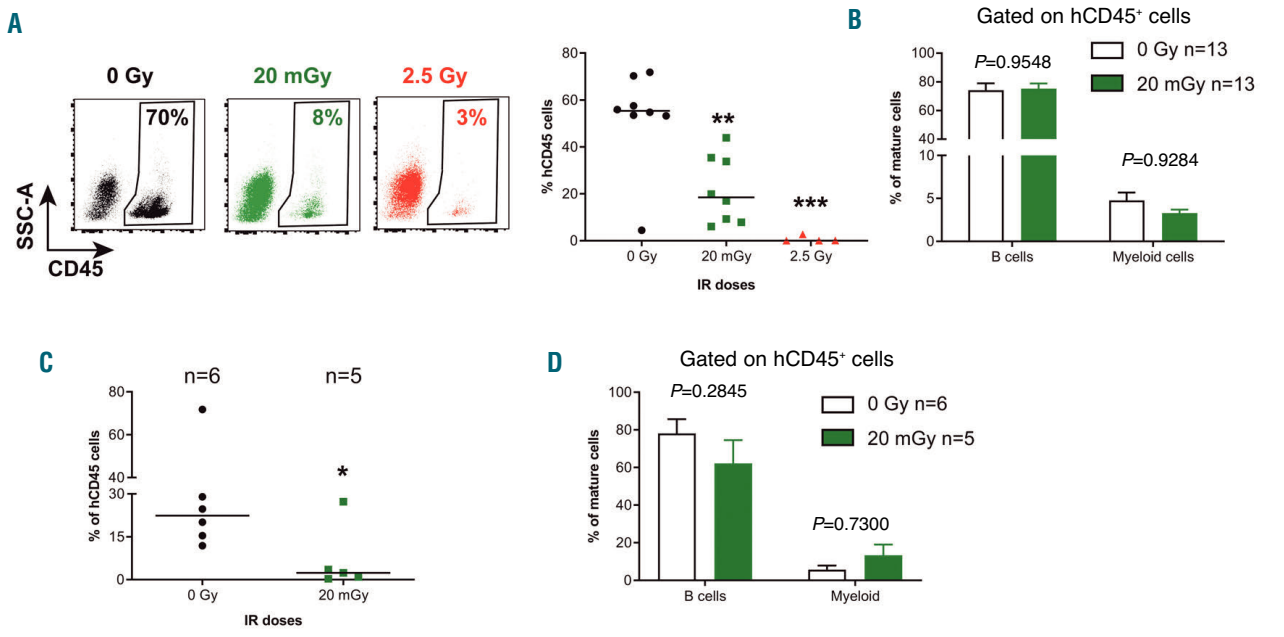


Figure 2. Hematopoietic reconstitution capacities of human hematopoietic stem cells (HSC) after *in vivo* exposure to low doses (LD) of ionizing radiations (IR). NSG mice were transplanted with 5.10^4 CD34$^+$ CB cells and 13 to 16 weeks post graft mice were irradiated or not with the indicated doses then immediately sacrificed. Bone marrow (BM) cells were recovered and characterized by flow cytometry (*Online Supplementary Figure S2A and B*). An equivalent of 5.10^4 CD34$^+$ CD19$^-$ BM cells were injected in secondary recipient mice. (A) Dot plots of representative engraftment levels (left: human hCD45$^+$ cells) in secondary recipient mice and human engraftment levels obtained in the BM of 9 secondary NSG mice (right: 2 independent experiments are pooled). Results of a third experiment is shown in *Online Supplementary Figure S2D* since engraftment levels of control mice were lower. (B) Proportion of engrafted human B cells and myeloid cells based respectively on CD19 and CD14/CD15 expression gated in human CD45$^+$ cells, in secondary recipient mice. (C) Human hematopoietic reconstitution of CD34$^+$ CD38^{low} Lin^{neg} BM cells purified by cell sorting from primary mice and transplanted in secondary recipient mice. Shown are human cell reconstitution in the BM of secondary recipient mice 13 weeks later. (D) Proportion of engrafted human B cells and myeloid cells gated within human CD45$^+$ cell compartment in secondary mice after human CD34$^+$ CD38^{low} Lin^{neg} BM cell transplants. Results are shown as mean±standard error of mean. *P<0.05; **P<0.01, ***P<0.001 (Mann-Whitney statistics).

able to perform such extended LTC-IC with the 2.5 Gy condition due to very low cell quantities in the cultures. Interestingly, there was a 2-fold decrease in the extended LTC-IC frequency of 20 mGy-irradiated HSPC compared to sham-irradiated HSPC (1/275 *vs.* 1/128) (*Online Supplementary Figure S1F*) showing a defect in long-term HSPC maintenance. This decrease in secondary LTC-IC frequency induced by 20 mGy LDIR was also found in bulk culture conditions with 20 mGy-irradiated HSPC generating fewer CFU-C than sham-irradiated cells after secondary LTC-IC cultures (*Online Supplementary Figure S1G*). Taken together, these results suggest that a single exposure to 20 mGy LDIR impairs the *in vitro* self-renewal potential of human CD34$^+$CD38^{low}CD45RA$^-$CD90$^+$ HSPC.

A 20 mGy dose of irradiation decreases human hematopoietic stem/progenitor cell hematopoietic reconstitution potential

We then studied the effect of 20 mGy LDIR on *in vivo* HSC functions. To do so, NSG mice were first engrafted with human CD34$^+$ cells. Sixteen weeks later, once human hematopoiesis was stabilized, engrafted mice were exposed to 0, 20 mGy and 2.5 Gy IR doses and sacrificed immediately after irradiation. Bone marrow (BM) cells were harvested and phenotype analysis was performed. The levels of human CD45$^+$ cells and the percentage of Lin^{neg}CD34$^+$ cells recovered from NSG BM were similar in the irradiated and non-irradiated groups (*Online Supplementary Figure S2A and B*). Furthermore, no increase of apoptosis of human cells engrafted in NSG mouse BM was observed in mice irradiated at 20 mGy compared to non-irradiated mice (*Online Supplementary Figure S2C*). To study the consequences of irradiation on human HSC functions (i.e. reconstitution and differentiation potential), BM cells containing 5.10^4 human CD45$^+$CD34$^+$CD19$^-$cells were transplanted in secondary NSG mice. Human hematopoietic development in the secondary recipient mice was analyzed 13-16 weeks later. Human engraftment levels in mice receiving 20 mGy and 2.5 Gy-irradiated BM cells were decreased compared to sham-irradiated BM cells (Figure 2A and *Online Supplementary Figure S2D*) showing that 20 mGy-irradiated BM cells are less efficient than non-irradiated BM cells to reconstitute human hematopoiesis in secondary recipient mice. However, in the 20 mGy condition, some human cells were still detected in the BM of secondary recipient mice. Among them, human B CD19$^+$ lymphocytes and CD14$^+$/CD15$^+$ myeloid cells were produced at the same proportion than in non-irradiated conditions, indicating that the few HSC that survived LDIR had maintained their differentiation capacities (Figure 2B). To exclude a non-cell autonomous effect of LDIR on HSPC mediated by irradiated hematopoietic or non-hematopoietic BM cells during the transplantation, we purified human CD34$^+$CD38^{low} cells from the BM of control and 20 mGy-irradiated mice before transplantation in secondary NSG mice. As in the previous experiment, human cell engraftment in secondary recipients showed a reduced hematopoietic reconstitution capacity when 20 mGy-irradiated CD34$^+$CD38^{low} cells were used (Figure 2C) and again no difference in the differentiation

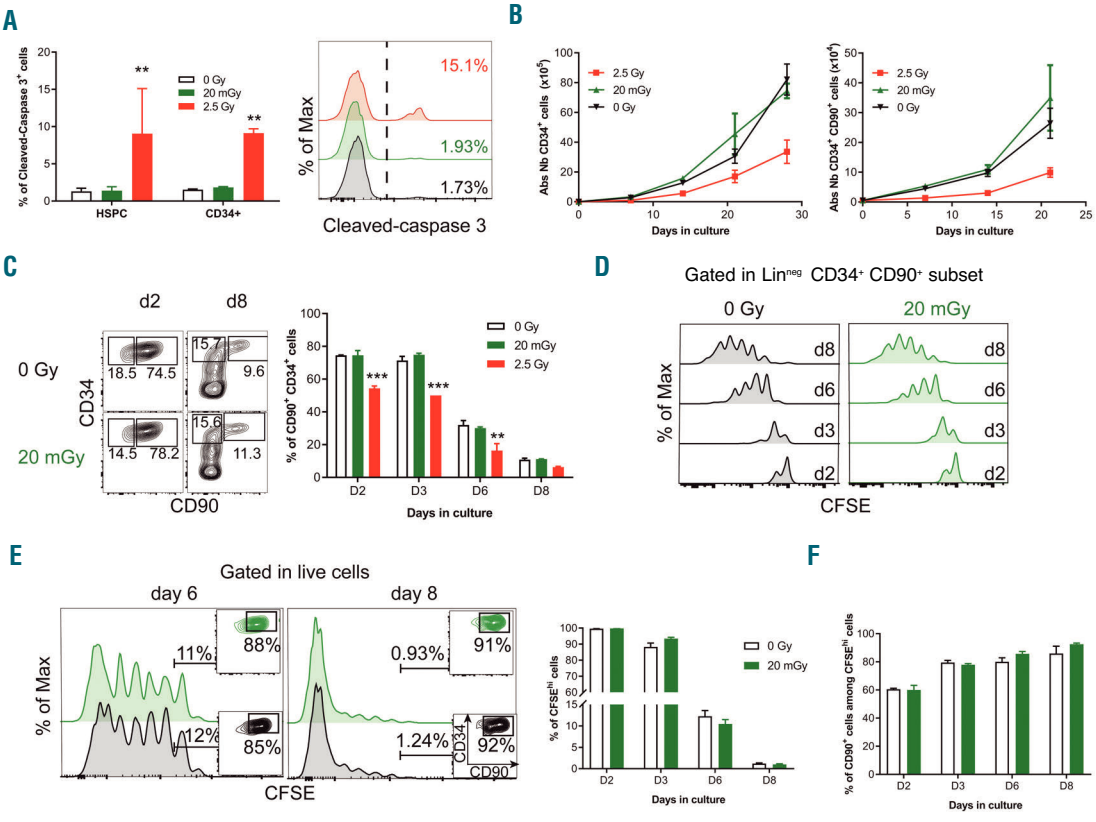


Figure 3. Low doses (LD) of ionizing radiations (IR) do not induce apoptosis and do not modify the cell cycle in human hematopoietic stem progenitor cells (HSPC). (A) CD34$^+$ cells were irradiated and cultured for 6 hours (h) at 37°C, then stained for cell surface markers and fixed. Cleaved-caspase 3 protein expression was analyzed by FACS. Percentage of cleaved-caspase 3$^+$ cells on CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC and on total CD34$^+$ (left panel) and overlay histograms of cleaved-caspase 3 expression on HSPC (right panel) are represented in function of IR doses. One representative experiment out of two is shown. (B) Sorted CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$CD90$^+$ HSPC were irradiated or not and co-cultured with MS5 stroma cell line for several days. At several time points, cells were numerated and stained for cell surface markers. The numbers of CD34$^+$ cells (left) and Lin^{neg}CD34$^+$CD90$^+$ cells (right) were monitored over time. One representative experiment out of two is shown. (C-F) Sorted CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC were first stained with carboxyfluorescein hydroxysuccinimidyl ester (CFSE), irradiated and cultured for several days. One representative experiment out of two is shown. (C) Differentiation of CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC in culture was followed by using expression levels of CD90 and CD34 surface markers. Dot plots (left panel) represent CD90 and CD34 expression after 2 and 8 days of culture for control and 20 mGy-irradiated HSPC. Histogram bars (right panel) represent the percentage of Lin^{neg}CD34$^+$CD90$^+$ cells at different days of culture after IR. (D) Levels of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) fluorescence in the Lin^{neg}CD34$^+$CD90$^+$ subset at different days of culture in control and 20 mGy conditions. No differences in cell division can be detected between both conditions. (E) Histogram representing CFSE staining in the HSPC-derived bulk cells at days 6 and 8 of culture in control and 20 mGy conditions (left panels). Histogram bars show CFSE labeling loss over culture time in the bulk population (right panel). (F) Percentage of Lin^{neg}CD34$^+$CD90$^+$ cells in CFSE^{hi} cells in control and in 20 mGy conditions. Results are shown as mean±standard error of mean. $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ (Mann and Whitney statistics). Abs Nb: absolute numbers.

of the engrafted HSC was shown (Figure 2D) showing a cell-autonomous effect of LDIR in HSPC. Taken together these results indicate that 20 mGy LDIR affects the hematopoietic reconstitution capacity of human HSPC.

Low doses of ionizing radiations do not induce apoptosis nor alter cell cycle of hematopoietic stem/progenitor cells

To characterize the mechanisms activated by 20 mGy LDIR in human primary HSPC, we first investigated if LDIR trigger apoptosis. Analysis of caspase 3 cleavage showed that 2.5 Gy irradiation increases CD34$^+$CD38^{low}CD45RA$^-$CD90$^+$ HSPC apoptosis (Figure 3A, red histograms), whereas 20 mGy LDIR had no significant effect on the percentage of cleaved caspase 3-expressing HSPC compared to sham-irradiated HSPC (Figure 3A, green histograms). As increased HSPC cell cycle can lead to self-renewal defects and HSC exhaustion,[28] we also determined if 20 mGy LDIR could alter HSPC proliferation. 20 mGy and sham-irradiated CD34$^+$CD38^{low}CD45RA$^-$CD90$^+$ HSPC generated the same number of CD34$^+$ and CD34$^+$CD90$^+$ cells *in vitro* (Figure 3B, left and right panel, respectively) whereas 2.5 Gy-irradiated HSPC did not proliferate efficiently. Moreover, the proportion of CD34$^+$CD90$^+$ cells evolved similarly during culture period after no irradiation or 20 mGy LDIR, strengthening the lack of effect of a 20 mGy irradiation on HSPC differentiation (Figure 3C). We studied the cell division rate of irradiated HSPC after staining with CFSE and during culture in serum free medium with cytokines. The number of cell divisions was the same for sham- or 20 mGy-irradiated HSPC (Figure 3D). After 6 and 8 days of culture, no difference in CFSE^{hi} cell (the most immature cells)[28] proportion was observed between 20 mGy and control HSPC (Figure 3E) and 90% of these CFSE^{hi} cells expressed the immature markers CD34 and CD90[29] regardless of the culture time and irradiation conditions considered (Figure 3F). These results show that 20 mGy LDRI does not impair either proliferation or differentiation of the most immature HSPC in cytokine-stimulating conditions.

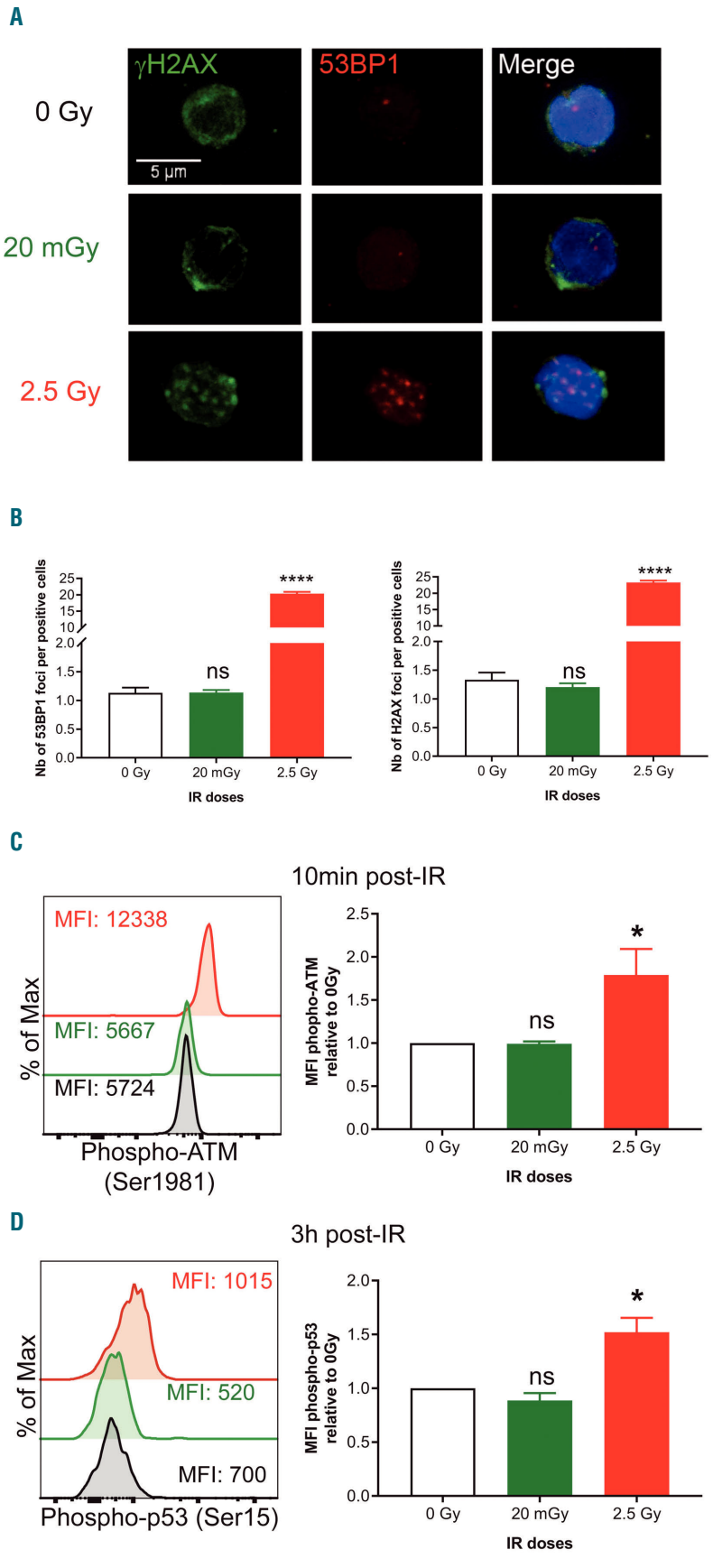


Figure 4. Low doses (LD) of ionizing radiations (IR) do not induce DNA double strand breaks nor activate ATM-dependent/p53-dependent DNA repair pathway in human hematopoietic stem progenitor cells (HSPC). CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC were purified by cell sorting and exposed to different doses of IR as indicated. (A) γH2AX and 53BP1 foci were examined by confocal microscopy 30 minutes (min) post IR (at least 100 cells by condition were analyzed. (B) Number (Nb) of 53BP1 (left panel) and γH2AX (right panel) foci by positive HSPC. (C and D) CD34$^+$ cells were irradiated, cultured 10 min (C) or 3 hours (h) (D) at 37°C, stained for cell surface markers then fixed. (C) Analysis of ATM-phosphorylation on Ser1981 by FACS in CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC (one representative experiment out of 4). (D) Analysis of p53-phosphorylation on Ser15 (left) and p53 protein expression (right) in CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC by FACS 3 h post IR (one representative experiment out of 5). Results are shown as mean±standard error of mean. *P<0.05, ****P<0.0001 (Mann and Whitney statistics).

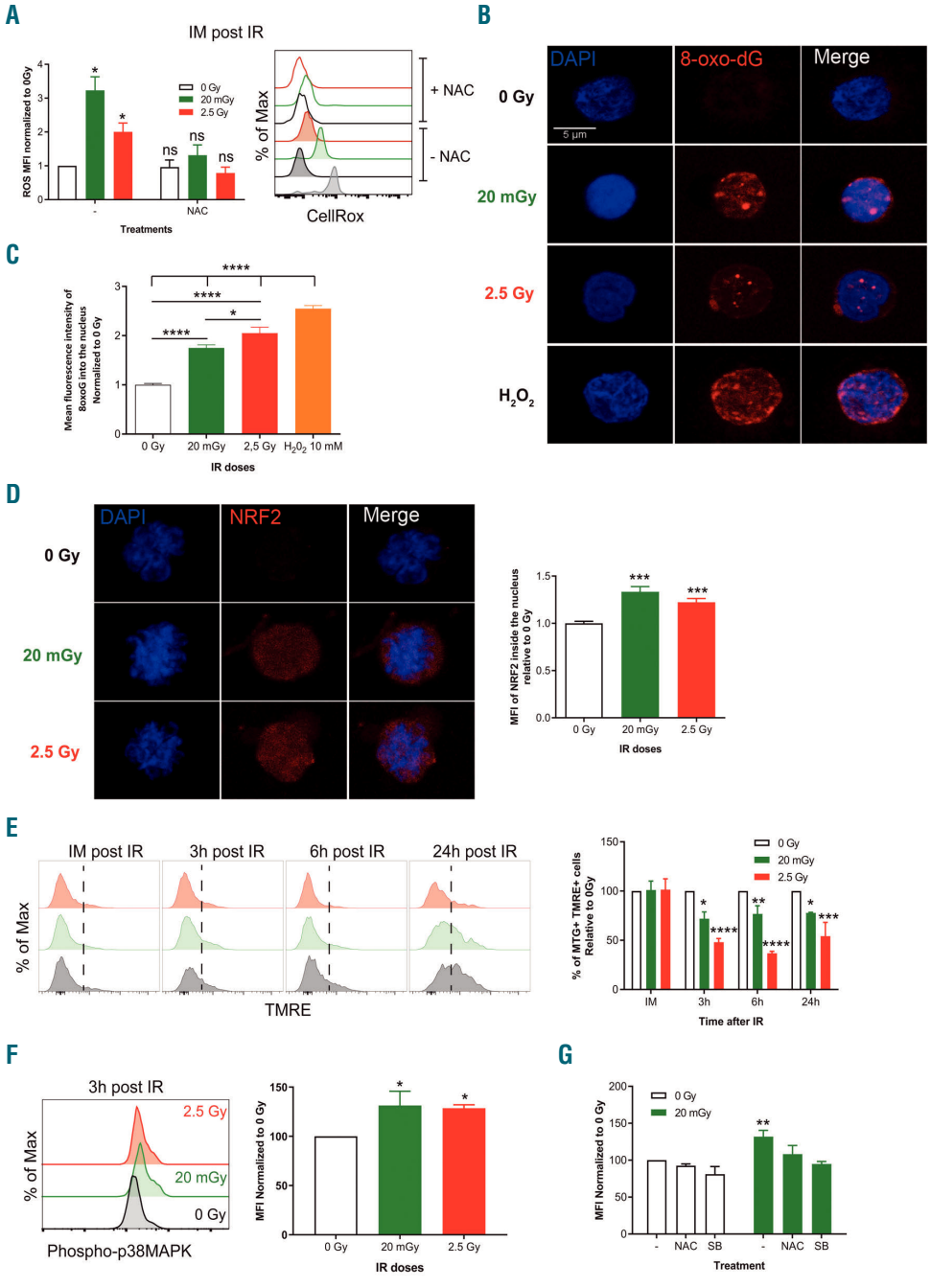


Figure 5. Low doses (LD) of ionizing radiations (IR) induce transitory reactive oxygen species (ROS) increase, 8-Oxo-dG DNA lesions and p38MAPK activation with altered mitochondrial activity in hematopoietic stem progenitor cells (HSPC). (A) ROS levels were quantified in CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC using CellRox Orange probe immediately after IR. (Left) Pool of CellRox Orange mean of fluorecence relative to 0 Gy condition, right overlay histograms showing CellRox Orange fluorescence. One representative experiment out of four is shown (see also *Online Supplementary Figure S4*). Results are shown as mean±standard error of mean. (B and C) CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC were purified by cell sorting and exposed to different doses of IR or H_2O_2 as indicated. Shown are 8-oxo-dG lesions quantified by confocal microscopy 30 minutes post IR (at least 50 cells were screened by condition in 3 independent experiments. Blue: Dapi, Red: 8-oxo-dG). Histograms represent the intensity of fluorescence of 8-oxo-dG staining within HSPC nucleus. To avoid heterogeneity, mean fluorescence intensity (MFI) has been normalized to the sham-irradiated condition. (D) CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC were purified by cell sorting and exposed to different doses of IR as indicated. Shown are NRF2 staining quantified by confocal microscopy 2 hours (h) post IR (at least 50 cells were screened by condition in 2 independent experiments. Blue: Dapi, Red: NFR2). Histograms represent the intensity of fluorescence of NRF2 staining within HSPC nucleus. To avoid heterogeneity, MFI has been normalized to the sham-irradiated condition. (E) Mitochondrial activity was monitored over time by using TMRE (membrane potential, left panel) and MTG (mitochondrial mass) probes in HSPC. Shown is the frequency of TMRE$^+$ cells over time in culture for one representative experiment out of three independent experiments and the mitochondria activation (% of MTG$^+$ TMRE$^+$, right panel) over time in culture (pool of the 3 independent experiments). (F) CD34$^+$ cells were irradiated and cultured 2 h at 37°C followed by cell surface marker staining and then fixed. Phosphorylation of p38MAPK on Thr180/Tyr182 was analyzed by flow cytometry. Overlay histograms of p38MAPK phosphorylation on CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC (left panel) are represented for the three irradiation conditions. Overlay histograms are from one representative experiment out of three. Histogram bars (right panel) show the MFI of phospho-p38MAPK in CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC (n=3 independent experiments). (G) CD34$^+$ cells were treated with NAC, SB203580 (SB) or untreated for 1 h at 37°C then irradiated and cultured 2 h at 37°C. Staining for cell surface markers was performed and then cells were fixed. Phosphorylation of p38MAPK on Thr180/Tyr182 was analyzed by flow cytometry. Histogram bars show mean of fluorescence of phospho-p38MAPK in CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC (n=3 independent experiments). Results are shown as mean±standard error of mean. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 (Mann-Whitney statistics).

Low doses of ionizing radiations do not induce DNA double strand breaks nor activate ATM or p53 signaling pathway

Since irradiation usually induces DNA double strand breaks (DSB), we quantified the number of H2AX and 53BP1 foci 30 min post irradiation (Figure 4A). In contrast to a 2.5 Gy irradiation, a 20 mGy irradiation did not increase the number of H2AX and 53BP1 foci compared to sham-irradiated CD34$^+$CD38^{low}CD45RA$^-$CD90$^+$ HSPC indicating that 20 mGy LDIR does not induce DNA DSB (Figure 4B). We then studied the DNA damage response (DDR) pathway after exposure to LDIR by quantification of ATM and p53 phosphorylation 10 min and 3 h after irradiation. As expected, 2.5 Gy-irradiated HSPC exhibited an increased ATM and p53 phosphorylation compared to control HSPC (Figure 4C and D). In contrast, no increase in ATM or p53 phosphorylation was detected after exposure to 20 mGy (Figure 4C and D). Importantly, the expression of p53 protein was not modified by IR (*Online Supplementary Figure S3*). Altogether these results indicate that 20 mGy LDIR does not induce DNA DSB nor activate p53 and ATM-dependent DNA damage repair pathway in human HSPC.

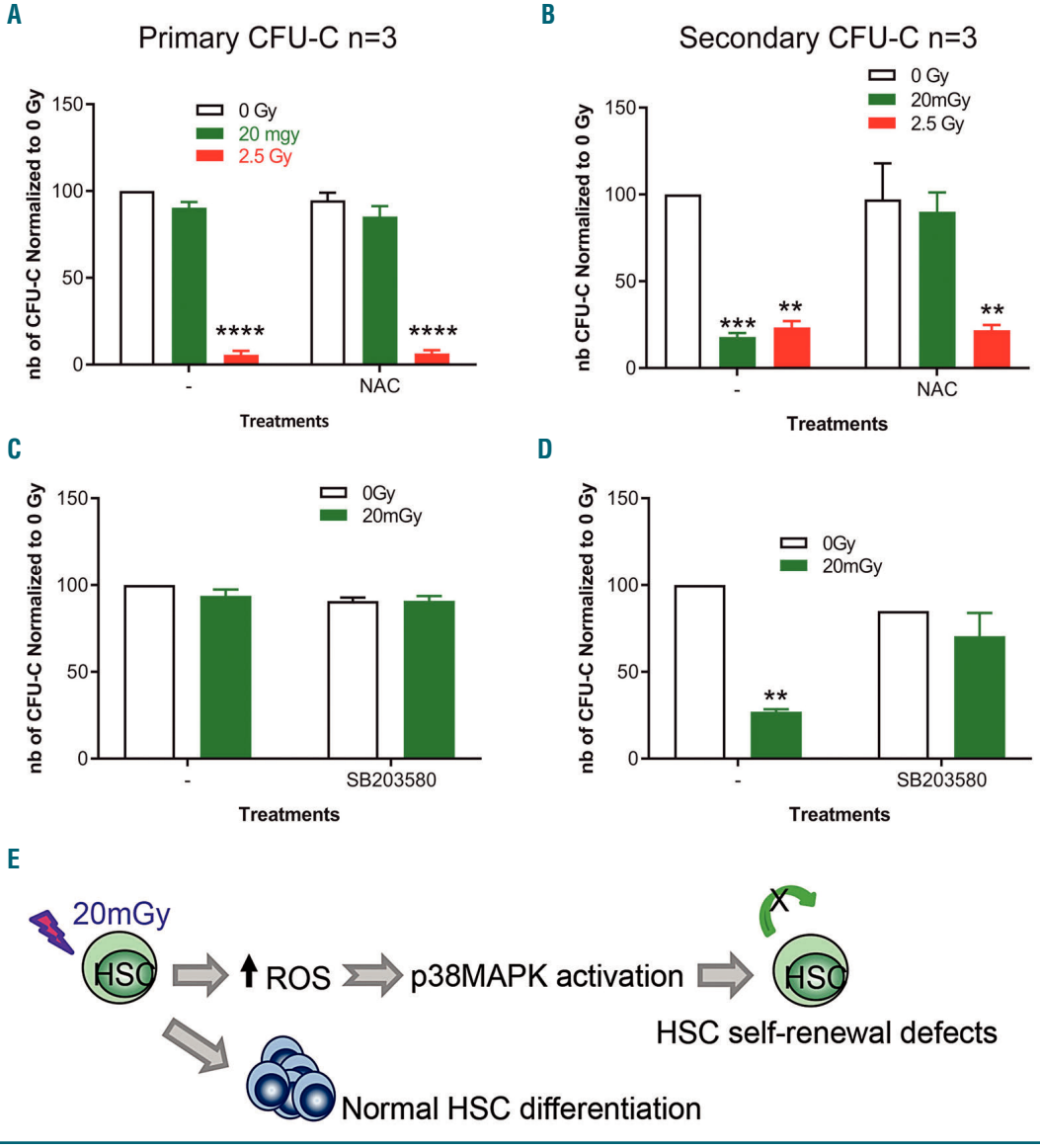


Figure 6. Low doses (LD) of ionizing radiations (IR) induce a transitory increase of ROS in CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$CD90$^+$ hematopoietic stem progenitor cells (HSPC) that alters their serial clonogenic potential. (A) Colony forming unit-cell (CFU-C) assay. Cumulative results from 3 independent experiments with CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$CD90$^+$ HSPC from 3 independent pools of cord blood (CB) samples. Sorted CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC were pre-treated or not with N-acetylcysteine (NAC) prior to IR and plated (500 cells/plate) in CFU-C conditions for 12-14 days. Shown are the number (nb) of CFU-C (primary CFU-C). Results are normalized to the sham-irradiated conditions. (B) Primary CFU-C were pooled and replated in CFU-C conditions for 12-14 days. Shown are the nb of secondary CFU-C, normalized to the sham-irradiated conditions (cumulative results from 3 independent experiments). (C) Sorted CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC were pre-treated or not with SB203580 prior to IR and plated (500 cells/plate) in CFU-C conditions for 12-14 days. Shown are the nb of CFU-C (primary CFU-C). Results are normalized to the sham-irradiated conditions. (D) Primary CFU-C were pooled and replated in CFU-C conditions for 12-14 days. Shown are the nb of secondary CFU-C, normalized to the sham-irradiated conditions (cumulative results from 2 experiments with CD34$^+$ CD38^{low} CD45RA$^-$ CD90$^+$ HSPC from two independent pools of CB samples. (E) Model explaining how LDIR can impair HSC self-renewal through ROS-p38MAPK dependent pathway. Results are shown as mean+standard error of mean. $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$ (Mann- Whitney statistics).

Low doses of ionizing radiations increase reactive oxygen species levels, 8-oxo-dG lesions, induce NRF2 translocation into the nucleus, activate p38MAPK pathway and delay mitochondrial activation

Since irradiation is known to promote ROS production,[10,18,30] we next quantified ROS levels after LDIR exposure. ROS levels in $CD34^+CD38^{low}CD45RA^-CD90^+$ HSPC after exposure to LDIR were measured immediately or 3 h after irradiation of $CD34^+$ cells. Menadione and NAC treatments were used to respectively induce and inhibit ROS production. Increased ROS levels in HSPC were observed immediately after exposure to 20 mGy LDIR and to a lesser extent after exposure to 2.5 Gy, as compared to no irradiation (Figure 5A and *Online Supplementary Figure S4A and B*). These ROS increased levels were transient as no further difference in ROS levels could be detected 3 h after irradiation (*Online Supplementary Figure S4C*). NAC pretreatment of HSPC significantly decreased this early burst of ROS after 20 mGy and 2.5 Gy exposure. As increased ROS levels can lead to 8-oxo-dG lesions, as well as NRF2 translocation into the nucleus, we looked for 8-oxo-dG lesions in DNA of irradiated *versus* sham-irradiated HSPC[30,31] and NRF2 location into HSPC.[22,24] As expected sham-irradiated and H_2O_2-treated (control) cells exhibited respectively no and highly detectable anti-8-oxo-dG nuclear labeling. After exposure to 20 mGy, 8-oxo-dG staining was detected in the HSPC nucleus showing that 20 mGy LDIR can induce 8-oxo-dG lesions in DNA (Figure 5B and C). Similarly, the NRF2 protein was found in the nucleus of 20 mGy- and 2.5 Gy-irradiated HSPC compared to sham-irradiated cells (Figure 5D). As an increase in ROS is also associated with a delay in mitochondrial activation,[32] we used mitotracker green (MTG) and TMRE probes to study respectively mitochondrial mass and membrane potential. Of note, CB $CD34^+$ cells and CB HSPC are mainly quiescent, therefore there is very little mitochondrial activation ($TMRE^{neg}$) (Figure 5E, first left panel, and *data not shown*). HSPC exposure to LDIR did not alter the mitochondrial mass (MTG) of $CD34^+$ cells in short-term culture (*Online Supplementary Figure S5A*). However, a delay in mitochondrial activation occurred (MTG^+ $TMRE^+$ HSPC) as soon as 3 h post IR (Figure 5E and *Online Supplementary Figure S5B*), suggesting that LDIR affect mitochondrial activity. In line with mitochondria activation, autophagy activation was monitored after IR (*Online Supplementary Figure S6*). The CytoID probe was used to follow autophagy in HSPC.[33,34] As expected, after treatment with chloroquine and rapamycine, autophagy was detected in $CD34^+$ cells (*Online Supplementary Figure S6A*). Besides, LDIR did not induce autophagy in HSPC after a different culture time (*Online Supplementary Figure S6B and C*). Finally, we investigated whether the observed increase of ROS can lead to p38MAPK activation as previously documented.[19] Thr180/Tyr18 phosphorylation was used as a marker of p38MAPK activation. As a positive control of p38MAPK activation, increased p38MAPK phosphorylation (P-p38MAPK) can be detected in PMA-treated HSPC (*Online Supplementary Figure S5C*). In irradiated HSPC, we observed an increase of P-p38MAPK after exposure to 20 mGy and 2.5 Gy IR compared to sham-irradiated controls, suggesting that LDIR can activate p38MAPK pathway in HSPC similarly to high irradiation doses (2.5 Gy)[35] (Figure 5F). To further confirm that p38MAPK activation was due to the early transient increase in ROS levels, HSPC were treated with NAC or SB203580, a p38MAPK inhibitor, prior to 20 mGy irradiation. As expected, SB203580 prevented increased p38MAPK phosphorylation in 20 mGy-irradiated HSPC (Figure 5G). NAC treatment resulted in the same decrease in p38MAPK phosphorylation in 20 mGy-irradiated HSPC (Figure 5G). Altogether, these results show that LDIR increase ROS levels leading to DNA 8-oxo-dG lesions, NRF2 translocation into the nucleus and p38MAPK activation in 20 mGy-irradiated HSPC.

20 mGy-dependent reactive oxygen species increase and p38MAPK activation lead to defects in the serial clonogenic potential of hematopoietic stem/progenitor cells

As increased ROS levels can lead to HSC loss of potentials,[18] we then asked if ROS-dependent pathways could explain the HSPC functional defects after LDIR exposure. To this end, serial CFU-C assays were performed using sorted $CD34^+CD38^{low}CD45RA^-CD90^+$ HSPC pre-treated or not with NAC before exposure to LDIR and cultures. 20 mGy-irradiated HSPC generated the same number of primary CFU-C compared to sham-irradiated HSPC with or without NAC treatment (Figure 6A and *Online Supplementary Figure S7A*). However, 20 mGy-irradiated HSPC treated with NAC before IR, but not 2.5 Gy-irradiated cells, were capable of generating equivalent numbers of secondary CFU-C compared to sham-irradiated HSPC, showing that NAC treatment prior to exposure to 20 mGy protected HSPC from the loss of *in vitro* serial clonogenic potential (Figure 6B and *Online Supplementary Figure S7B*). This result was obtained when the serial plating assays were performed with the whole cell population harvested from primary CFU cultures (Figure 6B), and also after picking up and replating individual primary CFU-GM colonies (*Online Supplementary Figure S7C*). Rescue of secondary replating properties of HSPC after 20 mGy LDIR was also obtained using HSPC pretreatment with Catalase, another antioxidant enzyme (*Online Supplementary Figure S7D*). These results show that preventing ROS production with antioxidants before LDIR exposure rescues the *in vitro* serial clonogenic potentials of HSPC.

Finally, we wondered whether ROS-mediated p38MAPK activation was involved in LDIR-induced HSC self-renewal defects. HSPC were pre-treated with SB203580, a specific inhibitor of p38MAPK, prior to 20 mGy irradiation and serial CFU-C assays. No difference in the number of primary CFU-C was detected with SB203580 pretreated HSPC regardless of the irradiation dose used (Figure 6C and *Online Supplementary Figure S7E*). However, whereas SB203580-untreated 20 mGy-irradiated HSPC generated very few secondary CFU-C, SB203580 treatment of HSPC protected their capacity to generate secondary CFU-C as efficiently as sham-irradiated HSPC (Figure 6D and *Online Supplementary Figure S7F*), suggesting that p38MAPK pathway activation participates in LDIR-mediated HSPC defects. Based on all these results, we propose a model in which 20 mGy LDIR rapidly increases ROS amounts in HSPC that induce p38MAPK activation altogether leading to a defect in the long-term maintenance of the clonogenic potential of $CD34^+CD38^{low}CD45RA^-CD90^+$ HSPC (Figure 6E).

Discussion

Here we show that exposure to a single 20 mGy LDIR alters the functional properties of human HSPC. No defect in HSPC differentiation potential tested in primary cultures was detected after exposure to LDIR. However, HSPC irradiated at 20 mGy *in vivo* in the NSG mouse BM harbored a defect in human hematopoietic reconstitution potential. This defect was cell-intrinsic since 20 mGy-irradiated $CD34^{+}CD38^{low}$ cells isolated after *in vivo* irradiation failed to serially reconstitute NSG mice as efficiently as non-irradiated cells; the same was observed with *in vivo* 20 mGy-irradiated bulk BM cells. This *in vivo* phenotype was also observed *in vitro* when using LDIR-exposed $CD34^{+}CD38^{-/low}CD45RA^{-}CD90^{+}$ HSPC in serial CFU-C and LTC-IC assays, supporting the fact that these effects are cell-autonomous and not limited to transplantation conditions. Likewise, *in vitro*, HSPC exposure to 20 mGy induced a loss of secondary CFU-C potential as well as a decrease in secondary LTC-IC frequency. Altogether, based on the use of *in vivo* assays and *in vitro* surrogate assays to evaluate the self-renewal potential,[25-27] these functional results strongly argue for an effect of 20 mGy LDIR on the long-term HSC functional properties, most likely through a loss of self-renewal potential. Of note, 20 mGy LDIR has been shown to decrease self-renewal capacity in murine HSC as well.[22]

High-dose ionizing radiations (HDIR) (2.5 Gy) are known to induce DNA DSB in human HSPC, rejoining is delayed, and H2AX foci persist leading to a loss of HSC functions partly related to apoptosis and activation of p53 pathway.[23] Despite the publication of several studies over the past few years,[36-38] little is known about which pathway is used to repair DNA DSB in human HSPC.[16] In the present work, we tested if a single 20 mGy LDIR can alter cell cycle and induce apoptosis, and cause DNA DSB in HSPC. Surprisingly, and in contrast to HDIR, 20 mGy irradiation did not induce obvious cell cycle defects nor promote apoptosis in HSPC, since no increased cleaved caspase 3 protein was detected after exposure to 20 mGy LDIR. Moreover, no significant increase in H2AX and 53BP1 foci numbers was revealed, suggesting that 20 mGy LDIR does not produce DNA DSB. Finally, neither p53 nor ATM pathway was activated after 20 mGy exposure. However, and similarly to HDIR, 20 mGy irradiation led to 8-oxo-dG lesions in HSPC DNA. No such lesion was observed in sham-irradiated cells. Altogether, 20 mGy LDIR does not induce classic DNA damage and repair pathways usually activated by γ-irradiation but rather triggers 8-oxo-dG-dependent DNA damage that can be linked to uncontrolled increase in ROS levels. Moreover, NRF2 protein was found in the nucleus of 20 mGy-irradiated HSPC. Indeed, increased ROS levels were detected immediately after HSPC exposure to 20 mGy and, in line with this, we could observe that 20 mGy-irradiated HSPC had a delay in mitochondrial activation compared to control cells. Our results and those from Romeo's lab[22] suggest that the transient increase in ROS levels is likely to be responsible for HSPC defects after LDIR exposure. We tested this hypothesis using antioxidant treatment of HSPC prior to exposure to LDIR. Importantly, pre-treatment of HSPC with NAC or Catalase prior to LDIR exposure did rescue the loss of *in vitro* serial clonogenic potential of HSPC. In mouse, irradiation can induce p38MAPK activation through increased levels of ROS.[19,35] Prevention of p38MAPK activation leads to decreased IR toxicity in HSC.[35] It is also known that dormant HSC have little or no p38MAPK activation, and that p38MAPK activation in HSC is associated with differentiation and loss of HSC self-renewal.[17,39] In humans, the function of the p38MAPK pathway is still not fully understand but preventing p38MPAK activation allows HSC maintenance/expansion *in vitro*.[40,41] Interestingly, in our model, we observed a ROS-dependent p38MAPK activation in human HSPC after exposure to both 2.5 Gy and 20 mGy IR. The involvement of the p38MAPK pathway in the LDIR-mediated HSC self-renewal defects was then confirmed in serial replating CFU-C assays. Indeed, pre-treatment of HSPC with a specific inhibitor of p38MAPK prior to LDIR rescued their serial replating capacities. This is in agreement with the fact that HSC treatments either with NAC or p38MAPK inhibitor increase LTC-IC frequency and promote higher hematopoietic reconstitution upon serial transplantation.[18,19] It is important to highlight that two other studies on the effect of LDIR have also shown that LDIR did not induce classic DNA damage and repair pathways, but rather an oxidative stress (increase in ROS level and NRF2 nuclear localization).[22,42] Therefore, oxidative stress induction seems to be a feature of exposure to LDIR, leading either to a differentiation defect in the case of cycling stem cells[42] or a self-renewal defect in the case of quiescent stem cells, as we observed for human HSPC; this is also the case for mouse HSC.[22]

Increased ROS levels as well as p38MAPK activation in HSC are associated with aging and stress during serial transplantation.[17,18,43] The aging phenomenon is clearly a strong driver of differentiation and expansion of myeloid-biased HSPC.[44] Here we were not able to detect any bias toward myelopoiesis when analyzing the progeny of the surviving LDIR-treated human HSC after serial transplantation, maybe due to the NSG mouse model, as the NSG BM microenvironment is more supportive of B-cell rather than myeloid-cell differentiation.[45] Moreover, all experiments were performed with HSPC from CB, i.e. young HSPC. Thus, although it is tempting to speculate that exposure to LDIR may induce early/accelerated aging of the human HSC, we have no formal proof of that. Since radiation sensitivity and transplantation efficiency are highly dependent on the ontogenic origin of HSPC,[46-48] aged HSPC may be more sensitive to LDIR. Another feature of HSC aging is higher risk of leukemic transformation, especially in the presence of an oncogenic-initiating event such as a mutation of the epigenetic modifiers *DNMT3a* or *TET2*, as observed in blood from elderly people.[49] A very interesting and important question for the future would be to determine if aged HSC exposed to LDIR are more prone to (pre)leukemic transformation, especially when HSC contain primary oncogenic mutations.

To sum up, in contrast to HDIR, 20 mGy does not induce DNA DSB, nor apoptosis and a defect in the cell cycle. However, both 20 mGy and 2.5 Gy IR induce 8-oxo-dG lesions in DNA, increase ROS levels, and activate the p38MAPK pathway leading to HSC self-renewal defects. Nevertheless, only 20 mGy-LDIR effects were counteracted by use of antioxidants prior to irradiation exposure, indicating there are major differences between these two IR doses. These results show for the first time that a dose as low as 20 mGy can have a huge impact on human HSC through both similar and also different molecular mechanisms to those of high IR doses.

Acknowledgments

We acknowledge the midwives from Clinique des Noriets in Vitry-sur-Seine and the Cell therapy department of Hôpital Saint Louis in Paris, France, especially Prof. J. Larghero, for providing cord blood samples free of charge and the families who agreed to donate the samples for research purposes. This work was made possible thanks to multiple platforms (Flow cytometry, Microscopy, Irradiation and animal facilities) of IRCM, Fontenay-aux-Roses, France. We are thus grateful to J Tilliet and N Dechamps for their great technical help during this project. A special thanks to J Bernardino and JB Lahaye for their devoted work at the irradiation platform from IRCM but also to C. Villagrasa, Y. Ristic and M. Razanajotovo-Derichebourg for their precious help at the irradiation platform, laboratory of dosimetry of ionizing radiation, IRSN, Fontenay-aux-Roses, France. Finally, we acknowledge Paul-Henri Roméo, Franck Yates, Christophe Carles, Benjamin Uzan and Rima Haddad for helpful discussions and manuscript reviewing.

Funding

This study was supported by grants from INSERM, CEA (Segment Radiobiologie), Ligue Nationale contre le Cancer (équipe labellisée from 2014 to 2017), Région Ile de France/Cancéropole, Electricité de France and the European network RISK-IR. I-SS was supported by the European network RISK-IR and EH is a PhD fellow from the Ligue Nationale Contre le Cancer.

References

1. Mendelson A, Frenette PS. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. Nat Med. 2014; 20(8):833-846.
2. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. Cell Stem Cell. 2012;10(2):120-136.
3. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. Cell Stem Cell. 2007;1(6):635-645.
4. Arcangeli ML, Frontera V, Bardin F, et al. JAM-B regulates maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. Blood. 2011;118(17):4609-4619.
5. Yu VW, Scadden DT. Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche. Curr Top Dev Biol. 2016;118:21-44.
6. Benyoucef A, Calvo J, Renou L, et al. The SCL/TAL1 Transcription Factor Represses the Stress Protein DDiT4/REDD1 in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. Stem Cells. 2015;33(7):2268-2279.
7. Brunet de la Grange P, Armstrong F, Duval V, et al. Low SCL/TAL1 expression reveals its major role in adult hematopoietic myeloid progenitors and stem cells. Blood. 2006; z108(9):2998-3004.
8. Correia NC, Arcangeli ML, Pflumio F, Barata JT. Stem Cell Leukemia: how a TALented actor can go awry on the hematopoietic stage. Leukemia. 2016; 30(10):1968-1978.
9. Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. Nat Rev Genet. 2000;1(1):57-64.
10. Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature. 2004;431(7011):997-1002.
11. Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, et al. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. Nature. 2007; 447(7145):686-690.
12. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. Nature. 2007;447(7145):725-729.
13. Cheng T, Rodrigues N, Dombkowski D, Stier S, Scadden DT. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). Nat Med. 2000;6(11):1235-1240.
14. Matsumoto A, Takeishi S, Kanie T, et al. p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell. 2011;9(3):262-271.
15. Zou P, Yoshihara H, Hosokawa K, et al. p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. Cell Stem Cell. 2011;9(3):247-261.
16. Biechonski S, Milyavsky M. Differences between human and rodent DNA-damage response in hematopoietic stem cells: at the crossroads of self-renewal, aging and leukemogenesis. Transl Cancer Res. 2013; 2(5):372-383.
17. Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. Blood. 2007;110(8):3056-3063.
18. Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, et al. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. Blood. 2011; 118(11):2941-2950.
19. Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. Nat Med. 2006;12(4):446-451.
20. Pearce MS. Patterns in paediatric CT use: an international and epidemiological perspective. J Med Imaging Radiat Oncol. 2011;55(2):107-109.
21. Pearce MS, Salotti JA, Little MP, et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. Lancet. 2012;380(9840):499-505.
22. Rodrigues-Moreira S, Moreno SG, Ghinatti G, et al. Low-dose irradiation promotes persistent oxidative stress and decreases self-renewal in hematopoietic stem cells. Cell Rep. 2017;20(13):3199-3211.
23. Milyavsky M, Gan OI, Trottier M, et al. A distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal. Cell Stem Cell. 2010;7(2):186-197.
24. Picou F, Debeissat C, Bourgeais J, et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids induce acute myeloid leukemia cell death associated with mitochondrial glycolytic switch and Nrf2 pathway activation. Pharmacol Res. 2018;136:45-55.
25. Hao QL, Thiemann FT, Petersen D, Smogorzewska EM, Crooks GM. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. Blood. 1996;88(9):3306-3313.
26. 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(4):1470-1474.
27. Rizo A, Dontje B, Vellenga E, de Haan G, Schuringa JJ. Long-term maintenance of human hematopoietic stem/progenitor cells by expression of BMI1. Blood. 2008;111(5):2621-2630.
28. Nakamura-Ishizu A, Takizawa H, Suda T. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. Development. 2014;141(24):4656-4666.
29. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. Science. 2011;333(6039):218-221.
30. Walter D, Lier A, Geiselhart A, et al. Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. Nature. 2015;520(7548):549-552.
31. Haghdoost S, Czene S, Naslund I, Skog S, Harms-Ringdahl M. Extracellular 8-oxo-dG as a sensitive parameter for oxidative stress in vivo and in vitro. Free Radic Res. 2005;39(2):153-162.
32. Cabon L, Bertaux A, Brunelle-Navas MN, et al. AIF loss deregulates hematopoiesis and reveals different adaptive metabolic responses in bone marrow cells and thymocytes. Cell Death Differ. 2018;25(5):983-1001.
33. Chabi S, Uzan B, Naguibneva I, et al. Hypoxia regulates lymphoid development of human hematopoietic progenitors. Cell Rep. 2019;29(8):2307-2320.e6.
34. Gomez-Puerto MC, Folkerts H, Wierenga AT, et al. Autophagy Proteins ATG5 and ATG7 Are Essential for the Maintenance of Human CD34(+) Hematopoietic Stem-Progenitor Cells. Stem Cells. 2016; 34(6):1651-1663.
35. Wang Y, Liu L, Zhou D. Inhibition of p38 MAPK attenuates ionizing radiation-induced hematopoietic cell senescence and residual bone marrow injury. Radiat Res. 2011;176(6):743-752.
36. de Laval B, Pawlikowska P, Petit-Cocault L, et al. Thrombopoietin-increased DNA-PK-dependent DNA repair limits hematopoietic stem and progenitor cell mutagenesis in response to DNA damage. Cell Stem Cell. 2013;12(1):37-48.
37. Kraft D, Rall M, Volcic M, et al. NF-kappaB-dependent DNA damage-signaling differ-

entially regulates DNA double-strand break repair mechanisms in immature and mature human hematopoietic cells. Leukemia. 2015;29(7):1543-1554.
38. Shao L, Feng W, Lee KJ, Chen BP, Zhou D. A sensitive and quantitative polymerase chain reaction-based cell free in vitro non-homologous end joining assay for hematopoietic stem cells. PLoS One. 2012;7(3):e33499.
39. Tesio M, Tang Y, Mudder K, et al. Hematopoietic stem cell quiescence and function are controlled by the CYLD-TRAF2-p38MAPK pathway. J Exp Med. 2015;212(4):525-538.
40. Baudet A, Karlsson C, Safaee Talkhoncheh M, Galeev R, Magnusson M, Larsson J. RNAi screen identifies MAPK14 as a druggable suppressor of human hematopoietic stem cell expansion. Blood. 2012;119(26):6255-6258.
41. Zou J, Zou P, Wang J, et al. Inhibition of p38 MAPK activity promotes ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells. Ann Hematol. 2012;91(6):813-823.
42. Fernandez-Antoran D, Piedrafita G, Murai K, et al. Outcompeting p53-Mutant Cells in the Normal Esophagus by Redox Manipulation. Cell Stem Cell. 2019;25(3):329-341.e6.
43. Rube CE, Fricke A, Widmann TA, et al. Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging. PLoS One. 2011;6(3):e17487.
44. Akunuru S, Geiger H. Aging, Clonality, and Rejuvenation of Hematopoietic Stem Cells. Trends Mol Med. 2016;22(8):701-712.
45. Ito R, Takahashi T, Katano I, Ito M. Current advances in humanized mouse models. Cell Mol Immunol. 2012;9(3):208-214.
46. Hernandez L, Terradas M, Camps J, Martin M, Tusell L, Genesca A. Aging and radiation: bad companions. Aging Cell. 2015;14(2):153-161.
47. Holyoake TL, Nicolini FE, Eaves CJ. Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow. Exp Hematol. 1999;27(9):1418-1427.
48. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. Blood. 2001;98(7):2043-2051.
49. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. Nat Med. 2014;20(12):1472-1478.

Human hematopoietic stem/progenitor cells display reactive oxygen species-dependent long-term hematopoietic defects after exposure to low doses of ionizing radiations

Elia Henry,[*1,2,3,4] Inès Souissi-Sahraoui,[*1,2,3,4] Margaux Deynoux,[1,2,3,4] Andréas Lefèvre,[1,2,3,4] Vilma Barroca,[1,2,3,4] Anna Campalans,[3,4,5] Véronique Ménard,[3,4,6] Julien Calvo,[1,2,3,4] Françoise Pflumio,[#1,2,3,4] and Marie-Laure Arcangeli[#1,2,3,4]

[1]INSERM, U1274, Laboratory "Niche, Cancer and Hematopoiesis"; [2]CEA, DRF-JACOB-IRCM-SCSR-LSHL, UMR "Genetic stability, Stem Cells and Radiation"; [3]UMR "Genetic stability, Stem Cells and Radiation" Université de Paris; [4]UMR "Genetic stability, Stem Cells and Radiation", Université Paris-Saclay; [5]CEA, DRF-JACOB-IRCM-SIGRR-LRIG, UMR "Genetic stability, Stem Cells and Radiation" and [6]UMR "Genetic stability, Stem Cells and Radiation", F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

**EH and IS-S contributed equally as co-first authors.*

#FP and M-LA contributed equally as co-senior authors.

©2020 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper. doi:10.3324/haematol.2019.226936

Received: May 14, 2019.

Accepted: November 27, 2019.

Pre-published: November 28, 2019.

Correspondence: *MARIE-LAURE ARCANGELI* - marie-laure.arcangeli@inserm.fr

Supplemental Methods

Primary cells

Cord Blood (CB) samples were collected from healthy infants with the informed written consent of the mothers based on the declaration of Helsinki. Samples were obtained in collaboration with the Clinique des Noriets, Vitry-sur-Seine and with the Cell Therapy Department in Hôpital Saint Louis, Paris, France. Samplings and experiments were acknowledged by the Institutional Review Board of INSERM (Opinion number 13-105-1, IRB00003888). $CD34^+$ cells were purified by immuno-magnetic selection using a CD34 MicroBeads kit (Miltenyi Biotec, Paris, France). For each experiment, we used a pool of $CD34^+$ cells from different healthy infants to diminish individual variability.

Flow cytometry

Femurs, tibias and hips were collected and BM cells were flushed in DMEM medium containing 10% FCS. Cells were labeled with specific anti-human antibodies in PBS buffer containing 2 mM EDTA and 0.5% BSA. In experiments in which the viability marker ZombiAqua (Biolegend) was used, cells were stained in PBS buffer only. Flow cytometry analyses were performed using BD-FACS-Canto (laser 488, 405 and 633, BD Bioscience), BD-LSR2 SORP (laser 405, 488, 561, and 633; BD Bioscience) and FACS-ARIA 2 (BD-Bioscience) cytometers. Results were analyzed using FlowJo Version 10.2 software (TreeStar).

Drug treatments

$CD34^+$ cells or HSPC were treated with NAC (50 μM, Sigma), Catalase (5 mg/mL, Sigma), SB203580 (p38MAPK inhibitor, 10 μM, Cell Signaling Technology) or Cysclosporine A (50 μg/mL, Sigma) for 1 hour at 37°C. Menadione (100 μM, Sigma) was used as a positive control of ROS production.

Transplantation assays

For primary transplantation, a pool of several samples of CB $CD34^+$ cells (10^5cells/mouse) were injected in NSG mice. Mice were sacrificed after 13 to 16 weeks post-transplantation. BM cells were recovered after flushing femurs, tibias and hips. Red cells were lysed using ACK lysing buffer (Gibco, LifeTechnologies). Engrafted human $CD45^+$ hematopoietic cells were measured

using specific anti-human CD45 antibodies. $CD45^+CD19^+$ B cells and $CD45^+CD14^+/CD15^+$ myeloid cells were quantified as previously done (Benyoucef et al., 2015). Serial transplantation assays were performed after phenotyping of BM cells from primary mice. Total BM cells were transplanted in new recipients with an equivalent of 5.10^4 $CD45^+$ $CD34^+$ $CD19^-$ human cells per mouse. In some experiments, human $CD34^+$ cells were isolated from mouse BM using CD34 microbeads (Miltenyi Biotech) and $CD34^+$ $CD38^{low}$ cells were purified by cell sorting then transplanted in secondary NSG mice (1.6 10^4 cells/mouse). Mice were sacrificed after 13 weeks post-transplantation.

Immunofluorescence

For DNA damage experiments, cell-sorted HSPC were irradiated and incubated 30 min, 1 hour or 3 hours at 37°C in MyeloCult medium(H5100, Stem Cell Technologies), fixed in paraformaldehyde 4% for 15 min at room temperature (RT) then washed in PBS. 2000 HSPC were coated on Poly-Prep slides (P0425-72EA, Sigma) overnight at 37°C then permeabilized with Triton™ X-100 (0.1%, 9002-93, Sigma) 10 min at RT. Cells were first incubated 1 hour with a saturation buffer containing 7.5% of goat serum and 7.5% of fetal bovine serum in PBS, then stained with anti-γH2AX (05-636, Merck Millipore) and anti-53BP1 (NB100_304, Novus Biologicals) overnight at 4°C, washed 3 times and finally stained with secondary antibodies, goat-anti-mouse-AF488 (A-11001) and goat-anti-rabbit AF-594 (A-11012, both from LifeTechnologies).

For assessment of 8-hydroxy-2'-deoxyguanisine (8-oxo-dG) lesions in DNA, sorted cells were irradiated at indicated doses or treated with H_2O_2 100 mM and cultured for 30 min in Myelocult H5100 (StemCell Technologies), then fixed in 1:1 methanol/acetone (-20°C) 5 min on ice. 10000 HSPC were coated on Poly-Prep slides (P0425-72EA, Sigma) at 4°C for at least 6 hours in PBS with calcium and magnesium ions. They were treated with HCl 2N (30 min), washed 3 times then neutralized with Tris-HCl pH 8,8 (5min). Cells were permeabilized using PBS + BSA 4 % + Triton 0,2% (15 min). Cells were first incubated 45 min with the saturation buffer (PBS + BSA 4% + Tween 0,2%) for 45 min, then stained with an anti-8-oxo-dG antibody (ab48508, AbCam) overnight at 4°C in the same buffer, washed 3 times and finally stained with goat-anti-mouse-AF647 (A-21235, LifeTechnologies) in PBS + Tween 0,2% for at least 1 hour.

For NRF2 translocation experiments, sorted cells were irradiated at indicated doses and

cultured for 2 hours in Myelocult (H5100, StemCell Technologies), then fixed in paraformaldehyde 4% 15 min at room temperature. 10000 HSPC were coated on Poly-Prep slides (P0425-72EA, Sigma) at 4°C for at least 6 hours in PBS with calcium and magnesium. Cells were permeabilized using PBS + BSA 4 % + Triton 0,2% (15 min). Cells were first incubated with the saturation buffer (PBS + BSA 4% + Tween 0,2%) for 45 min, then stained with an anti-NRF2 antibody (ab31163, AbCam) overnight at 4°C in the same buffer, washed 3 times and finally stained with goat-anti-rabbit-AF647 (A-21244, LifeTechnologies) in PBS + Tween 0,2% for at least 1 hour.

After 3 wash, staining with DAPI 1/2000 in PBS + Tween 0,2% was performed (5 min). Sealing of the slides was done using Fluoromount-G (Southern Biotech). Reading was done on the Leica TCS SP8 confocal microscope. Images were analyzed using ImageJ and CellProfiler softwares.

CFU-C assays

HSPC sorted from a pool of several samples of CB $CD34^+$, were seeded in complete methylcellulose medium (triplicates, 300 cells/mL, H4230, StemCell Technologies), supplemented with 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, IL-3 (8 ng/mL), erythropoietin (2 IU/mL; Miltenyi Biotec), SCF (50 ng/mL), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF; 25 ng/mL; Stem Cell Technologies) and granulocyte macrophage (GM) CSF (10 ng/mL; Stem Cell Technologies). Colonies were identified and scored after 12-14 days at 37°C. Depending on cord blood samples, between 60 to 80 colonies were generated from 300 sham or 20 mGy-irradiated HSPC. Serial plating was also performed: mixed or individual colonies were harvested in sterile 37°C pre-warmed PBS, and re-plated in complete methylcellulose medium for 12-14 additional days. In the case of mixed colonies, cells were counted then 2500 cells were plated in secondary cultured. When individual colonies were picked, they were re-plated in complete methylcellulose medium for 12-14 additional days in 24-well plate (10 cells/condition and / experiment). After 12-14 days, positive wells (wells with colonies) were numerated (Sup Figure 6).

Primary and extended Long-Term Culture Initiating Cell (LTC-IC) assays.

Limiting dilution allowed evaluating LTC-IC frequency within HSPC after exposure to different doses of irradiation. HSPC were seeded in 96-well plates pre-coated with MS5 stromal cells in

Myelocult medium (H5100, StemCell Technologies) (60, 20 or 6 cells per well) for 5 to 6 weeks. Each well was harvested and mixed with 500µL of complete methylcellulose (H4230, StemCell Technologies) before being plated in 24-well plates. LTC-IC-derived CFU-C were analyzed 12-14 days later. For extended LTC-IC assay, 3000 irradiated HSPC were seeded in 6-well plates pre-coated with MS5 stromal cells in MyeloCult medium (H5100, Stem Cell Technologies). Five weeks later $CD34^+$ expressing cells were cell sorted and re-seeded in limiting dilution (500, 100, 50, 25 and 10 cells per well in 96-well plates) with MS5 cells in MyeloCult medium for 5 additional weeks before to be tested for CFU-C during 12 to 14 days as described.

A positive well contained at least one colony. LTC-IC frequency was determined using L-CALC software (Stem Cell Technology).

CFSE staining

$3x10^5$ $CD34^+$ cells were labeled with CFSE (2.5 µM, sigma, France) and cultured ($5\text{-}10x10^3$/well) for 2 to 8 days in StemSpan medium (Stem Cell Technologies) supplemented with 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, IL-3 (8 ng/mL), erythropoietin (2 IU/mL; Miltenyi Biotec), SCF (50 ng/mL), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF; 25 ng/mL; Stem Cell Technologies) and granulocyte macrophage (GM) CSF (10 ng/mL; Stem Cell Technologies). Cell divisions were analyzed by flow cytometry.

Intracellular flow cytometry

Cells were first stained with antibodies directed against extracellular markers (CD34, CD90, CD38 and CD45). Then, cells were permeabilized and fixed using Cytoperm/cytofix and Perm wash buffer (BD Bioscience). Intracellular staining was performed for Ki67- FITC or PE kit (BD Biosciences) and Hoechst or cleaved-caspase3-PE kit (BD Biosciences) according to manufacturer instructions.

For phospho-P38MPAK, after extracellular staining, cells were first fixed with Phosflow Fix buffer I (BD Bioscience), then permeabilized using BD Phosflow Perm Buffer II following manufacturer procedures. Cells were then stained with anti-pP38-PE (clone 3D7, Cell signaling technology).

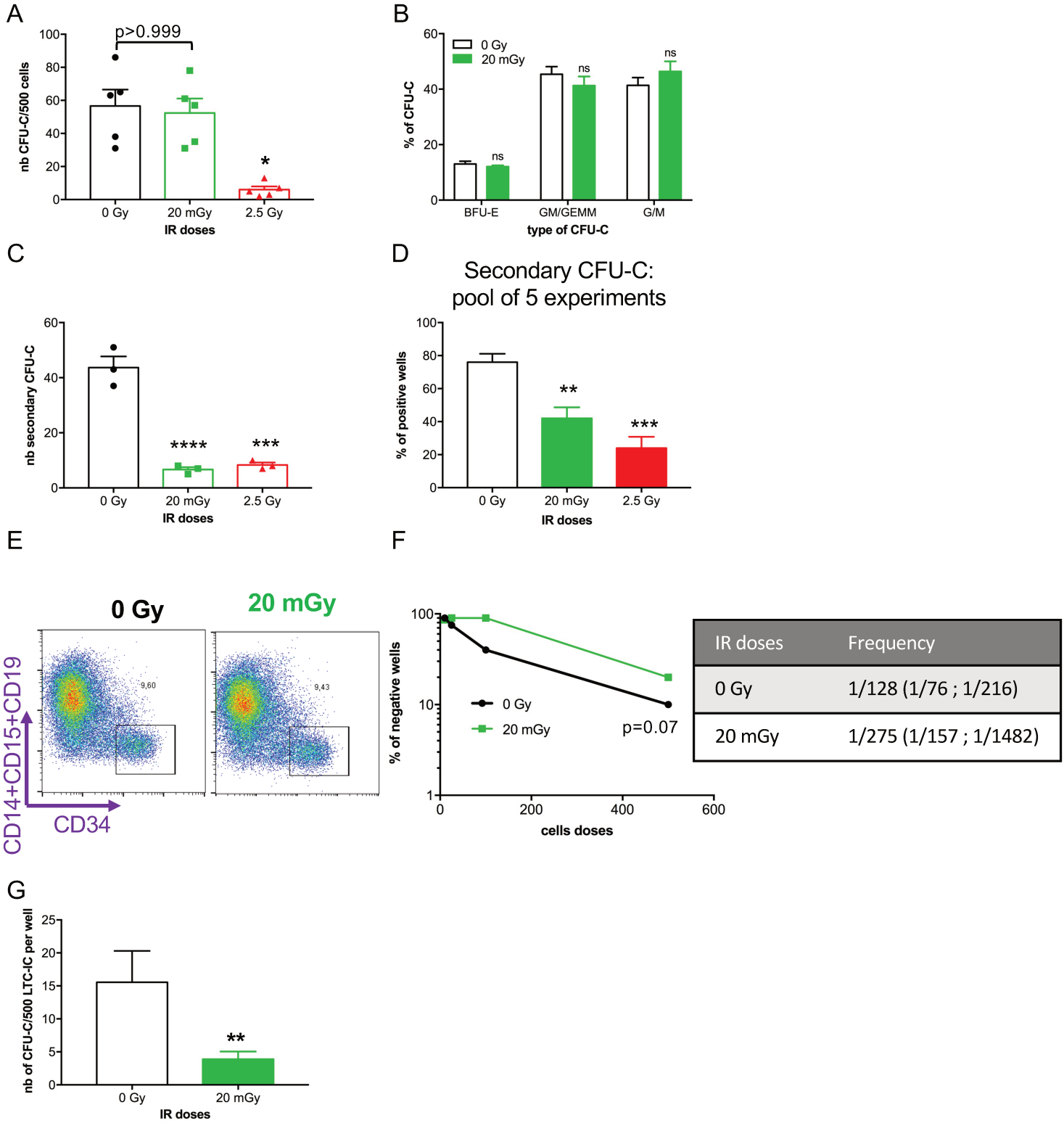
For phosphor-ATM (Ser1981), p53 and phospho-p53 (Ser 35), cells were fixed and permeabilized using Nuclear transcription factor buffer set (Biolegend) following manufacturer procedures.

Autophagy measurement

Cells were first stained with antibodies directed against extracellular markers (CD34, CD90, CD38 and CD45) at 37°C, then washed in PBS. Autophagy was measured using CytoID kit (Ref ENZ-51031-0050, Enzo Life Science) following manufacturer procedures.

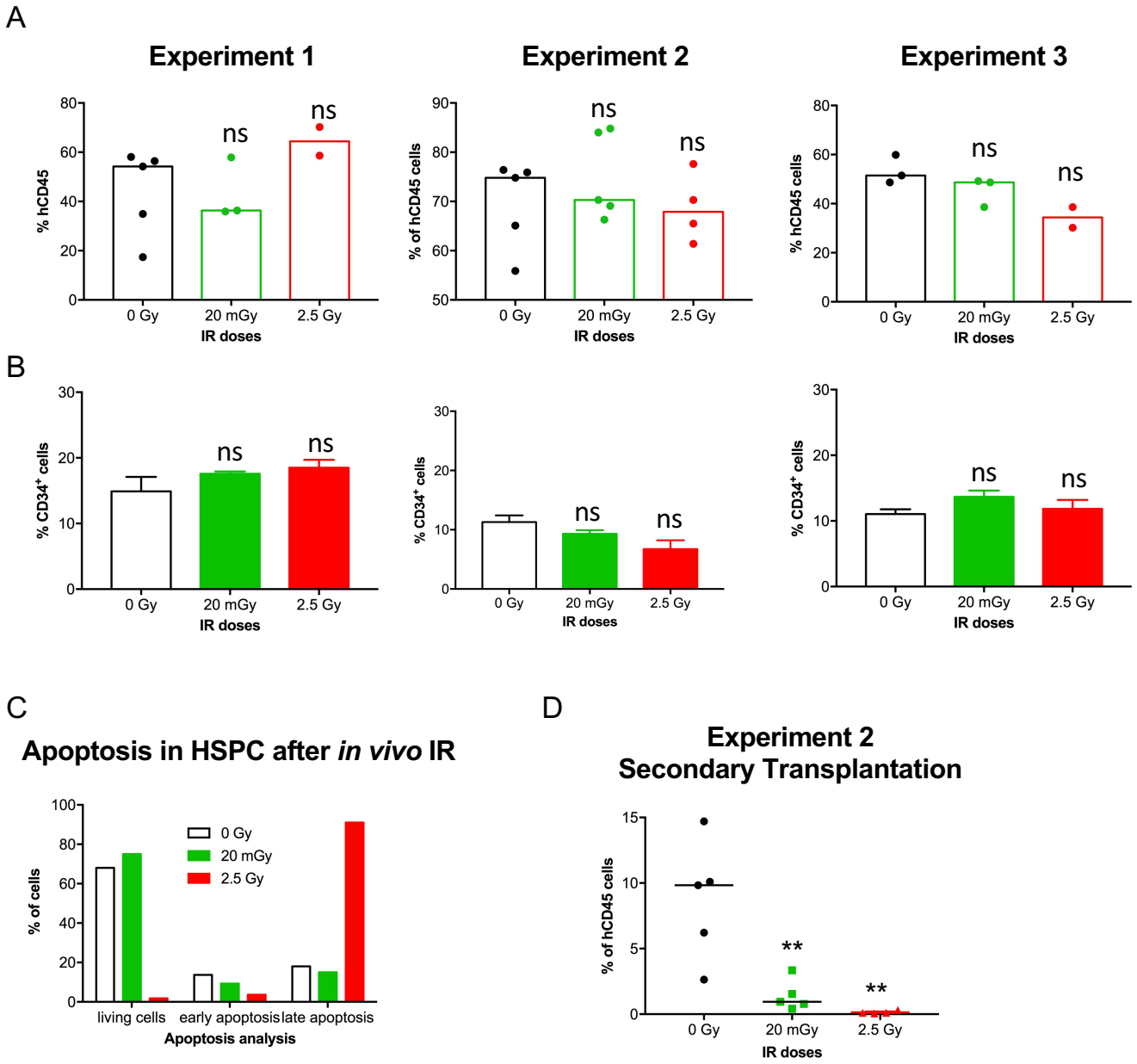
Ab name	Clone	Fluorochrome	Reference	Brand
CD90	5E10	APC	559869	BD Bioscience
CD34	581	PE-Cy7	343516	Biolegend
CD34	581	APC	343510	Biolegend
CD38	HB-7	FITC	356610	Biolegend
CD45RA	HI100	PE	304108	Biolegend
CD45	HI30	BV421	304032	Biolegend
CD3	SK7	PeRCP-Cy5.5	344808	Biolegend
CD19	HIB19	APC-eF780	47-0199-42	ebioscience
CD19	HIB19	PE	302208	Biolegend
CD14	61D3	PE	12-0149-42	ebioscience
CD15	HI98	PE	301906	Biolegend
Phospho-ATM (Ser1981)	10H11.E12	PE	651203	Biolegend
p53	1C12	AFF488	2015	Cell Signaling
Phospho-p53 (Ser15)	16G8	AF647	8695	Cell Signaling
Cleaved-Caspase 3	C92-605	PE	561011	BD Bioscience
Phospho-p38MAPK (Thr130/Tyr182)	3D7	PE	6908S	Cell Signaling
8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8oxo)	N45.1	purified	ab48508	abcam
phospho-Histone H2A.X (ser139) γH2AX	JBW301	Purified (mouse)	05-636	Merck Millipore
53BP1	polyclonal	Purified (rabbit)	NB100_304	Novus Biologicals
NRF2	polyclonal	Purified (rabbit)	ab31163	abcam
Goat-anti-mouse		AF488	A-11001	Life Technologies
Goat-anti-rabbit		AF594	A-11012	Life Technologies
Goat-anti-mouse		AF647	A-21235	Life Technologies

Sup table 1: Antibodies used for this study

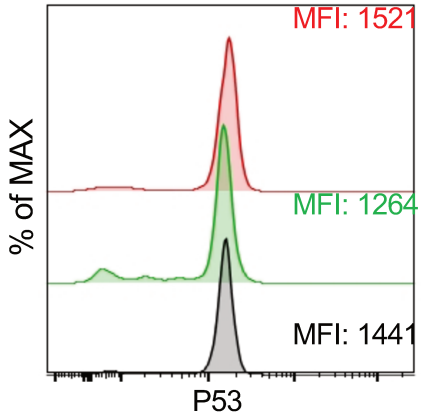


IR doses	Frequency
0 Gy	1/128 (1/76 ; 1/216)
20 mGy	1/275 (1/157 ; 1/1482)

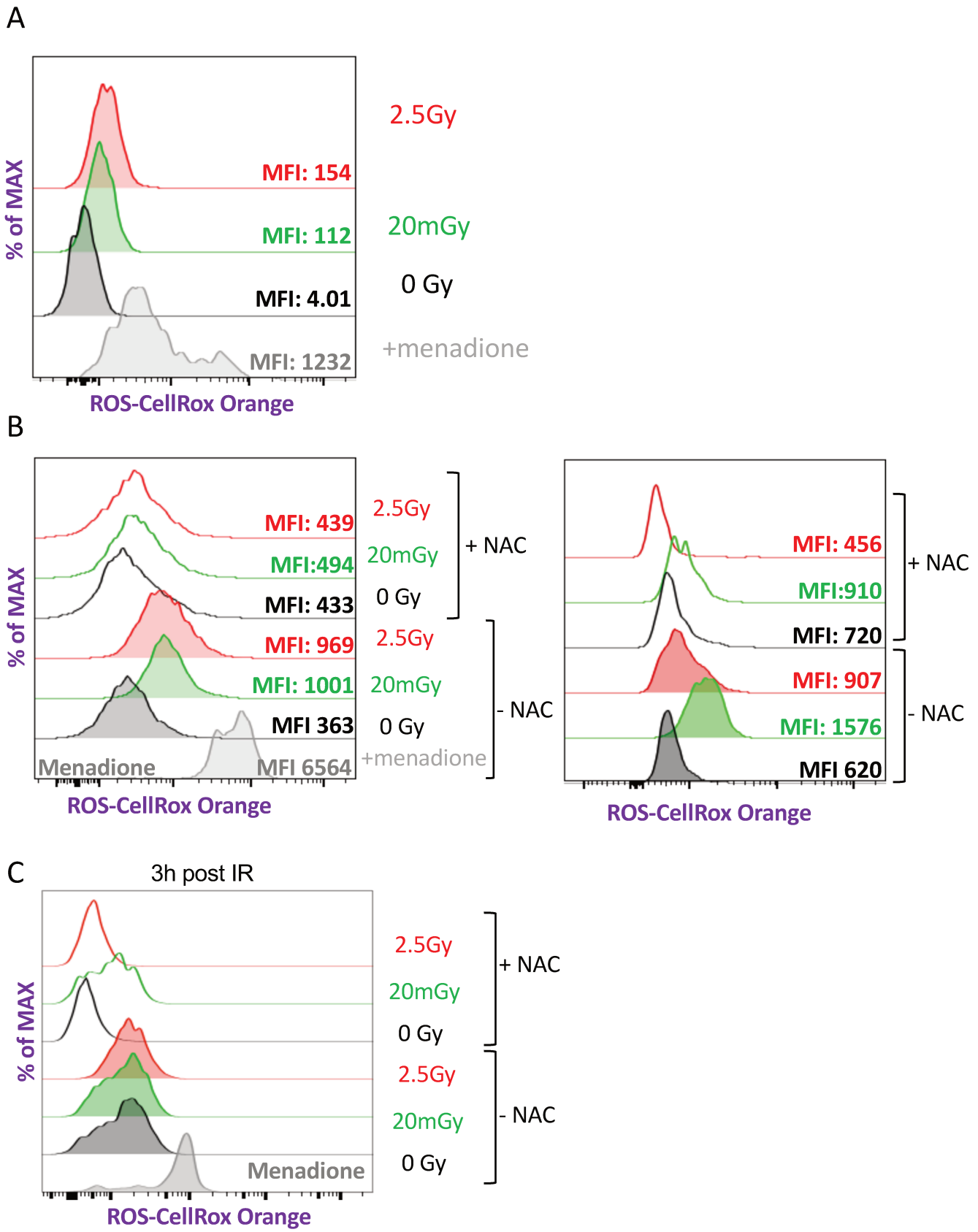
Sup Figure 1 related to Figure 1: (A) Cell-sorted HSPC were irradiated at indicated doses then culture for 12 days in CFU-C medium. CFU-C were then quantified. Primary CFU-C assay (cumulative results from 4 experiments with HSPC isolated from 4 independent pools of CB samples). HSPC (500 cells/plate) were plated in CFU-C conditions for 12 to 14 days and the CFU-C number was quantified. Raw data of normalized data shown in Figure 1B are represented here (B) Quantification of the different types of CFU generated (BFU-E, CFU-GEMM + CFU-GM and CFU-M+CFU-G) (C) Primary CFU-C were pooled and replated in methylcellulose for 12 to 14 days. Shown are the number of secondary CFU-C. Raw data of normalized data shown in Figure 1C are represented here (cumulative results from 3 experiments). **, $p<0.01$ (Mann and Whitney statistics) (D) CFU-GM colonies from primary cultures were picked and replated in methylcellulose for 12 more days in CFU-C condition in 24 wells plates. The percentage of wells with CFU-C is shown. (E-G) Cell-sorted HSPC were irradiated at indicated doses and cultured with MS5 stromal cells for 5 weeks in LTC-IC medium. Cells were thereafter recovered, stained with surface markers against CD14 CD15 CD19 (Ab conjugated to PE) and CD34 (Ab conjugate to APC). (E) shows gating strategy. Cultured $CD34^{hi}$ cells were sorted and re-seeded at limiting dilution on MS5 cells for 5 additional weeks. After 5 weeks, each single well was transferred in methylcellulose for 12 days. (F) Frequency of LTC-IC calculated using L-CALC software (G) Number of CFU-C obtained when 500 sorted $CD34^{hi}$ cells were cultured as described in (E).



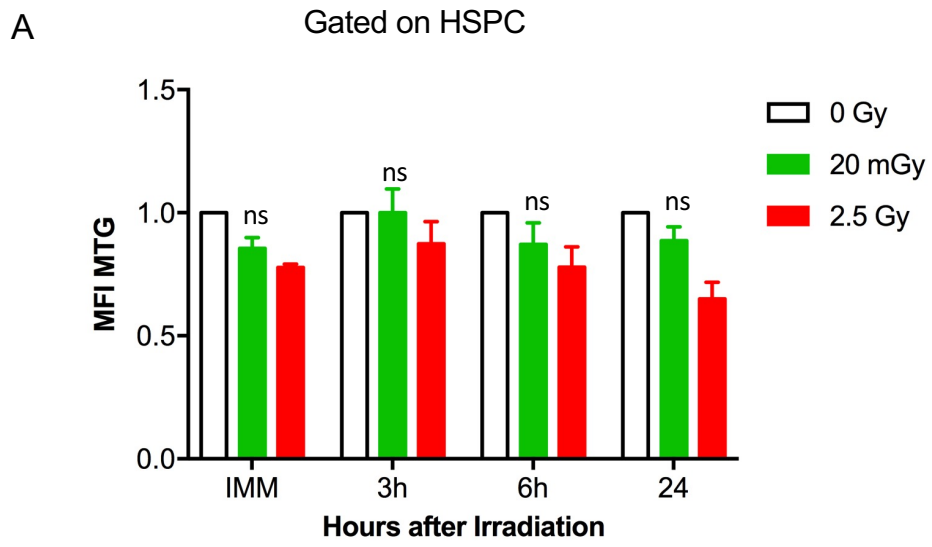
Sup Figure 2 related to Figure 2: Hematopoietic reconstitution capacities of human HSC after *in vivo* exposure to LDIR. NSG mice were grafted with 5.10^4 $CD34^+$ cells. Engrafted mice were irradiated 15 weeks post graft then sacrificed. 3 independent experiments. (A) Graphs represent human chimerism for each experiment just after NSG mouse irradiation and sacrifice. (B) Graphs represent the frequency of $CD34^+$ cells among $CD45^+$ compartment just after NSG mouse irradiation and sacrifice. (C) The apoptosis was measured in HSPC compartment after mouse exposure to irradiation. (D) BM cells were recovered from primary recipient mice and an equivalent of 5.10^4 $CD34^+$ $CD19^-$ BM cells were injected in secondary recipient mice. This graph represents the frequency of $hCD45^+$ cells in the BM of secondary NSG mice for experiment n°2. Statistical analysis : Anova one way 0Gy vs 20mGy p=0.0036 and 0 Gy vs 2.5 Gy p=0.0026.

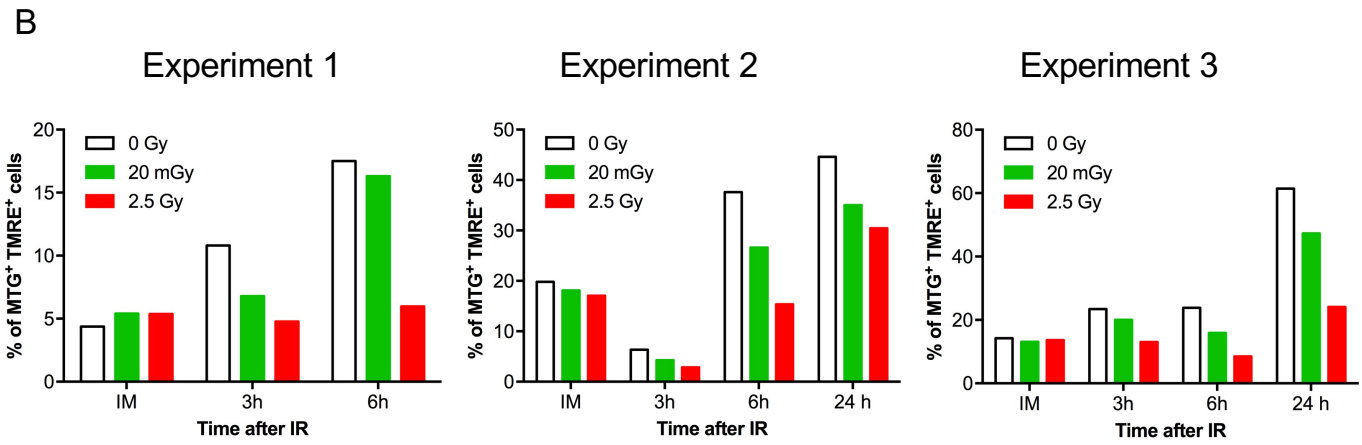


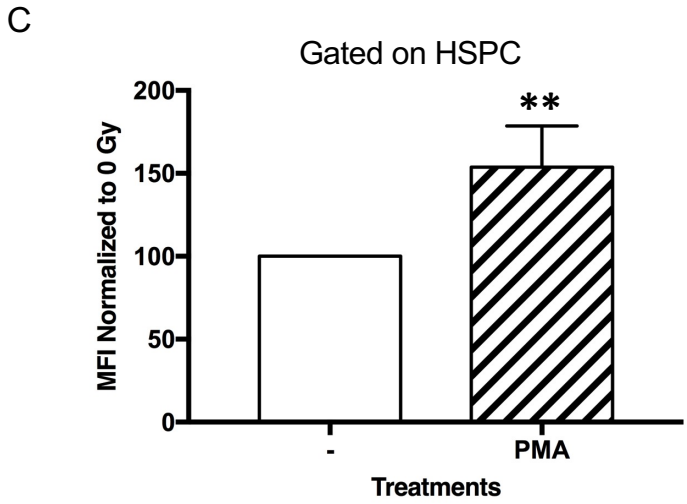
Sup Figure 3 related to Figure 4: CD34^{+} cells were irradiated, cultured 3h at 37°C, stained for cell surface markers then fixed. Analysis p53 protein expression in CD34^{+} CD38^{low} CD45RA^{-} CD90^{+} HSPC by FACS 3 hours post IR (one representative experiment out of 4).



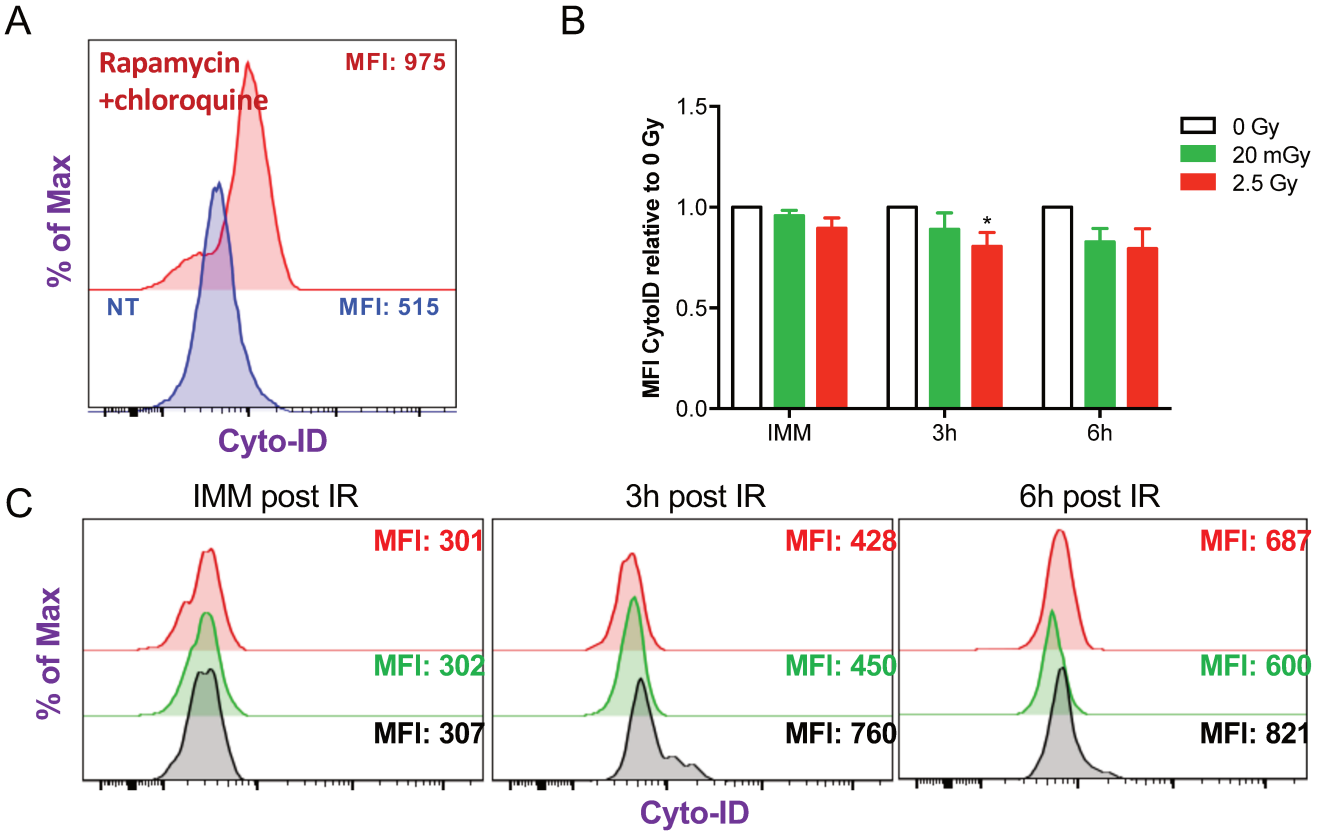
Sup Figure 4 related to Figure 5: Cell-sorted HSPC were treated or not with NAC, irradiated at indicated doses, then ROS levels were quantified immediately post IR on HSPC using CellRox Orange probe (3 experiments). (A) First experiment done with menadione (light grey) as positive control, full black histogram represents non-irradiated condition, green 20mGy-irradiated condition and red 2.5Gy-irradiated condition. (B) Second and third experiments made. Cell-sorted HSPC were treated or not with NAC. Full histogram represents without NAC treatment, and empty histogram represents after NAC treatment. (C) ROS levels were quantified in $CD34^{+}$ $CD38^{low}$ $CD45RA^{-}$ $CD90^{+}$ HSPC using CellRox Orange probe 3h post IR.



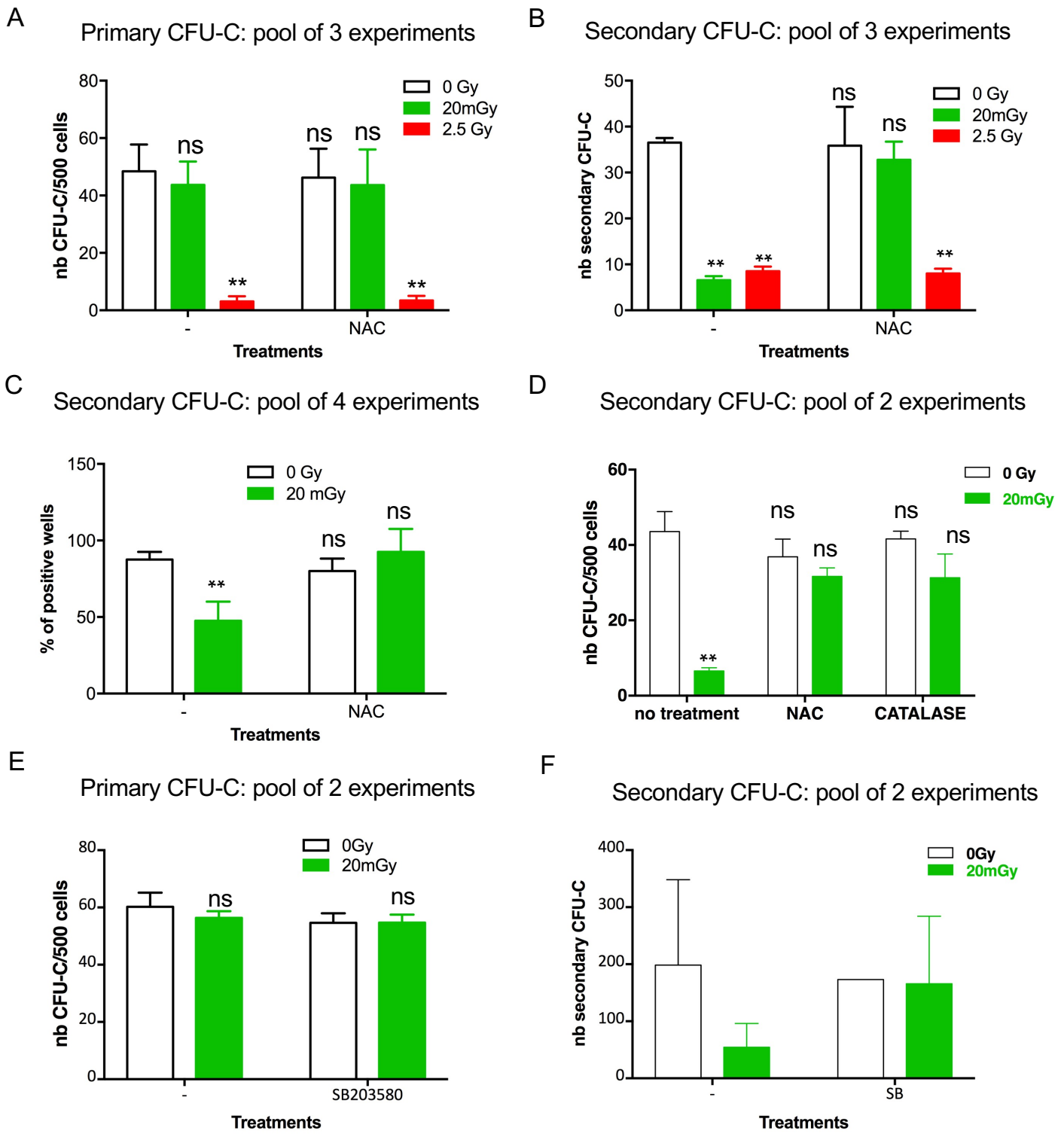




Sup Figure 5 related to Figure 5: (A-B) The mitochondrial activity was monitored over time by using MTG (Mitochondrial mass) and TMRE (membrane potential) probes in HSPC. (A) Shown is the mitochondria mass (MFI MTG) over time in culture in HSPC compartment (3 independent experiments) (B) Shown is the membrane potential (MFI TMRE) over time in culture in HSPC compartment for each experiment (C) CD34^{+} cells were incubated at 37°C with PMA (positive control) for 30 min or remain untreated. Surface staining was made during incubation period. Then cells were fixed and permeabilized (see method) then stained with phospho-p38MAPK antibody. As expected increased p38MAPK phosphorylation is observed when HSPC are treated with PMA as shown by mean of fluorescence (MFI).



Sup Figure 6 related to Fig 5: (A) The autophagy activation was monitored over time by using the CytoID probe in HSPC. (A) As positive control of autophagy activation, CD34$^+$ cells were treated for 16h with chloroquine and rapamycin, known to induce autophagy, and thereafter incubated for 30 min with the CytoID probe. (B) CD34$^+$ cells were first irradiated then incubated with the cytoID probe at indicated time post IR. Shown is the autophagy activation (MFI CytoID) over time in culture in HSPC compartment (pool of 3 independent experiments) (C) Shown is the overlay histogram of the CytoID staining over time in culture in HSPC compartment for one representative experiment.



Sup Figure 7 related to Figure 6: Cell-sorted HSPC were treated or not with indicated drugs, irradiated at indicated doses and seeded in CFU-C conditions. CFU-C were then quantified. (A) Primary CFU-C assay (cumulative results from 3 experiments with HSPC isolated from 3 independent pools of CB samples). HSPC (500 cells/plate) were plated in CFU-C conditions for 12 to 14 days and the number of CFU-C was quantified. Raw data of normalized data shown in Figure 6A are represented here. (B) Primary CFU-C were pooled and replated in methylcellulose for 12 to 14 days. Shown are the number of secondary CFU-C. Raw data of normalized data shown in Figure 6B are represented here. (C) CFU-GM colonies were picked then cultured for 12 more days in CFU-C condition in 24 wells plates. The number of wells with CFU-C is shown. (D) Primary CFU-C untreated, NAC, or Catalase-treated were pooled and cultured in CFU-C conditions for 12 more days. The number of secondary CFU-C generated in each condition is shown. (E) Primary CFU-C assay (cumulative results from 2 experiments with HSPC). HSPC (500 cells/plate) were plated in CFU-C conditions for 12 to 14 days and the number of CFU-C was quantified. Raw data of normalized data shown in Figure 6C are represented here. (F) Primary CFU-C were pooled and replated in methylcellulose for 12 to 14 days. Shown are the number of secondary CFU-C. Raw data of normalized data shown in Figure 6D are represented here.

4. *Editorial rédigé par T. Suda et M. Yamashita*

Dans le numéro où notre article apparaît, un éditorial lui a été consacré. Celui-ci revient sur les résultats obtenus à la fois sur les CSH murines et humaines.

Low-Dose X-Rays Leave Scars On Human Hematopoietic Stem And Progenitor Cells: The Role Of Reactive Oxygen Species

Masayuki Yamashita, Toshio Suda

Haematologica August 2020 105: 1986-1988; **Doi:**10.3324/haematol.2020.254292

Low-dose X-rays leave scars on human hematopoietic stem and progenitor cells: the role of reactive oxygen species

Masayuki Yamashita[1] and Toshio Suda[2,3]

[1]Division of Stem Cell and Molecular Medicine, Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; [2]International Research Center for Medical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan and [3]Cancer Science Institute, National University of Singapore, Singapore

E-mail: TOSHIO SUDA - sudato@keio.jp

doi:10.3324/haematol.2020.254292

After Röntgen's discovery in 1895, an X-ray became a game changer in medicine.[1] It was discovered as an invisible ray of light that passes through many objects, including human bodies, and visualizes the internal organs and structures as silhouettes. As now seen in medical radiography, such as chest X-rays and computed tomography (CT) scans, X-rays have enabled investigation of deep tissues in humans that had been otherwise impossible without surgical intervention, contributing to the early detection and treatment of many diseases. However, as is often the case with new medicine, X-rays were shown to have a biohazard effect.[2] They are identified as a type of ionizing radiation (IR): a stream of high energy photons that are strong enough to ionize atoms and disrupt molecular bonds in biomolecules, including DNA. As DNA encodes an essential blueprint of a cell, the DNA-damaging property of X-rays can be toxic. This effect, although used for killing cancer cells in radiotherapy, has raised concerns about the effect of X-rays on normal tissues and whether the benefits exceed the risks.

Modern medicine relies heavily on radiography to assess human health. The annual doses of X-rays people receive are increasing. A recent study estimated that around 2% or 4,000,000 of the non-elderly adults in the US receive 20 milligray (mGy) or more per year due to medical requirements.[3] Historically, risks associated with low-dose IR are considered to be almost negligible as it does not cause any acute toxicity, nor does it increase the risk of carcinogenesis, based on empirical linear fits of existing human data determined at high doses, such as those of Japanese atomic bomb survivors.[4] Indeed, low-dose IR rarely induces DNA double strand breaks (DSB), which often cause mutations and are considered to be the most relevant lesion for the deleterious effects of IR.[5] However, even though low-dose X-rays rarely cause DSB, they are reportedly less easy to repair than those induced by high-dose X-rays.[6] Importantly, recent evidence suggests that cumulative doses of 50 mGy X-ray (doses equivalent to 5-10 brain CT scans when given in childhood) have long-term detrimental effects on human health, including a more than 3-fold increase in the risks of acute lymphoblastic leukemia and myelodysplastic syndrome.[7] Furthermore, mouse studies demonstrate that low-dose X-rays affect function of long-lived tissue-specific stem cells, including hematopoietic stem cells (HSC).[8,9] Thus, understanding the persistent effect of low-dose X-rays on human tissue-specific stem cells is of particular importance in precisely evaluating the risks posed by radiography on public health.

In this issue of *Haematologica*, Henry *et al.* compared the effects of low and high doses of X-rays on hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) obtained from human umbilical cord blood (CB) (Figure 1).[10] HSPC sustain themselves *via* self-renewing ability, and give rise to all of the blood lineage cells, such as innate and acquired immune cells, erythrocytes and platelets, through multi-lineage differentiation. They found that a single dose of 20 mGy X-rays is sufficient to impair the self-renewing capacity of CB HSPC. Intriguingly, this effect is independent of canonical DNA damage response (DDR), as a 20 mGy dose fails to induce DSB markers γ–H2AX and 53BP1 foci, or DDR hallmarks phospho-ATM and -p53, all of which are induced by a 2.5 Gy dose. Instead, the authors demonstrate that it is mediated by reactive oxygen species (ROS), a highly reactive oxygen byproduct mainly generated *via* the cell respiratory process of oxidative phosphorylation (OXPHOS) in mitochondria, and p38/MAPK14, a key enzyme that, upon elevation of ROS, sends a signal to HSPC to inhibit their self-renewing potential.[11] Thus, the results of Henry *et al.* indicate that low-dose X-rays impair human CB HSPC function through ROS and p38/MAPK14, but not *via* canonical DDR *via* ATM or p53.

The high sensitivity of HSC to elevated levels of ROS is well established, first in ATM deficiency and later in the contexts of other stress conditions.[11-13] Similarly, p38/MAPK14 activation in response to ROS elevation is identified as a common downstream pathway responsible for impairment of self-renewal in HSC.[11,12] In contrast, what is often unclear is the upstream mediator that causes ROS elevation. In the context of low-dose IR, mouse studies have uncovered the hypersensitivity of HSC and esophageal stem cells to low-dose IR that is mediated by ROS elevation, although the molecular link between low-dose IR and elevated ROS has not yet been investigated.[8,9] It is estimated that approximately 90% of ROS can be generated during OXPHOS in mitochondria,[14] mainly through functions of complexes I and III.[15] Interestingly, the results shown by Henry *et al.* indicate that ROS elevation in human CB HSPC upon exposure to 20 mGy X-rays is closely associated with loss of mitochondrial membrane potential, which reflects a decrease in proton gradient across the cristae and often correlates with mitochondrial dysfunction.[10] Apart from nucleus, mitochondria are the only organelle in mammalian cells that contain DNA, which can also be damaged by low-dose IR.[16] Mitochondrial DNA (mtDNA) encodes proteins that consist of complexes I and ATP synthase, both of which are essential for proper electron transport and OXPHOS. Of note, these components are located in the so-called "common deletion" region of mtDNA that is commonly deleted upon exposure to low-dose IR. mtDNA is not protected by histones, and is thus potentially more susceptible to IR-induced damage compared to nuclear DNA. Moreover, mtDNA is located in matrix inside inner membranes where ROS is generated, and is thus more greatly affected by IR-induced oxidative stress

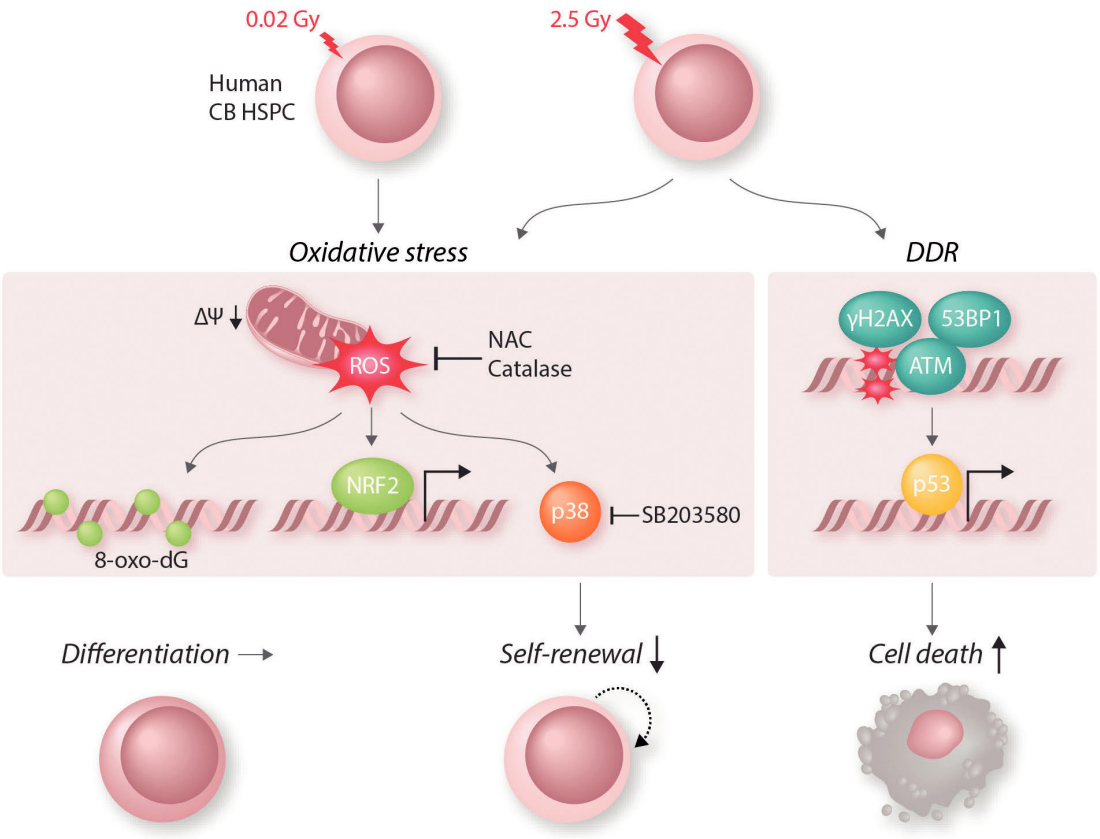


Figure 1. Response of human cord blood (CB) hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) to low- and high-dose X-ray irradiation demonstrated by Henri *et al.*[10] A low dose of 0.02 Gy (20 mGy) X-rays induces reactive oxygen species (ROS) elevation coupled with decrease in mitochondrial membrane potential (ΔΨ), which leads to increase in oxidative stress represented by formation of 8-oxo-deoxyguanosine (8-oxo-dG) in DNA, nuclear expression of NRF2, and activation of p38/MAPK14. The p38/MAPK14 activation mediates a decline in self-renewing capacity of HSPC without affecting their differentiating potential. The low-dose X-rays do not induce γ-H2AX and 53BP1 foci that represents nuclear DNA double strand breaks (DSB), or canonical DNA damage response *via* phosphorylation of ATM and p53. In contrast, a high dose of 2.5 Gy X-ray irradiation causes both ROS elevation and nuclear DSB. As a result, ROS inhibition either by N-acetylcysteine (NAC) or catalase, or p38 inhibition by SB203580, can reverse the detrimental effect by low dose, but not high dose, of X-rays on self-renewal capacity of HSPC.

than nuclear DNA. Damage in mtDNA is not so simple as that in nuclear DNA, as a cell can contain more than 1,000 copies of mtDNA. Furthermore, numbers of mitochondria are dynamically changed by fusion and fission, which play critical roles in maintaining functional mitochondria *via* inter-mitochondrial complementation and quality control.[17] In addition, damaged mitochondria can be removed by autophagy, which contributes to maintenance of self-renewal capacity of HSC.[18,19] Henry *et al.* show that mitochondrial mass in HSPC does not seem to change after irradiation of 20 mGy X-rays.[10] Although this observation should be validated by other methods,[20] it supports the idea that changes in mitochondrial mass are unlikely to be the cause of ROS elevation. Rather, it is tempting to speculate that damage in mtDNA induced by low-dose IR causes persistent changes in mitochondrial function that lead to initial elevation of ROS and long-term impairment of HSC function. This would be consistent with the results reported by Rodrigues-Moreira *et al.*, which demonstrate that low-dose X-rays cause biphasic elevations of ROS and the second wave of ROS elevation causes persistent reduction in self-renewing capacity of mouse bone marrow HSC.[9] Mitochondrial dysfunction, but not constant elevation of ROS, is implicated in age-associated decline in HSC function.[18] Since involvement of mtDNA remains unknown, investigating whether aged HSC have mtDNA damage would be of particular interest. Collectively, identifying molecular 'scars' left by low-dose X-rays on HSC would help provide a precise evaluation of the long-term detrimental effects by medical radiographic examination and also find common mechanisms that underlie hematopoietic aging and disease.

References

1. Röntgen WC. On a New Kind of Rays. Science. 1896;3(59):227-231.
2. Daniel J. The X-Rays. Science. 1896;3(67):562-563.
3. Fazel R, Krumholz HM, Wang Y, et al. Exposure to low-dose ionizing radiation from medical imaging procedures. N Engl J Med. 2009;361(9):849-857.
4. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. Radiat Res. 1994;137(2 Suppl):S68-97.
5. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature. 2001;411(6835):366-374.
6. Rothkamm K, Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(9):5057-5062.
7. Pearce MS, Salotti JA, Little MP, et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain

tumours: a retrospective cohort study. Lancet. 2012;380(9840):499-505.
8. Fernandez-Antoran D, Piedrafita G, Murai K, et al. Outcompeting p53-Mutant Cells in the Normal Esophagus by Redox Manipulation. Cell Stem Cell. 2019;25(3):329-341.e6.
9. Rodrigues-Moreira S, Moreno SG, Ghinatti G, et al. Low-Dose Irradiation Promotes Persistent Oxidative Stress and Decreases Self-Renewal in Hematopoietic Stem Cells. Cell Rep. 2017;20(13):3199-3211.
10. Henry E, Souissi-Sahraoui I, Deynoux M, et al. Human hematopoietic stem/progenitor cells display ROS-dependent long-term hematopoietic defects after exposure to low dose of ionizing radiations. Haematologica. 2020;105(8):2044-2055.
11. Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. Nat Med. 2006;12(4):446-451.
12. Miyamoto K, Araki KY, Naka K, et al. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. Cell Stem Cell. 2007;1(1):101-112.
13. Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. Cell. 2007;128(2):325-339.
14. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. Cell. 2005;120(4):483-495.
15. Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. FEBS Lett. 2018;592(5):728-742.
16. Kawamura K, Qi F, Kobayashi J. Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production. J Radiat Res. 2018;59(suppl_2):ii91-ii97.
17. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. Science. 2012;337(6098):1062-1065.
18. Ho TT, Warr MR, Adelman ER, et al. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. Nature. 2017;543(7644):205-210.
19. Ito K, Turcotte R, Cui J, et al. Self-renewal of a purified Tie2+ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. Science. 2016;354(6316):1156-1160.
20. de Almeida MJ, Luchsinger LL, Corrigan DJ, Williams LJ, Snoeck HW. Dye-Independent Methods Reveal Elevated Mitochondrial Mass in Hematopoietic Stem Cells. Cell Stem Cell. 2017;21(6):725-729.e4.

Busy signal: platelet-derived growth factor activation in myelofibrosis

Anna E. Marneth[1] and Ann Mullally[1,2,3]

[1]Division of Hematology, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston; [2]Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston and [3]Broad Institute, Cambridge, MA, USA.

E-mail: ANN MULLALLY - amullally@partners.org

doi:10.3324/haematol.2020.253708

The pathogenesis of myelofibrosis, a bone marrow (BM) disorder characterized by megakaryocytic hyperplasia and the deposition of extracellular matrix components such as reticulin, remains incompletely understood.

Using a mouse model of myelofibrosis (i.e. Gata-1^{low} mice), Kramer *et al.*[1] sought to identify key signaling molecules that play a role in early myelofibrosis development. GATA-1 is a transcription factor that is key to megakaryocyte development, and its downregulation results in expansion and abnormal maturation of megakaryocytes.[2] Importantly, low GATA-1 expression has been demonstrated in patients with myelofibrosis,[3] and GATA-1 mutations are found in megakaryocytic leukemias.[2]

New key findings

Unlike several widely used myelofibrosis mouse models that rely on BM transplantation to engender fibrosis, primary Gata-1^{low} mice gradually develop myelofibrosis spontaneously.[4] Due to its slow progression, this model allows for analysis at prefibrotic (5 months), early fibrotic (10 months), and overtly fibrotic (15 months) stages. A strength of the study by Kramer *et al.* is the application of an unbiased approach (i.e. RNA sequencing) to interrogate the changes that occur in receptor tyrosine kinase pathways during the development of myelofibrosis. Using bulk RNA sequencing on unfractionated BM (including stromal cells), the authors identified the platelet-derived growth factor (PDGF) pathway as significantly up-regulated in early fibrotic Gata-1^{low} mice compared to wild-type mice. Additionally, the authors analyzed protein expression of PDGF receptors and ligands on BM sections at the three aforementioned time points; this allowed them to study the PDGF pathway in a spatio-temporal manner.

In addition to demonstrating increased transcript expression of PDGF receptor a (Pdgfra) and Pdgfrb, as well as the ligand Pdgfb, in fibrotic Gata-1^{low} mice, the authors employed a novel technique called *in situ* proximity ligation assay to determine protein localization. They found that the receptor PDGFRβ and ligand PDGF-B are in close proximity in the setting of overtly fibrotic BM, suggesting binding of the ligand to the receptor and increased PDGF-B signaling. Furthermore, their data suggest that the most important cell types involved in PDGF signaling are megakaryocytes, which express PDGFRα and secrete the ligand PDGF-B, and spindle-shaped stromal cells which express PDGFRβ (Figure 1).

Despite these findings, Kramer *et al.* did not detect increased PDGFRβ tyrosine phosphorylation, a marker of receptor activation. They suggest that the phosphatase TC-PTP (PTPN2) may play a role in dephosphorylation of PDGFRβ and show that TC-PTP is in close proximity to PDGFRβ in fibrotic Gata-1^{low} mice. There are two main potential explanations for these findings. Either: (i) PDGF receptor activation is transient and rapidly down-regulated; or (ii) PDGF receptor activation is rapidly reset by phosphatases such as TC-PTP after ligand binding. Rapid downregulation would call into question the importance of the PDGF pathway in myelofibrosis, while a rapid reset may increase signaling in the presence of ligand and potentially contribute to the development of myelofibrosis. Further investigation of PDGF signaling in human myelofibrosis will be required to fully resolve this question.

5. Résumé

Dans ce travail, nous avons montré que les CSH humaines, tout comme les CSH murines, avaient une senbilité particulière aux faibles doses de radiations ionisantes, et en particulier à la dose de 20 mGy. Cette sensibilité se traduit par des défauts fonctionnels *in vitro* (CFU-C et LTC-IC) et *in vivo* à long-terme, suggérant une diminution de leurs capacités d'auto-renouvèlement.

Ces défauts se traduisent par une perte presque totale des capacités de clonogénicité en série, ainsi qu'une baisse de la fréquence des LTC-IC « extended » après 10 semaines de culture et permettant d'évaluer l'auto-renouvèlement *in vitro*. De plus, si *in vivo* aucun effet n'est visible non plus en transplantation primaire, les capacités de reconsitution en transplantation secondaire sont drastiquement diminuées, après irradiation *in vivo* ou *ex vivo*.

Afin de proposer un mécanisme d'action des radiations γ à faible dose, différents aspects ont été vérifiés. Ainsi, comme chez la souris (Rodrigues-Moreira et al., 2017) la plupart des mécanismes habituellement observés après une irradiation ne sont pas activés. Aucune augmentation de l'apoptose, du nombre de foyers γH2AX, de l'activation des voies p53 ou ATM, ou de modification du cycle cellulaire n'a ainsi pu être mise en évidence. En revanche, une augmentation rapide et transitoire des ROS est bien visible. Celle-ci s'accompagne d'une augmentation du stress oxydant au niveau de l'ADN, observé grâce au marquage en immunofluorescence des lésions 8-oxo-dG, et d'une translocation nucléaire de NRF2. De plus, il se produit une augmentation de l'activation de la voie p38MPAK, impliquée dans la régulation du stress oxydant et des propriétés essentielles des CSH.

Enfin, un pré-traitement avec l'antioxydant NAC ou avec l'inhibiteur de la voie p38MAPK SB203580 permet de restaurer les capacités fonctionnelles des CSH après irradiation à faible dose, observées grâce au rétablissement de la génération de colonies secondaires. Ainsi, une protection contre le stress oxydant ou ses conséquences permet de maintenir les propriétés des CSH dans le cadre de faibles doses d'irradiation γ.

A la suite de ce travail, nous avons écrit une revue afin de comparer les effets des fortes et faibles doses de radiations ioniantes sur le compartiment particulièrement sensible des CSH. Celle-ci est présentée en Annexe 1.

Projet 2 : Amélioration du maintien des propriétés des cellules souches hématopoïétiques pendant la culture *ex vivo* grâce aux antioxydants

1. *Contexte scientifique*

La transplantation de CSH est une solution thérapeutique de choix pour traiter nombre de maladies hématologiques. De plus, les avancées au niveau des possiblités de modifications génétiques ouvrent la porte à de nombreuses applications de thérapie génique. Cependant, nous avons vu en introduction que les protocoles de culture pour la transduction virale ou l'expansion ne sont toujours pas totalement optimisés. En effet, les méthodes les plus courantes détaillées en introduction reposent sur l'utilisation de cytokines et facteurs de croissance. Si ceux-ci promeuvent l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques et favorisent leur survie, ils entraînent également l'entrée en cycle et la différenciation des CSH, au détriment de leurs propriétés de quiescence et d'auto-renouvèlement.

Une partie de cet effet peut être attribuable à l'augmentation des ROS. En effet, il est connu que la signalisation par des cytokines et des facteurs de croissance induit une signalisation par les ROS (Sattler et al., 1999). Nous avons introduit de façon détaillée le rôle prépondérant du niveau de ROS dans la régulation des propriétés des CSH. Plusieurs équipes se sont appuyées sur ce constat pour proposer des améliorations de ces protocoles permettant un meilleur maintien des CSH *in vitro*. Ainsi, l'hypoxie a beaucoup été utilisée pour mieux mimer le micro-environnement de la niche en diminuant la saturation en oxygène et par extension les ROS (voir partie 2.a. du chapitre 3 de l'introduction). Cependant, cette méthode est peu aisément applicable en clinique. De même, la culture en gel hydrophile permet d'obtenir de très bons résultats sur la fonctionnalité des CSH et semble fonctionner via une diminution des ROS (Bai et al., 2019).

Ainsi, notre approche repose sur l'utilisation d'antioxydants pour normaliser le niveau de ROS dans les CSH et éviter leur déterioration pendant la culture.

2. *Objectifs*

Les objectifs de cette étude sont d'une part, de confirmer l'implication du stress oxydant dans la perte des propriétés des CSH ; et d'autre part d'évaluer la faisabilité et l'impact d'un traitement antioxydant sur des CSH de sang de cordon dans une optique de culture *ex vivo* pour la transduction lentivirale. Cette étude pourrait donc à la fois mener à une meilleure compréhension des mécanismes régissant l'expansion *ex vivo* des CSH et donner des pistes d'amélioration des protocoles cliniques existant.

3. *Résultats : article en préparation (Henry E et al)*

Les résultats obtenus au cours de ma thèse sont résumés dans le manuscrit suivant. Celui-ci sera soumis dans un journal scientifique du domaine dès validation statistique des dernières expériences en cours.

Antioxidants protect human hematopoietic stem and progenitor cells from culture-induced loss of potential during protocols for gene therapy

Elia Henry[1-3], Frédéric Picou[4-6], Steicy Sobrino[7,8], Vilma Barroca[1-3], Emmanuelle Six[7,8], Olivier Hérault[4-6], Françoise Pflumio[1-3], Marie-Laure Arcangeli[1-3]

1. INSERM, U1274, Team « Niche et Cancer dans l'Hématopoïèse », F-92265 Fontenay-aux-Roses, France
2. CEA, DRF-JACOB-IRCM-SCSR-LSHL, UMR « Genetic stability, Stem Cells and Radiation », F-92265 Fontenay-aux-Roses, France
3. UMR « Genetic stability, Stem Cells and Radiation », Université de Paris – Université Paris Saclay, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France
4. CNRS Equipe labellisée 7001, Laboratoire Leukemic Niche and Redox Metabolism, Tours, France
5. Equipe 7501, Université de Tours, Tours, France
6. Biological Hematology Service, CHRU de Tours, Tours, France
7. INSERM, UMR1163, « Laboratory of Human Lymphohematopoiesis », Paris, France
8. Université de Paris – Sorbonne Paris Cité, Imagine Institute, Paris, France

Abstract

Hematopoietic stem cells are increasingly used for cell and gene therapy. For such protocols, they may be cultured in cytokine-enriched media in a goal of viral transduction or expansion. However, these protocols are harmful for HSC properties such as quiescence and self-renewal. We propose here a method based on antioxidant treatment prior culture to circumvent this. We have shown that the antioxidants N-acetyl cysteine and Tempol, a super oxide dismutase mimetic, protect cord blood hematopoietic stem cell functional properties during *ex vivo* culture, assessed by CFU-C, LTC-IC and serial transplantation assays. This phenomenon is attributable to a decrease of oxidative stress, p38MAPK activation and metabolic activity. This technique could be easily applied in clinics to improve long-term outcome of hematopoietic stem cell transplantation.

Introduction

Human hematopoietic stem cells (HSC) are a very rare population able to give rise to all hematopoietic cells. They are found within the $CD34^{+}CD38^{-/low}CD45RA^{-}CD90^{+}$ cell population [1], called hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) since transplantation assays in limiting dilution have shown that HSC represent only 10% of this population in the best conditions [2]. HSC are largely quiescent and possess a self-renewal potential along with multipotent differentiation capacities [3]. These characteristics make them powerful therapeutic tools for regenerative medicine, cell and gene therapies [4], [5]. For transplantation, $CD34^{+}$ cells, containing HSC along with hematopoietic progenitor and precursor cells, are injected, allowing hematopoietic progenitors and precursors to sustain production of blood cells during HSC differentiation period [6]. Different sources of $CD34^{+}$ cells can be used: bone marrow $CD34^{+}$ cells, $CD34^{+}$ cells mobilized in peripheral blood by the use of G-CSF or G-CSF+Plerixafor treatments and finally umbilical cord blood (CB) $CD34^{+}$ cells. The efficacy of HSC grafts is tightly correlated with the number of cells transplanted, which can be low, especially in CB samples [7]. However, CB HSC are increasingly used in transplantation, due to their easy recovery and their lower immunogenicity compared to other sources of allogeneic HSC. For gene therapy, $CD34^{+}$ cells need to be cultivated a few days in a specific medium supplemented with cytokines and growth factors such as Stem Cell Factor (SCF), thrombopoietin (TPO) and FLT3 ligand (FLT3L) factors during genetic modification by retrovirus or lentivirus [8]. However, if growth factor signaling allows $CD34^{+}$ cell transduction, it also drives their differentiation and most of all the loss of HSC properties such as quiescence and self-renewal.

Adult HSC are known to reside in specific microenvironment called niches which harbor a low level of oxygen (hypoxia), involved in the maintenance of HSC functional properties [9]. Hypoxia allows HSC to display a very low level of reactive oxygen species (ROS) [10]. These very reactive molecules are byproducts of mitochondrial respiration and can also be produced by NOX enzymes[11]. They induce oxidative stress and damages to the cells when their level is too high, but they also act as signaling molecules driving different intracellular mechanisms. Several mechanisms are used by cells to detoxify ROS generated both by physiological cues and by various stresses. In particular, several enzymes act in concert to limit the accumulation of highly reactive species: O_2^- is transformed in H_2O_2 by the superoxide dismutase (SOD) family, then different families (thioredoxins, peroxiredoxins, etc) can metabolize H_2O_2 to avoid its transformation into $HO^{\bullet}$ [11]. One major detoxification system uses glutaredoxins, which are oxidized during the process then turned back to their reduced form by the glutathione. These systems are fundamental because a ROS increase in HSC leads to differentiation and to a loss of their fundamental properties, inducing a decrease in their hematopoietic reconstitution capacities [12]–[14].

Therefore, when $CD34^{+}$ cells (and among them HSC) are cultured for gene therapy procedures, they partially lose their properties mostly due to an increase in ROS levels induced by normoxia conditions and growth factor signaling, which was shown to be detrimental as soon as during recovery of samples [15]. Several methods have been proposed to enhance HSC maintenance in these conditions. Most recent ones include culture in hypoxia [16], [17], in hydrophobic hydrogels [18] or use of small molecules like UM171 [19], [20]. In particular, hypoxia and hydrogels may work through ROS mitigation to prevent HSC properties loss. However, they could be uneasy to put in place in clinics and mechanisms of action are not always well characterized.

In our previous study, we have shown that pretreatment with antioxidants was able to protect HSC from ROS increase due to low-doses of irradiation [21]. We then hypothesized that treating HSC with antioxidants prior culture for gene therapy procedures could help maintaining HSC functional properties. We explored the effects of two different antioxidants, N-acetyl-cysteine (NAC), widely used for its antioxidant activity; and Tempol, a mimetic of the superoxide dismutase (SOD) enzymes, which has been shown to reduce oxidative stress on different organs and has been used to protect cells from radiation effects [22].

Materials and Methods

Cord blood samples

Cord blood (CB) samples were collected from healthy infants with the informed written consent of the mothers based on the declaration of Helsinki with the collaboration of Clinique des Noriets, Vitry, France and Cell Therapy Department of Hôpital Saint-Louis, Paris, France. $CD34^+$ cells were obtained through classical purification procedures. Briefly, a ficoll was performed on the blood. Mononucleated cells were numerated and CD34+ cells were purified by immuno-magnetic selection using a CD34 MicroBeads kit according to manufacturer instructions (Miltenyi Biotech, Paris, France). Cells were then either used right away or frozen (liquid nitrogen) in serum with 10% DMSO.

Cell culture and treatments

Transduction medium was composed of BIT medium (StemCell Technologies) supplemented with 100 ng/mL Stem Cell Factor (SCF), 100 ng/mL FLT3L, 60 ng/mL interleukin-3 (IL3) and 10 nM thrombopoïetin (TPO) (all from Miltenyi Biotec). For longer liquid culture experiments, we used StemSpan SFEM (StemCell Technologies) supplemented with 100 ng/mL SCF, 100 ng/mL FLT3L, 60 ng/mL IL3, 20 ng/mL IL6 and 50 ng/mL TPO. Before culture, cells were treated with N-acetylcystein (NAC) 50 µM (Sigma) or Tempol 300 µM (Sigma) diluted in water during 2 hours and washed, except when stated otherwise. When stated, VEGFα treatment (50 nM, BioTechne) was performed during the whole culture.

Colony Forming Unit in Culture (CFU-C) assay

CFU-C cultures were started with the progeny of 500 sorted HSPC cultured during two days in transduction medium in triplicates. They were seeded in 1 mL of methylcellulose medium H4435 (StemCell Technologies). After 12-14 days, colonies were numerated and identified. Plates with similar numbers and types of colonies were resuspended in warm PBS and 1% of the total recovered cells was seeded in secondary culture.

Long Term Culture Initiating Cells (LTC-IC) assay

After two days of culture, HSPC were put in culture in 96-well plates coated with MS5 stroma in Myelocult H5100 medium (StemCell Technologies). They were cultured during 5 weeks with weekly change of half of the medium. Cells were then recovered in each well and seeded in 500 µL of methylcellulose medium H4435. The presence of colonies was assessed after 10-12 days. For extended assays, HSPC were cultured in 6-well plates during five weeks with weekly change of half of the medium.

113 $CD34^+$ cells were sorted at the end of the five initial weeks then placed in culture in 96-well plates at
114 different concentrations in limiting dilution.

115 Transplantation experiments

116 NOD.Cg-Prkdc(scid) Il2rg(tm1Wjll)/SzJ (NSG) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) mice were
117 housed in the pathogen-free animal facility of IRCM, CEA, Fontenay-aux-Roses, France. Adult 8-12
118 weeks-old NSG mice received a 2,5 Gy sublethal irradiation using a GSRD1-irradiator (^{137}Cs source, GSM)
119 and were anesthetized with isoflurane before intravenous retro-orbital injection (i.v.) of human cells.
120 All experimental procedures were done in compliance with French Ministry of Agriculture regulations
121 (animal facility registration number: D9203202, APAFIS #20464-201904301501699) for animal
122 experimentation and in accordance with a local ethical committee (#44). $CD34^+$ were treated and
123 cultured during 2 days in the transduction medium before being numerated to be able to transplant the
124 exact same number of cells to each mouse. Mice were sacrificed after 12-16 weeks and bone marrow
125 (from femurs and tibias) and blood were harvested for analysis. In the case of secondary experiments,
126 the equivalent of 4.10^6 $hCD45^+$ cells were injected in each secondary recipient mice. For limiting dilution
127 experiments, $CD34^+$ cells were cultured in bulk during two days in transduction medium after pre-
128 treatment (or not) with NAC 50 µM or Tempol 300 µM. Total cells were then numerated and increasing
129 numbers (5 000, 10 000, 25 000 and 100 000) were injected i.v. to irradiated mice. Chimerism in bone
130 marrow was assessed after 12 to 16 weeks as previously described.

131 Microarray transcriptomic analysis

132 For the transcriptomic analysis, an Affymetrix Human Clariom D chip was used according to
133 manufacturer instructions. 3 samples of sorted HSPC from different pools of CB were used for each
134 condition. Results were analysed on Affymetrix TAC Software, GSEA and Molecular Signature.
135 Differentiel expression of genes was considered true when fold change was superior to 2 and p-value
136 inferior to 0.05.

137 Flow cytometry

138 Surface staining was performed for at least 15 min in the dark in room temperature before washing and
139 resuspending cells in PBS. Antibodies are listed in supplementary material. Hoescht and ZombiAqua
140 (Biolegend) were used as viability markers. Intracellular p38MAPK staining was done according to
141 manufacturer instructions for phospho-flow staining (BD Biosciences). Briefly, cells were fixed with Fix
142 Buffer I (BD Biosciences) for 10 min at 37°C then permeabilized using Perm Buffer II (BD Biosciences) for
143 1 hour on ice. Intracellular staining was then done in PBS with BSA and EDTA. Cells were generally
144 analyzed either on a BD Canto II or a BD LSR II SORP (5 lasers). Cell sorting was done on a BD Influx or a
145 BD Aria III SORP (5 lasers) (all from BD Biosciences). Experiments were analyzed using FlowJo software.

146 Metabolic assays

147 After staining with cell surface antibodies, cells were incubated either with TMRE (50 µM) and MTG (50
148 nM, Life Technologies) in PBS or with 2-NBDG (100 µM, Life Technologies) in glucose-free IMDM
149 medium (Gibco) during 30 min at 37°C and immediately analyzed on a BD Canto II or LSR-Fortessa FACS
150 analyzer.

151

152 ROS measurement

153 After staining with cell surface antibodies, CellRox Orange staining (Life Technologies) was performed
154 during 30 min at 37°C. The cells were then placed on ice and immediately analyzed on a BD CantoII FACS
155 analyzer. Pre-treatments with NAC or Tempol were performed during 1 hour prior to induction of ROS,
156 which was either made before CellRox Orange staining with TBHP () for 30 min. or in the last 15 min of
157 CellRox staining using H202 (100 µM).

158 For measurement with endogenously expressed probes, the lentiviral construct is provided in
159 supplementary material. $CD34^+$ cells were pre-treated with NAC or Tempol for 2 hours at 37°C then
160 placed in the presence of 10 MOI of lentivirus in transduction medium for 48 hours. Cells were then
161 recovered and washed extensively. Cells were cultured in expansion medium to assess ROS at different
162 timings of culture from d2 to d12 post transduction. Data were analyzed on a BD Canto II flow cytometer
163 looking at the emission around 510 nm from excitation at 405 and 488 nm (respectively with bandpass
164 filters 510/50 nm and 530/30 nm).

165 Immunofluorescence (IF)

166 HSPC were purified by cell sorting then treated or not with NAC 50 µM and Tempol 300 µM during two
167 hours and cultured two days in transduction medium before doing IF experiments. 10 000 fresh cells
168 were kept as control.

169 For NRF2 translocation experiments: cells were fixed in paraformaldehyde 4% for 15 min at room
170 temperature (RT) and washed in PBS. 10 000 HSPC were let to adhere on Poly-Prep slides (P0425-72EA,
171 Sigma) for at least 6 hours at 4°C in PBS with calcium and magnesium, then permeabilized using PBS
172 supplemented with bovine serum albumin (BSA, Sigma) 4 % + Triton ™ X-100 (Sigma) 0,2% for 15 min.
173 Cells were first incubated with the saturation buffer (PBS + BSA 4% + Tween (Sigma) 0,2%) for 45 min,
174 then stained with an anti-NRF2 antibody (ab31163, AbCam) overnight at 4°C in the same buffer, washed
175 3 times and finally stained with goat-anti-rabbit-AF647 (A-21244, LifeTechnologies) in PBS + Tween 0,2%
176 for at least 1 hour.

177 For assessment of 8-hydroxy-2'-deoxyguanisine (8-oxo-dG) lesions in DNA, cells were fixed in 1:1
178 methanol/acetone (-20°C) 5 min on ice. 10000 HSPC were let to adhere on Poly-Prep slides (P0425-
179 72EA, Sigma) at 4°C for at least 6 hours in PBS with calcium and magnesium. They were treated with HCl
180 2N (30 min), washed 3 times then neutralized with Tris-HCl pH 8,8 (5 min). Cells were permeabilized
181 using PBS + BSA 4 % + Triton 0,2% for 15 min. Cells were first incubated 45 min with the saturation
182 buffer (PBS + BSA 4% + Tween 0,2%) for 45 min, then stained with an anti-8-oxo-dG antibody (ab48508,
183 AbCam) overnight at 4°C in the same buffer, washed 3 times and finally stained with goat-anti-mouse-
184 AF647 (A-21235, LifeTechnologies) in PBS + Tween 0,2% for at least 1 hour.

185 In both cases, after 3 rounds of washing, staining with DAPI 1/2000 in PBS + Tween 0,2% was performed
186 (5 min). Sealing of the slides was done using Fluoromount-G (Southern Biotech). Reading was done on
187 the Leica TCS SP8 confocal microscope.

188 qPCR

189 qPCR was performed with commercially available Taqman assays in FAM-MGB (ThermoFisher) on a
190 StepOne Plus thermocycler (ThermoFisher).

191 Statistics

192 Statistical analyses were performed on Prism Software using predefined tests. Limiting dilutions
193 analyses *in vivo* and *in vitro* were analyzed using L-Calc software. In all the results, significance is stated
194 with stars according to: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

195

196 Results

197 Tempol decreases oxidative stress

198 First, the antioxidant effect of NAC and Tempol on ROS level in HSC was characterized, at the
199 concentration 50 nM and 300 nM respectively. To do so, $CD34^+$ cells were pretreated with NAC or
200 Tempol before inducing oxidative stress with Tert-butyl-hydroperoxyde (TBHP) and measuring ROS
201 levels with CellRox Orange staining. NAC but mostly Tempol inhibited ROS increase induced by pro-
202 oxidant molecule TBHP (Figure 1A). However, after two days of culture in transduction medium, no
203 significant decrease in ROS in NAC and Tempol pretreated HSPC could be evidenced (Figure 1B). Of note,
204 levels of ROS are known to be very low in this population, so we believe this result could be due to a
205 lack of sensitivity of this probe when ROS levels are too weak. To circumvent this, other techniques were
206 implemented to highlight their antioxidant action. First, we used another type of genetically encoded
207 ROS probe, mito-Grx1-roGFP2, expressed by $CD34^+$ cells after lentiviral transduction[23], [24]. This
208 probe is specific of the oxidation status of GRX1 protein and thus of glutathione, and is addressed to the
209 mitochondria. Cells were transduced with the lentivirus for two days after the antioxidant treatment
210 and the oxidation status was monitored at several time points of culture. The addition of Tempol during
211 the whole culture (chronic Tempol) was also evaluated. NAC having a very short half-life (less than a few
212 hours), we did not investigate its effect in chronic treatment. As positive and negative controls, cells
213 were treated with the oxidant and reducing agents, H_2O_2 and DTT respectively. The frequency of
214 oxidized fraction increased and decreased respectively as expected (Figure S1A). However, as seen with
215 CellRox Orange, in all conditions very few cells were in an oxidized state (Figure 5C) at d2. During culture,
216 the oxidized fraction increased a little over time, which was inhibited by chronic treatment with Tempol
217 and at a lesser extent with pre-treatment (Figure 1C-D). Of note, NAC and Tempol did not alter lentiviral
218 transduction efficiency (Figure S1B). To fully demonstrate the effect of antioxidants in inhibiting ROS
219 production, we analyzed the expression of different antioxidant genes performing an "antioxidogram"
220 which provides a synthetic view of many antioxidant pathways activation [25]. Oxidative stress was
221 induced in HSPC cultured 2 days (black bold line) in transduction medium compared to uncultured HSPC
222 (dashed line), since many antioxidant proteins were significantly overexpressed compared to uncultured
223 cells (Figure 5E). On the contrary, the curves of NAC and Tempol pretreated cells were globally shifted
224 down compared to untreated one, many of these genes being down-regulated. Their expression levels
225 were then not statistically different from the basal level of uncultured cells (Figure 1E). This indicated
226 that NAC and Tempol were able to preserve low oxidative stress, mostly comparable between
227 antioxidant-treated d2 and d0 HSPC. However, no difference in NRF2 translocation nor DNA oxidative
228 damage by 8-oxo-dG staining could be detected between treated and untreated samples (Figure S1C-
229 F). Plus, unexpectedly, a decrease of 8-oxo-dG staining was even visible at day 2 compared to fresh cells.
230 We hypothesize the timing may not be adequate and that this type of damages may not be visible after
231 two days of culture; or that sorting may have triggered additional stress and damage to uncultured cells,

232 repaired afterwards. Altogether, these results showed that Tempol and NAC did preserve d2 HSPC from
233 the increase of oxidative stress during culture.

234 Antioxidants increase HSC maintenance of immaturity features during culture

235 To understand how the antioxidants can protect HSPC *ex vivo*, several parameters were monitored, such
236 as immaturity cell surface marker, proliferation, cell division rate or mitochondrial activity, at different
237 time points of liquid culture after pretreatment with NAC and Tempol. Considering the effect of chronic
238 pretreatment with Tempol on ROS levels during culture, this condition was added too. As expected, a
239 progressive loss of immaturity markers such as CD34 and CD90 was observed during culture (Figure 2A).
240 Chronic treatment with Tempol induced a decrease in the proliferation capacities of $CD34^+$ cells and
241 sorted HSPC, which was not seen after Tempol pretreatement (Figure 2B). This was not due to toxicity
242 (not shown), but rather to a decrease of cells cycling activity, as shown by CFSE staining (Figure 2C).
243 Although quiescence is a characteristic of HSC, since the goal was not to decrease the number of cells
244 to be recovered at the end of the culture for potential clinical applications in transplantation, we chose
245 not to continue with chronic exposure to Tempol, but rather used the pretreatment strategy. Plus, pre-
246 treatment with Tempol still allowed an increase of the frequency of phenotypic HSPC during culture
247 (Figure 2D), with no impact on the cell cycle at day 2 (Figure 2E) and thus on the number of cells
248 recovered in both media (Figure S1C). NAC had roughly no effect on neither the proliferation nor the
249 maintenance of the phenotype (Figure 2D and S1G). Since ROS levels can be related to mitochondria
250 function and given that metabolic status is an important component of HSC quiescence and self-renewal
251 properties, mitochondrial activation was also monitored in NAC and Tempol pretreated conditions. We
252 noticed a slow decrease of the mitochondrial potential, measured using TMRE probe, throughout
253 culture in Tempol-treated cells (Figure 5F). At day 7, mitochondria in Tempol-treated cells were
254 significantly less active than untreated counterparts. Of note, after only 2 days of culture, no difference
255 was detected. However, no effect of antioxidants could be evidenced concerning the mitochondrial
256 mass and the glucose uptake (Figure S1H-I).

257 Antioxidants improve functional capacities *in vitro*

258 To investigate the impact of antioxidants on HSC functional capacities, we performed CFU-C
259 experiments with 2 days-cultured (d2) HSPC and replated them serially. HSPC were sorted accorded to
260 usual gating for $CD34^+CD38^{-/low}CD45RA^-CD90^+$ (Figure S2A) In primary cultures, the number of colonies
261 generated was equivalent in all conditions (Figure 3A). However, in secondary cultures, a significant
262 increased number of colonies was generated (Figure 3B-C), up to 2 times when HSPC were pre-treated
263 with Tempol prior culture. This suggested either a better preservation of immature progenitor cells or
264 an increased self-renewal potential of HSC, giving rise to a larger number of differentiated cells on
265 secondary replatings. Of note, no bias in the type of CFU-C was observed, demonstrating that neither
266 NAC nor Tempol impacted HSPC differentiation (Figure S2B-C). Plus, no further beneficial effect of
267 chronic treatment with Tempol was obtained compared to pretreatment (data not shown). Therefore,
268 LTC-IC assay was performed to assess the effect of antioxidants on the frequency of the most immature
269 cells. After 5 weeks in LTC-IC conditions, the frequencies of LTC-IC in Tempol d2 and NAC d2 HSPC
270 populations were increased compared to d2 non treated HSPC subset, being closer to frequencies
271 obtained with uncultured HSPC (Figure 3D). To evaluate the capacity of these cells to self-renew, the
272 similar experiment was conducted but with extended culture period (10 weeks). After the 5 first weeks

273 of culture in bulk, CD34$^+$ cells were purified (Figure S2D) by cell sorting and seeded in limiting dilution
274 for 5 more weeks. After this total of 10 weeks of culture, the LTC-IC frequency rose up to 50% for Tempol
275 d2 HSPC compared to untreated ones (Figure 3E).

276 Antioxidants allow a better engraftment *in vivo*

277 To confirm these results, transplantations *in vivo* using NSG mice irradiated sublethally (2,5 Gy) were
278 performed. CD34$^+$ cells were first pre-treated or not with antioxidant and cultured 2 days in transduction
279 medium. First, low numbers of cultured CD34$^+$ (10.000 to 25.000 depending on experiments) were
280 transplanted to assess the primary reconstitution ability (Figure 4A). Mice were sacrificed after 12 to
281 16 weeks to assess the long-term reconstitution potential by looking at human chimerism with CD45
282 staining (Figure S3A). d2 HSPC failed to generate as efficiently as d0 HSPC human hematopoietic cell in
283 NSG mouse BM. HSPC treatment with antioxidants partially rescued HSC abilities to engraft into NSG
284 mice (Figure 4B). Neither a myeloid nor a lymphoid bias were detectable (Figure S2B-C). However, using
285 classical HSPC markers, a tendency to a higher percentage of HSPC in the mice receiving antioxidant-
286 treated d2 CD34$^+$ were observed, suggesting that antioxidants partially preserved the hematopoietic
287 reconstitution potential of HSPC during the 2 days culture step (Figure 4C). To further prove the benefits
288 of antioxidants on HSC self-renewal abilities, serial transplantation assay was performed. For primary
289 transplantation, a high number of CD34$^+$ cells was transplanted (100.000 to 250.000) to ensure a robust
290 chimerism and secondary transplantation feasibility (Figure S2G). We then transplanted whole bone
291 marrow containing 4 million of hCD45$^+$ cells in each secondary recipient (Figure 4D). Unfortunately,
292 secondary grafts are not easily done in NSG mice, and we were able to obtain only one positive
293 experiment (Figure 4E). Though, looking at the chimerism level, we noticed a benefit of especially
294 Tempol on the secondary engraftment capacities of cultured CD34$^+$ cells, suggesting an improvement
295 of their self-renewal capacities (Figure 4E). The same kind of tendency about the percentage of HSC was
296 observed, although not statistically significant (Figure 4F). However, performing limiting dilution
297 analyses in vivo, we were not able to demonstrate an increase in SCID repopulating cells (SRC) frequency
298 although the chimerism was higher for a same given dose of cell in antioxidant treated conditions (Figure
299 S2H-I).

300 Culture in cytokines-enriched medium does induce major changes in HSC transcriptomic profile.

301 In order to understand the effects of the antioxidants on d2 cultured HSC, we performed transcriptomic
302 analysis using CLARIOM D microarray technology. In this purpose, HSPC were purified by cell sorting
303 based on the CD34$^+$CD38$^-$CD45RA$^-$CD90$^+$ phenotype. We compared the transcriptional profile of d2
304 untreated, d2 Tempol and d2 NAC-treated HSPC along with uncultured HSPC. As expected, d2 untreated
305 and d0 HSPC clustered separately in principal component analysis (Figure 5A), revealing different
306 transcriptomic landscapes. 14831 genes were differentially regulated after the culture (Figure 5B-C).
307 This analysis provided the confirmation that 2 days in culture induced oxidative stress in HSPC. Indeed,
308 when performing a Gene Ontology analysis on GSEA software, numerous pathways upregulated after 2
309 days of culture were uncovered related to cell cycle, DNA damage, or ROS production (Figure 5D). On
310 the contrary, signatures related to hypoxia were downregulated in d2 HSPC. Using gene sets specific of
311 HSC signatures published elsewhere [26]–[30], we could highlight a significant loss of these signatures
312 in d2 HSPC demonstrating that culturing 2 days HSPC led to switching on cell cycle activation and
313 oxidative stress programs while switching off stemness ones. (Figure 5E-F). These results confirmed the

314 hypothesis that *ex vivo* culture drove the loss of quiescence, cell cycle entry and differentiation of HSC,
315 possibly via production of ROS.

316 ### Tempol may act through p38MAPK inactivation and intracrine regulation by VEGF

317 We also analyzed the transcriptomic differences between untreated and Tempol-treated HSC cultured
318 during 2 days. Few genes were differentially expressed and we could not highlight major differences
319 performing GSEA analyzes (Figure S3G). However, one gene drew our attention: VEGFA was significantly
320 more expressed after treatment with Tempol compared to untreated samples (Figure 6C). This result is
321 interesting considering the different papers highlighting the role of VEGF signaling in HSC [31], [32]. To
322 further validate this, we performed qPCR and confirmed the result (Figure 6D). We also checked for the
323 expression of VEGF receptor 2 (VEGFR2) at HSC surface at different time-points in culture, in
324 transduction and expansion media. Interestingly, its expression was drastically downregulated upon
325 chronic treatment with Tempol during the whole culture (Figure 6E). This effect was not visible after
326 only a pre-treatment. We hypothesized that this could be due to a more important intracellular
327 production that would make unnecessary the expression of this receptor on the cell surface. Surprisingly
328 though, supplementation with VEGF during the culture did not induce changes in the expression of
329 VEGFR (Figure 6E) nor the expression of immaturity markers CD34 and CD90 (Figure 6F). Thus we
330 wanted to see if supplementation with VEGF still could mimic the functional effects of Tempol or not.
331 To do so, we performed CFU-C experiments with VEGF treatment. Alike Tempol, but to a lesser extent,
332 this treatment led to an increase in colony generation in secondary culture, and hence in HSC long-term
333 functional properties (Figure 6G). This may suggest that VEGFα is not the only actor in Tempol effect.

334 Indeed, after 2-days of culture, a significant decrease of the phosphorylation of p38MAPK in
335 antioxidants pre-treated cells was evidenced (Figure 6A-B). This result strengthens the message that
336 ROS level is reduced by antioxidant treatments, since p38MAPK was shown to be involved in ROS
337 response [13], [21], but also provides a candidate pathway to explain the improvement of HSC
338 functionality.

339

340 ## Discussion

341 Our results provide a proof of concept that antioxidant treatment may be a valid strategy to prevent
342 HSC loss during *ex vivo* culture for gene therapy protocols. Indeed, NAC and Tempol harbor potent
343 antioxidant activity and induce a decrease of oxidative stress endured by HSC after two days of culture.
344 This has beneficial consequences on phenotypic features of immaturity, such as surface markers and
345 low mitochondrial activity, and on HSC functional capacities. Indeed, antioxidant pre-treatment
346 enhanced *in vitro* generation of CFU-C, increased frequency of LTC-IC and rescued the loss of
347 hematopoietic reconstitution abilities induced by culture in an immunodeficient mouse model. We also
348 evaluated the consequences of culture on HSC transcriptome, confirming that cell cycle entry and
349 oxidative stress are the major drivers of the loss of functionality witnessed. Finally, it was demonstrated
350 that antioxidant effects are mediated at least in part by inhibition of p38MAPK pathway and increase of
351 VEGFα signaling during culture. Hence, we believe it is worth using antioxidant to ameliorate HSC
352 maintenance during culture for lentiviral transduction.

Using ROS inhibition is a strategy that has also been evaluated by other groups. Hypoxia was for a long-time a well studied method to avoid ROS increase in HSC transplantation. Indeed it has been shown by many groups that hypoxia preserves HSC, both during the culture, and immediately at the time of HSC collection. However, working in hypoxia may be difficult to apply in clinics. The idea of working with antioxidants was proposed more than 10 years ago with suggestions such as GSH during collection or acid ascorbic derivatives during culture [33]. Plus, several other teams demonstrated a beneficial impact of reduction of ROS. For instance, adding cyclosporin right at the moment of CB harvesting could help reducing ROS levels and protecting HSC [15]. Plus, a nice study in which HSC were culture in hydrophilic gels, with drastic increase in their number without differentiation, also witnessed a significant decrease in ROS levels in their system [18]. Recently, another team identified a small molecule compounds with antioxidant properties, Chrysin, which could also help to preserve HSC during *ex vivo* culture [34].

Futhermore, we have shown that culture induces major changes in HSC transcriptomic landscape. In particular, we found that some genes involved in epigenetic modifications, such as TET2 and DNMT3B, were differentially expressed. While no normalization of the expression of these genes could be observed after only two days of culture, it is tempting to believe they, or other proteins involved in epigenetic modifications, could be targets of antioxidants. Indeed, only a short contact with antioxidants triggers long lasting functional effects, suggesting reprogramming towards “stemness” (or lack of reprogramming towards differentiation). This relates to the fact that it is now more and more known that epigenetic modifications are involved in HSC fate and properties [35], [36] and even in HSC maintenance *ex vivo* [37]. For instance, a recent paper focusing on calcium concentrations modulation to improve HSC expansion demonstrated an implication of TET2 in the observed effects [38]. Thus, it would be interesting to focus on eventual epigenetic modifications triggered by antioxidants and to combine Tempol with epigenetic modifiers to see if they could synergize.

To finish with, while this study has mainly been completed on CB HSPC, we believe it might be applicable to other types of HSC such as bone marrow or peripheral blood HSC. Indeed, it is well known that adult HSC are less efficient for reconstituting the hematopoietic system compared to CB HSC [39]. However, bone marrow or peripheral blood $CD34^+$ are the cells used in the case of autologous graft and gene therapy for instance. It is then worth trying to preserve these cells as well. In addition, increase of ROS and p38MAPK activation are often linked to HSC aging [40], [41]. It would then be even more important to protect these cells from further oxidative stress to optimize gene therapy protocols.

Altogether, these results confirm that NAC treatment is helpful for HSC maintenance [42] and propose Tempol as well as a novel antioxidant agent for HSC protection. Since Tempol is recently more and more studied for its protective effects in a wide range of pathologies[43]–[45], it might be interesting now to validate its action into clinics and to approve it as a treatment for oxidative stress related disorders.

Acknowledgments

We acknowledge the midwives from Clinique des Noriets in Vitry-sur-Seine and the Cell therapy department of Hôpital Saint Louis in Paris, France, especially Prof J. Larghero, for providing cord blood samples free of charge and the families who accepted to donate the samples to research purposes. This work was made possible thanks to multiple platforms (Flow cytometry, Microscopy, Irradiation,

Microarray and animal facilities) of IRCM, Fontenay-aux-Roses, France. We are thus grateful to C Devanand, N Dechamps, D Lewandowski and A Chicheportiche for their great technical help during this project. A special thanks to V Ménard for her devoted work at the irradiation platform from IRCM. We are grateful for D Busso and G Piton from Cigex platform who designed, constructed and produced the lentiviruses we used. This study was supported by grants from INSERM, CEA (Segment Radiobiologie), Ligue Nationale contre le Cancer, Cordons de Vie, and by the EUR G.E.N.E (ref #ANR-17-EURE-0013) and is part of the Université de Paris IdEx #ANR—18-IDEX-0001 funded by the French Government through its "Investments for the Future" program. E Henry is a PhD fellow from Ligue Nationale contre le Cancer and a doctoral Mentor of the EUR G.E.N.E.

Contributions

ML Arcangeli and O Hérault designed experiments. E Henry, F Picou and ML Arcangeli performed and analyzed experiments. V Barroca performed *in vivo* experiments. S Sobrino provided transcriptomic analyses of microarray data. E Six, O Hérault and F Pflumio provided scientific advice and critical look at the study. E Henry and ML Arcangeli wrote the manuscript. ML Arcangeli supervised the whole study.

References

[1] S. Doulatov, F. Notta, E. Laurenti, et J. E. Dick, « Hematopoiesis: a human perspective », *Cell Stem Cell*, vol. 10, n° 2, p. 120-136, févr. 2012, doi: 10.1016/j.stem.2012.01.006.

[2] R. Majeti, C. Y. Park, et I. L. Weissman, « Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood », *Cell Stem Cell*, vol. 1, n° 6, p. 635-645, déc. 2007, doi: 10.1016/j.stem.2007.10.001.

[3] S. Pinho et P. S. Frenette, « Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 20, n° 5, p. 303-320, mai 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0103-9.

[4] T. Tsuruta, « Recent Advances in Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy », *Innov. Stem Cell Transplant.*, févr. 2013, doi: 10.5772/53587.

[5] E. Hatzimichael et M. Tuthill, « Hematopoietic stem cell transplantation », *Stem Cells Cloning Adv. Appl.*, vol. 3, p. 105-117, août 2010, doi: 10.2147/SCCAA.S6815.

[6] S. Scala et A. Aiuti, « In vivo dynamics of human hematopoietic stem cells: novel concepts and future directions », *Blood Adv.*, vol. 3, n° 12, p. 1916-1924, 25 2019, doi: 10.1182/bloodadvances.2019000039.

[7] C. G. Brunstein et J. E. Wagner, « Umbilical cord blood transplantation and banking », *Annu. Rev. Med.*, vol. 57, p. 403-417, 2006, doi: 10.1146/annurev.med.57.051804.123642.

[8] M. Millington, A. Arndt, M. Boyd, T. Applegate, et S. Shen, « Towards a Clinically Relevant Lentiviral Transduction Protocol for Primary Human CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells », *PLoS ONE*, vol. 4, n° 7, p. e6461, juill. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0006461.

[9] P. Imanirad et E. Dzierzak, « Hypoxia and HIFs in regulating the development of the hematopoietic system », *Blood Cells. Mol. Dis.*, vol. 51, n° 4, p. 256-263, déc. 2013, doi: 10.1016/j.bcmd.2013.08.005.

[10] Y.-Y. Jang et S. J. Sharkis, « A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche », *Blood*, vol. 110, n° 8, p. 3056-3063, oct. 2007, doi: 10.1182/blood-2007-05-087759.

[11] M. Schieber et N. S. Chandel, « ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress », *Curr. Biol. CB*, vol. 24, n° 10, p. R453-R462, mai 2014, doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.

[12] Z. Tothova *et al.*, « FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress », *Cell*, vol. 128, n° 2, p. 325-339, janv. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.01.003.
[13] K. Ito *et al.*, « Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells », *Nat. Med.*, vol. 12, n° 4, p. 446-451, avr. 2006, doi: 10.1038/nm1388.
[14] K. Ito *et al.*, « Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells », *Nature*, vol. 431, n° 7011, p. 997-1002, oct. 2004, doi: 10.1038/nature02989.
[15] C. R. Mantel *et al.*, « Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock », *Cell*, vol. 161, n° 7, p. 1553-1565, juin 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.04.054.
[16] M. G. Cipolleschi, P. Dello Sbarba, et M. Olivotto, « The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells », *Blood*, vol. 82, n° 7, p. 2031-2037, oct. 1993.
[17] F. Hermitte, P. Brunet de la Grange, F. Belloc, V. Praloran, et Z. Ivanovic, « Very low O2 concentration (0.1%) favors G0 return of dividing CD34+ cells », *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 24, n° 1, p. 65-73, janv. 2006, doi: 10.1634/stemcells.2004-0351.
[18] T. Bai *et al.*, « Expansion of primitive human hematopoietic stem cells by culture in a zwitterionic hydrogel », *Nat. Med.*, vol. 25, n° 10, p. 1566-1575, 2019, doi: 10.1038/s41591-019-0601-5.
[19] I. Fares *et al.*, « Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal », *Science*, vol. 345, n° 6203, p. 1509-1512, sept. 2014, doi: 10.1126/science.1256337.
[20] S. Cohen *et al.*, « Hematopoietic stem cell transplantation using single UM171-expanded cord blood: a single-arm, phase 1-2 safety and feasibility study », *Lancet Haematol.*, vol. 7, n° 2, p. e134-e145, févr. 2020, doi: 10.1016/S2352-3026(19)30202-9.
[21] E. Henry *et al.*, « Human hematopoietic stem/progenitor cells display reactive oxygen species-dependent long-term hematopoietic defects after exposure to low doses of ionizing radiations », *Haematologica*, vol. 105, n° 8, p. 2044-2055, août 2020, doi: 10.3324/haematol.2019.226936.
[22] L. Ramachandran et C. K. Nair, « Radioprotection by tempol: studies on tissue antioxidant levels, hematopoietic and gastrointestinal systems, in mice whole body exposed to sub- lethal doses of gamma radiation », *Iran J Radiat Res*, vol. 10, n° 1, p. 1-10, 2012.
[23] B. Morgan, M. C. Sobotta, et T. P. Dick, « Measuring EGSH and H2O2 with roGFP2-based redox probes », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, n° 11, p. 1943-1951, déc. 2011, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.035.
[24] D. Fernandez-Antoran *et al.*, « Outcompeting p53-Mutant Cells in the Normal Esophagus by Redox Manipulation », *Cell Stem Cell*, vol. 25, n° 3, p. 329-341.e6, 05 2019, doi: 10.1016/j.stem.2019.06.011.
[25] F. Picou *et al.*, « Bone marrow oxidative stress and specific antioxidant signatures in myelodysplastic syndromes », *Blood Adv.*, vol. 3, n° 24, p. 4271-4279, 23 2019, doi: 10.1182/bloodadvances.2019000677.
[26] E. Laurenti *et al.*, « The transcriptional architecture of early human hematopoiesis identifies multilevel control of lymphoid commitment », *Nat. Immunol.*, vol. 14, n° 7, p. 756-763, juill. 2013, doi: 10.1038/ni.2615.
[27] N. Cabezas-Wallscheid *et al.*, « Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy », *Cell*, vol. 169, n° 5, p. 807-823.e19, mai 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.04.018.
[28] A.-C. Villani *et al.*, « Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors », *Science*, vol. 356, n° 6335, 21 2017, doi: 10.1126/science.aah4573.
[29] L. Velten *et al.*, « Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process », *Nat. Cell Biol.*, vol. 19, n° 4, p. 271-281, 2017, doi: 10.1038/ncb3493.
[30] N. Novershtern *et al.*, « Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis », *Cell*, vol. 144, n° 2, p. 296-309, janv. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.01.004.

489 [31] H.-P. Gerber *et al.*, « VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine
490 loop mechanism », *Nature*, vol. 417, n° 6892, p. 954-958, juin 2002, doi: 10.1038/nature00821.
491 [32] K. Kirito, N. Fox, N. Komatsu, et K. Kaushansky, « Thrombopoietin enhances expression of
492 vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of
493 HIF-1alpha », *Blood*, vol. 105, n° 11, p. 4258-4263, juin 2005, doi: 10.1182/blood-2004-07-2712.
494 [33] Y. Hao, D. Cheng, Y. Ma, W. Zhou, et Y. Wang, « Antioxidant intervention: A new method for
495 improving hematopoietic reconstitution capacity of peripheral blood stem cells », *Med.*
496 *Hypotheses*, vol. 76, n° 3, p. 421-423, mars 2011, doi: 10.1016/j.mehy.2010.11.008.
497 [34] Y. Li *et al.*, « Antioxidant Small Molecule Compound Chrysin Promotes the Self-Renewal of
498 Hematopoietic Stem Cells », *Front. Pharmacol.*, vol. 11, p. 399, 2020, doi:
499 10.3389/fphar.2020.00399.
500 [35] C. Iancu-Rubin et R. Hoffman, « Role of epigenetic reprogramming in hematopoietic stem cell
501 function », *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 22, n° 4, p. 279-285, juill. 2015, doi:
502 10.1097/MOH.0000000000000143.
503 [36] S. Sharma et G. Gurudutta, « Epigenetic Regulation of Hematopoietic Stem Cells », *Int. J. Stem*
504 *Cells*, vol. 9, n° 1, p. 36-43, mai 2016, doi: 10.15283/ijsc.2016.9.1.36.
505 [37] P. Chaurasia, D. C. Gajzer, C. Schaniel, S. D'Souza, et R. Hoffman, « Epigenetic reprogramming
506 induces the expansion of cord blood stem cells », *J. Clin. Invest.*, vol. 124, n° 6, p. 2378-2395, juin
507 2014, doi: 10.1172/JCI70313.
508 [38] L. L. Luchsinger *et al.*, « Harnessing Hematopoietic Stem Cell Low Intracellular Calcium Improves
509 Their Maintenance In Vitro », *Cell Stem Cell*, vol. 25, n° 2, p. 225-240.e7, 01 2019, doi:
510 10.1016/j.stem.2019.05.002.
511 [39] T. L. Holyoake, F. E. Nicolini, et C. J. Eaves, « Functional differences between transplantable
512 human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow », *Exp. Hematol.*,
513 vol. 27, n° 9, p. 1418-1427, sept. 1999, doi: 10.1016/s0301-472x(99)00078-8.
514 [40] T. Yahata *et al.*, « Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of
515 human hematopoietic stem cells », *Blood*, vol. 118, n° 11, p. 2941-2950, sept. 2011, doi:
516 10.1182/blood-2011-01-330050.
517 [41] J. Lee, S. R. Yoon, I. Choi, et H. Jung, « Causes and Mechanisms of Hematopoietic Stem Cell
518 Aging », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, n° 6, mars 2019, doi: 10.3390/ijms20061272.
519 [42] L. Hu *et al.*, « Antioxidant N-acetyl-L-cysteine increases engraftment of human hematopoietic
520 stem cells in immune-deficient mice », *Blood*, vol. 124, n° 20, p. e45-48, nov. 2014, doi:
521 10.1182/blood-2014-03-559369.
522 [43] M. G. Ewees, B. A. S. Messiha, M. S. Abdel-Bakky, A. M. A. Bayoumi, et A. A. Abo-Saif, « Tempol, a
523 superoxide dismutase mimetic agent, reduces cisplatin-induced nephrotoxicity in rats », *Drug*
524 *Chem. Toxicol.*, vol. 42, n° 6, p. 657-664, nov. 2019, doi: 10.1080/01480545.2018.1485688.
525 [44] D. V. Nunes *et al.*, « Tempol, a superoxide dismutase-mimetic drug, prevents chronic ischemic
526 renal injury in two-kidney, one-clip hypertensive rats », *Clin. Exp. Hypertens. N. Y. N 1993*, vol.
527 40, n° 8, p. 721-729, 2018, doi: 10.1080/10641963.2018.1425423.
528 [45] Y. Wang *et al.*, « Tempol alleviates chronic intermittent hypoxia-induced pancreatic injury
529 through repressing inflammation and apoptosis », *Physiol. Res.*, vol. 68, n° 3, p. 445-455, 30
530 2019, doi: 10.33549/physiolres.934010.
531

532 ## Figure Legends

533 **Figure 1: Antioxidants decrease ROS and oxidative stress response.**

534 A. CellRox Orange staining of $CD34^+$ cells after treatment with pro and antioxidants: demonstration of
535 the antioxidant activity of NAC and Tempol. B. CellRox Orange staining of $CD34^+$ cells after 2 days of
536 culture, gating on $CD34^+CD45RA^-CD90^+CD133^+$ cells C. Dot plots showing distribution of cells between
537 oxidized and reduced state. D. Quantification of oxidized vs reduced cells during culture. Ratio of % of

538 cells in an oxidized state (fluorescence excitation at 405 nm) over % of cells in a reduced state
539 (fluorescence excitation at 488 nm) overtime. Log_{10} scale. Kruskall-Wallis test for each day. E.
540 Antioxidogram displaying the relative expression of antioxidant genes determined by qPCR compared
541 to fresh cells. Grey zone: no significant difference. Dashed lines: genes being differentially expressed in
542 cultured cells compared to fresh cells.

543 Figure 2: Antioxidants improve maintenance at immaturity markers.

544 A. Gating strategy and progressive loss of CD34 and CD90 markers during culture. B. Comparison of
545 $CD34^+$ cell growth in expansion medium between pre-treatment and chronic treatment with Tempol
546 300 µM. C. CFSE staining of sorted HSPC treated with chronic Tempol 300 µM compared to untreated
547 cells. One representative example out of 3 independent experiments. D. % of HSC still harboring CD34,
548 CD90 and CD133 markers after indicated days of culture relative to untreated condition. n>5,
549 Kruskall&Wallis test for each day. E. % of cells in each cell cycle state determined by Ki67 and Hoescht
550 staining. F. % of TMRE positive cells after several days in liquid culture. n=4, 2 way-ANOVA test.

551 Figure 3: Antioxidants improve long-term *in vitro* HSC functionality.

552 A. Primary CFU-C: 500 cells were seeded per plate in triplicate. n=5. B. Secondary CFU-C: 1% of total
553 cells of equivalent primary plates were seeded in triplicate. n=5, Mann&Whitney test. C. Photos of
554 secondary CFU-C plates. One representative example out of triplicates from 5 experiments. D.
555 Representation of negative wells % from normal LTC-IC in limiting dilution (5 weeks) and quantification
556 of LTC-IC frequency. n=3. E. Representation of negative wells % from extended LTC-IC (10 weeks) in
557 limiting dilution and quantification of LTC-IC frequency. n=3.

558 Figure 4: Antioxidants improve HSC reconstitution capacity in vivo and self-renewal.

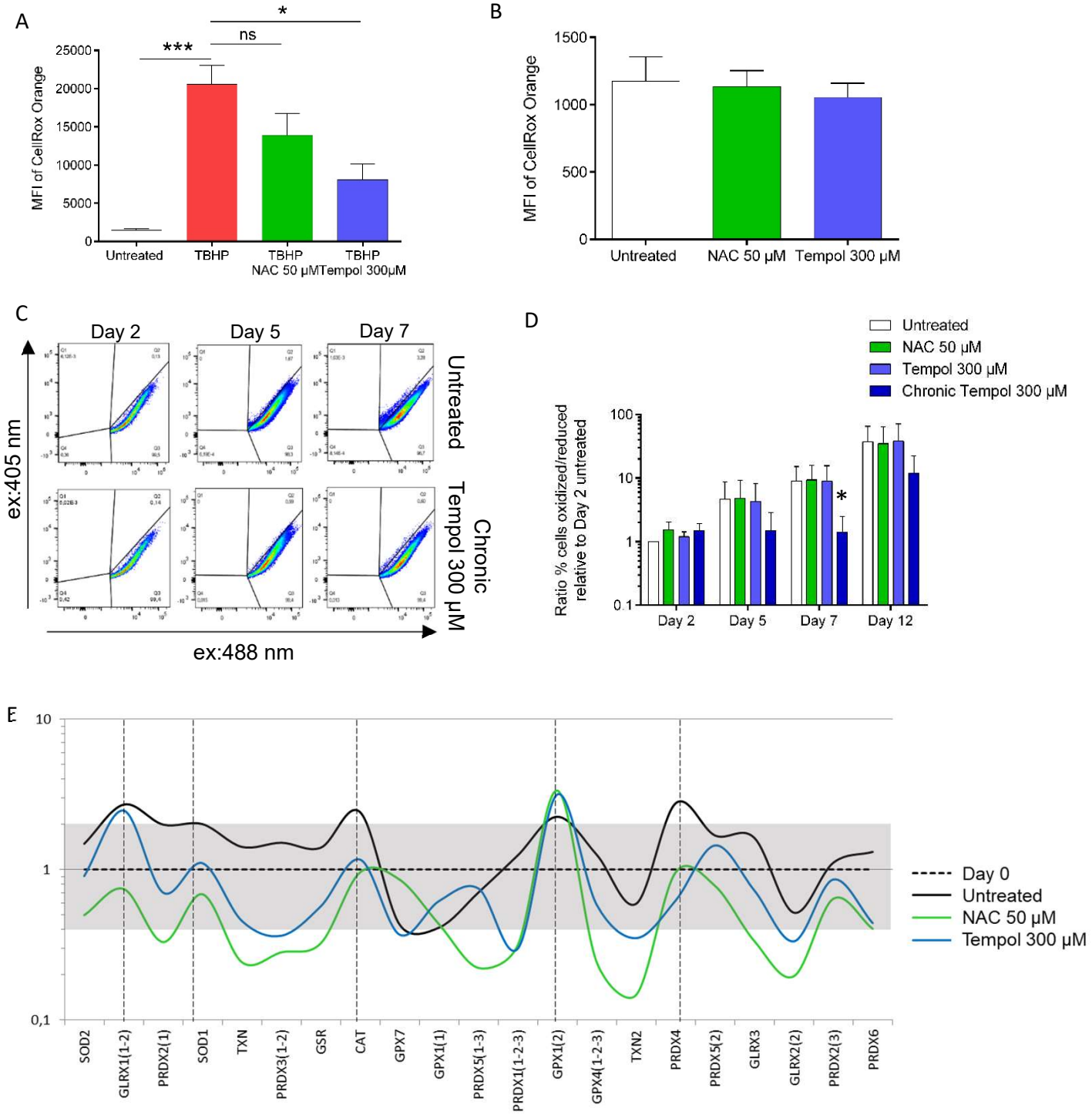
559 A. Schematic representation of the transplantation procedure for evaluation of the primary
560 hematopoietic reconstitution capacities. B. % of human bone marrow chimerism obtained after 12 to
561 16 weeks. n=4. C. % of phenotypic HSPC ($CD34^+CD38^{low}CD45RA^-CD90^+$) in human cells recovered from
562 the bone marrow. n=4 D. Schematic representation of the transplantation procedure for the evaluation
563 of serial reconstitution capacities and self-renewal. E. % of human bone marrow chimerism obtained in
564 secondary transplantation after 12 to 16 weeks. n=1. F. % of phenotypic HSPC ($CD34^+CD38^{low}CD45RA^-$
565 $CD90^+$) in human cells recovered from the bone marrow after the secondary transplantation. n=1.

566 Figure 5: 2-day culture does induce major differences in gene expression

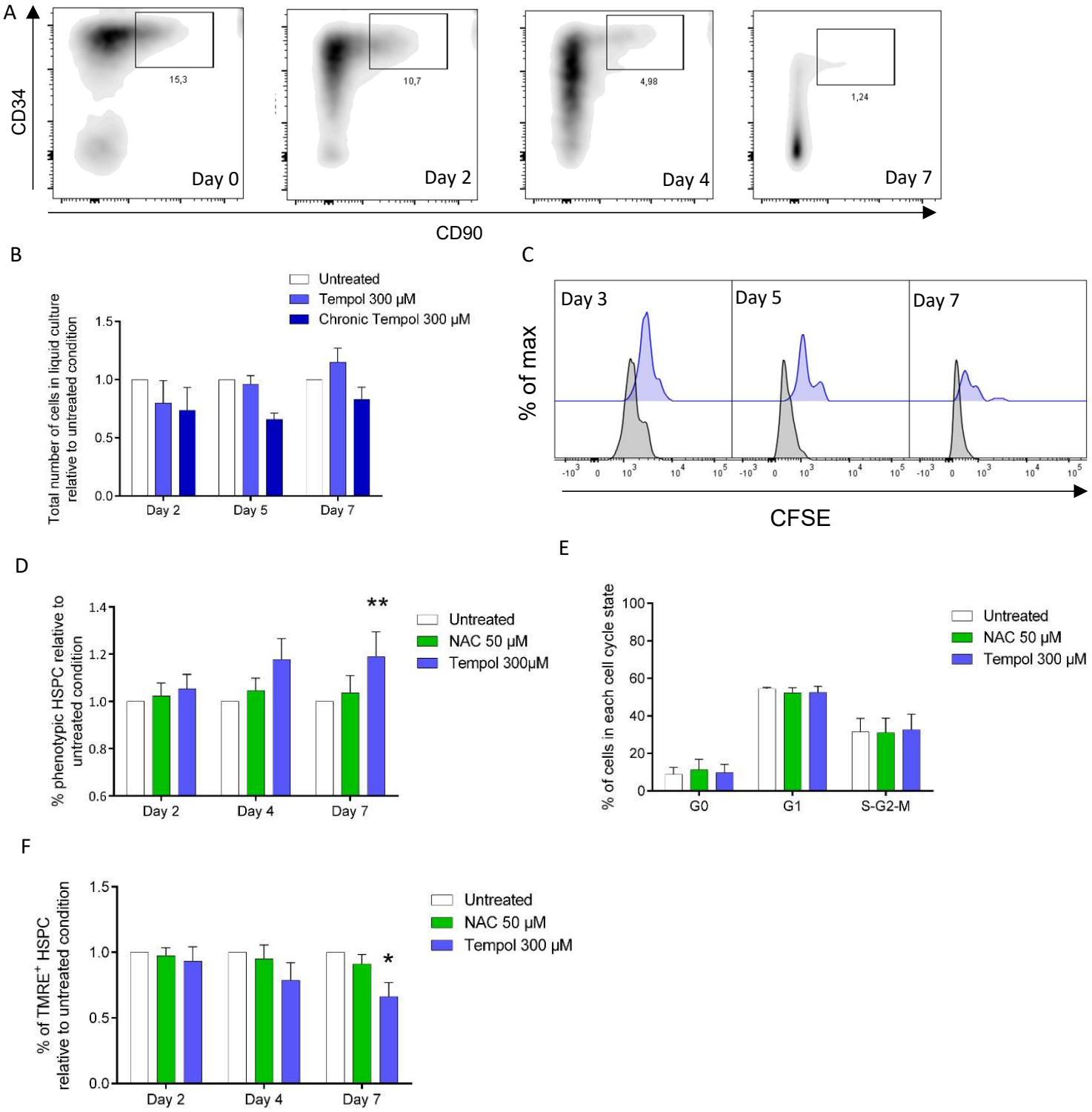
567 A. Principal component analysis of data: uncultured cells and 2-day cultured cells cluster separately. B.
568 Volcano plot of data: a great number of genes are differentially expressed between the two conditions.
569 C. Heatmap of the most deregulated genes. D. GSEA hallmark analysis of the data: several pathways are
570 significantly different. For instance, hypoxia signature is downregulated in 2-day cultured cells while cell
571 cycle, fatty acid metabolism and oxidative phosphorylation are upregulated, indicating changes in the
572 metabolic pathways. E and F. Molecular signature analysis with gene sets obtained from previous
573 publications. E. Upregulated signatures in cultured cells: cell cycle signatures are upregulated (red
574 arrows). F. downregulated signatures in cultured cells: HSC signatures are downregulated (blue arrows).

575 Figure 6: Tempol may work through VEGFα to preserve HSC functionalities

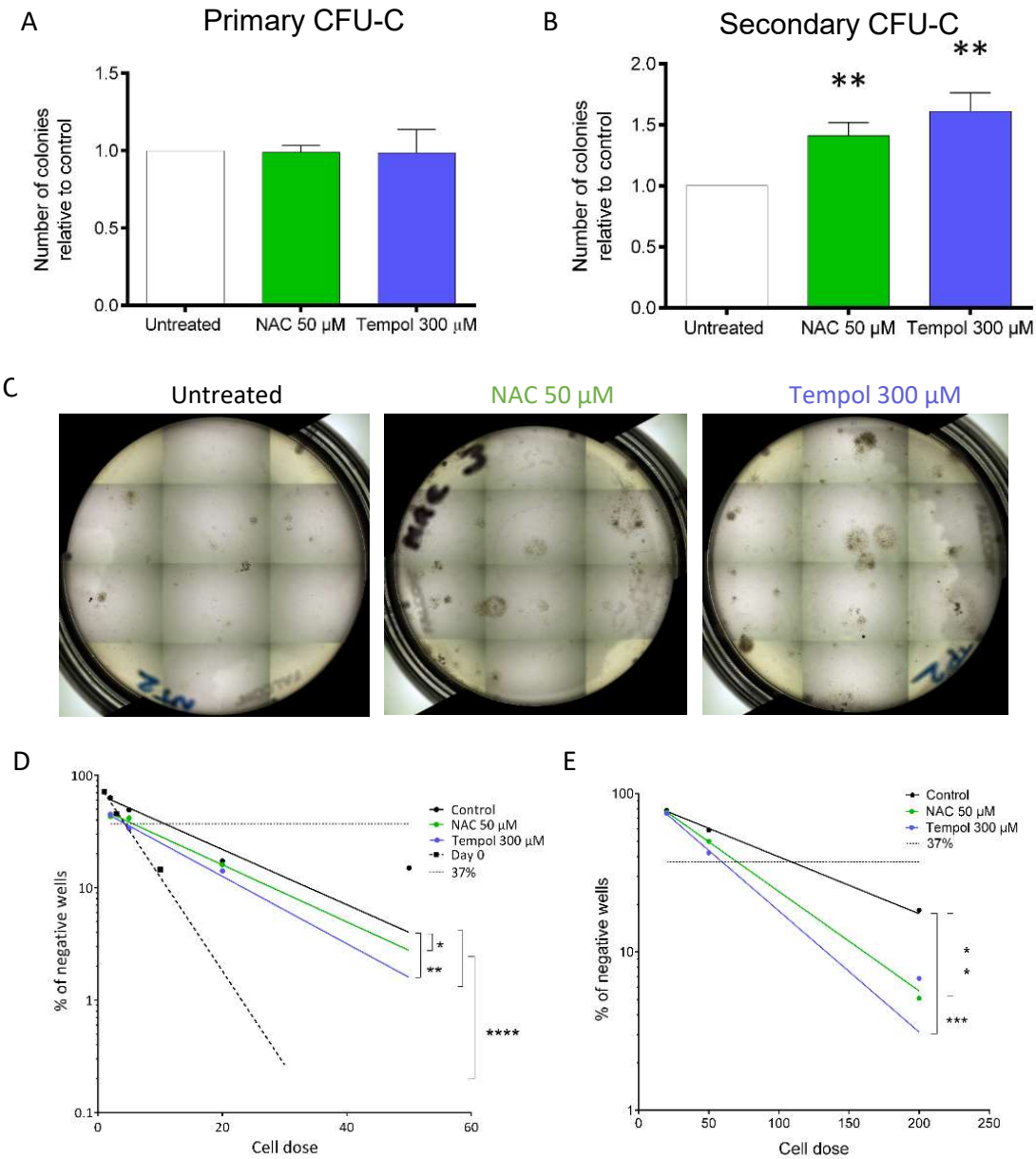
576 A. Quantification of *VEGFA* expression obtained by transcriptomic data. n=3, One-way ANOVA. B.
577 Validation of the microarray data by qPCR. n=3. C. Surface expression of VEGFR2 throughout culture of
578 $CD34^+$ cells in expansion medium. n=3, two-way ANOVA. D. Percentage of phenotypic HSC during culture
579 in cells treated with VEGFα compared to untreated cells. n=3. E. Secondary CFU-C obtained after
580 treatment with VEGFα compared to untreated or Tempol-treated cells. n=1. F. FACS histograms
581 representing the level of phosphorylated p38MAPK (P-p38MAPK) in phenotypic HSPC after 2 days of
582 culture in transduction medium. One representative example out of 4 G. Quantification of MFI of P-
583 p38MAPK relative to untreated condition. n=4, One-way ANOVA test.



<u>Figure 1</u>: Antioxidants decrease ROS and oxidative stress response.



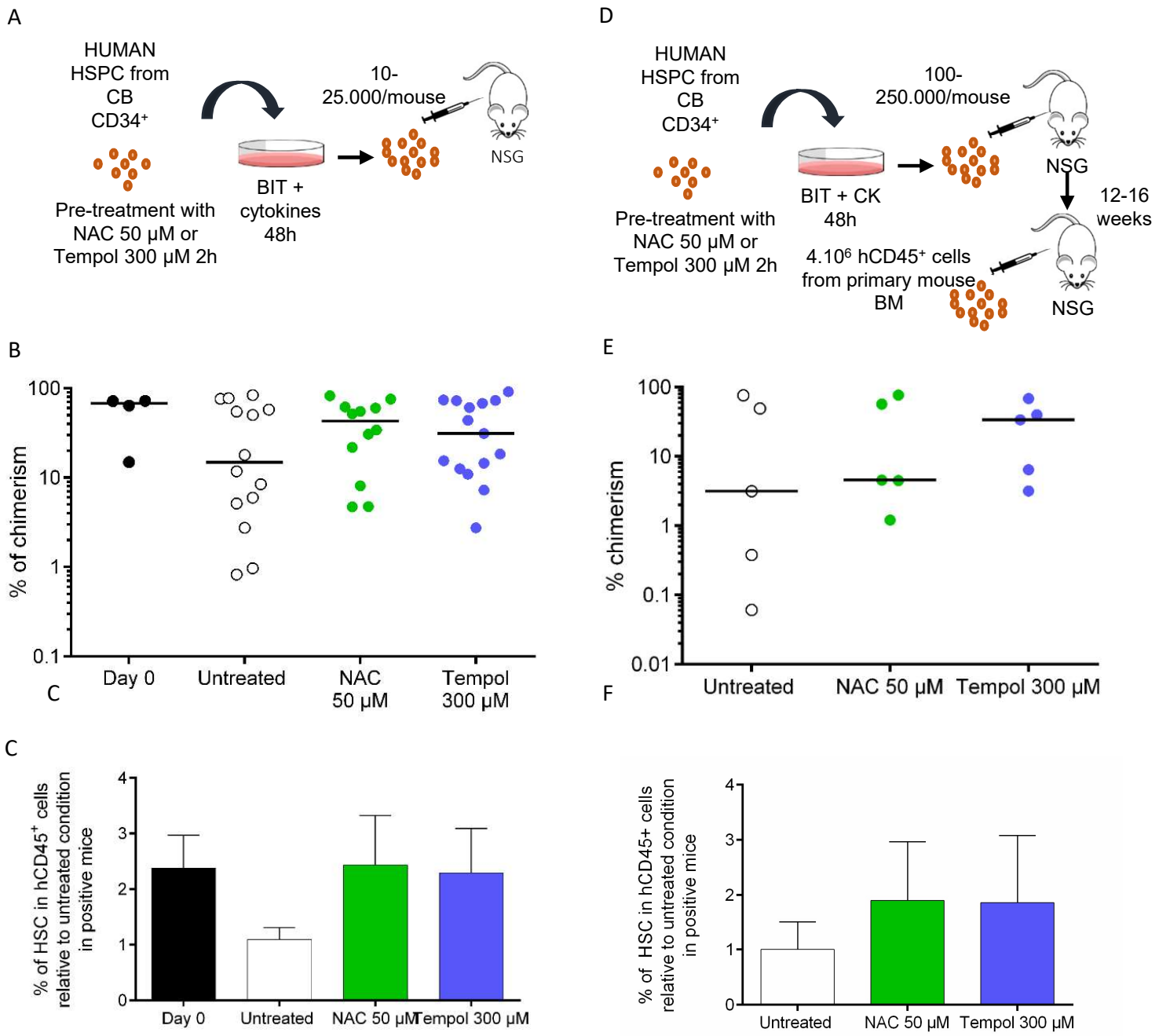
<u>Figure 2</u>: Antioxidants improve maintenance of immaturity markers.



Condition	LTC-IC frequency
Day 0	1/4
Day 2 Untreated	1/11
Day 2 NAC 50 µM	1/6
Day 2 Tempol 300 µM	1/5

Condition	Extended LTC-IC frequency
Day 2 Untreated	1/98
Day 2 NAC 50 µM	1/71
Day 2 Tempol 300 µM	1/66

<u>Figure 3</u>: Antioxidants improve long-term *in vitro* HSC functionality.



<u>Figure 4</u>: Antioxidants improve HSC reconstitution capacity *in vivo* and self-renewal.

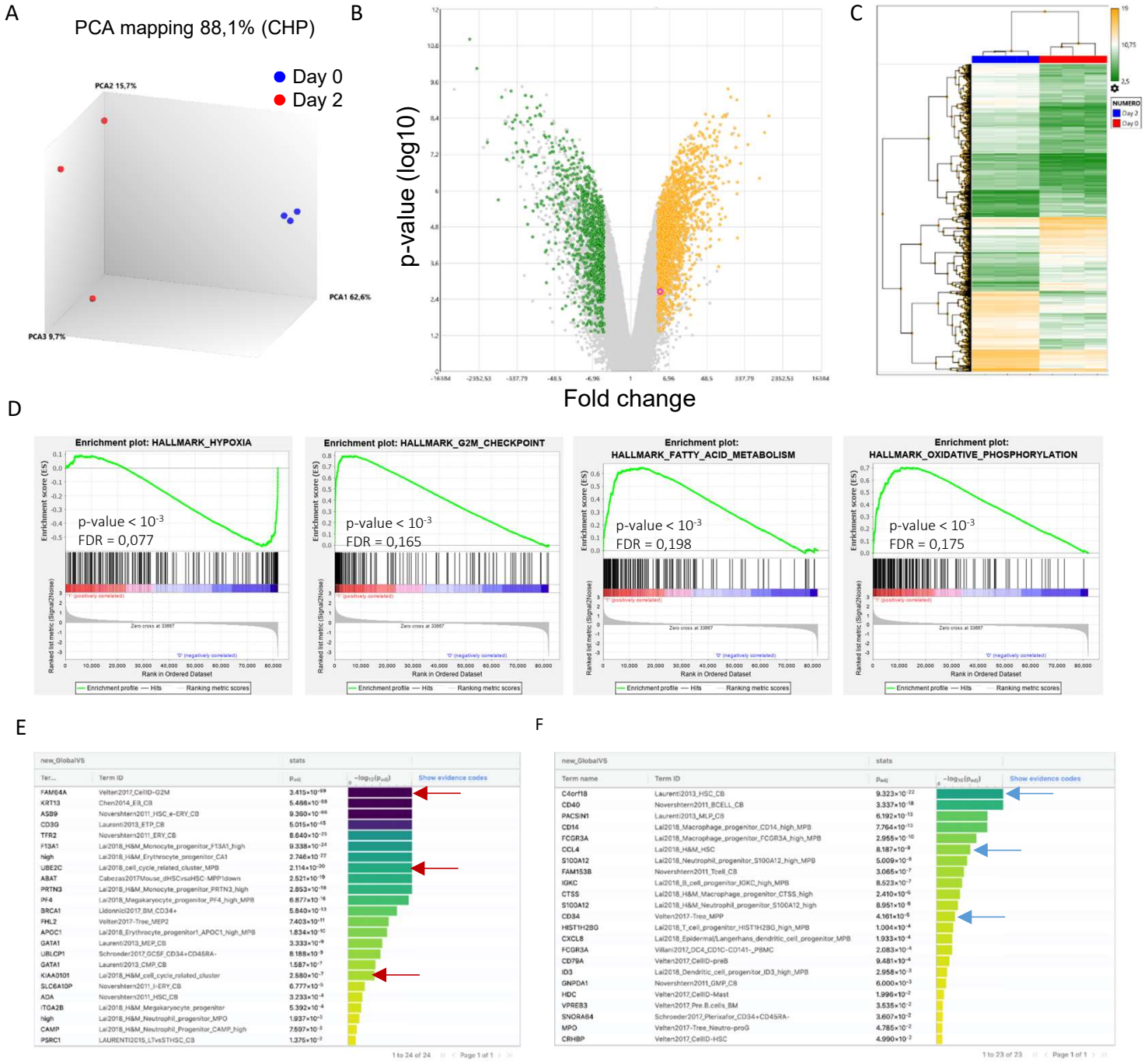
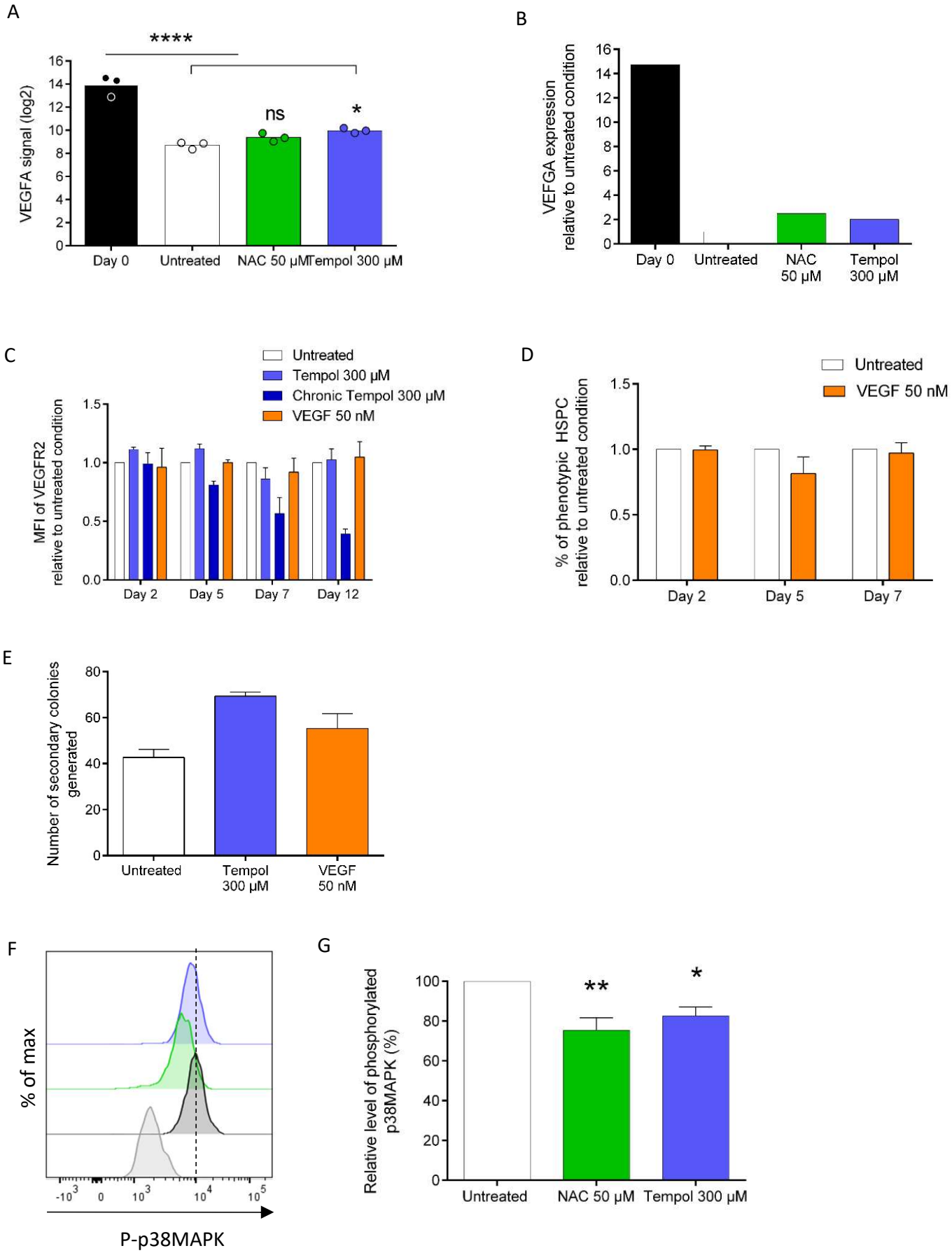


Figure 5: **2-day culture does induce major differences in gene expression**



<u>Figure 6</u>: NAC and Tempol may work through VEGFα to preserve HSC functionalities

Supplemental data

Supplemental figure legends

Table 1: Antibodies used

Figure S1 related to Figures 1 and 2: A. Demonstration of the sensitivity of endogenous mito-Grx1-roGFP2 probe thanks to oxidant agent H_2O_2 or reducing agent DTT. B. Lentiviral transduction efficiency depending on the treatment with usual lentiviral constructions used in-house. C. 8oxoG staining, max projection. One representative exemple for each condition. D. Quantification of mean fluorescence intensity of 8oxoG in the nucleus, n>50 cells from 3 independent experiments. Statistics compared to untreated condition. E. NRF2 staining, max projection. One representative example for each condition. F. Quantification of mean fluorescence intensity of NRF2 in the nucleus, n>50 cells from 4 independent experiments. Statistics compared to untreated condition. G. Cell growth with NAC and Tempol starting with $CD34^+$ cells. H.Mitochondrial mass measured by MitoTracker Green is not affected by NAC and Tempol pre-treatments during culture. n=4. I. Glucose uptake measure by 2-NBDG staining is not affected by NAC and Tempol pre-treatments during culture. n=3.

Figure S2 related to Figure 3: A. Gating strategy used for CB HSC sorting. B. Repartition of the different types of colonies in primary CFU-C. n=5. C. Repartition of the different types of colonies in secondary CFU-C. n=5. D. Sorting strategy for extended LTC-IC.

Figure S3 related to Figure 4 and 6: A. FACS dot plot of bone marrow staining with antibodies against human and murine CD45. Representative example. B. Repartition of different mature lineages (B, T and myeloid cells) in human cells in the bone marrow of NSG mice 12 to 16 weeks after transplantation. C. Gating strategy used to determine the % of cells in every lineage. D. Chimerism obtained in the bone marrow of NSG mice 12 to 16 weeks after transplantation in limiting dilution. A mouse was considered positive if the chimerism was above 2%. Data are pooled from 3 independent experiments with different cord bloods. E. Limiting dilution analysis of transplantation experiments. No significance was found. G. Diagrams from TAC software showing differentially expressed genes between Tempol d2 and untreated d2 conditions from Affymetrix microarray experiments.

Ab name	Clone	Fluorochrome	Reference	Brand
CD90	5E10	APC	559869	BD Bioscience
CD34	581	PE-Cy7	343516	Biolegend
CD34	581	PerCPCy5.5	343522	Biolegend
CD38	HB-7	FITC	356610	Biolegend
CD45RA	HI100	PE	304108	Biolegend
CD45RA	REA1047	APCVio770	130-117-747	MiltenyiBiotec
CD45RA	HI100	BV421	562885	BD Biosciences
CD45	REA747	VioGreen	130-110-638	MiltenyiBiotec
CD45	HI30	PE	304008	Biolegend
CD14	M5E2	PE	301850	Biolegend
CD15	W6D3	PE	323006	Biolegend
CD3	SK7	APCCy7	344818	Biolegend
CD19	SJ25C1	PerCPCy5.5	45-0198-42	Life Technologies
CD45 (mouse)	30-F11	APC	17-0451-83	eBiosciences
Ki67	B56	FITC	556026	BD Biosciences
Phospho-p38MAPK (Thr130/Tyr182)	3D7	PE	6908S	Cell Signaling
8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8oxodG)	N45.1	purified	ab48508	abcam
NRF2	polyclonal	Purified (rabbit)	ab31163	abcam
Goat-anti-rabbit	polyclonal	AF647	A-21244	Life Technologies
Goat-anti-mouse	polyclonal	AF647	A-21235	Life Technologies

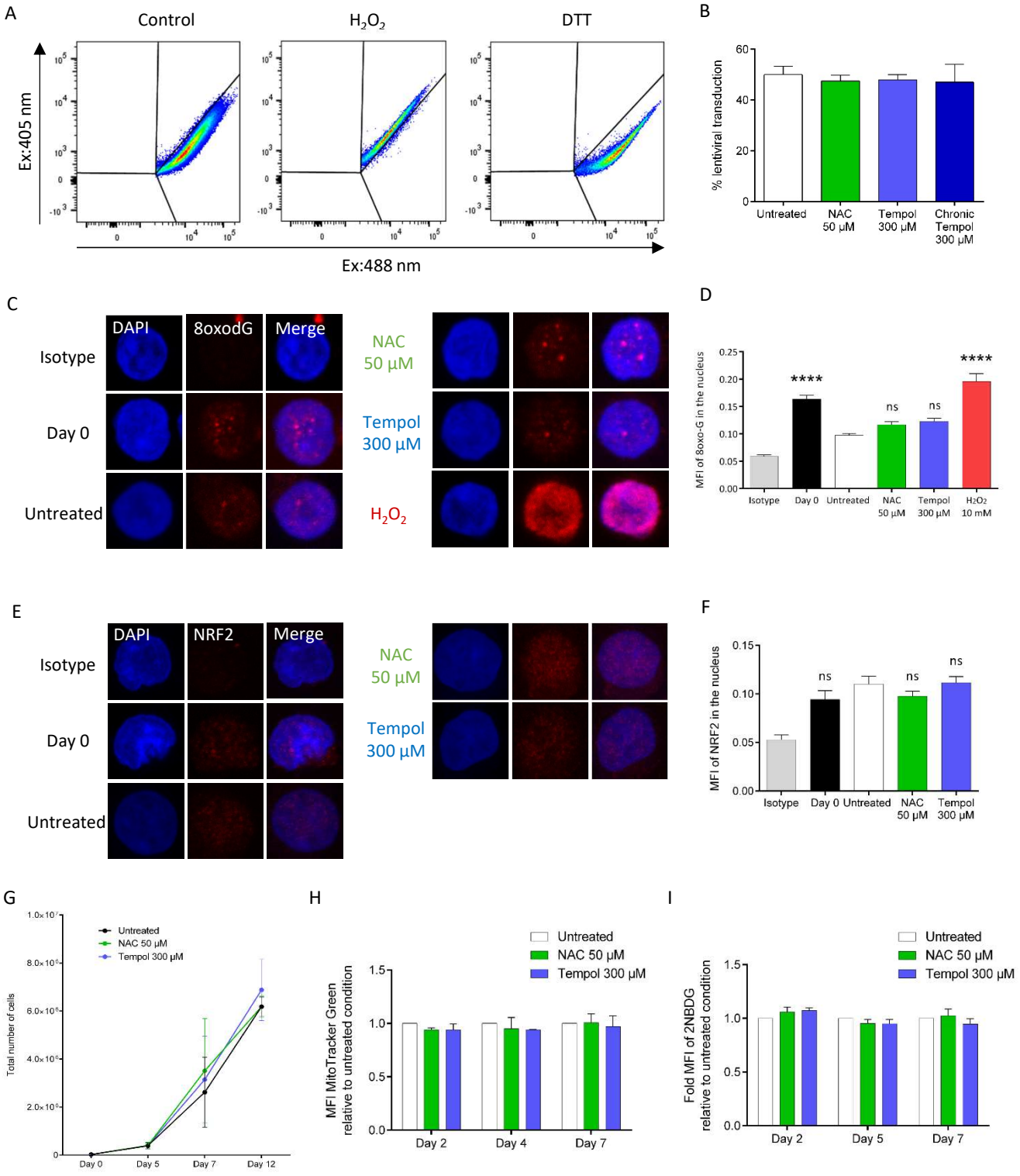


Figure S1 related to figure 1 and 2

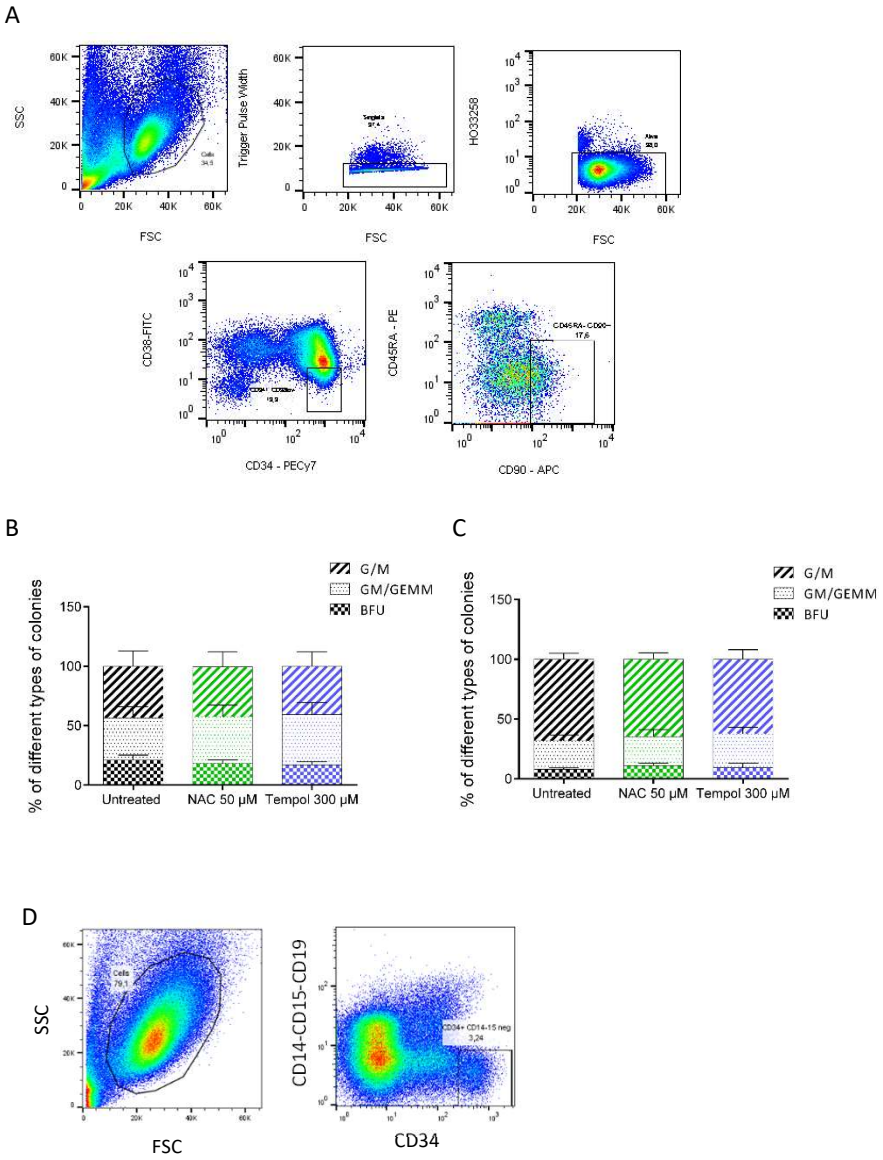
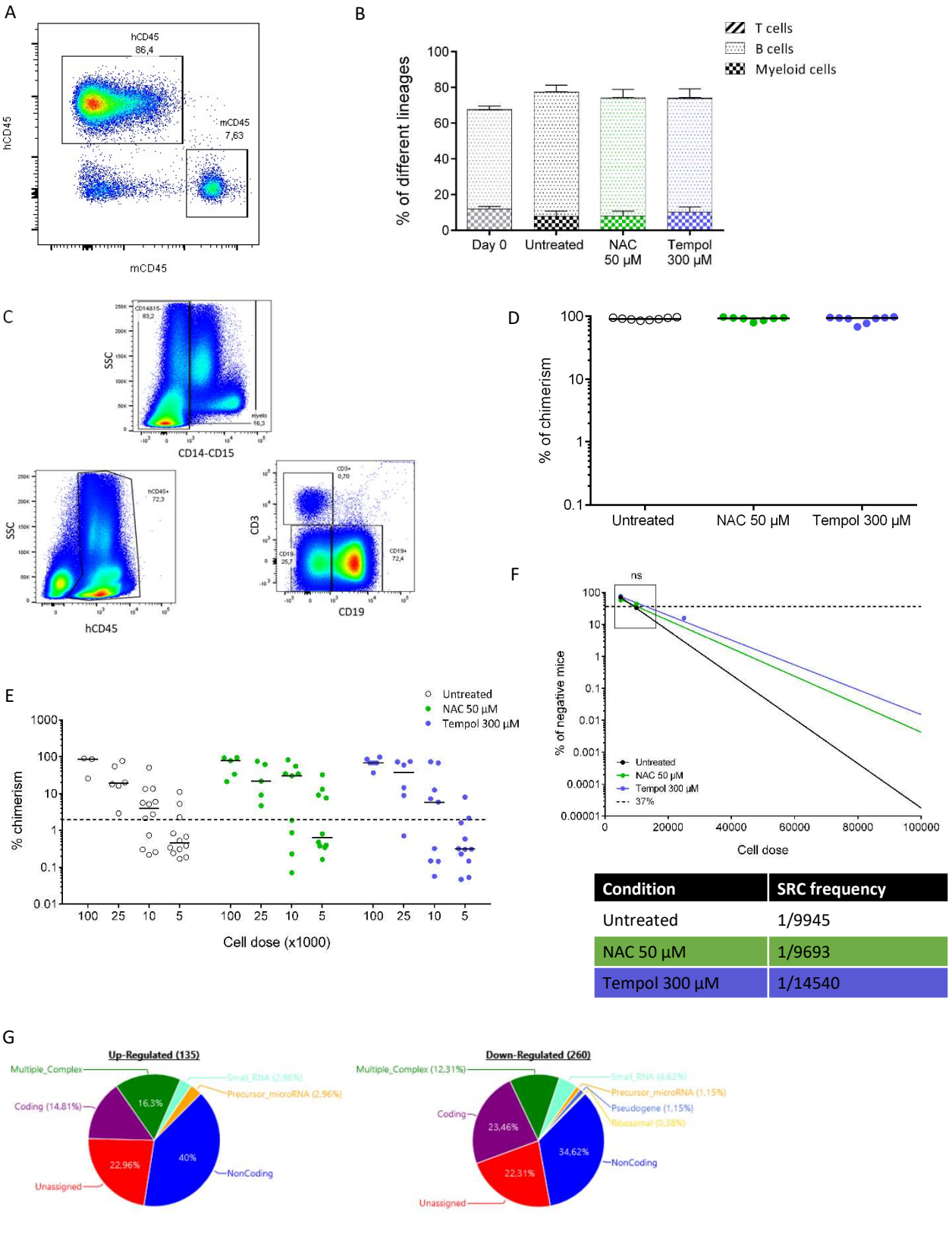


Figure S2 related to Figure 3



Condition	SRC frequency
Untreated	1/9945
NAC 50 µM	1/9693
Tempol 300 µM	1/14540

Figure S3 related to figure 4 and 6

4. *Résultats complémentaires obtenus sur les CSH murines*

Au cours de ma thèse, j'ai souhaité confirmer certains résultats sur les CSH de souris, dans l'optique d'utiliser des modèles murins pour mieux caractériser l'action des antioxydants. Par exemple, il aurait été intéressant de caractériser l'impact du Tempol sur le statut « dormant » des CSH, par exemple à l'aide des modèles génétiques cités en introduction (H2B-GFP ou GPRC5C-YFP) ; ou encore de caractériser l'implication de différentes protéines dans les effets observés par l'utilisation de modèle de knock-out (KO). Si cet axe n'a finalement pas été une priorité par la suite, nous avons néanmoins pu confirmer quelques résultats obtenus chez l'homme sur le modèle murin.

a. CFU-C

Tout d'abord, nous avons réalisé des tests fonctionnels CFU-C en série sur les CSPH murines, afin d'évaluer les capacités de clonogénicité et de différenciation et de mimer l'auto-renouvèlement par cultures successives.

Matériel et méthodes

Des souris C57BL/6 ont été sacrifiées et la moelle osseuse récupérée à partir des fémurs, tibias et hanches. Une sélection magnétique des cellules Lin^- a été réalisée grâce au kit « Direct Lineage Cell Depletion » (Miltenyi Biotec). Les cellules LSK ont été triées sur un trieur BD Influx ou BD AriaII, traitées deux heures avec du NAC 50 µM ou du Tempol 300 µM (ou non) puis mises en culture pendant 2 jours dans un milieu de transduction murin : BIT 9500 (StemCell Technologies) additionné de SCF (100 ng/mL), FLT3L (100 ng/mL), TPO (10 nM), IL3 (20 ng/mL) et IL6 (10 ng/mL)). 500 cellules ont ensuite été mises en methylcellulose (M3434, StemCell Technologies) par plaque en triplicat. Les colonies ont été numérées au bout de 7 jours, et 1% des cellules totales ont été replantées en culture secondaire.

Résultats

Nous avons démontré, comme sur les CSPH humaines, que les antioxydants n'ont pas d'effet sur la clonogénicité primaire des CSPH murines (Figure 21A) mais améliorent leur capacité à générer des colonies secondaires (Figure 21B). De plus, nous sommes parvenus à obtenir une culture tertiaire à une seule reprise, qui nous a permis de démontrer la perte totale des capacités clonogéniques des CSPH non traitées, alors que les CSPH pré-traitées avec des antioxydants peuvent générer des colonies tertiaires (Figure 21C). Il s'agit alors essentiellement de CFU-G et CFU-M, et le NAC est beaucoup plus efficace que le Tempol dans le maintien de ces capacités à long-terme.

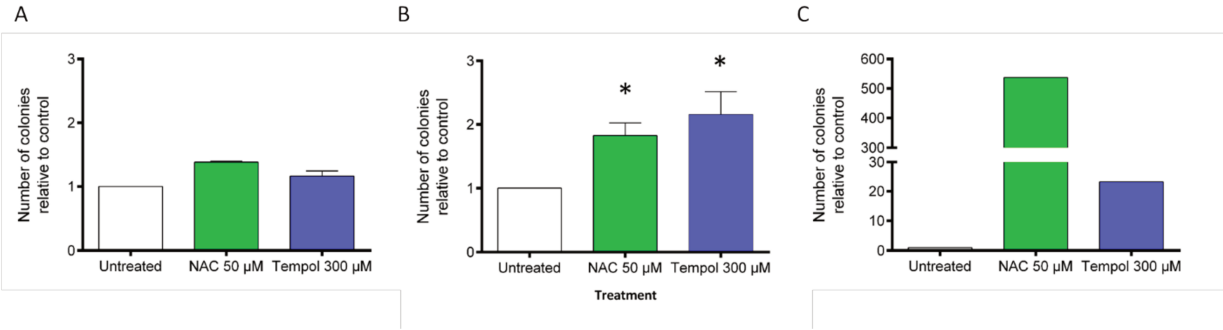


Figure 21 : Nombre de CFU-C obtenues à partir de CSH murines cultivées deux jours après traitements antioxydants par rapport à la condition non traitée

A. CFU-C primaires (n=4)
B. CFU-C secondaires (n=4, test statistique Mann-Whitney)
C. CFU-C tertiaires (n=1)

Par ailleurs, nous avons saisi l'opportunité de la présence de souris déficientes pour la protéine REDD1/DDIT4 (DNA damage-inducible transcript 4) dans le laboratoire. Cette protéine est une protéine de réponse au stress qui pourrait être impliquée dans la réponse à l'hypoxie, la voie mTor et la régulation des ROS (DeYoung et al., 2008; Horak et al., 2010) et dans la régulation des CSH humaines via la protéine TAL1 (Benyoucef et al., 2015). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait être impliquée dans les mécanismes à l'origine des effets des antioxydants. Les expériences précédentes ont donc été réitéréesen parallèles sur des CSPH WT et REDD1 KO.

De façon intéressante, une absence de réponse aux antioxydants a été observée dans les CSPH REDD1 KO. Ainsi, les CSPH REDD1 KO ne génèrent pas plus de colonies secondaires lorsqu'elles ont été traitées avec les antioxydants que les CSPH non traitées. La protéine REDD1 pourrait donc être impliquée dans la cascade de signalisation découlant du traitement antioxydant.

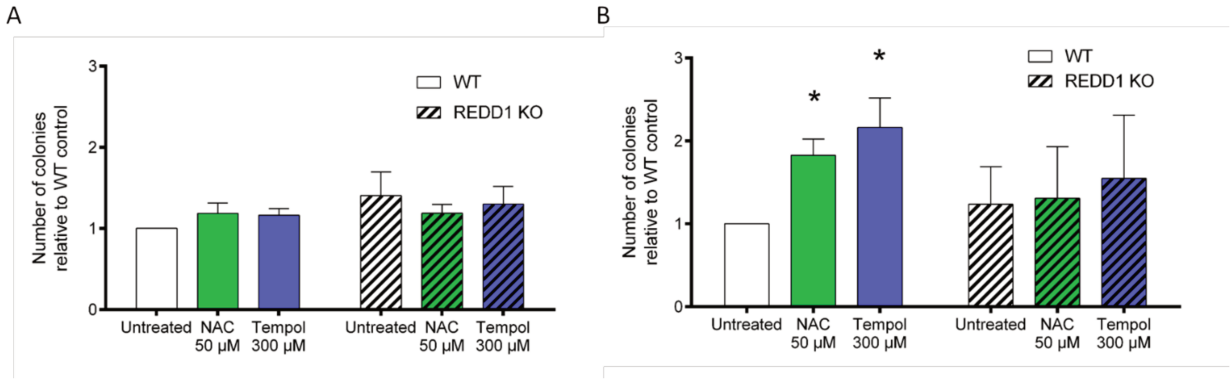


Figure 22 : Nombre de CFU-C obtenues à partir de CSH murines WT et REDD1 KO cultivées 2 jours après traitements antioxydants par rapport à la condition non traitée

A. CFU-C primaires (n=3)
B. CFU-C secondaires (n=3)

b. Transplantations *in vivo*

Afin d'évaluer l'impact du NAC et du Tempol sur les capacités de reconstitution hématopoïétique et d'auto-renouvèlement des CSH murines, des expériences de transplantation en série ont été réalisées.

Matériel et méthodes

Les cellules LSK ont été obtenues par la même méthode que précédemment. Les cellules ont été traitées (ou non) pendant deux heures avec du NAC 50 µM ou du Tempol 300 µM puis lavées et mises en culture dans le milieu de transduction murin précédemment décrit pour 48h. Les cellules ont alors été greffées dans des souris C57BL/6 CD45.1/.2 avec 100.00 cellules de moelle totale CD45.1 ou CD45.1/.2 (entre 10 000 et 40 000 cellules selon les expériences, toujours le même nombre entre les trois conditions non traitées, traitées au NAC et traitées au Tempol). La moelle osseuse des souris receveuse a été analysée à plus de 12 semaines après greffe et 2 millions de cellules de moelle totale ont été greffées en souris CD45.1/CD45.2 pour la transplantation secondaire (et de même pour les transplantations tertiaires et quaternaires).

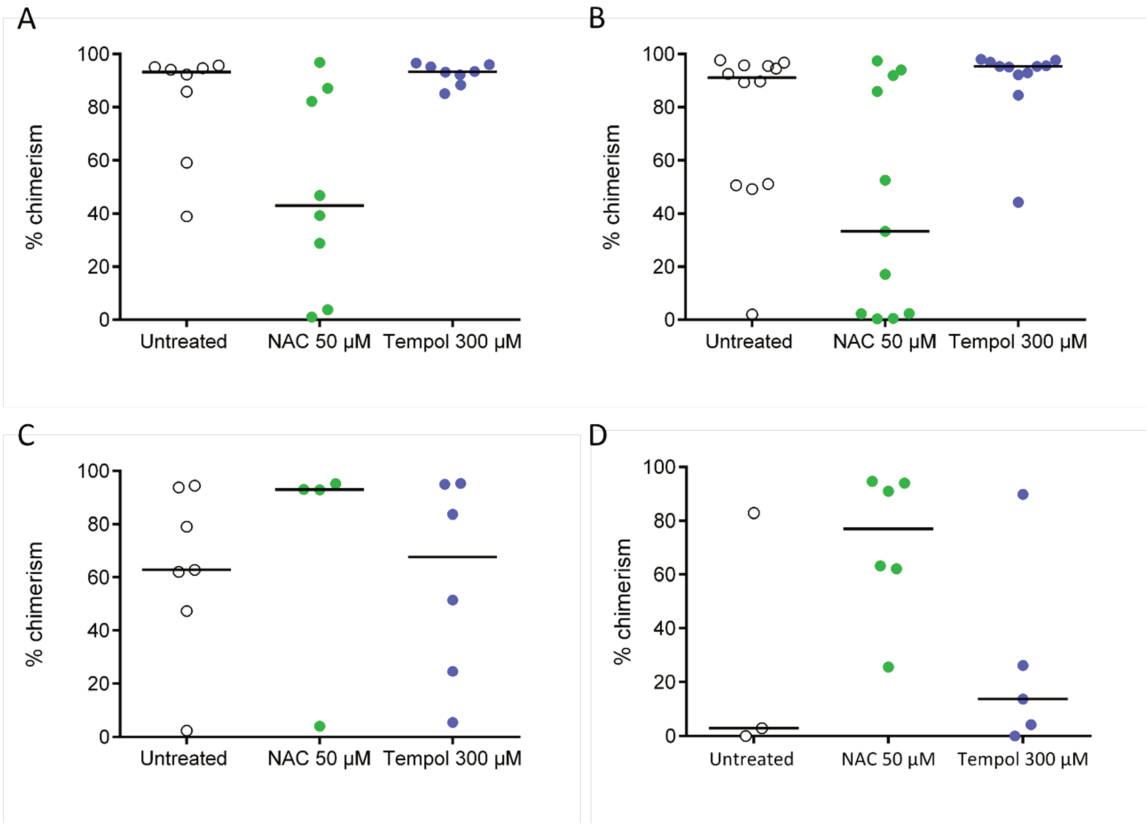


Figure 23 : Chimérisme obtenu lors de transplantations en série de LSK cultivées 2 jours après traitements antioxydants

A. Transplantation primaire (n=2)
B. Transplantation secondaire (n=2)
C. Transplantation tertiaire (n=1)
D. Transplantation quaternaire (n=1)

Résultats

Sur les CSPH murines, le Tempol semble avoir peu d'effet. Les capacités de reconstitution hématopoïétiques diminuent progressivement au fil des transplantations successives de la même façon que des cellules non traitées. Cependant, de façon intriguante, le NAC a semblé avoir un effet néfaste sur les cellules pour la reconstitution hématopoïétique primaire, mais un effet bénéfiqueà partir de la troisième et la quatrième transplantation. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène pourrait être la mise en quiescence plus importantes des cellules traitées par le NAC, empêchant la différenciation mais permettant un maintien plus important des propriétés des CSH à long-terme. Cependant, les transplantations tertiaires et quaternaires n'ayant été réalisées qu'une fois, les résultats nécessiteraient d'être validées par des expériences complémentaires.

c. Activation de p38MAPK

Afin de comparer les mécanismes à l'origine des effects fonctionnels observés, notamment *in vitro*, avec les résultats obtenus sur les CSH humaines, nous avons étudié l'effet des antioxydants sur la phosphorylation de p38MAPK, qui est en lien avec la quantité de ROS.

Matériel et méthodes

Les cellules LSK ont été obtenues par la même méthode que précédemment. Les cellules ont été traitées (ou non) pendant deux heures avec du NAC 50 µM ou du Tempol 300 µM puis lavées et mises en culture dans le milieu de transduction murin précédemment décrit pour 48 heures. Les cellules ont ensuite été marquées pour les protéines de surface cKit, Sca1, CD150 et CD48, fixées pendant 10 min à 37°C avec le tampon Fix Buffer I (BD) et perméabilisées pendant 1 heure sur la glace avec le tampon Perm Buffer II (BD), conformément aux recommandations du fournisseur. Le marquage avec l'anticorps dirigé contre p38MAPK phosphorylé a ensuite été réalisée pendant la nuit à 4°C dans du PBS contenant de la BSA et de l'EDTA, avant l'analyse sur un BD LSRII.

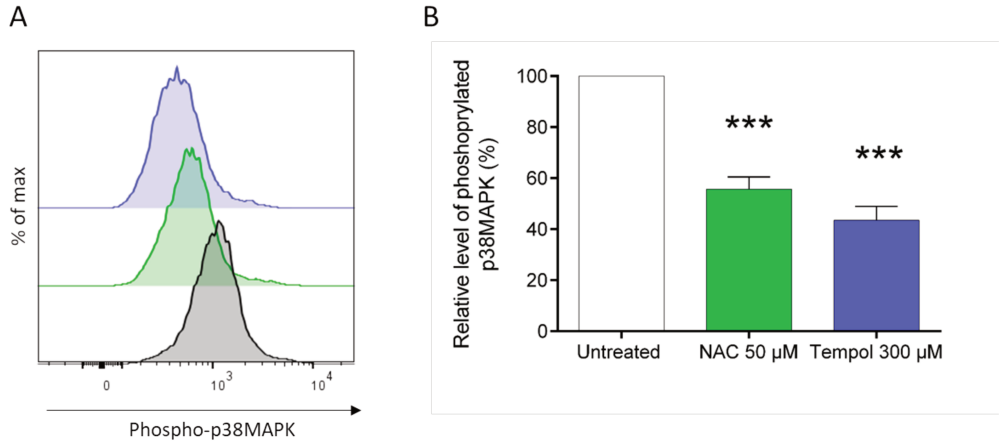


Figure 24 : Diminution de l'activation de p38MAPK après culture de 48h et traitement antioxydant

A. Histogrammes FACS montrant la quantité de p38MAPK phosphorylé (P-p38MAPK), exemple représentatif de 3 expériences
B. Quantification de l'intensité de fluorescence moyenne de P-p38MAPK en % relatif à la condition non traitée (n=3, test One-way ANOVA)

Résultats

Une baisse de l'activation de p38MAPK est observée dans les CSH murines phénotypiques (LSK $CD150^{+}CD48^{-}$) après traitement par le NAC et le Tempol par rapport aux CSH murines non traitées. Cette diminution est encore plus drastique que pour les CSH humaines (50% de diminution contre 20% pour les humaines). Ceci indique probablement une implication forte de la voie p38MAPK dans les mécanismes induits par les antioxydants et les effets fonctionnels observés chez la souris.

5. Résumé

Dans ce travail, nous avons étudié la faisabilité d'un traitement antioxydant dans le cadre de cultures *ex vivo* pour la thérapie génique. Nous avons utilisé deux antioxydants différents, l'un bien connu et utilisé en clinique, le NAC ; et l'autre encore peu utilisé, le Tempol. La méthode consiste en un pré-traitement de 2 heures avant la mise en culture dans un milieu de transduction pendant 2 jours, proche de ce qui peut se faire en clinique pour la thérapie génique, afin d'évaluer les différences phénotypiques, transcriptomiques, et la fonctionnalité des CSH.

Nous avons tout d'abord confirmé le pouvoir antioxydant des deux molécules utilisées, par des méthodes de mesures de ROS et de l'expression de gènes antioxydants après culture. Le pré-traitement a pour conséquence une amplification de la fréquence de cellules au phénotype immature (marqueurs de surface et activité mitochondriale) pendant la culture, visible surtout avec le Tempol et à partir de 4 jours de culture. Nous avons par ailleurs choisi de ne réaliser qu'un pré-traitement au Tempol et non un traitement chronique, car celui-ci, malgré une meilleure amélioration du phénotype, induit une diminution du cycle cellulaire et de la prolifération. Cette décision est liée à une optique clinique pour laquelle une diminution du nombre de cellules n'est pas souhaitée.

La fonctionnalité des CSPH est augmentée après traitement antioxydant et deux jours de culture, tel qu'observé par une augmentation du nombre de CFU-C secondaires et du pourcentage de reconstitution hématopoïétique en souris NSG. De plus, les tests *in vitro* de LTC-IC et LTC-IC « extended », ainsi que des expériences de transplantation en série, suggèrent une amélioration tu potentiel d'auto-renouvèlement des CSH tout d'abord confirmé que la culture dans des milieux enrichis en cytokines utilisés pour la transduction des CSH humaines provoquait une perte non négligeable de leurs propriétés, en particulier après seulement 2 jours de culture, durée moyenne utilisée dans les protocoles de thérapie génique. Cette perte se traduit à la fois *in vivo*, avec une diminution du chimérisme observé par rapport à des CSH fraîches, mais aussi au niveau transcriptomique. Les signatures génétiques spécifiques des CSH sont en effet diminuées tandis que d'autres liées au cycle cellulaire par exemple sont amplifiées.

Cette étude transcriptomique n'a pas permis de mettre en évidence une différence flagrante entre les cellules traitées avec les antioxydants et les cellules non traitées. Cependant, l'expression de VEGFA est augmentée après traitement au Tempol, laissant à penser à une éventuelle implication implication de la protéine VEGFα dans ses effets. L'activation de la voie p38MAPK est également réduite. Ceci nous permet de proposer des pistes de mécanismes concernant l'effet biologique du Tempol, au-delà de ces propriétés antioxydantes.

DISCUSSION

Discussion

Résumé

Au cours de ma thèse, j'ai abordé le sujet de la régulation des propriétés des CSH, et en particulier de leur auto-renouvèlement, à travers le prisme du stress oxydant. En effet, parmi les nombreux acteurs qui assurent le maintien des propriétés des CSH, le taux d'oxygène à proximité immédiate des CSH semble avoir un impact majeur. Il permet en effet de réguler le métabolisme de la cellule et par conséquent son taux de ROS. Or, la quantité de ROS dans la CSH est une donnée cruciale pour la régulation de sa prolifération, de son auto-renouvèlement et de sa différenciation (pour revue Bigarella et al., 2014; Ludin et al., 2014; Prieto-Bermejo et al., 2018; Sardina et al., 2012) . De plus, ce taux est très sensible à de nombreux facteurs et régule un certain nombre de voies essentielles au maintien des CSH (Bigarella et al., 2017; Maryanovich et al., 2012; Tothova et al., 2007).

J'ai tout d'abord étudié le rôle d'un facteur environnemental sur les CSH : les radiations ionisantes. Il est très connu que les fortes doses de radiations ionisantes ont un impact majeur sur les CSH, entraînant majoritairement une augmentation des ROS et des dommages à l'ADN, menant potentiellement à l'apoptose des cellules. Cependant, le rôle des faibles doses a longtemps été laissé de côté, notamment à cause de l'existence supposée d'un effet de seuil dans les radiations ionisantes. Suite à des inquiétudes concernant l'incidence de cancers cérébraux et hématopoïétiques chez des enfants soumis à des CT scans réguliers (Pearce et al., 2012), et parce que le système hématopoïétique est un des organes les plus radiosensibles, nous avons abordé la question du rôle des faibles doses de radiation ionisantes sur les CSH. Nous avons observé que celles-ci avaient un effet majeur sur les propriétés fonctionnelles à long-terme des CSH *in vitro* et *in vivo*, suggérant un défaut d'auto-renouvèlement. Cependant, une majorité des facteurs habituellement modulés par l'irradiation, comme l'apoptose, les cassures double-brin de l'ADN ou encore la phosphorylation d'ATM ou de p53, n'étaient pas observés. Nous avons cependant montré que cet effet était lié à une augmentation importante mais transitoire des ROS dans les cellules, visible également par une activation de la translocation nucléaire de NRF2 et l'existence de dommage oxydatifs sur l'ADN du type 8-oxo-dG. Cette augmentation de ROS induit dans les CSH une activation de la voie p38MAPK. De façon intéressante, il a été possible de restaurer les propriétés des CSH grâce à un traitement antioxydant par le NAC ou par un inhibiteur de p38MAPK, montrant que cette augmentation des ROS menant à l'activation cette voie était bien à l'origine des défauts d'auto-renouvèlement constatés.

Je me suis ensuite intéressée à la possibilité de réduire le taux de ROS dans d'autres conditions de stress oxydant que l'irradiation. Beaucoup de paramètres peuvent en effet affecter la génération de ces molécules dans les CSH, comme le vieillissement, des conditions inflammatoires, etc (pour revue Pietras, 2017; Porto et al., 2015). En particulier, un axe de recherche très important concernant les CSH est la possibilité de les cultiver *ex vivo* en vue de leur expansion et/ou de leur modification génétique pour une utilisation clinique. Cependant, les méthodes actuellement validées au niveau clinique induisent une perte des propriétés des CSH. De nombreuses équipes étudient des méthodes pour

coupler augmentation du nombre de CSH, avec un bénéfice clinique en termes de rapidité de reconstitution hématopoïétique et maintien des propriétés à long-terme des cellules souches permettant un succès de la greffe. Une des approches est d'éviter le choc hyperoxique dû à la forte concentration en oxygène de l'atmosphère par rapport à la niche physiologique dans la moelle osseuse en cultivant les cellules dans une chambre à hypoxie. Nous proposons une méthode plus aisée à mettre en œuvre en clinique : la réduction des ROS par l'utilisation d'antioxydants. Nous avons prouvé que la culture dans des milieux enrichis en cytokines et facteurs de croissance entraînait une augmentation des signatures de stress oxydant au niveau transcriptomique dès 2 jours, avec des effets fonctionnels visibles *in vitro* et *in vivo*. Le pré-traitement avec des antioxydants et en particulier le Tempol a permis une amélioration des propriétés fonctionnelles des CSH, appréciées par différentes méthodes in vitro (CFU-C et LTC-IC) et par une tendance à l'amélioration de la reconstitution hématopoïétique lors de transplantation en série dans le modèle de souris immunodéficientes NSG. Nous avons constaté que ces effets étaient liés à une diminution de l'expression de certains gènes antioxydants surexprimés lors de la culture, ainsi que de l'activation de la voie p38MAPK. Enfin, nous avons exploré le rôle de la protéine VEGFα dans la réponse à l'antioxydant Tempol.

Ces deux projets complémentaires démontrent par de nouvelles approches le rôle prépondérant de la régulation des ROS dans le maintien des CSH *in* et *ex vivo*. Ils révèlent par ailleurs que des méthodes simples de traitement par des antioxydants pourraient permettre de mieux contrôler le stress oxydant subi par les CSH lors d'évènements perturbateurs. Ces résultats pourraient être facilement appliqués sur de nombreuses cibles en tant que traitement préventif : personnes subissant de nombreux examens médicaux, astronautes soumis aux radiations ionisantes spatiales, manipulation des CSH à des fins de thérapie génique et cellulaire, etc. Cependant, plusieurs axes pourraient encore être développés afin de renforcer les résultats obtenus.

Discussion et perspectives

Utilisation de différents types cellulaires

Pour les deux projets, les expériences ont été réalisées sur des cellules de sang de cordon ombilical. Ce modèle présente l'avantage d'être facile à obtenir et à utiliser, et correspond à un axe important de la recherche en thérapie cellulaire. Néanmoins, il existe des différences entre les CSH issues de différentes sources, foie fœtal, sang de cordon ombilical et adulte (moelle osseuse ou sang périphérique après mobilisation) (Holyoake et al., 1999). Il serait donc intéressant de tester des CSH d'origines différentes afin de mettre en lumière d'éventuelles disparités de réponse, à la fois aux faibles doses de radiations ionisantes et aux antioxydants.

Regarder les CSH adultes pourrait apporter un éclairage supplémentaire car ces cellules ont généralement des capacités de reconstitution hématopoïétique amoindries. D'ailleurs, comme indiqué en introduction, le stress oxydant est un des vecteurs principaux du vieillissement des CSH. Ainsi, le traitement antioxydant proposé pourrait s'avérer encore plus utile dans le cadre de cellules adultes. De plus, les différents phénomènes accompagnant le vieillissement des CSH (augmentation des ROS,

activation de p38 MAPK, dommages à l'ADN) peuvent rappeler ceux observés après irradiation à forte et faible dose (Jang and Sharkis, 2007; Rübe et al., 2011; Yahata et al., 2011). Il serait alors possible que l'irradiation à faible dose induise ou mime un vieillissement prématuré des CSH, même si nous n'avons pas de preuve formelle. Par exemple, aucun biais myéloïde n'est observé. Cependant, les souris NSG utilisées favorisant la différenciation lymphocytaire B, il n'est pas évident d'observer ce genre d'effet dans ce modèle. Enfin, il est connu que l'irradiation a un impact plus important sur les CSH âgées (Hernández et al., 2015). Il serait donc intéressant de réitérer les expériences sur des CSH adultes.

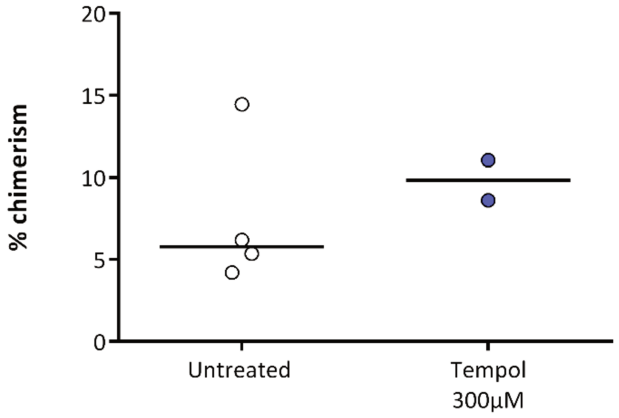


Figure 25 : Chimérisme obtenu après transplantation primaire de 250 000 cellules CD34⁺ de sang périphérique mobilisé cultivées deux jours en présence ou non de Tempol

Pour ce dernier point, nous avons d'ores et déjà réalisé une expérience sur des CSH adultes obtenues par cytaphérèse. Nous avons greffé 250 000 cellules $CD34^+$ par souris. Les taux de chimérisme obtenus après plus de 12 semaines de greffe étaient assez bas (≤ 10%) par rapport aux résultats obtenus sur des CSH de sang de cordon et nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet drastique du Tempol du fait du petit nombre de souris greffées (Figure 25). Cette expérience doit néanmoins être répétée afin d'obtenir suffisamment de réplicats pour nous permettre d'analyser statistiquement les résultats. Cependant les échantillons sont plus difficiles à obtenir.

Concernant le foie fœtal, l'intérêt en thérapie cellulaire et génique est pour le moment plus limité, cette technique n'étant pas encore appliquée en clinique malgré d'anciennes études prouvant la faisabilité d'une transplantation *in utero* sur le mouton (Zanjani et al., 1994) et une possibilité de mise en banque de ce type de cellules (Mychaliska et al., 1998). Cependant, malgré le principe de précaution déjà appliqué en imagerie médicale concernant les femmes enceintes, étudier l'impact des faibles doses de radiations ionisantes sur ces cellules pourrait permettre de consolider les connaissances autour des effets de l'irradiation sur le fœtus.

Métabolisme, faibles doses d'irradiation et antioxydants

Concernant le projet sur les faibles doses d'irradiation, plusieurs questions restent en suspens. Premièrement, à cause de difficultés techniques liées aux prises de greffe dans les souris NSG, nous n'avons pas pu démontrer statistiquement la validité du traitement NAC dans la restauration des capacités de reconstitution hématopoïétique des cellules irradiées *in vivo*. Même si l'effet sur les capacités clonogéniques en CFU-C était drastique, la seule méthode pour obtenir la certitude que le traitement antioxydant est réellement efficace sur les capacités d'auto-renouvèlement à long-terme des CSH reste la transplantation en série. Les prises de greffe étant très faibles dans l'expérience que nous avons réalisée, nous n'avons pu mettre en évidence qu'une tendance à l'amélioration du chimérisme, en particulier dans le sang, qui pourrait être confirmée par des expériences supplémentaires (Figure 26).

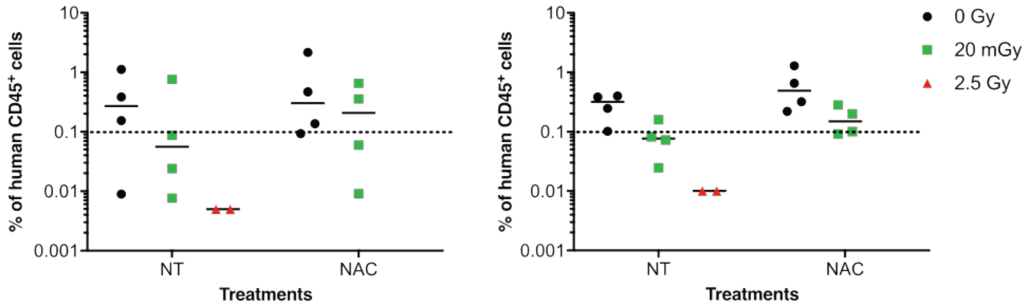


Figure 26 : prise de greffe dans le sang et dans la moelle en transplantation secondaire de cellules irradiées ou non après pré-traitement avec du NAC

A. Prise de greffe dans la MO
B. Prise de greffe dans le sang

Par ailleurs, la question de l'implication de la mitochondrie dans ces effets mériterait d'être approfondie, car chez la souris, il a été montré que les faibles d'irradiation induisaient spécifiquement une activation de l'autophagie (Rodrigues-Moreira et al., 2017). Sur des CSH humaines, nous n'avons pas constaté cet effet, mais les méthodes utilisées étaient différentes (marquage au CytoID versus marquage du LC3B (microtubule associated protein light chain 3 beta). En revanche, un délai dans l'activation mitochondriale, mesurée par le TMRE, est observé. Cela peut sembler contradictoire avec le pic de génération de ROS après irradiation, étant donné que l'hypothèse communément admise est que les ROS proviennent majoritairement de la mitochondrie en activité.

Cependant, certaines études sur différents types cellulaires suggèrent qu'un excès de ROS peut à l'inverse altérer l'activité mitochondriale (Guo et al., 2013; Sheng et al., 2009). En effet, les ROS sont produits par la mitochondrie mais peuvent également l'endommager et il n'est pas clair si ces dommages induisent une diminution ou une activation de l'activité de la mitochondrie. Par exemple, une diminution de la polarisation mitochondriale peut à la fois être interprétée comme une souffrance de la cellule ou comme un changement métabolique vers d'autres voies de génération d'énergie (glycolyse par exemple), ce qui rend parfois les résultats difficiles à interpréter. De plus, il existe un lien étroit entre ROS, mitochondries et réponse à l'irradiation à faible et forte dose (pour revue Kawamura

et al., 2018). Par exemple, une étude réalisée sur la lignée myéloïde U937 (isolée à partir d'un lymphome) irradiée à 7 Gy montre à la fois un pic de ROS et une diminution de la polarisation mitochondriale 24 heures après irradiation (Kim et al., 2008). Ces résultats rappellent nos observations. D'autres équipes ont également montré une dualité encore augmentation des ROS et baisse de la respiration mitochondriale dans différents types cellulaires (Barjaktarovic et al., 2011; Kam and Banati, 2013; Yoshida et al., 2012). Un groupe en particulier rapporte que la réponse mitochondriale est dépendante du type cellulaire (Nugent et al., 2010). Ainsi, s'il est certain que des atteintes de la mitochondrie jouent un rôle dans la réponse à l'irradiation via les ROS, aucun consensus n'est pour le moment établi sur les mécanismes liés.

Concernant notre sujet particulier, cette question pourrait donc être approfondie en utilisant des méthodes complémentaires (techniques différentes pour mesurer les ROS, analyses de l'activité mitochondriale par SeaHorse, etc). De plus, il est fréquemment observé après une forte dose d'irradiation deux vagues de ROS : une immédiate, transitoire, et une plus tardive après plusieurs jours. Cette observation pourrait être attribuable à un phénomène nommé « ROS induced ROS-release » (Brady et al., 2006). Nous avons mesuré les ROS sur des temps relativement courts après l'irradiation (quelques heures) et n'avons donc observé que la première vague transitoire. Ainsi nous n'avons pas déterminé si des effets d'augmentation secondaire des ROS pouvaient être visibles également sur les faibles doses. Dans les CSH murines, cette deuxième vague est en effet observée plusieurs jours après irradiation lorsque les cellules sont gardées en culture ainsi qu'*in vivo*. Ce point pourrait être précisé afin de mieux caractériser les différences entre les conséquences des fortes et des faibles doses d'irradiation ainsi que les différences ou similarités entre CSH humaines et murines. Il est néanmoins important de noter que l'espèce n'est probablement pas le seul facteur impliqué dans les différences observées, étant donné que dans les deux cas les CSH n'ont pas la même provenance ontogénique (CSH de sang de cordon pour l'homme et CSH de moelle osseuse adulte pour la souris).

Concernant le projet sur les antioxydants, une diminution du potentiel mitochondrial est observée après plusieurs jours de culture et nous n'avons pas pu mettre en évidence d'autres différences métaboliques avec les techniques utilisées (sondes fluorescentes pour la consommation de glucose et la masse mitochondriale). Cependant, il est difficile de conclure sur le type de métabolisme adopté par les cellules avec si peu d'informations. Ainsi, des mesures complémentaires (production de lactate, d'ATP, respiration cellulaire mesurée par SeaHorse, étude du métabolome, etc) seraient nécessaires pour définitivement statuer sur les changements métaboliques impliqués notamment par le Tempol.

ROS et faibles doses d'irradiation : un message qui ne passe pas ?

L'augmentation des ROS semble être un phénomène récurrent dans la réponse aux faibles doses d'irradiation, dans les CSH mais aussi dans d'autres types de cellules souches. Une étude sur les progéniteurs des cellules épithéliales de l'œsophage a en effet montré qu'une irradiation à 50 mGy (source ^{137}Cs) induisait un stress oxydant important et une plus grande différenciation au détriment de la prolifération, en particulier dans les cellules mutantes pour p53 (Fernandez-Antoran et al., 2019). Ces progéniteurs ont en effet un fort potentiel prolifératif, contrairement aux CSH quiescentes. Ainsi, même

si les effets fonctionnels sont différents, probablement à cause des différences intrinsèques dans les propriétés des deux populations, l'augmentation de ROS est très probablement à l'origine des défauts dans ces cellules. En effet, comme dans notre étude, l'effet des faibles doses d'irradiation est annulé par un traitement antioxydant au NAC. Cette observation est doublement intéressante car il est connu que les ROS sont impliqués dans de nombreux processus pathologiques ; mais il est également de plus en plus clair qu'elles ont aussi un rôle prépondérant dans la signalisation physiologique. Ainsi, cette augmentation de ROS pourrait être un moyen pour la cellule de résoudre le stress causé par l'irradiation, en activant différents mécanismes. Cependant, dans le cas des faibles doses, cette signalisation pourrait être en dessous du seuil nécessaire pour activer les voies de réparation ou de destruction de la cellule, impliquant des dommages plus sournois à long-terme car potentiellement non détectés comme dangereux par la cellule.

Différents types de radiations ionisantes, différentes réponses ?

Enfin, une des grandes inconnues dans la réponse aux faibles doses d'irradiation est la dépendance entre le type d'irradiation et les effets observés. En effet, chaque type d'irradiation possède une énergie et une pénétration dans la matière différentes. Cela se matérialise par différentes grandeurs comme le transfert d'énergie linéraire (TEL) ou l'efficacité biologique relative (RBE pour relative biological effectiveness). Compte-tenu des effets différentiels de différents types de radiations à faible dose présentés en introduction, une hypothèse serait qu'il existe une courbe spécifique de dose-réponse pour chaque source d'irradiation et chaque type cellulaire. Il n'existerait donc pas de modèle universel de réponse aux faibles doses. Ainsi, il serait très intéressant d'étudier d'autres types de rayonnements à faible dose sur les CSH. Dans notre étude, nous avons observé les effets de l'irradiation aux rayons gamma du cobalt (^{60}Co). Cette source a été notamment utilisée en radiothérapie et progressivement remplacée par des accélérateurs de particules délivrant des rayons. Les applications de nos résultats pourraient donc concerner de potentiels effets secondaires indésirables sur les zones en périphérie des zones traitées. De plus, d'autres éléments, comme l'iode utilisée en tant qu'agent de contraste pour différents examens d'imagerie, produisent également des rayonnements gamma. Nous

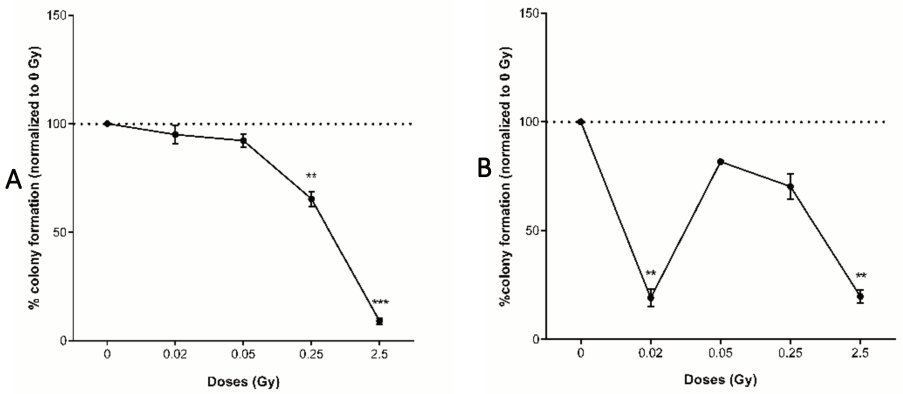


Figure 27 : Courbe de radiosensibilité des CSH humaines à court et à long-terme

A. Nombre de CFU-C primaires par rapport à des CSH non irradiées (court-terme)
B. Nombre de CFU-C secondaires par rapport à des CSH non irradiées (long-terme)

avons observé une baisse drastique de la fonctionnalité à long-terme autour de la dose 20 mGy, indiquant une hypersensibilité à cette dose particulière. En effet, à de plus « fortes » faibles doses, comme 50 mGy voire 250 mGy, l'effet est moins visible. Cela suggère un effet très spécifique en fonction de la dose (Figure 27).

D'autres types de sources sont davantage utilisés en imagerie médicale, par exemple les rayons X issus d'accélérateurs de particules. Cette source ne produit pas les mêmes rayons et n'a pas la même énergie ni le même LET que le Cobalt. Nous avons fait quelques tests de fonctionnalité (CFU-C) sur un accélérateur de particules d'énergie 1 MeV. Nous avons obtenu des résultats plus mitigés à la dose 20 mGy. Il est donc probable que la dose d'hypersensibilité soit différente pour ce type de rayonnement chez les CSH. De plus, les pré-traitements au NAC ou au SB n'ont pas permis d'obtenir une amélioration majeure de la fonctionnalité comme c'était le cas pour le ^{60}Co (Figure 28). Il est donc également possible que les mécanismes d'actions diffèrent en fonction de l'énergie déposée, pour une même dose finale.

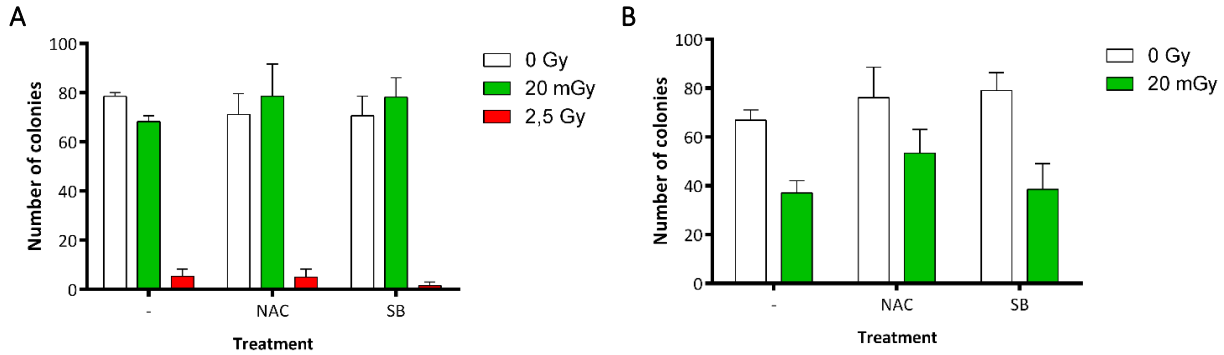


Figure 28 : Nombre de CFU-C obtenues à partir de CSH irradiées aux rayons X (accélérateur de particules LINAC)

A. CFU-C primaires
B. CFU-C secondaires

Utilisation d'antioxydants en clinique

Pour les CSH murines, l'adjonction de l'enzyme antioxydante catalase dans le milieu de culture induit de façon réversible un maintien d'une population immature (Gupta et al., 2006). De plus, nous avons montré au laboratoire que la catalase, tout comme le NAC, permet de protéger les CSH des faibles doses de radiations ionisantes. Ainsi, il semble raisonnable de proposer un traitement antioxydant dans le cadre d'une protection des CSH humaines. Un article publié dans Medical Hypotheses a proposé il y a déjà 10 ans que l'utilisation d'antioxydants pourrait permettre d'améliorer la transplantation de CSH de sang périphérique mobilisé (Hao et al., 2011). Les auteurs indiquent que les multiples manipulations des CSH dans des milieux présentant différents taux d'oxygène au cours de ce type de protocole (mobilisation, culture, infusion par voie-intraveineuse) provoquent une augmentation des ROS. Les auteurs proposent alors l'utilisation de GSH lors de l'étape de mobiliastion et d'un dérivé d'acide

ascorbique (vitamine C) pendant la culture. Ces deux composés présentent en effet l'avantage d'être stables et non toxiques. Une autre équipe a également identifié l'action antioxydante comme responsable de l'effet d'une petite molécule, la chrysine, dans la préservation des propriétés fonctionnelles de CSH humaines de sang de cordon pendant 7 jours de culture (Li et al., 2020c).

En dehors du cas particulier des CSH, le stress oxydant est connu pour être impliqué dans un grand nombre de pathologies dans différents organes. Le traitement *in vitro* et *in vivo* au NAC est déjà largement utilisé pour un large panel d'applications (pour revue Mokhtari et al., 2017). Concernant le système hématopoïétique, il a déjà été montré qu'il améliorait la prise de greffe *in vivo* des CSH humaines (Hu et al., 2014). Le Tempol a été initialement proposé dans le domaine de la radioprotection (Ramachandran and Nair, 2012) et plusieurs essais cliniques portent sur cette application. Il est de plus récemment très étudié pour un certain nombre de maladies avec une composante de stress oxydant (Ewees et al., 2019; Nunes et al., 2018; Wang et al., 2019).

Cependant, de façon surprenante, peu d'antioxydants sont effectivement utilisés en clinique (pour revue Suzuki, 2009). Si la GSH, le NAC, des dérivées de vitamine (acide ascorbique, tocophérol), ou encore quelques flavonoïdes ou l'acide alpha-lipolique (Firuzi et al., 2011) sont acceptés comme molécules antioxydantes, leurs mécanismes d'actions sont parfois obscurs et leur absorption par le corps peut être très faible. Pour d'autres molécules, comme des inhibiteurs d'enzymes, une toxicité a pu être mise en évidence. De plus, la demi-vie de molécule comme le NAC ou la SOD est très réduite, ce qui limite leur action. Même si ces effets sont moins critiques dans le cadre d'un traitement *ex vivo*, les questions de sécurité et d'efficacité restent centrales dans le développement d'une molécule à visée clinique. Ainsi, ces problématiques devront être étudiées plus finement pour un éventuel usage en essai clinique.

Tempol : cycle cellulaire, auto-renouvèlement et application thérapeutique

Concernant le projet sur les antioxydants, une interrogation particulière nous a poursuivis pendant ma thèse. En effet, nous avons montré que selon la manière d'administrer le Tempol, en pré-traitement ou en traitement chronique, les effets sur les CSH étaient plus ou moins intenses. En chronique, le Tempol permet de mieux préserver la fréquence des CSH mais diminue la prolifération globale des cellules mises en culture. Pour une utilisation clinique, les CSH sont certes fondamentales pour le succès de la greffe à long-terme, mais le rôle des progéniteurs présents dans la population $CD34^+$ est également prépondérant dans la survie à court-terme. Ceux-ci interviennent dans les premières vagues de reconstitution hématopoïétique post-greffe, permettant une élimination rapide de la cytopénie, notamment via la récupération des populations de neutrophiles et de mégacaryocytes. Ainsi, diminuer la prolifération de ces cellules pourrait altérer le bénéfice à court-terme de la greffe, même si cela protège mieux les CSH à long-terme. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de continuer l'étude avec seulement un pré-traitement au Tempol, des effets fonctionnels intéressants étaient toujours visibles malgré une moins bonne préservation du pourcentage de CSH au cours de la culture. Cependant, il serait intéressant de renouveler ces tests après un traitement chronique au Tempol afin de comparer les capacités des CSH ainsi cultivées et de mieux cerner le mécanisme du Tempol. De plus, il pourrait être possible de réaliser des cinétiques de reconstitution hématopoïétique afin d'évaluer

l'impact sur les progéniteurs. Par ailleurs, l'effet de ce traitement chronique au niveau transcripomique pourrait donner des résultats beaucoup plus drastiques qu'avec un pré-traitement, pour lequel peu de gènes étaient différentiellement exprimés en comparaison avec des cellules cultivées sans antioxydants.

Cependant, un article récent présenté en introduction suggère que certains composés pourraient favoriser un maintien des CSH sans prolifération (Gupta et al., 2020). Ainsi, si le Tempol ne permet pas une expansion du nombre de CSPH, une hypothèse serait qu'il favorise l'auto-renouvèlement des CSH au détriment de leur différenciation. Le Tempol chronique pourrait lui maintenir un état de quiescence plus important. Pour tester ces hypothèses, plusieurs méthodes pourraient convenir. L'une d'elle pourrait s'appuyer sur l'utilisation de modèles de souris transgéniques dans lesquels les CSH quiescentes sont identifiables grâce à un marqueur fluorescent, comme les souris H2B-GFP (Foudi et al., 2009) ou GPRCC-EGFP (Cabezas-Wallscheid et al., 2017). L'utilisation de CSH murines permet en effet une plus grande latitude sur les méthodes utilisées pour identifier les mécanismes d'action des molécules utilisées. Cela nous permettrait par exemple de vérifier si le Tempol (chronique ou non) permet de mieux maintenir une population de cellules ayant conservé le marquage, donc davantage dormantes. D'autres techniques, plus difficiles à mettre en œuvre expérimentalement, pourraient permettre de suivre les divisions des CSH à l'échelle unicellulaire, par exemple en observant la distribution de la protéine NUMB (Will et al., 2013; Wu et al., 2007) ou en analysant le potentiel des cellules filles après division d'une cellule unique (Ema et al., 2000; Takano et al., 2004). Ainsi il serait possible de déterminer si les divisions symétriques d'auto-renouvèlement ont lieu plus souvent dans les échantillons traités avec l'antioxydant par rapport aux cellules contrôles, au détriment des divisions asymétriques ou des divisions de différenciation.

Nous avons également pris le parti de focaliser ces tests fonctionnels et transcriptomiques sur un protocole de transduction avec seulement deux jours de culture. Cependant, cette méthode de traitement antioxydant pourrait également être applicable sur des protocoles d'expansion de CSH sur des temps plus longs (minimum 7 jours). Si *a priori* un traitement chronique semble contre-indiqué dans cette optique à cause de l'apparent ralentissement du nombre de divisions, un pré-traitement pourrait donner des résultats intéressants sur des temps de culture longs favorisant d'autant plus l'augmentation des ROS.

L'implication du VEGFα est également à mieux caractériser. Les résutlats observés semblent intéressants car *VEGFA* est un gène cible de HIF1α, la protéine de l'hypoxie. Ainsi, une restauration partielle du niveau d'expression de *VEGFA* dans les cellules après un pré-traitement par Tempol peut faire penser à un phénotype « hypoxie-like ». Si au niveau de l'expression des gènes *HIF* aucune différence n'est visible, il serait en revanche très intéressant de caractériser l'effet du Tempol sur la stabilisation des protéines HIF et en particulier HIF1. Ce type de conséquences du traitement par Tempol pourrait d'ailleurs expliquer les effets d'arrêt du cycle observés lors de traitements chroniques.

Enfin, nous avons montré que sur les CSPH de souris, le Tempol ne semble pas avoir d'effet drastique *in vivo*, même si *in vitro* le traitement semble être plus efficace que sur les CSPH humaines. Pour rappel, concernant les faibles doses d'irradiations, il avait été montré que les CSH murines et humaines ne répondaient pas par les mêmes mécanismes au stress oxydant induit par 20 mGy d'irradiation, conduisant à une réponse fonctionnelle également différente. Ainsi, il se pourrait que l'absence observée de réponse au traitement au Tempol soit dûe soit à un stress moins intense

provoqué par la culture, soit à des mécanismes de réponse à ce stress différent. Par exemple, il serait intéressant de vérifier également le rôle de REDD1 dans les CSH humaines, afin de voir si ce mécanisme est partagé par les deux espèces. En revanche, la diminution de l'activation de p38MAPK est observée chez la souris comme chez l'homme. Enfin, on peut également noter que la différence ontogénique des CSH utilisées (sang de cordon chez l'homme, moelle osseuse adulte chez la souris) pourrait également jouer sur la réponse au stress oxydant et aux antioxydants, comme dans le cas des faibles doses d'irradiations.

Epigénétique, héritage à long-terme et expansion des CSH

Comme discuté en introduction, les modifications épigénétiques ont un impact important sur les CSH. Par exemple, des modifications épigénétiques sont observées dans voire sont à l'origine de mécanismes plus généraux comme la fonction des CSH et leur différenciation (Raghuwanshi et al., 2018; Sharma and Gurudutta, 2016; Yu et al., 2016), le vieillissement (Beerman and Rossi, 2014; Cakouros and Gronthos, 2019) ou l'(a)symétrie des divisions des CSH (Florian et al., 2018). Ces phénomènes sont intimement liés à nos problématiques de réponse aux faibles doses d'irradiation et au maintien en culture des CSH. Il semble donc pertinent de s'intéresser à ce sujet dans notre contexte. Cela est d'autant plus vrai que des modifications épigénétiques ont été observées après irradiation de CSH à faible dose par des noyaux lourds (Miousse et al., 2014) ; de plus, de nombreuses méthodes pour l'expansion des CSH se sont intéressées à l'utilisation de techniques régulant les phénomènes épigénétiques, comme présenté en introduction (Chaurasia et al., 2014; Saraf et al., 2015).

Au cours de notre étude, nous avons souvent observé des effets à long-terme, probablement transmissibles à la progénie, à la fois de l'irradiation ou du traitement antioxydant. Nos expériences d'analyse transcriptomique ont par ailleurs montré que la culture induisait une expression différentielle d'un certain nombre de gènes impliqués dans la régulation épigénétique, comme TET2 ou DNMT3B (Figure 29). Ainsi, une hypothèse pourrait être que la quantité de ROS influe sur le paysage épigénétique des CSH. En perspectives futures, nous aimerions donc nous intéresser plus précisément au profil épigénétique des CSH (profil de méthylation de l'ADN, ouverture de la chromatine etc).

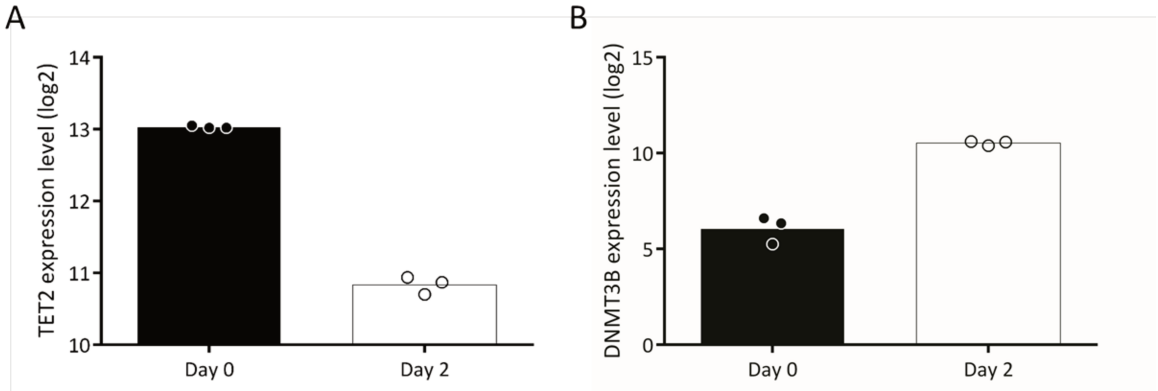


Figure 29 : Expression de gènes impliqués dans l'épigènese dans des cellules fraîches ou cultivées 2 jours, données issues de l'analyse transcriptionnelle Affymetrix.

A. Expression de *TET2*
B. Expression de *DNMT3B*

Cependant, le rôle de l'épigénétique dans la transformation leucémique est de plus en plus connu (pour revue Hu and Shilatifard, 2016). En particulier, les gènes *TET2* et *DNMT3*, dont l'expression est modifiée par la culture en milieu de transduction, sont fréquemment retrouvés mutés dans les cancers hématologiques (Busque et al., 2012; Shlush et al., 2014). Ainsi, les modifications à caractère épigénétique induites soit par la culture, soit éventuellement par le traitement antioxydant, pourraient avoir un rôle important sur la qualité de l'hématopoïèse à long-terme après une greffe.

Expansion clonale et transformation leucémique, des chemins à ne pas emprunter

Une des grandes questions lorsque l'on travaille sur l'expansion des CSH est le maintien de leurs propriétés sans l'induction d'une éventuelle transformation leucémique. En effet, de nombreux gènes impliqués dans la régulation des CSH sont également connus pour être fréquemment mutés ou différentiellement exprimés dans des cancers hématologiques : par exemple, RUNX1 pour les leucémies aïgues myéloïdes ou lymphoïdes (pour revue Sood et al., 2017) ou encore NOTCH et TAL1 plus précisément dans les leucémies aïgues lymphoblastiques T (pour revue Correia et al., 2016; Tosello and Ferrando, 2013). Différentes tactiques s'appuyant sur l'expression de ces gènes font donc emprunter un chemin risqué en termes de sécurité pour le patient, ce qui peut expliquer le peu de méthodes passant effectivement le stade de l'essai clinique. Dans notre cas, après seulement deux jours de culture, peu de gènes sont dérégulés dans les CSH traitées par les antioxydants par rapport aux CSH contrôles ; le risque semble donc faible. Néanmoins, dans l'hypothèse d'un traitement chronique, la question pourrait éventuellement se poser, de même qu'après plusieurs jours de culture. Il pourrait également être utile de réaliser une analyse de l'expression génique sur les cellules obtenues après reconstitution hématopoïétique, afin de déterminer si l'expansion *in vivo* a pu intensifier des défauts génétiques induits ou amplifiés par les traitements antioxydants proposés.

De plus, même sans induire de mutations spécifique d'un proto-oncogène, il existe un risque de favoriser une expansion clonale des cellules. Celle-ci est souvent caractéristique du vieillissement du système hématopoïétique (Park et al., 2019). Ce phénomène peut également être à l'origine de transformations malignes (pour revue Bowman et al., 2018). Ainsi, un effet secondaire possible de molécules utilisées pour l'expansion *in vitro* pourrait être d'appliquer une pression de sélection pouvant mener à ce type de conséquences. Une manière élégante de vérifier cela pourrait être d'utiliser des techniques de barcoding génétique (Perié et al., 2014) permettant de suivre la progénie des cellules transplantées et de vérifier sa diversité clonogénique.

Enfin, il existe une implication importante de l'état métabolique des cellules dans le cancer. Nous avons par exemple abordé la question de l'effet Warburg en introduction. Les cellules cancéreuses utilisent en effet un vaste panel d'adaptations métaboliques afin de conserver un avantage évolutif et de proliférer (pour revue DeBerardinis and Chandel, 2016). De nombreux cancers hématologiques présentent par ailleurs des mutations ou des désordres liés au métabolisme qui peuvent avoir un impact sur leur agressivité et leur résistance au traitement, à titre d'exemple au niveau des protéines IDH1 ou encore GAPDH (Chiche et al., 2015; Inoue et al., 2016). Ainsi, agir au niveau du métabolisme des cellules via les antioxydants pourrait avoir des conséquences non négligeables sur une éventuelle

transformation leucémique. De plus, il est de plus en plus clair que le métabolisme est lié à l'épigénèse, notamment dans le cancer et dans différents types de cellules souches (pour revue Harvey et al., 2019; Montellier and Gaucher, 2019; Ryall et al., 2015). Même si ce type de mécanisme peut expliquer les effets du Tempol, il convient de rester vigilant vis-à-vis du rôle des transformations métaboliques et épigénétiques dans l'hématopoïèse : pour rebondir sur le point précédent, celles-ci peuvent en effet également jouer un rôle dans la leucémogénèse et des défauts au niveau des gènes (et des protéines associées) jouant un rôle dans l'épigénèse sont fréquemment retrouvés dans le cancer (TET2, DNMT3B, EZH2…).

Comment obtenir un milieu de culture des CSH idéal ?

En introduction, nous avons pu voir que le domaine de la recherche des conditions de culture optimales pour les CSH est un domaine très compétitif. De nombreuses équipes se sont intéressées à ce sujet et ont formulé des hypothèses de natures différentes sur les méthodes qui pourraient permettre d'améliorer les résultats cliniques lors de greffes de CSH humaines, en particulier issues de sang de cordon ombilical, mais également dans une optique de thérapie génique. Le challenge repose principalement sur l'obtention d'une expansion du nombre de CSH et de progéniteurs, afin de permettre une amélioration plus rapide de la neutropénie et de la thrombocytopénie, sans compromettre les propriétés des CSH afin de garantir un succès à long-terme de la greffe. Cet équilibre est extrêmement difficile à trouver, étant donné que les conditions de culture permettant l'expansion des CSPH provoquent généralement une perte des capacités des CSH par leur entrée en cycle forcée.

Dans le cas particulier de la transduction rétro- ou lenti-virale des CSH, plusieurs milieux ont été testés afin de trouver le meilleur compromis entre qualité de la transduction et maintien des propriétés des CSH. Ainsi, en faisant une revue de la littérature, il semble que chaque laboratoire ait sa propre composition favorite (milieu commercial, cytokines et facteurs de croissance, autres adjuvants, temps de transduction, etc) (Millington et al., 2009; Ngom et al., 2018; Uchida et al., 2011). Cela est également vrai pour les protocoles cliniques (Aiuti et al., 2013; Negre et al., 2015).

Ainsi, le but à atteindre est de se rapprocher le plus possible des conditions d'expansion physiologique des CSH *in vivo* : même si à terme ce type d'expansion peut mener à un épuisement des CSH, lors du vieillissement par exemple, cet effet est beaucoup moins rapide que lors de divisions cellulaires induites par la culture. Ainsi, une étude systématique de toutes les combinaisons des différentes méthodes citées en introduction (hypoxie, cellules stromales, culture 3D, petites molécules, différents cocktails de cytokines etc) et éventuellement d'antioxydants pourrait permettre d'obtenir un milieu optimal d'expansion des CSH. Cependant cela représente un travail colossal, ce qui explique les nombreuses tentatives pour trouver la méthode supérieure aux autres. Je reste néanmoins convaincue de la nécessité d'une combinaison de plusieurs facteurs pour se rapprocher le plus possible d'une situation *in vivo*.

Usage des antioxydants en dehors de la clinique et protocoles

Les résultats obtenus avec les antioxydants sont prometteurs non seulement dans le cadre de potentiels usages en clinique, mais également pour des applications plus fondamentales. En effet, la transduction lentivirale est très largement utilisée en recherche pour étudier l'implication de différents gènes sur le système hématopoïétique (Brunet de la Grange et al., 2006; Chabi et al., 2019), la génération de modèle knock-out étant infaisable sur l'homme. Ainsi, améliorer les capacités de prise de greffe et ainsi favoriser la réussite des expériences *in vivo* pourrait permettre d'étudier plus facilement les CSH et le système hématopoïétique humain.

Cependant, dans ce contexte, j'aimerais aborder l'effet du protocole de transduction lentivirale sur la différenciation des CSH. Lors de la conduite des expériences de transduction, nous avons en effet observé une altération de l'expression des marqueurs de surface, au cours du maintien en culture après transduction. Ainsi, la population $CD45RA^{-}CD34^{+}$ disparaît complètement après deux jours de culture en milieu de transduction suivi de 5 à 7 jours en milieu d'expansion, au profit d'une population $CD45RA^{+}$, suggérant un enrichissement en progéniteurs lymphoïdes (Figure 30). Nous avons cherché à savoir quelle était l'origine de cette différence. Nous avons testé différentes hypothèses pour expliquer l'origine de cet effet. Une transduction avec un autre lentivirus contrôle exprimant la GFP, l'absence de virus dans le puits, ou bien la culture dans un autre milieu (StemSpan SFEM au lieu du BIT 9500) n'ont pas modifié le phénotype de surface des cellules par rapport à ce que nous avions observé, indiquant une autre cause à cet effet. Pourtant, lors de protocoles de culture classiques en StemSpan SFEM, nous conservions bien un phénotype « classique » avec une perte progressive du CD34 mais sans modification drastique de l'expression du CD45RA. Une dernière hypothèse qu'il nous reste à tester concerne la densité cellulaire. Le protocole de transduction lentivirale du laboratoire implique une culture de 50 000 $CD34^{+}$ dans 50 µL, ce qui correspond à une densité bien plus importante que celle utilisée en culture plus classique (par exemple, 25 000 cellules dans 500 µL).

Habituellement, les cellules sont peu gardées en culture après transduction mais plutôt utilisées immédiatement pour des tests fonctionnels, cet effet est donc observé pour la première fois. Des expériences supplémentaires sont donc à mener afin de savoir si cette altération des marqueurs de surface n'est qu'un effet phénotypique sans conséquence sur les propriétés des cellules $CD34^{+}$, ou bien si cela pourrait induire des effets fonctionnels. Cette dernière hypothèse semble néanmoins peu probable, aucun biais de différenciation flagrant n'ayant été observé lors de transplantations de cellules transduites au laboratoire, ni lors d'expériences fonctionnelles in vitro (CFU-C, LTC-IC) (Benyoucef et al., 2015; Brunet de la Grange et al., 2006; Chabi et al., 2019), mais cela pourrait néanmoins être confirmé de façon formelle. Enfin, dans un article cité plus haut, un groupe a récemment montré que l'efficacité de la transduction lentivirale était étroitement liée à une densité cellulaire importante (Uchida et al., 2019), ce qui confirme la validité de notre protocole. L'altération des marqueurs de surface dans certaines conditions, comme le CD38 (Dorrell et al., 2000; von Laer et al., 2000), n'est par ailleurs pas un phénomène inhabituel, sans nécessairement d'impact sur la fonctionnalité des cellules.

Remarques finales

Dans l'ensemble, cette étude permet d'ouvrir la possibilité de l'utilisation d'antioxydants dans deux domaines, la protection contre les faibles doses de radiations ionisantes et le maintien des CSH ex vivo. Les antioxydants semblent a priori présenter peu de risques, mais la validité de leur efficacité en clinique reste à démontrer. Si notre étude s'est cantonnée à l'étude du NAC et du Tempol, cela ouvre également la voie à l'étude d'autres molécules antioxydantes, avec d'autres modes d'actions potentiels.

RÉFÉRENCES & ANNEXES

Références bibliographiques

Abbas, H.A., Maccio, D.R., Coskun, S., Jackson, J.G., Hazen, A.L., Sills, T.M., You, M.J., Hirschi, K.K., and Lozano, G. (2010). Mdm2 is required for survival of hematopoietic stem cells/progenitors via dampening of ROS-induced p53 activity. Cell Stem Cell *7*, 606–617.

Abramson, S., Miller, R.G., and Phillips, R.A. (1977). The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. J. Exp. Med. *145*, 1567–1579.

Acar, M., Kocherlakota, K.S., Murphy, M.M., Peyer, J.G., Oguro, H., Inra, C.N., Jaiyeola, C., Zhao, Z., Luby-Phelps, K., and Morrison, S.J. (2015). Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. Nature *526*, 126–130.

Adams, G.B., Chabner, K.T., Alley, I.R., Olson, D.P., Szczepiorkowski, Z.M., Poznansky, M.C., Kos, C.H., Pollak, M.R., Brown, E.M., and Scadden, D.T. (2006). Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. Nature *439*, 599–603.

Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.-J., Thoren, L.A.M., et al. (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. Cell *121*, 295–306.

Afzal, E., Zarrabi, M., Asghari, M.H., and Ebrahimi, M. (2020). Combination of SB431542, Chir9901, and Bpv as a Novel Supplement in the Culture of Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells (In Review).

Aguila, J.R., Liao, W., Yang, J., Avila, C., Hagag, N., Senzel, L., and Ma, Y. (2011). SALL4 is a robust stimulator for the expansion of hematopoietic stem cells. Blood *118*, 576–585.

Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M.P., Baricordi, C., Dionisio, F., Calabria, A., Giannelli, S., Castiello, M.C., et al. (2013). Lentivirus-based Gene Therapy of Hematopoietic Stem Cells in Wiskott-Aldrich Syndrome. Science *341*, 1233151.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. Nature *404*, 193–197.

Akhter, S., Rahman, M.M., Lee, H.S., Kim, H.-J., and Hong, S.-T. (2013). Dynamic roles of angiopoietin-like proteins 1, 2, 3, 4, 6 and 7 in the survival and enhancement of ex vivo expansion of bone-marrow hematopoietic stem cells. Protein Cell *4*, 220–230.

Aljoufi, A., Cooper, S., and Broxmeyer, H.E. (2020). Collection and Processing of Mobilized Mouse Peripheral Blood at Lowered Oxygen Tension Yields Enhanced Numbers of Hematopoietic Stem Cells. Stem Cell Rev. Rep. *16*, 946–953.

Allen, E.S., and Conry-Cantilena, C. (2019). Mobilization and collection of cells in the hematologic compartment for cellular therapies: Stem cell collection with G-CSF/plerixafor, collecting lymphocytes/monocytes. Semin. Hematol. *56*, 248–256.

de Almeida, M.J., Luchsinger, L.L., Corrigan, D.J., Williams, L.J., and Snoeck, H.-W. (2017). Dye-Independent Methods Reveal Elevated Mitochondrial Mass in Hematopoietic Stem Cells. Cell Stem Cell *21*, 725-729.e4.

Al-Saif, A.M. (2019). Gene therapy of hematological disorders: current challenges. Gene Ther. *26*, 296–307.

Altman, B.J., Stine, Z.E., and Dang, C.V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. Nat. Rev. Cancer *16*, 619–634.

Amsellem, S., Pflumio, F., Bardinet, D., Izac, B., Charneau, P., Romeo, P.-H., Dubart-Kupperschmitt, A., and Fichelson, S. (2003). Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. Nat. Med. *9*, 1423–1427.

Anand, S., Thomas, S., Hyslop, T., Adcock, J., Corbet, K., Gasparetto, C., Lopez, R., Long, G.D., Morris, A.K., Rizzieri, D.A., et al. (2017). Transplantation of Ex Vivo Expanded Umbilical Cord Blood (NiCord) Decreases Early Infection and Hospitalization. Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. *23*, 1151–1157.

Anderson, J., and Akkina, R. (2007). Complete knockdown of CCR5 by lentiviral vector-expressed siRNAs and protection of transgenic macrophages against HIV-1 infection. Gene Ther. *14*, 1287–1297.

Andrade, P.Z., dos Santos, F., Almeida-Porada, G., da Silva, C.L., and S Cabral, J.M.S. (2010). Systematic delineation of optimal cytokine concentrations to expand hematopoietic stem/progenitor cells in co-culture with mesenchymal stem cells. Mol. Biosyst. *6*, 1207–1215.

Anguela, X.M., and High, K.A. (2019). Entering the Modern Era of Gene Therapy. Annu. Rev. Med. *70*, 273–288.

Ansó, E., Weinberg, S.E., Diebold, L.P., Thompson, B.J., Malinge, S., Schumacker, P.T., Liu, X., Zhang, Y., Shao, Z., Steadman, M., et al. (2017). The mitochondrial respiratory chain is essential for haematopoietic stem cell function. Nat. Cell Biol. *19*, 614–625.

Antarianto, R.D., Alodia, B., Prasetyadi, Y.L., Nurhayati, R.W., Pratama, G., and Sianipar, I.R. (2019). Human serum albumin potentially maintain CD34 hematopoetic stem/progenitor cell stemness in vitro. Cytotherapy *21*, S65.

Antonchuk, J., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (2001). HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. Exp. Hematol. *29*, 1125–1134.

Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell *118*, 149–161.

Araki, H., Mahmud, N., Milhem, M., Nunez, R., Xu, M., Beam, C.A., and Hoffman, R. (2006). Expansion of human umbilical cord blood SCID-repopulating cells using chromatin-modifying agents. Exp. Hematol. *34*, 140–149.

Araki, H., Yoshinaga, K., Boccuni, P., Zhao, Y., Hoffman, R., and Mahmud, N. (2007). Chromatin-modifying agents permit human hematopoietic stem cells to undergo multiple cell divisions while retaining their repopulating potential. Blood *109*, 3570–3578.

Arcangeli, M.-L., Lancrin, C., Lambolez, F., Cordier, C., Schneider, E., Rocha, B., and Ezine, S. (2005). Extrathymic hemopoietic progenitors committed to T cell differentiation in the adult mouse. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 1980–1988.

Arcangeli, M.-L., Frontera, V., Bardin, F., Obrados, E., Adams, S., Chabannon, C., Schiff, C., Mancini, S.J.C., Adams, R.H., and Aurrand-Lions, M. (2011). JAM-B regulates maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. Blood *118*, 4609–4619.

Arcangeli, M.-L., Brault, P., Bourhis, J.-H., Kuhnowskie, F., Henry, E., Barroca, V., Koscielny, S., Pflumio, F., and Amsellem, S. (2020). Combined G-CSF and Plerixafor enhance hematopoietic recovery of CD34+ cells from poor mobilizer patients in NSG mice. Exp. Hematol. *86*, 15-20.e2.

Asada, N., Kunisaki, Y., Pierce, H., Wang, Z., Fernandez, N.F., Birbrair, A., Ma'ayan, A., and Frenette, P.S. (2017). Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. Nat. Cell Biol. *19*, 214–223.

Asai, T., Liu, Y., Bae, N., and Nimer, S.D. (2011). The p53 tumor suppressor protein regulates hematopoietic stem cell fate. J. Cell. Physiol. *226*, 2215–2221.

Auvray, C., Delahaye, A., Pflumio, F., Haddad, R., Amsellem, S., Miri-Nezhad, A., Broix, L., Yacia, A., Bulle, F., Fichelson, S., et al. (2012). HOXC4 homeoprotein efficiently expands human hematopoietic stem cells and triggers similar molecular alterations as HOXB4. Haematologica *97*, 168–178.

Avigdor, A., Goichberg, P., Shivtiel, S., Dar, A., Peled, A., Samira, S., Kollet, O., Hershkoviz, R., Alon, R., Hardan, I., et al. (2004). CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. Blood *103*, 2981–2989.

Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.-P., and Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Lett. *327*, 48–60.

Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B., and Rhee, S.G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. J. Biol. Chem. *272*, 217–221.

Bai, T., Li, J., Sinclair, A., Imren, S., Merriam, F., Sun, F., O'Kelly, M.B., Nourigat, C., Jain, P., Delrow, J.J., et al. (2019). Expansion of primitive human hematopoietic stem cells by culture in a zwitterionic hydrogel. Nat. Med. *25*, 1566–1575.

Barjaktarovic, Z., Schmaltz, D., Shyla, A., Azimzadeh, O., Schulz, S., Haagen, J., Dörr, W., Sarioglu, H., Schäfer, A., Atkinson, M.J., et al. (2011). Radiation-induced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to X-rays. PloS One *6*, e27811.

Baudet, A., Karlsson, C., Safaee Talkhoncheh, M., Galeev, R., Magnusson, M., and Larsson, J. (2012). RNAi screen identifies MAPK14 as a druggable suppressor of human hematopoietic stem cell expansion. Blood *119*, 6255–6258.

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. U. S. A. *89*, 2804–2808.

Baumgartner, C., Toifl, S., Farlik, M., Halbritter, F., Scheicher, R., Fischer, I., Sexl, V., Bock, C., and Baccarini, M. (2018). An ERK-Dependent Feedback Mechanism Prevents Hematopoietic Stem Cell Exhaustion. Cell Stem Cell *22*, 879-892.e6.

Becker, A.J., McCULLOCH, E.A., and Till, J.E. (1963). Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. Nature *197*, 452–454.

Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol. Rev. *87*, 245–313.

Beerman, I., and Rossi, D.J. (2014). Epigenetic regulation of hematopoietic stem cell aging. Exp. Cell Res. *329*, 192–199.

Beerman, I., Bock, C., Garrison, B.S., Smith, Z.D., Gu, H., Meissner, A., and Rossi, D.J. (2013). Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. Cell Stem Cell *12*, 413–425.

Belluschi, S., Calderbank, E.F., Ciaurro, V., Pijuan-Sala, B., Santoro, A., Mende, N., Diamanti, E., Sham, K.Y.C., Wang, X., Lau, W.W.Y., et al. (2018). Myelo-lymphoid lineage restriction occurs in the human haematopoietic stem cell compartment before lymphoid-primed multipotent progenitors. Nat. Commun. *9*, 4100.

Bennaceur-Griscelli, A., Tourino, C., Izac, B., Vainchenker, W., and Coulombel, L. (1999). Murine stromal cells counteract the loss of long-term culture-initiating cell potential induced by cytokines in CD34(+)CD38(low/neg) human bone marrow cells. Blood *94*, 529–538.

Benveniste, P., Frelin, C., Janmohamed, S., Barbara, M., Herrington, R., Hyam, D., and Iscove, N.N. (2010). Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. Cell Stem Cell *6*, 48–58.

Benveniste, P., Serra, P., Dervovic, D., Herer, E., Knowles, G., Mohtashami, M., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2014). Notch signals are required for in vitro but not in vivo maintenance of human hematopoietic stem cells and delay the appearance of multipotent progenitors. Blood *123*, 1167–1177.

Benyoucef, A., Calvo, J., Renou, L., Arcangeli, M.-L., van den Heuvel, A., Amsellem, S., Mehrpour, M., Larghero, J., Soler, E., Naguibneva, I., et al. (2015). The SCL/TAL1 Transcription Factor Represses the Stress Protein DDiT4/REDD1 in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. Stem Cells Dayt. Ohio *33*, 2268–2279.

Bernitz, J.M., Kim, H.S., MacArthur, B., Sieburg, H., and Moore, K. (2016). Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions. Cell *167*, 1296-1309.e10.

Bhatia, M., Bonnet, D., Kapp, U., Wang, J.C., Murdoch, B., and Dick, J.E. (1997). Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. J. Exp. Med. *186*, 619–624.

Bigarella, C.L., Liang, R., and Ghaffari, S. (2014). Stem cells and the impact of ROS signaling. Development *141*, 4206–4218.

Bigarella, C.L., Li, J., Rimmelé, P., Liang, R., Sobol, R.W., and Ghaffari, S. (2017). FOXO3 Transcription Factor Is Essential for Protecting Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Oxidative DNA Damage. J. Biol. Chem. *292*, 3005–3015.

Bird, G.A., Polsky, A., Estes, P., Hanlon, T., Hamilton, H., Morton, J.J., Gutman, J., Jimeno, A., Turner, B.C., and Refaeli, Y. (2014). Expansion of human and murine hematopoietic stem and progenitor cells ex vivo without genetic modification using MYC and Bcl-2 fusion proteins. PloS One *9*, e105525.

Bissels, U., Wild, S., Tomiuk, S., Hafner, M., Scheel, H., Mihailovic, A., Choi, Y.-H., Tuschl, T., and Bosio, A. (2011). Combined characterization of microRNA and mRNA profiles delineates early differentiation

pathways of CD133+ and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. Stem Cells Dayt. Ohio *29*, 847–857.

Boiron, J.-M., Dazey, B., Cailliot, C., Launay, B., Attal, M., Mazurier, F., McNiece, I.K., Ivanovic, Z., Caraux, J., Marit, G., et al. (2006). Large-scale expansion and transplantation of CD34(+) hematopoietic cells: in vitro and in vivo confirmation of neutropenia abrogation related to the expansion process without impairment of the long-term engraftment capacity. Transfusion (Paris) *46*, 1934–1942.

Boisset, J.-C., and Robin, C. (2012). On the origin of hematopoietic stem cells: progress and controversy. Stem Cell Res. *8*, 1–13.

Boitano, A.E., Wang, J., Romeo, R., Bouchez, L.C., Parker, A.E., Sutton, S.E., Walker, J.R., Flaveny, C.A., Perdew, G.H., Denison, M.S., et al. (2010). Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. Science *329*, 1345–1348.

Bonig, H., and Papayannopoulou, T. (2012). Mobilization of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells: General Principles and Molecular Mechanisms. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *904*, 1–14.

Bourgine, P.E., Klein, T., Paczulla, A.M., Shimizu, T., Kunz, L., Kokkaliaris, K.D., Coutu, D.L., Lengerke, C., Skoda, R., Schroeder, T., et al. (2018). In vitro biomimetic engineering of a human hematopoietic niche with functional properties. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *115*, E5688–E5695.

Bowman, R.L., Busque, L., and Levine, R.L. (2018). Clonal Hematopoiesis and Evolution to Hematopoietic Malignancies. Cell Stem Cell *22*, 157–170.

Boyer, S.W., Schroeder, A.V., Smith-Berdan, S., and Forsberg, E.C. (2011). All hematopoietic cells develop from hematopoietic stem cells through Flk2/Flt3-positive progenitor cells. Cell Stem Cell *9*, 64–73.

Brady, N.R., Hamacher-Brady, A., Westerhoff, H.V., and Gottlieb, R.A. (2006). A wave of reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release in a sea of excitable mitochondria. Antioxid. Redox Signal. *8*, 1651–1665.

Brandt, J.E., Bartholomew, A.M., Fortman, J.D., Nelson, M.C., Bruno, E., Chen, L.M., Turian, J.V., Davis, T.A., Chute, J.P., and Hoffman, R. (1999). Ex vivo expansion of autologous bone marrow CD34(+) cells with porcine microvascular endothelial cells results in a graft capable of rescuing lethally irradiated baboons. Blood *94*, 106–113.

Breems, D.A., Blokland, E.A., Neben, S., and Ploemacher, R.E. (1994). Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay. Leukemia *8*, 1095–1104.

Brown, K., Xie, S., Qiu, X., Mohrin, M., Shin, J., Liu, Y., Zhang, D., Scadden, D.T., and Chen, D. (2013). SIRT3 Reverses Aging-Associated Degeneration. Cell Rep. *3*, 319–327.

Broxmeyer, H.E. (1984). Colony assays of hematopoietic progenitor cells and correlations to clinical situations. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *1*, 227–257.

Broxmeyer, H.E., Orschell, C.M., Clapp, D.W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P.A., Liles, W.C., Li, X., Graham-Evans, B., Campbell, T.B., et al. (2005). Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. J. Exp. Med. *201*, 1307–1318.

Brunet de la Grange, P., Armstrong, F., Duval, V., Rouyez, M.-C., Goardon, N., Romeo, P.-H., and Pflumio, F. (2006). Low SCL/TAL1 expression reveals its major role in adult hematopoietic myeloid progenitors and stem cells. Blood *108*, 2998–3004.

Brunet de la Grange, P., Vlaski, M., Duchez, P., Chevaleyre, J., Lapostolle, V., Boiron, J.-M., Praloran, V., and Ivanovic, Z. (2013). Long-term repopulating hematopoietic stem cells and "side population" in human steady state peripheral blood. Stem Cell Res. *11*, 625–633.

Bruns, I., Lucas, D., Pinho, S., Ahmed, J., Lambert, M.P., Kunisaki, Y., Scheiermann, C., Schiff, L., Poncz, M., Bergman, A., et al. (2014). Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. Nat. Med. *20*, 1315–1320.

Brunstein, C.G., and Wagner, J.E. (2006). Umbilical cord blood transplantation and banking. Annu. Rev. Med. *57*, 403–417.

Bryder, D., and Jacobsen, S.E. (2000). Interleukin-3 supports expansion of long-term multilineage repopulating activity after multiple stem cell divisions in vitro. Blood *96*, 1748–1755.

Bug, G., Gül, H., Schwarz, K., Pfeifer, H., Kampfmann, M., Zheng, X., Beissert, T., Boehrer, S., Hoelzer, D., Ottmann, O.G., et al. (2005). Valproic Acid Stimulates Proliferation and Self-renewal of Hematopoietic Stem Cells. Cancer Res. *65*, 2537–2541.

Bunting, K.D., Galipeau, J., Topham, D., Benaim, E., and Sorrentino, B.P. (1998). Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. Blood *92*, 2269–2279.

Bunting, K.D., Galipeau, J., Topham, D., Benaim, E., and Sorrentino, B.P. (1999). Effects of retroviral-mediated MDR1 expression on hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation in culture. Ann. N. Y. Acad. Sci. *872*, 125–140; discussion 140-141.

Bunting, K.D., Zhou, S., Lu, T., and Sorrentino, B.P. (2000). Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells in vitro and repopulating cells in vivo. Blood *96*, 902–909.

Busch, K., Klapproth, K., Barile, M., Flossdorf, M., Holland-Letz, T., Schlenner, S.M., Reth, M., Höfer, T., and Rodewald, H.-R. (2015). Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo. Nature *518*, 542–546.

Busque, L., Patel, J.P., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Provost, S., Hamilou, Z., Mollica, L., Li, J., Viale, A., Heguy, A., et al. (2012). Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. Nat. Genet. *44*, 1179–1181.

Cabezas-Wallscheid, N., Klimmeck, D., Hansson, J., Lipka, D.B., Reyes, A., Wang, Q., Weichenhan, D., Lier, A., von Paleske, L., Renders, S., et al. (2014). Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis. Cell Stem Cell *15*, 507–522.

Cabezas-Wallscheid, N., Buettner, F., Sommerkamp, P., Klimmeck, D., Ladel, L., Thalheimer, F.B., Pastor-Flores, D., Roma, L.P., Renders, S., Zeisberger, P., et al. (2017). Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy. Cell *169*, 807-823.e19.

Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. Nat. Rev. Cancer *11*, 85–95.

Cakouros, D., and Gronthos, S. (2019). Epigenetic Regulation of Bone Marrow Stem Cell Aging: Revealing Epigenetic Signatures associated with Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cell Aging. Aging Dis. *10*, 174–189.

Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature *425*, 841–846.

Cao, Y., Fang, Y., Cai, J., Li, X., Xu, F., Yuan, N., Zhang, S., and Wang, J. (2016). ROS functions as an upstream trigger for autophagy to drive hematopoietic stem cell differentiation. Hematol. Amst. Neth. *21*, 613–618.

Carrelha, J., Meng, Y., Kettyle, L.M., Luis, T.C., Norfo, R., Alcolea, V., Boukarabila, H., Grasso, F., Gambardella, A., Grover, A., et al. (2018). Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. Nature *554*, 106–111.

Castellanos, J.G., and Longman, R.S. (2019). The balance of power: innate lymphoid cells in tissue inflammation and repair. J. Clin. Invest. *129*, 2640–2650.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., et al. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science *288*, 669–672.

Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K., et al. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β-thalassaemia. Nature *467*, 318–322.

Celebi, B., Mantovani, D., and Pineault, N. (2012). Insulin-like growth factor binding protein-2 and neurotrophin 3 synergize together to promote the expansion of hematopoietic cells ex vivo. Cytokine *58*, 327–331.

Chabi, S., Uzan, B., Naguibneva, I., Rucci, J., Fahy, L., Calvo, J., Arcangeli, M.-L., Mazurier, F., Pflumio, F., and Haddad, R. (2019). Hypoxia Regulates Lymphoid Development of Human Hematopoietic Progenitors. Cell Rep. *29*, 2307-2320.e6.

Challen, G.A., Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J.S., Bock, C., Vasanthakumar, A., Gu, H., Xi, Y., et al. (2011). Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. Nat. Genet. *44*, 23–31.

Challen, G.A., Sun, D., Mayle, A., Jeong, M., Luo, M., Rodriguez, B., Mallaney, C., Celik, H., Yang, L., Xia, Z., et al. (2014). Dnmt3a and Dnmt3b have overlapping and distinct functions in hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell *15*, 350–364.

Chan, C.K.F., Chen, C.-C., Luppen, C.A., Kim, J.-B., DeBoer, A.T., Wei, K., Helms, J.A., Kuo, C.J., Kraft, D.L., and Weissman, I.L. (2009). Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. Nature *457*, 490–494.

Chan, W.-I., Hannah, R.L., Dawson, M.A., Pridans, C., Foster, D., Joshi, A., Göttgens, B., Van Deursen, J.M., and Huntly, B.J.P. (2011). The transcriptional coactivator Cbp regulates self-renewal and differentiation in adult hematopoietic stem cells. Mol. Cell. Biol. *31*, 5046–5060.

Chang, J., Luo, Y., Wang, Y., Pathak, R., Sridharan, V., Jones, T., Mao, X.W., Nelson, G., Boerma, M., Hauer-Jensen, M., et al. (2016). Low Doses of Oxygen Ion Irradiation Cause Acute Damage to Hematopoietic Cells in Mice. PloS One *11*, e0158097.

Chaurasia, P., Gajzer, D.C., Schaniel, C., D'Souza, S., and Hoffman, R. (2014). Epigenetic reprogramming induces the expansion of cord blood stem cells. J. Clin. Invest. *124*, 2378–2395.

Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K.-L., Liu, Y., and Zheng, P. (2008). TSC–mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. J. Exp. Med. *205*, 2397–2408.

Cheng, H., Zheng, Z., and Cheng, T. (2020). New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. Protein Cell *11*, 34–44.

Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., and Scadden, D.T. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. Science *287*, 1804–1808.

Cheshier, S.H., Prohaska, S.S., and Weissman, I.L. (2007). The effect of bleeding on hematopoietic stem cell cycling and self-renewal. Stem Cells Dev. *16*, 707–717.

Chiche, J., Pommier, S., Beneteau, M., Mondragón, L., Meynet, O., Zunino, B., Mouchotte, A., Verhoeyen, E., Guyot, M., Pagès, G., et al. (2015). GAPDH enhances the aggressiveness and the vascularization of non-Hodgkin's B lymphomas via NF-κB-dependent induction of HIF-1α. Leukemia *29*, 1163–1176.

Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. Dev. Camb. Engl. *125*, 725–732.

Choi, Y.-S., Noh, S.-E., Lim, S.-M., and Kim, D. (2010). Optimization of ex vivo hematopoietic stem cell expansion in intermittent dynamic cultures. Biotechnol. Lett. *32*, 1969–1975.

Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Méndez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., Battista, M., Leboeuf, M., Prophete, C., van Rooijen, N., et al. (2011). Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. J. Exp. Med. *208*, 261–271.

Chow, D.C., Wenning, L.A., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (2001a). Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. Biophys. J. *81*, 675–684.

Chow, D.C., Wenning, L.A., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (2001b). Modeling pO2 Distributions in the Bone Marrow Hematopoietic Compartment. II. Modified Kroghian Models. Biophys. J. *81*, 685–696.

Christensen, J.L., and Weissman, I.L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 14541–14546.

Christopher, M.J., Rao, M., Liu, F., Woloszynek, J.R., and Link, D.C. (2011). Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. J. Exp. Med. *208*, 251–260.

Chua, K.-N., Chai, C., Lee, P.-C., Tang, Y.-N., Ramakrishna, S., Leong, K.W., and Mao, H.-Q. (2006). Surface-aminated electrospun nanofibers enhance adhesion and expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. Biomaterials *27*, 6043–6051.

Chute, J.P., Muramoto, G.G., Dressman, H.K., Wolfe, G., Chao, N.J., and Lin, S. (2006). Molecular profile and partial functional analysis of novel endothelial cell-derived growth factors that regulate hematopoiesis. Stem Cells Dayt. Ohio *24*, 1315–1327.

Cipolleschi, M.G., Dello Sbarba, P., and Olivotto, M. (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. Blood *82*, 2031–2037.

Civin, C.I., Strauss, L.C., Fackler, M.J.O., and Shaper', J.H. (1984). A Hematopoietic Progenitor Cell Surface Antigen Defined by a Monoclonal Antibody Raised against KG-la Cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *133*, 157–165.

Claveau, J.-S., Cohen, S., Ahmad, I., Delisle, J.-S., Kiss, T., Lachance, S., Sauvageau, G., Busque, L., Brito, R.-M., Bambace, N., et al. (2020). Single UM171-expanded cord blood transplant can cure severe idiopathic aplastic anemia in absence of suitable donors. Eur. J. Haematol.

Cohen, S., Roy, J., Lachance, S., Marinier, A., Roy, D.-C., Delisle, J.-S., Busque, L., Caudrelier, P., Larochelle, F., Bouchard, P., et al. (2017). Single UM171 Expanded Cord Blood Transplant Is Feasible, Safe, and Permits Transplantation of Better HLA Matched Cords with Very Low Transplant Related Mortality. Blood *130*, 658–658.

Cohen, S., Roy, J., Lachance, S., Delisle, J.-S., Marinier, A., Busque, L., Roy, D.-C., Barabé, F., Ahmad, I., Bambace, N., et al. (2020). Hematopoietic stem cell transplantation using single UM171-expanded cord blood: a single-arm, phase 1-2 safety and feasibility study. Lancet Haematol. *7*, e134–e145.

Conneally, E., Cashman, J., Petzer, A., and Eaves, C. (1997). Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 9836–9841.

Correia, N.C., Arcangeli, M.-L., Pflumio, F., and Barata, J.T. (2016). Stem Cell Leukemia: how a TALented actor can go awry on the hematopoietic stage. Leukemia *30*, 1968–1978.

Cosgun, K.N., Rahmig, S., Mende, N., Reinke, S., Hauber, I., Schäfer, C., Petzold, A., Weisbach, H., Heidkamp, G., Purbojo, A., et al. (2014). Kit Regulates HSC Engraftment across the Human-Mouse Species Barrier. Cell Stem Cell *15*, 227–238.

Coulombel, L. (2004). Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. Oncogene *23*, 7210–7222.

Craig, W., Kay, R., Cutler, R.L., and Lansdorp, P.M. (1993). Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. J. Exp. Med. *177*, 1331–1342.

Crcareva, A., Saito, T., Kunisato, A., Kumano, K., Suzuki, T., Sakata-Yanagimoto, M., Kawazu, M., Stojanovic, A., Kurokawa, M., Ogawa, S., et al. (2005). Hematopoietic stem cells expanded by fibroblast growth factor-1 are excellent targets for retrovirus-mediated gene delivery. Exp. Hematol. *33*, 1459–1469.

Csaszar, E., Kirouac, D.C., Yu, M., Wang, W., Qiao, W., Cooke, M.P., Boitano, A.E., Ito, C., and Zandstra, P.W. (2012). Rapid expansion of human hematopoietic stem cells by automated control of inhibitory feedback signaling. Cell Stem Cell *10*, 218–229.

Cutler, C., Multani, P., Robbins, D., Kim, H.T., Le, T., Hoggatt, J., Pelus, L.M., Desponts, C., Chen, Y.-B., Rezner, B., et al. (2013). Prostaglandin-modulated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. Blood *122*, 3074–3081.

Daga, A., Podesta, M., Capra, M.C., Piaggio, G., Frassoni, F., and Corte, G. (2000). The retroviral transduction of HOXC4 into human CD34(+) cells induces an in vitro expansion of clonogenic and early progenitors. Exp. Hematol. *28*, 569–574.

Dahlberg, A., Brashem-Stein, C., Delaney, C., and Bernstein, I.D. (2014). Enhanced generation of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells by culture with StemRegenin1 and Delta1Ext-IgG. Leukemia *28*, 2097–2101.

Dakic, A., Metcalf, D., Di Rago, L., Mifsud, S., Wu, L., and Nutt, S.L. (2005). PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. J. Exp. Med. *201*, 1487–1502.

Danet, G.H., Pan, Y., Luongo, J.L., Bonnet, D.A., and Simon, M.C. (2003). Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. J. Clin. Invest. *112*, 126–135.

Dao, M.A., Hashino, K., Kato, I., and Nolta, J.A. (1998). Adhesion to fibronectin maintains regenerative capacity during ex vivo culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood *92*, 4612–4621.

De Felice, L., Tatarelli, C., Mascolo, M.G., Gregorj, C., Agostini, F., Fiorini, R., Gelmetti, V., Pascale, S., Padula, F., Petrucci, M.T., et al. (2005). Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Enhances the Cytokine-Induced Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells. Cancer Res. *65*, 1505–1513.

DeBerardinis, R.J., and Chandel, N.S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. Sci. Adv. *2*, e1600200.

Delaney, C., Varnum-Finney, B., Aoyama, K., Brashem-Stein, C., and Bernstein, I.D. (2005). Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells. Blood *106*, 2693–2699.

Delaney, C., Heimfeld, S., Brashem-Stein, C., Voorhies, H., Manger, R.L., and Bernstein, I.D. (2010). Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. Nat. Med. *16*, 232–236.

Desouky, O., Ding, N., and Zhou, G. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. J. Radiat. Res. Appl. Sci. *8*, 247–254.

Dexter, T.M., Allen, T.D., and Lajtha, L.G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. J. Cell. Physiol. *91*, 335–344.

DeYoung, M.P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., and Ellisen, L.W. (2008). Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. Genes Dev. *22*, 239–251.

Diaz-Montero, C.M., Wang, Y., Shao, L., Feng, W., Zidan, A.-A., Pazoles, C.J., Montero, A.J., and Zhou, D. (2012). The glutathione disulfide mimetic NOV-002 inhibits cyclophosphamide-induced hematopoietic and immune suppression by reducing oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. *52*, 1560–1568.

DiGiusto, D.L., Lee, R., Moon, J., Moss, K., O'Toole, T., Voytovich, A., Webster, D., and Mule, J.J. (1996). Hematopoietic potential of cryopreserved and ex vivo manipulated umbilical cord blood progenitor cells evaluated in vitro and in vivo. Blood *87*, 1261–1271.

Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. Nature *495*, 231–235.

Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. Nature *481*, 457–462.

Dooley, C.T., Dore, T.M., Hanson, G.T., Jackson, W.C., Remington, S.J., and Tsien, R.Y. (2004). Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. J. Biol. Chem. *279*, 22284–22293.

Dorrell, C., Gan, O.I., Pereira, D.S., Hawley, R.G., and Dick, J.E. (2000). 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 *95*, 102–110.

Doss, M. (2013). Linear No-Threshold Model VS. Radiation Hormesis. Dose-Response Publ. Int. Hormesis Soc. *11*, 480–497.

Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., Nguyen, L.T., Ohashi, P.S., and Dick, J.E. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. Nat. Immunol. *11*, 585–593.

Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., and Dick, J.E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. Cell Stem Cell *10*, 120–136.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. *82*, 47–95.

Du, Z., Cai, H., Ye, Z., and Tan, W.-S. (2012). Optimization of SCF feeding regimen for ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem cells. J. Biotechnol. *164*, 211–219.

Duchez, P., Chevaleyre, J., Vlaski, M., Dazey, B., Milpied, N., Boiron, J.-M., and Ivanovic, Z. (2012). Definitive setup of clinical scale procedure for ex vivo expansion of cord blood hematopoietic cells for transplantation. Cell Transplant. *21*, 2517–2521.

Duchez, P., Chevaleyre, J., Brunet de la Grange, P., Vlaski, M., Boiron, J.-M., and Ivanovic, Z. (2013). Functional stability (at +4°C) of hematopoietic stem and progenitor cells amplified ex vivo from cord blood CD34+ cells. Cell Transplant. *22*, 1501–1506.

Duchez, P., Rodriguez, L., Chevaleyre, J., Lapostolle, V., Vlaski, M., Brunet de la Grange, P., and Ivanovic, Z. (2015). Interleukin-6 enhances the activity of in vivo long-term reconstituting hematopoietic stem cells in “hypoxic-like” expansion cultures ex vivo. Transfusion (Paris) *55*, 2684–2691.

Dupard, S.J., Grigoryan, A., Farhat, S., Coutu, D.L., and Bourgine, P.E. (2020). Development of Humanized Ossicles: Bridging the Hematopoietic Gap. Trends Mol. Med. *26*, 552–569.

Dussiot, M., Maciel, T.T., Fricot, A., Chartier, C., Negre, O., Veiga, J., Grapton, D., Paubelle, E., Payen, E., Beuzard, Y., et al. (2014). An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in β-thalassemia. Nat. Med. *20*, 398–407.

Dykstra, B., Kent, D., Bowie, M., McCaffrey, L., Hamilton, M., Lyons, K., Lee, S.-J., Brinkman, R., and Eaves, C. (2007). Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. Cell Stem Cell *1*, 218–229.

Eaves, C.J. (2015). Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. Blood *125*, 2605–2613.

Eliasson, P., Rehn, M., Hammar, P., Larsson, P., Sirenko, O., Flippin, L.A., Cammenga, J., and Jönsson, J.-I. (2010). Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. Exp. Hematol. *38*, 301-310.e2.

Ema, H., Takano, H., Sudo, K., and Nakauchi, H. (2000). In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. J. Exp. Med. *192*, 1281–1288.

Ema, H., Sudo, K., Seita, J., Matsubara, A., Morita, Y., Osawa, M., Takatsu, K., Takaki, S., and Nakauchi, H. (2005). Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. Dev. Cell *8*, 907–914.

Essers, M.A.G., Offner, S., Blanco-Bose, W.E., Waibler, Z., Kalinke, U., Duchosal, M.A., and Trumpp, A. (2009). IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. Nature *458*, 904–908.

Ewees, M.G., Messiha, B.A.S., Abdel-Bakky, M.S., Bayoumi, A.M.A., and Abo-Saif, A.A. (2019). Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, reduces cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Drug Chem. Toxicol. *42*, 657–664.

Fan, X., Gay, F.P., Lim, F.W., Ang, J.M., Chu, P.P., Bari, S., and Hwang, W.Y. (2014). Low-dose insulin-like growth factor binding proteins 1 and 2 and angiopoietin-like protein 3 coordinately stimulate ex vivo expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem cells as assayed in NOD/SCID gamma null mice. Stem Cell Res. Ther. *5*, 71.

Farahbakhshian, E., Verstegen, M.M., Visser, T.P., Kheradmandkia, S., Geerts, D., Arshad, S., Riaz, N., Grosveld, F., van Til, N.P., and Meijerink, J.P.P. (2014). Angiopoietin-like protein 3 promotes preservation of stemness during ex vivo expansion of murine hematopoietic stem cells. PloS One *9*, e105642.

Fares, I., Chagraoui, J., Gareau, Y., Gingras, S., Ruel, R., Mayotte, N., Csaszar, E., Knapp, D.J.H.F., Miller, P., Ngom, M., et al. (2014). Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. Science *345*, 1509–1512.

Fares, I., Chagraoui, J., Lehnertz, B., MacRae, T., Mayotte, N., Tomellini, E., Aubert, L., Roux, P.P., and Sauvageau, G. (2017). EPCR expression marks UM171-expanded CD34+ cord blood stem cells. Blood *129*, 3344–3351.

Fehér, I., and Gidáli, J. (1974). Prostaglandin E2 as stimulator of haemopoietic stem cell proliferation. Nature *247*, 550–551.

Fei, X.M., Wu, Y.J., Chang, Z., Miao, K.R., Tang, Y.H., Zhou, X.Y., Wang, L.X., Pan, Q.Q., and Wang, C.Y. (2007). Co-culture of cord blood CD34(+) cells with human BM mesenchymal stromal cells enhances short-term engraftment of cord blood cells in NOD/SCID mice. Cytotherapy *9*, 338–347.

Feng, Q., Chai, C., Jiang, X.-S., Leong, K.W., and Mao, H.-Q. (2006). Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin. J. Biomed. Mater. Res. A *78*, 781–791.

Fernández, M., Regidor, C., Cabrera, R., García-Marco, J., Briz, M., Forés, R., Sanjuán, I., McWhinnie, A., Querol, S., García, J., et al. (2001). Cord blood transplants: early recovery of neutrophils from co-transplanted sibling haploidentical progenitor cells and lack of engraftment of cultured cord blood cells, as ascertained by analysis of DNA polymorphisms. Bone Marrow Transplant. *28*, 355–363.

Fernandez-Antoran, D., Piedrafita, G., Murai, K., Ong, S.H., Herms, A., Frezza, C., and Jones, P.H. (2019). Outcompeting p53-Mutant Cells in the Normal Esophagus by Redox Manipulation. Cell Stem Cell *25*, 329-341.e6.

Ferreira, M.S.V., Jahnen-Dechent, W., Labude, N., Bovi, M., Hieronymus, T., Zenke, M., Schneider, R.K., Neuss, S., and Neurs, S. (2012). Cord blood-hematopoietic stem cell expansion in 3D fibrin scaffolds with stromal support. Biomaterials *33*, 6987–6997.

Ferrua, F., and Aiuti, A. (2017). Twenty-Five Years of Gene Therapy for ADA-SCID: From Bubble Babies to an Approved Drug. Hum. Gene Ther. *28*, 972–981.

Ferrua, F., Cicalese, M.P., Galimberti, S., Giannelli, S., Dionisio, F., Barzaghi, F., Migliavacca, M., Bernardo, M.E., Calbi, V., Assanelli, A.A., et al. (2019). Lentiviral haemopoietic stem/progenitor cell gene therapy for treatment of Wiskott-Aldrich syndrome: interim results of a non-randomised, open-label, phase 1/2 clinical study. Lancet Haematol. *6*, e239–e253.

Ficara, F., Murphy, M.J., Lin, M., and Cleary, M.L. (2008). Pbx1 regulates self-renewal of long-term hematopoietic stem cells by maintaining their quiescence. Cell Stem Cell *2*, 484–496.

Fielding, C., and Méndez-Ferrer, S. (2020). Neuronal regulation of bone marrow stem cell niches. F1000Research *9*.

Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. J. Cell Biol. *194*, 7–15.

Firuzi, O., Miri, R., Tavakkoli, M., and Saso, L. (2011). Antioxidant therapy: current status and future prospects. Curr. Med. Chem. *18*, 3871–3888.

Flach, J., Bakker, S.T., Mohrin, M., Conroy, P.C., Pietras, E.M., Reynaud, D., Alvarez, S., Diolaiti, M.E., Ugarte, F., Forsberg, E.C., et al. (2014). Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. Nature *512*, 198–202.

Florian, M.C., Klose, M., Sacma, M., Jablanovic, J., Knudson, L., Nattamai, K.J., Marka, G., Vollmer, A., Soller, K., Sakk, V., et al. (2018). Aging alters the epigenetic asymmetry of HSC division. PLoS Biol. *16*, e2003389.

Focosi, D., Amabile, G., Di Ruscio, A., Quaranta, P., Tenen, D.G., and Pistello, M. (2014). Induced pluripotent stem cells in hematology: current and future applications. Blood Cancer J. *4*, e211.

Folkes, L.K., Patel, K.B., Wardman, P., and Wrona, M. (2009). Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydrorhodamine and the reaction of the dihydrorhodamine radical with oxygen: implications for quantifying peroxynitrite formation in cells. Arch. Biochem. Biophys. *484*, 122–126.

Ford, C.E., Hamerton, J.L., Barnes, D.W.H., and Loutit, J.F. (1956). Cytological Identification of Radiation-Chimæras. Nature *177*, 452–454.

Forsberg, E.C., Serwold, T., Kogan, S., Weissman, I.L., and Passegué, E. (2006). New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3+ multipotent hematopoietic progenitors. Cell *126*, 415–426.

Foudi, A., Hochedlinger, K., Van Buren, D., Schindler, J.W., Jaenisch, R., Carey, V., and Hock, H. (2009). Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. Nat. Biotechnol. *27*, 84–90.

Franke, K., Pompe, T., Bornhäuser, M., and Werner, C. (2007). Engineered matrix coatings to modulate the adhesion of CD133+ human hematopoietic progenitor cells. Biomaterials *28*, 836–843.

Fraser, C.C., Szilvassy, S.J., Eaves, C.J., and Humphries, R.K. (1992). Proliferation of totipotent hematopoietic stem cells in vitro with retention of long-term competitive in vivo reconstituting ability. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *89*, 1968–1972.

Gammaitoni, L., Bruno, S., Sanavio, F., Gunetti, M., Kollet, O., Cavalloni, G., Falda, M., Fagioli, F., Lapidot, T., Aglietta, M., et al. (2003). Ex vivo expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hemopoietic reconstitution. Exp. Hematol. *31*, 261–270.

Gan, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y.A., Chin, L., et al. (2010). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. Nature *468*, 701–704.

Genovese, P., Schiroli, G., Escobar, G., Tomaso, T.D., Firrito, C., Calabria, A., Moi, D., Mazzieri, R., Bonini, C., Holmes, M.C., et al. (2014). Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. Nature *510*, 235–240.

Gerber, H.-P., Malik, A.K., Solar, G.P., Sherman, D., Liang, X.H., Meng, G., Hong, K., Marsters, J.C., and Ferrara, N. (2002). VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. Nature *417*, 954–958.

Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., and Fenn, W.O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. Science *119*, 623–626.

Girard-Gagnepain, A., Amirache, F., Costa, C., Lévy, C., Frecha, C., Fusil, F., Nègre, D., Lavillette, D., Cosset, F.-L., and Verhoeyen, E. (2014). Baboon envelope pseudotyped LVs outperform VSV-G-LVs for gene transfer into early-cytokine-stimulated and resting HSCs. Blood *124*, 1221–1231.

Glimm, H., and Eaves, C.J. (1999). Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture. Blood *94*, 2161–2168.

Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., and Lehn, P. (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N. Engl. J. Med. *321*, 1174–1178.

Goardon, N., Marchi, E., Atzberger, A., Quek, L., Schuh, A., Soneji, S., Woll, P., Mead, A., Alford, K.A., Rout, R., et al. (2011). Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. Cancer Cell *19*, 138–152.

Goessling, W., North, T.E., Loewer, S., Lord, A.M., Lee, S., Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Puder, M., Daley, G.Q., Moon, R.T., et al. (2009). Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. Cell *136*, 1136–1147.

Golan, K., Kumari, A., Kollet, O., Khatib-Massalha, E., Subramaniam, M.D., Ferreira, Z.S., Avemaria, F., Rzeszotek, S., García-García, A., Xie, S., et al. (2018). Daily Onset of Light and Darkness Differentially Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Maintenance. Cell Stem Cell *23*, 572-585.e7.

Goldman, D.C., Bailey, A.S., Pfaffle, D.L., Al Masri, A., Christian, J.L., and Fleming, W.H. (2009). BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. Blood *114*, 4393–4401.

Gonçalves, R., Lobato da Silva, C., Cabral, J.M.S., Zanjani, E.D., and Almeida-Porada, G. (2006). A Stro-1(+) human universal stromal feeder layer to expand/maintain human bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in a serum-free culture system. Exp. Hematol. *34*, 1353–1359.

Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J. Exp. Med. *183*, 1797–1806.

Goodell, M.A., Rosenzweig, M., Kim, H., Marks, D.F., DeMaria, M., Paradis, G., Grupp, S.A., Sieff, C.A., Mulligan, R.C., and Johnson, R.P. (1997). Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. Nat. Med. *3*, 1337–1345.

Gori, J.L., Chandrasekaran, D., Kowalski, J.P., Adair, J.E., Beard, B.C., D'Souza, S.L., and Kiem, H.-P. (2012). Efficient generation, purification, and expansion of CD34(+) hematopoietic progenitor cells from nonhuman primate-induced pluripotent stem cells. Blood *120*, e35-44.

Goyama, S., Yamamoto, G., Shimabe, M., Sato, T., Ichikawa, M., Ogawa, S., Chiba, S., and Kurokawa, M. (2008). Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells. Cell Stem Cell *3*, 207–220.

Goyama, S., Wunderlich, M., and Mulloy, J.C. (2015). Xenograft models for normal and malignant stem cells. Blood *125*, 2630–2640.

Greenbaum, A., Hsu, Y.-M.S., Day, R.B., Schuettpelz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and Link, D.C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. Nature *495*, 227–230.

Guezguez, B., Campbell, C.J.V., Boyd, A.L., Karanu, F., Casado, F.L., Di Cresce, C., Collins, T.J., Shapovalova, Z., Xenocostas, A., and Bhatia, M. (2013). Regional localization within the bone marrow influences the functional capacity of human HSCs. Cell Stem Cell *13*, 175–189.

Guillem, F., Dussiot, M., Colin, E., Suriyun, T., Arlet, J.B., Goudin, N., Marcion, G., Seigneuric, R., Causse, S., Gonin, P., et al. (2019). XPO1 regulates erythroid differentiation and is a new target for the treatment of β-thalassemia. Haematologica.

Guo, B., Huang, X., Lee, M.R., Lee, S.A., and Broxmeyer, H.E. (2018). Antagonism of PPAR-γ signaling expands human hematopoietic stem and progenitor cells by enhancing glycolysis. Nat. Med. *24*, 360–367.

Guo, C., Sun, L., Chen, X., and Zhang, D. (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. Neural Regen. Res. *8*, 2003–2014.

Guo, S., Lu, J., Schlanger, R., Zhang, H., Wang, J.Y., Fox, M.C., Purton, L.E., Fleming, H.H., Cobb, B., Merkenschlager, M., et al. (2010). MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 14229–14234.

Gupta, R., Karpatkin, S., and Basch, R.S. (2006). Hematopoiesis and stem cell renewal in long-term bone marrow cultures containing catalase. Blood *107*, 1837–1846.

Gupta, R., Hong, D., Iborra, F., Sarno, S., and Enver, T. (2007). NOV (CCN3) functions as a regulator of human hematopoietic stem or progenitor cells. Science *316*, 590–593.

Gupta, R., Turati, V., Brian, D., Thrussel, C., Wilbourn, B., May, G., and Enver, T. (2020). Nov/CCN3 Enhances Cord Blood Engraftment by Rapidly Recruiting Latent Human Stem Cell Activity. Cell Stem Cell *26*, 527-541.e8.

Gur-Cohen, S., Itkin, T., Chakrabarty, S., Graf, C., Kollet, O., Ludin, A., Golan, K., Kalinkovich, A., Ledergor, G., Wong, E., et al. (2015). PAR1 signaling regulates the retention and recruitment of EPCR-expressing bone marrow hematopoietic stem cells. Nat. Med. *21*, 1307–1317.

Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., et al. (2010). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. Nature *468*, 659–663.

de Haan, G., Weersing, E., Dontje, B., van Os, R., Bystrykh, L.V., Vellenga, E., and Miller, G. (2003). In vitro generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. Dev. Cell *4*, 241–251.

Haas, S., Hansson, J., Klimmeck, D., Loeffler, D., Velten, L., Uckelmann, H., Wurzer, S., Prendergast, Á.M., Schnell, A., Hexel, K., et al. (2015). Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors. Cell Stem Cell *17*, 422–434.

Hacein-Bey-Abina, S., Hauer, J., Lim, A., Picard, C., Wang, G.P., Berry, C.C., Martinache, C., Rieux-Laucat, F., Latour, S., Belohradsky, B.H., et al. (2010). Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N. Engl. J. Med. *363*, 355–364.

Haddad, R. (2004). Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. Blood *104*, 3918–3926.

Haddad, R., Guimiot, F., Six, E., Jourquin, F., Setterblad, N., Kahn, E., Yagello, M., Schiffer, C., Andre-Schmutz, I., Cavazzana-Calvo, M., et al. (2006). Dynamics of thymus-colonizing cells during human development. Immunity *24*, 217–230.

Hagedorn, E.J., Durand, E.M., Fast, E.M., and Zon, L.I. (2014). Getting more for your marrow: boosting hematopoietic stem cell numbers with PGE2. Exp. Cell Res. *329*, 220–226.

Hamilton, M.L., Van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A., and Richardson, A. (2001). Does oxidative damage to DNA increase with age? Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 10469–10474.

Han, X., Sun, F., Zhang, Y., Wang, J., Liu, Q., Gao, P., and Zhang, S. (2019). The protective effect of propofol on ionizing radiation-induced hematopoietic system damage in mice. RSC Adv. *9*, 36366–36373.

Han, Y.-C., Park, C.Y., Bhagat, G., Zhang, J., Wang, Y., Fan, J.-B., Liu, M., Zou, Y., Weissman, I.L., and Gu, H. (2010). microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia. J. Exp. Med. *207*, 475–489.

Hao, Q.L., Shah, A.J., Thiemann, F.T., Smogorzewska, E.M., and Crooks, G.M. (1995). A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. Blood *86*, 3745–3753.

Hao, Q.L., Thiemann, F.T., Petersen, D., Smogorzewska, E.M., and Crooks, G.M. (1996). Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. Blood *88*, 3306–3313.

Hao, S., Chen, C., and Cheng, T. (2016). Cell cycle regulation of hematopoietic stem or progenitor cells. Int. J. Hematol. *103*, 487–497.

Hao, Y., Cheng, D., Ma, Y., Zhou, W., and Wang, Y. (2011). Antioxidant intervention: A new method for improving hematopoietic reconstitution capacity of peripheral blood stem cells. Med. Hypotheses *76*, 421–423.

Harrison, D.E., and Astle, C.M. (1982). Loss of stem cell repopulating ability upon transplantation. Effects of donor age, cell number, and transplantation procedure. J. Exp. Med. *156*, 1767–1779.

Harrison, J.S., Rameshwar, P., Chang, V., and Bandari, P. (2002). Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. Blood *99*, 394.

Harvey, A., Caretti, G., Moresi, V., Renzini, A., and Adamo, S. (2019). Interplay between Metabolites and the Epigenome in Regulating Embryonic and Adult Stem Cell Potency and Maintenance. Stem Cell Rep. *13*, 573–589.

Hatzimichael, E., and Tuthill, M. (2010). Hematopoietic stem cell transplantation. Stem Cells Cloning Adv. Appl. *3*, 105–117.

Haynes, B.F., Markert, M.L., Sempowski, G.D., Patel, D.D., and Hale, L.P. (2000). The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. Annu. Rev. Immunol. *18*, 529–560.

Heffner, G.C., Bonner, M., Christiansen, L., Pierciey, F.J., Campbell, D., Smurnyy, Y., Zhang, W., Hamel, A., Shaw, S., Lewis, G., et al. (2018). Prostaglandin E2 Increases Lentiviral Vector Transduction Efficiency of Adult Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. *26*, 320–328.

Heinz, N., Ehrnström, B., Schambach, A., Schwarzer, A., Modlich, U., and Schiedlmeier, B. (2015). Comparison of Different Cytokine Conditions Reveals Resveratrol as a New Molecule for Ex Vivo Cultivation of Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem Cells. Stem Cells Transl. Med. *4*, 1064–1072.

van Hensbergen, Y., Schipper, L.F., Brand, A., Slot, M.C., Welling, M., Nauta, A.J., and Fibbe, W.E. (2006). Ex vivo culture of human CD34+ cord blood cells with thrombopoietin (TPO) accelerates platelet engraftment in a NOD/SCID mouse model. Exp. Hematol. *34*, 943–950.

Herault, O., Hope, K.J., Deneault, E., Mayotte, N., Chagraoui, J., Wilhelm, B.T., Cellot, S., Sauvageau, M., Andrade-Navarro, M.A., Hébert, J., et al. (2012). A role for GPx3 in activity of normal and leukemia stem cells. J. Exp. Med. *209*, 895–901.

Hermitte, F., Brunet de la Grange, P., Belloc, F., Praloran, V., and Ivanovic, Z. (2006). Very low O2 concentration (0.1%) favors G0 return of dividing CD34+ cells. Stem Cells Dayt. Ohio *24*, 65–73.

Hernández, L., Terradas, M., Camps, J., Martín, M., Tusell, L., and Genescà, A. (2015). Aging and radiation: bad companions. Aging Cell *14*, 153–161.

Hills, D., Gribi, R., Ure, J., Buza-Vidas, N., Luc, S., Jacobsen, S.E.W., and Medvinsky, A. (2011). Hoxb4-YFP reporter mouse model: a novel tool for tracking HSC development and studying the role of Hoxb4 in hematopoiesis. Blood *117*, 3521–3528.

Hinge, A., Xu, J., Javier, J., Mose, E., Kumar, S., Kapur, R., Srour, E.F., Malik, P., Aronow, B.J., and Filippi, M.-D. (2017). p190-B RhoGAP and intracellular cytokine signals balance hematopoietic stem and progenitor cell self-renewal and differentiation. Nat. Commun. *8*, 14382.

Hirayama, A., Yoh, K., Nagase, S., Ueda, A., Itoh, K., Morito, N., Hirayama, K., Takahashi, S., Yamamoto, M., and Koyama, A. (2003). EPR imaging of reducing activity in Nrf2 transcriptional factor-deficient mice. Free Radic. Biol. Med. *34*, 1236–1242.

Hirschi, K.K., Li, S., and Roy, K. (2014). Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. Annu. Rev. Biomed. Eng. *16*, 277–294.

Ho, P.W., Ho, J.W., Liu, H.-F., So, D.H., Tse, Z.H., Chan, K.-H., Ramsden, D.B., and Ho, S.-L. (2012). Mitochondrial neuronal uncoupling proteins: a target for potential disease-modification in Parkinson's disease. Transl. Neurodegener. *1*, 3.

Ho, T.T., Warr, M.R., Adelman, E.R., Lansinger, O.M., Flach, J., Verovskaya, E.V., Figueroa, M.E., and Passegué, E. (2017). Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. Nature *543*, 205–210.

Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M., Schindler, J.W., Saleque, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. Nature *431*, 1002–1007.

Hodgson, G.S., and Bradley, T.R. (1979). Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell? Nature *281*, 381–382.

Hoggatt, J., Singh, P., Sampath, J., and Pelus, L.M. (2009). Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. Blood *113*, 5444–5455.

Hoggatt, J., Mohammad, K.S., Singh, P., and Pelus, L.M. (2013). Prostaglandin E2 enhances long-term repopulation but does not permanently alter inherent stem cell competitiveness. Blood *122*, 2997–3000.

Holmström, K.M., and Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 411–421.

Holst, J., Watson, S., Lord, M.S., Eamegdool, S.S., Bax, D.V., Nivison-Smith, L.B., Kondyurin, A., Ma, L., Oberhauser, A.F., Weiss, A.S., et al. (2010). Substrate elasticity provides mechanical signals for the expansion of hemopoietic stem and progenitor cells. Nat. Biotechnol. *28*, 1123–1128.

Holyoake, T.L., Nicolini, F.E., and Eaves, C.J. (1999). Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow. Exp. Hematol. *27*, 1418–1427.

Horak, P., Crawford, A.R., Vadysirisack, D.D., Nash, Z.M., DeYoung, M.P., Sgroi, D., and Ellisen, L.W. (2010). Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 4675–4680.

Horwitz, M.E. (2007). Sources of human and murine hematopoietic stem cells. Curr. Protoc. Immunol. *Chapter 22*, Unit 22A.2.

Horwitz, M.E., Chao, N.J., Rizzieri, D.A., Long, G.D., Sullivan, K.M., Gasparetto, C., Chute, J.P., Morris, A., McDonald, C., Waters-Pick, B., et al. (2014). Umbilical cord blood expansion with nicotinamide provides long-term multilineage engraftment. J. Clin. Invest. *124*, 3121–3128.

Hu, D., and Shilatifard, A. (2016). Epigenetics of hematopoiesis and hematological malignancies. Genes Dev. *30*, 2021–2041.

Hu, L., Cheng, H., Gao, Y., Shi, M., Liu, Y., Hu, Z., Xu, J., Qiu, L., Yuan, W., Leung, A.Y.-H., et al. (2014). Antioxidant N-acetyl-L-cysteine increases engraftment of human hematopoietic stem cells in immune-deficient mice. Blood *124*, e45-48.

Hu, L., Zhang, Y., Miao, W., and Cheng, T. (2019). Reactive Oxygen Species and Nrf2: Functional and Transcriptional Regulators of Hematopoiesis.

Hua, P., Hester, J., Adigbli, G., Li, R., Psaila, B., Roy, A., Bataille, C.J.R., Wynne, G.M., Jackson, T., Milne, T.A., et al. (2020). The BET inhibitor CPI203 promotes ex vivo expansion of cord blood long-term repopulating HSCs and megakaryocytes. Blood.

Huang, C.-H., Chen, P.-M., Lu, T.-C., Kung, W.-M., Chiou, T.-J., Yang, M.-H., Kao, J.-Y., and Wu, K.-J. (2010). Purified recombinant TAT-homeobox B4 expands CD34(+) umbilical cord blood and peripheral blood progenitor cells ex vivo. Tissue Eng. Part C Methods *16*, 487–496.

Huang, J., Nguyen-McCarty, M., Hexner, E.O., Danet-Desnoyers, G., and Klein, P.S. (2012). Maintenance of hematopoietic stem cells through regulation of Wnt and mTOR pathways. Nat. Med. *18*, 1778–1785.

Huang, X., Lee, M.-R., Cooper, S., Hangoc, G., Hong, K.-S., Chung, H.-M., and Broxmeyer, H.E. (2016). Activation of OCT4 enhances ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells by regulating HOXB4 expression. Leukemia *30*, 144–153.

Huynh, H., Iizuka, S., Kaba, M., Kirak, O., Zheng, J., Lodish, H.F., and Zhang, C.C. (2008). Insulin-like growth factor-binding protein 2 secreted by a tumorigenic cell line supports ex vivo expansion of mouse hematopoietic stem cells. Stem Cells Dayt. Ohio *26*, 1628–1635.

Iancu-Rubin, C., and Hoffman, R. (2015). Role of epigenetic reprogramming in hematopoietic stem cell function. Curr. Opin. Hematol. *22*, 279–285.

Ieyasu, A., Ishida, R., Kimura, T., Morita, M., Wilkinson, A.C., Sudo, K., Nishimura, T., Ohehara, J., Tajima, Y., Lai, C.-Y., et al. (2017). An All-Recombinant Protein-Based Culture System Specifically Identifies Hematopoietic Stem Cell Maintenance Factors. Stem Cell Rep. *8*, 500–508.

Igarashi, H., Gregory, S.C., Yokota, T., Sakaguchi, N., and Kincade, P.W. (2002). Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. Immunity *17*, 117–130.

Ikuta, K., and Weissman, I.L. (1992). Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. Proc. Natl. Acad. Sci. *89*, 1502–1506.

Imanirad, P., and Dzierzak, E. (2013). Hypoxia and HIFs in regulating the development of the hematopoietic system. Blood Cells. Mol. Dis. *51*, 256–263.

Inoue, S., Li, W.Y., Tseng, A., Beerman, I., Elia, A.J., Bendall, S.C., Lemonnier, F., Kron, K.J., Cescon, D.W., Hao, Z., et al. (2016). Mutant IDH1 Downregulates ATM and Alters DNA Repair and Sensitivity to DNA Damage Independent of TET2. Cancer Cell *30*, 337–348.

Inoue, S.-I., Noda, S., Kashima, K., Nakada, K., Hayashi, J.-I., and Miyoshi, H. (2010). Mitochondrial respiration defects modulate differentiation but not proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells. FEBS Lett. *584*, 3402–3409.

Iriuchishima, H., Takubo, K., Matsuoka, S., Onoyama, I., Nakayama, K.I., Nojima, Y., and Suda, T. (2011). Ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells by quiescence induction through Fbxw7α overexpression. Blood *117*, 2373–2377.

Iscove, N.N., and Nawa, K. (1997). Hematopoietic stem cells expand during serial transplantation in vivo without apparent exhaustion. Curr. Biol. CB *7*, 805–808.

Issaad, C., Croisille, L., Katz, A., Vainchenker, W., and Coulombel, L. (1993). A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34++/CD38- progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. Blood *81*, 2916–2924.

Itkin, T., Ludin, A., Gradus, B., Gur-Cohen, S., Kalinkovich, A., Schajnovitz, A., Ovadya, Y., Kollet, O., Canaani, J., Shezen, E., et al. (2012). FGF-2 expands murine hematopoietic stem and progenitor cells via proliferation of stromal cells, c-Kit activation, and CXCL12 down-regulation. Blood *120*, 1843–1855.

Itkin, T., Gur-Cohen, S., Spencer, J.A., Schajnovitz, A., Ramasamy, S.K., Kusumbe, A.P., Ledergor, G., Jung, Y., Milo, I., Poulos, M.G., et al. (2016). Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. Nature *532*, 323–328.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., et al. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature *431*, 997–1002.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., et al. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. Nat. Med. *12*, 446–451.

Ito, K., Carracedo, A., Weiss, D., Arai, F., Ala, U., Avigan, D.E., Schafer, Z.T., Evans, R.M., Suda, T., Lee, C.-H., et al. (2012). A PML–PPAR-δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. Nat. Med. *18*, 1350–1358.

Ito, K., Turcotte, R., Cui, J., Zimmerman, S.E., Pinho, S., Mizoguchi, T., Arai, F., Runnels, J.M., Alt, C., Teruya-Feldstein, J., et al. (2016). Self-renewal of a purified Tie2+ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. Science *354*, 1156–1160.

Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., et al. (2002). NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood *100*, 3175–3182.

Itoh, K., Tezuka, H., Sakoda, H., Konno, M., Nagata, K., Uchiyama, T., Uchino, H., and Mori, K.J. (1989). Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. Exp. Hematol. *17*, 145–153.

Ivanovic, Z. (2009). Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. J. Cell. Physiol. *219*, 271–275.

Ivanovic, Z., Hermitte, F., Brunet de la Grange, P., Dazey, B., Belloc, F., Lacombe, F., Vezon, G., and Praloran, V. (2004). Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O2 concentration (3%). Stem Cells Dayt. Ohio *22*, 716–724.

Jacobsen, S.E.W., and Nerlov, C. (2019). Haematopoiesis in the era of advanced single-cell technologies. Nat. Cell Biol. *21*, 2–8.

Jacobson, L.O., Simmons, E.L., Marks, E.K., and Eldredge, J.H. (1951). Recovery from radiation injury. Science *113*, 510–511.

Jang, Y.-Y., and Sharkis, S.J. (2007). A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. Blood *110*, 3056–3063.

Jaroscak, J., Goltry, K., Smith, A., Waters-Pick, B., Martin, P.L., Driscoll, T.A., Howrey, R., Chao, N., Douville, J., Burhop, S., et al. (2003). Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo–expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. Blood *101*, 5061–5067.

Jiang, M., Chen, H., Lai, S., Wang, R., Qiu, Y., Ye, F., Fei, L., Sun, H., Xu, Y., Jiang, X., et al. (2018). Maintenance of human haematopoietic stem and progenitor cells in vitro using a chemical cocktail. Cell Discov. *4*, 1–12.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science *337*, 816–821.

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.

Jung, H., Kim, M.J., Kim, D.O., Kim, W.S., Yoon, S.-J., Park, Y.-J., Yoon, S.R., Kim, T.-D., Suh, H.-W., Yun, S., et al. (2013). TXNIP maintains the hematopoietic cell pool by switching the function of p53 under oxidative stress. Cell Metab. *18*, 75–85.

Jung, H., Kim, D.O., Byun, J.-E., Kim, W.S., Kim, M.J., Song, H.Y., Kim, Y.K., Kang, D.-K., Park, Y.-J., Kim, T.-D., et al. (2016). Thioredoxin-interacting protein regulates haematopoietic stem cell ageing and rejuvenation by inhibiting p38 kinase activity. Nat. Commun. *7*, 13674.

Juntilla, M.M., Patil, V.D., Calamito, M., Joshi, R.P., Birnbaum, M.J., and Koretzky, G.A. (2010). AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. Blood *115*, 4030–4038.

Kam, W.W.-Y., and Banati, R.B. (2013). Effects of ionizing radiation on mitochondria. Free Radic. Biol. Med. *65*, 607–619.

Kamminga, L.M., Bystrykh, L.V., de Boer, A., Houwer, S., Douma, J., Weersing, E., Dontje, B., and de Haan, G. (2006). The Polycomb group gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion. Blood *107*, 2170–2179.

Karamitros, D., Stoilova, B., Aboukhalil, Z., Hamey, F., Reinisch, A., Samitsch, M., Quek, L., Otto, G., Repapi, E., Doondeea, J., et al. (2018). Single-cell analysis reveals the continuum of human lympho-myeloid progenitor cells. Nat. Immunol. *19*, 85–97.

Karlsson, M., Kurz, T., Brunk, U.T., Nilsson, S.E., and Frennesson, C.I. (2010). What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? Biochem. J. *428*, 183–190.

Kataoka, K., Sato, T., Yoshimi, A., Goyama, S., Tsuruta, T., Kobayashi, H., Shimabe, M., Arai, S., Nakagawa, M., Imai, Y., et al. (2011). Evi1 is essential for hematopoietic stem cell self-renewal, and its expression marks hematopoietic cells with long-term multilineage repopulating activity. J. Exp. Med. *208*, 2403–2416.

Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.-M., Hidalgo, A., Peired, A.J., Thomas, S.A., and Frenette, P.S. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. Cell *124*, 407–421.

Kato, K., Takahashi, K., Monzen, S., Yamamoto, H., Maruyama, A., Itoh, K., and Kashiwakura, I. (2010). Relationship between radiosensitivity and Nrf2 target gene expression in human hematopoietic stem cells. Radiat. Res. *174*, 177–184.

Kaur, K., Mirlashari, M.R., Kvalheim, G., and Kjeldsen-Kragh, J. (2013). 3',4'-Dimethoxyflavone and valproic acid promotes the proliferation of human hematopoietic stem cells. Stem Cell Res. Ther. *4*, 60.

Kawada, H., Ando, K., Tsuji, T., Shimakura, Y., Nakamura, Y., Chargui, J., Hagihara, M., Itagaki, H., Shimizu, T., Inokuchi, S., et al. (1999). Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system. Exp. Hematol. *27*, 904–915.

Kawamura, K., Qi, F., and Kobayashi, J. (2018). Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production. J. Radiat. Res. (Tokyo).

Kawano, Y., Fukui, C., Shinohara, M., Wakahashi, K., Ishii, S., Suzuki, T., Sato, M., Asada, N., Kawano, H., Minagawa, K., et al. (2017). G-CSF-induced sympathetic tone provokes fever and primes antimobilizing functions of neutrophils via PGE2. Blood *129*, 587–597.

de Keizer, P.L.J., Burgering, B.M.T., and Dansen, T.B. (2011). Forkhead box o as a sensor, mediator, and regulator of redox signaling. Antioxid. Redox Signal. *14*, 1093–1106.

Khan, S.H. (2019). Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. Mol. Ther. - Nucleic Acids *16*, 326–334.

Kiel, M.J., and Morrison, S.J. (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. Nat. Rev. Immunol. *8*, 290–301.

Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005a). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell *121*, 1109–1121.

Kiel, M.J., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., and Morrison, S.J. (2005b). Spatial differences in hematopoiesis but not in stem cells indicate a lack of regional patterning in definitive hematopoietic stem cells. Dev. Biol. *283*, 29–39.

Kiel, M.J., He, S., Ashkenazi, R., Gentry, S.N., Teta, M., Kushner, J.A., Jackson, T.L., and Morrison, S.J. (2007). Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. Nature *449*, 238–242.

Kim, E.M., Yang, H.S., Kang, S.W., Ho, J.-N., Lee, S.B., and Um, H.-D. (2008). Amplification of the gamma-irradiation-induced cell death pathway by reactive oxygen species in human U937 cells. Cell. Signal. *20*, 916–924.

Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab. *3*, 177–185.

Kim, J.-H., Thimmulappa, R.K., Kumar, V., Cui, W., Kumar, S., Kombairaju, P., Zhang, H., Margolick, J., Matsui, W., Macvittie, T., et al. (2014). NRF2-mediated Notch pathway activation enhances hematopoietic reconstitution following myelosuppressive radiation. J. Clin. Invest. *124*, 730–741.

Kim, S.-S., Peer, D., Kumar, P., Subramanya, S., Wu, H., Asthana, D., Habiro, K., Yang, Y.-G., Manjunath, N., Shimaoka, M., et al. (2010). RNAi-mediated CCR5 silencing by LFA-1-targeted nanoparticles prevents HIV infection in BLT mice. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. *18*, 370–376.

Kirito, K., Fox, N., Komatsu, N., and Kaushansky, K. (2005). Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1alpha. Blood *105*, 4258–4263.

Kiss, J., Rybka, W., Winkelstein, A., deMagalhaes-Silverman, M., Lister, J., D'Andrea, P., and Ball, E. (1997). Relationship of CD34+ cell dose to early and late hematopoiesis following autologous peripheral blood stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. *19*, 303–310.

Ko, K.-H., Holmes, T., Palladinetti, P., Song, E., Nordon, R., O'Brien, T.A., and Dolnikov, A. (2011). GSK-3β inhibition promotes engraftment of ex vivo-expanded hematopoietic stem cells and modulates gene expression. Stem Cells Dayt. Ohio *29*, 108–118.

Kobari, L., Pflumio, F., Giarratana, M., Li, X., Titeux, M., Izac, B., Leteurtre, F., Coulombel, L., and Douay, L. (2000). In vitro and in vivo evidence for the long-term multilineage (myeloid, B, NK, and T) reconstitution capacity of ex vivo expanded human CD34(+) cord blood cells. Exp. Hematol. *28*, 1470–1480.

Kobayashi, H., Morikawa, T., Okinaga, A., Hamano, F., Hashidate-Yoshida, T., Watanuki, S., Hishikawa, D., Shindou, H., Arai, F., Kabe, Y., et al. (2019). Environmental Optimization Enables Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo. Cell Rep. *28*, 145-158.e9.

Kobayashi, Y., Furukawa-Hibi, Y., Chen, C., Horio, Y., Isobe, K., Ikeda, K., and Motoyama, N. (2005). SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. Int. J. Mol. Med. *16*, 237–243.

Kohen, R., and Nyska, A. (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. Toxicol. Pathol. *30*, 620–650.

Köhler, T., Plettig, R., Wetzstein, W., Schaffer, B., Ordemann, R., Nagels, H.O., Ehninger, G., and Bornhäuser, M. (1999). Defining optimum conditions for the ex vivo expansion of human umbilical cord blood cells. Influences of progenitor enrichment, interference with feeder layers, early-acting cytokines and agitation of culture vessels. Stem Cells Dayt. Ohio *17*, 19–24.

Koller, M.R., Emerson, S.G., and Palsson, B.O. (1993). Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. Blood *82*, 378–384.

Koller, M.R., Palsson, M.A., Manchel, I., and Palsson, B.O. (1995). Long-term culture-initiating cell expansion is dependent on frequent medium exchange combined with stromal and other accessory cell effects. Blood *86*, 1784–1793.

Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. Cell *91*, 661–672.

Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., and May, W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. Blood *87*, 1–13.

Krosl, J., Austin, P., Beslu, N., Kroon, E., Humphries, R.K., and Sauvageau, G. (2003). In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. Nat. Med. *9*, 1428–1432.

Kumar, S., and Geiger, H. (2017). HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. Trends Mol. Med. *23*, 799–819.

Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D., Mizoguchi, T., Wei, Q., Lucas, D., Ito, K., et al. (2013). Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. Nature *502*, 637–643.

Kurtzberg, J., Laughlin, M., Graham, M.L., Smith, C., Olson, J.F., Halperin, E.C., Ciocci, G., Carrier, C., Stevens, C.E., and Rubinstein, P. (1996). Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. N. Engl. J. Med. *335*, 157–166.

Kusadasi, N., van Soest, P.L., Mayen, A.E., Koevoet, J.L., and Ploemacher, R.E. (2000). Successful short-term ex vivo expansion of NOD/SCID repopulating ability and CAFC week 6 from umbilical cord blood. Leukemia *14*, 1944–1953.

Kusadasi, N., Koevoet, J.L., van Soest, P.L., and Ploemacher, R.E. (2001). Stromal support augments extended long-term ex vivo expansion of hemopoietic progenitor cells. Leukemia *15*, 1347–1358.

Kustikova, O.S., Schwarzer, A., Stahlhut, M., Brugman, M.H., Neumann, T., Yang, M., Li, Z., Schambach, A., Heinz, N., Gerdes, S., et al. (2013). Activation of Evi1 inhibits cell cycle progression and differentiation of hematopoietic progenitor cells. Leukemia *27*, 1127–1138.

Lacaud, G., and Kouskoff, V. (2017). Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis. Exp. Hematol. *49*, 19–24.

Lacombe, J., Herblot, S., Rojas-Sutterlin, S., Haman, A., Barakat, S., Iscove, N.N., Sauvageau, G., and Hoang, T. (2010). Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. Blood *115*, 792–803.

von Laer, D., Corovic, A., Vogt, B., Fehse, B., Roscher, S., Rimek, A., Baum, C., and Ostertag, W. (2000). Loss of CD38 antigen on CD34+CD38+ cells during short-term culture. Leukemia *14*, 947–948.

Lai, A.Y., and Kondo, M. (2006). Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. J. Exp. Med. *203*, 1867–1873.

LaIuppa, J.A., McAdams, T.A., Papoutsakis, E.T., and Miller, W.M. (1997). Culture materials affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. J. Biomed. Mater. Res. *36*, 347–359.

Lampreia, F.P., Carmelo, J.G., and Anjos-Afonso, F. (2017). Notch Signaling in the Regulation of Hematopoietic Stem Cell. Curr. Stem Cell Rep. *3*, 202–209.

Lancrin, C., Schneider, E., Lambolez, F., Arcangeli, M.-L., Garcia-Cordier, C., Rocha, B., and Ezine, S. (2002). Major T Cell Progenitor Activity in Bone Marrow–derived Spleen Colonies. J. Exp. Med. *195*, 919–929.

Laurenti, E., and Göttgens, B. (2018). From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. Nature *553*, 418–426.

Laurenti, E., Varnum-Finney, B., Wilson, A., Ferrero, I., Blanco-Bose, W.E., Ehninger, A., Knoepfler, P.S., Cheng, P.-F., MacDonald, H.R., Eisenman, R.N., et al. (2008). Hematopoietic stem cell function and survival depend on c-Myc and N-Myc activity. Cell Stem Cell *3*, 611–624.

Lechman, E.R., Gentner, B., van Galen, P., Giustacchini, A., Saini, M., Boccalatte, F.E., Hiramatsu, H., Restuccia, U., Bachi, A., Voisin, V., et al. (2012). Attenuation of miR-126 Activity Expands HSC In Vivo without Exhaustion. Cell Stem Cell *11*, 799–811.

Lee, J.M., and Bernstein, A. (1993). p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 5742–5746.

Lee, J., Cho, Y.S., Jung, H., and Choi, I. (2018). Pharmacological Regulation of Oxidative Stress in Stem Cells. Oxid. Med. Cell. Longev. *2018*, 4081890.

Lee, J., Yoon, S.R., Choi, I., and Jung, H. (2019). Causes and Mechanisms of Hematopoietic Stem Cell Aging. Int. J. Mol. Sci. *20*.

Lessard, J., and Sauvageau, G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. Nature *423*, 255–260.

Lévesque, J.-P., Helwani, F.M., and Winkler, I.G. (2010). The endosteal “osteoblastic” niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. Leukemia *24*, 1979–1992.

Li, H., Pei, H., Wang, S., Zhang, B., Fan, Z., Liu, Y., Xie, X., Yang, Z., Xu, L., Jia, Y., et al. (2020a). Arterial endothelium creates a permissive niche for expansion of human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. Stem Cell Res. Ther. *11*, 358.

Li, X., Ma, X., Chen, Y., Peng, D., Wang, H., Chen, S., Xiao, Y., Li, L., Zhou, H., Cheng, F., et al. (2020b). Coinhibition of activated p38 MAPKα and mTORC1 potentiates stemness maintenance of HSCs from SR1-expanded human cord blood CD34+ cells via inhibition of senescence. Stem Cells Transl. Med.

Li, Y., Ma, T., Kniss, D.A., Yang, S.T., and Lasky, L.C. (2001). Human cord cell hematopoiesis in three-dimensional nonwoven fibrous matrices: in vitro simulation of the marrow microenvironment. J. Hematother. Stem Cell Res. *10*, 355–368.

Li, Y., He, M., Zhang, W., Yang, M., Ding, Y., Xu, S., Gu, J., Li, Y., Yin, J., and Gao, Y. (2020c). Antioxidant Small Molecule Compound Chrysin Promotes the Self-Renewal of Hematopoietic Stem Cells. Front. Pharmacol. *11*, 399.

Liles, W.C., Rodger, E., Broxmeyer, H.E., Dehner, C., Badel, K., Calandra, G., Christensen, J., Wood, B., Price, T.H., and Dale, D.C. (2005). Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. Transfusion (Paris) *45*, 295–300.

de Lima, M., McMannis, J., Gee, A., Komanduri, K., Couriel, D., Andersson, B.S., Hosing, C., Khouri, I., Jones, R., Champlin, R., et al. (2008). Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. Bone Marrow Transplant. *41*, 771–778.

de Lima, M., McNiece, I., Robinson, S.N., Munsell, M., Eapen, M., Horowitz, M., Alousi, A., Saliba, R., McMannis, J.D., Kaur, I., et al. (2012). Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. N. Engl. J. Med. *367*, 2305–2315.

Ling, K.-W., Ottersbach, K., van Hamburg, J.P., Oziemlak, A., Tsai, F.-Y., Orkin, S.H., Ploemacher, R., Hendriks, R.W., and Dzierzak, E. (2004). GATA-2 plays two functionally distinct roles during the ontogeny of hematopoietic stem cells. J. Exp. Med. *200*, 871–882.

Liu, F., Lee, J.Y., Wei, H., Tanabe, O., Engel, J.D., Morrison, S.J., and Guan, J.-L. (2010). FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells. Blood *116*, 4806–4814.

Liu, J., Cao, L., Chen, J., Song, S., Lee, I.H., Quijano, C., Liu, H., Keyvanfar, K., Chen, H., Cao, L.-Y., et al. (2009). Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. Nature *459*, 387–392.

Liu, J., Samuel, K., Turner, M.L., and Gallagher, R.C.J. (2014). Use of IL3 and chromatin-modifying reagents valproic acid and 5-aza-2′-deoxycytidine to affect mobilized peripheral blood CD34+ cell fate decisions. Vox Sang. *107*, 83–89.

Liu, X., Zheng, H., Yu, W.-M., Cooper, T.M., Bunting, K.D., and Qu, C.-K. (2015). Maintenance of mouse hematopoietic stem cells ex vivo by reprogramming cellular metabolism. Blood *125*, 1562–1565.

Lo Celso, C., Fleming, H.E., Wu, J.W., Zhao, C.X., Miake-Lye, S., Fujisaki, J., Côté, D., Rowe, D.W., Lin, C.P., and Scadden, D.T. (2009). Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. Nature *457*, 92–96.

Luchsinger, L.L., de Almeida, M.J., Corrigan, D.J., Mumau, M., and Snoeck, H.-W. (2016). Mitofusin 2 maintains haematopoietic stem cells with extensive lymphoid potential. Nature *529*, 528–531.

Luchsinger, L.L., Strikoudis, A., Danzl, N.M., Bush, E.C., Finlayson, M.O., Satwani, P., Sykes, M., Yazawa, M., and Snoeck, H.-W. (2019). Harnessing Hematopoietic Stem Cell Low Intracellular Calcium Improves Their Maintenance In Vitro. Cell Stem Cell *25*, 225-240.e7.

Ludin, A., Itkin, T., Gur-Cohen, S., Mildner, A., Shezen, E., Golan, K., Kollet, O., Kalinkovich, A., Porat, Z., D'Uva, G., et al. (2012). Monocytes-macrophages that express α-smooth muscle actin preserve primitive hematopoietic cells in the bone marrow. Nat. Immunol. *13*, 1072–1082.

Ludin, A., Gur-Cohen, S., Golan, K., Kaufmann, K.B., Itkin, T., Medaglia, C., Lu, X.-J., Ledergor, G., Kollet, O., and Lapidot, T. (2014). Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment. Antioxid. Redox Signal. *21*, 1605–1619.

Lundstrom, K. (2018). Viral Vectors in Gene Therapy. Dis. Basel Switz. *6*.

Lymperi, S., Horwood, N., Marley, S., Gordon, M.Y., Cope, A.P., and Dazzi, F. (2008). Strontium can increase some osteoblasts without increasing hematopoietic stem cells. Blood *111*, 1173–1181.

Magli, M.C., Iscove, N.N., and Odartchenko, N. (1982). Transient nature of early haematopoietic spleen colonies. Nature *295*, 527–529.

Magnusson, M., Sierra, M.I., Sasidharan, R., Prashad, S.L., Romero, M., Saarikoski, P., Van Handel, B., Huang, A., Li, X., and Mikkola, H.K.A. (2013). Expansion on stromal cells preserves the undifferentiated state of human hematopoietic stem cells despite compromised reconstitution ability. PloS One *8*, e53912.

Mahmud, N., Petro, B., Baluchamy, S., Li, X., Taioli, S., Lavelle, D., Quigley, J.G., Suphangul, M., and Araki, H. (2014). Differential effects of epigenetic modifiers on the expansion and maintenance of human cord

blood stem/progenitor cells. Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. *20*, 480–489.

Majeti, R., Park, C.Y., and Weissman, I.L. (2007). Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. Cell Stem Cell *1*, 635–645.

Mansour, A., Abou-Ezzi, G., Sitnicka, E., Jacobsen, S.E.W., Wakkach, A., and Blin-Wakkach, C. (2012). Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. J. Exp. Med. *209*, 537–549.

Mansson, R., Hultquist, A., Luc, S., Yang, L., Anderson, K., Kharazi, S., Al-Hashmi, S., Liuba, K., Thorén, L., Adolfsson, J., et al. (2007). Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. Immunity *26*, 407–419.

Mantel, C., Messina-Graham, S., and Broxmeyer, H.E. (2010). Upregulation of nascent mitochondrial biogenesis in mouse hematopoietic stem cells parallels upregulation of CD34 and loss of pluripotency: a potential strategy for reducing oxidative risk in stem cells. Cell Cycle Georget. Tex *9*, 2008–2017.

Mantel, C.R., O'Leary, H.A., Chitteti, B.R., Huang, X., Cooper, S., Hangoc, G., Brustovetsky, N., Srour, E.F., Lee, M.R., Messina-Graham, S., et al. (2015). Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock. Cell *161*, 1553–1565.

Martin, G.H., and Park, C.Y. (2017). EPCR: a novel marker of cultured cord blood HSCs. Blood *129*, 3279–3280.

Maryanovich, M., Oberkovitz, G., Niv, H., Vorobiyov, L., Zaltsman, Y., Brenner, O., Lapidot, T., Jung, S., and Gross, A. (2012). The ATM-BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. Nat. Cell Biol. *14*, 535–541.

Maryanovich, M., Zaltsman, Y., Ruggiero, A., Goldman, A., Shachnai, L., Zaidman, S.L., Porat, Z., Golan, K., Lapidot, T., and Gross, A. (2015). An MTCH2 pathway repressing mitochondria metabolism regulates haematopoietic stem cell fate. Nat. Commun. *6*, 7901.

Maryanovich, M., Takeishi, S., and Frenette, P.S. (2018). Neural Regulation of Bone and Bone Marrow. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *8*.

Mathé, G., and Bernard, J. (1959). Attempts at treatment of grafted leukemia 1210 by x-irradiation followed by transfusion of normal hematopoietic cells (isologous or homologous, myeloid or lymphoid, adult or embryonic). Rev. Fr. Etud. Clin. Biol. *4*, 442–446.

Mathé, G., Jammet, H., Pendic, B., Schwarzenberg, L., Duplan, J.F., Maupin, B., Latarjet, R., Larrieu, M.J., Kalic, D., and Djukic, Z. (1959). Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation. Rev. Fr. Etud. Clin. Biol. *4*, 226–238.

Mathé, G., Amiel, J.L., Schwarzenberg, L., Cattan, A., and Schneider, M. (1963). Haematopoietic Chimera in Man After Allogenic (Homologous) Bone-marrow Transplantation. Br. Med. J. *2*, 1633–1635.

Matsui, K., Ezoe, S., Oritani, K., Shibata, M., Tokunaga, M., Fujita, N., Tanimura, A., Sudo, T., Tanaka, H., McBurney, M.W., et al. (2012). NAD-dependent histone deacetylase, SIRT1, plays essential roles in the maintenance of hematopoietic stem cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *418*, 811–817.

Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2011). p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell *9*, 262–271.

Matsuoka, S., Oike, Y., Onoyama, I., Iwama, A., Arai, F., Takubo, K., Mashimo, Y., Oguro, H., Nitta, E., Ito, K., et al. (2008). Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. Genes Dev. *22*, 986–991.

Matsuzaki, Y., Kinjo, K., Mulligan, R.C., and Okano, H. (2004). Unexpectedly efficient homing capacity of purified murine hematopoietic stem cells. Immunity *20*, 87–93.

Mattia, G., Milazzo, L., Vulcano, F., Pascuccio, M., Macioce, G., Hassan, H.J., and Giampaolo, A. (2008). Long-term platelet production assessed in NOD/SCID mice injected with cord blood CD34+ cells, thrombopoietin-amplified in clinical grade serum-free culture. Exp. Hematol. *36*, 244–252.

Maximow, A.A. (1909). Untersuchungen über Blut und Bindegewebe I. Die frühesten Entwicklungsstadien der Blut- und Bindegewebszellen beim Säugetierembryo, bis zum Anfang der Blutbilding in der Leber. Arch Mikrosk. Anat *73*, 444–561.

McNamara, L.A., and Collins, K.L. (2011). Hematopoietic stem/precursor cells as HIV reservoirs. Curr. Opin. HIV AIDS *6*, 43–48.

Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., and Frenette, P.S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. Nature *452*, 442–447.

Méndez-Ferrer, S., Chow, A., Merad, M., and Frenette, P.S. (2009). Circadian rhythms influence hematopoietic stem cells. Curr. Opin. Hematol. *16*, 235–242.

Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. Nature *466*, 829–834.

Meng, A., Wang, Y., Brown, S.A., Van Zant, G., and Zhou, D. (2003a). Ionizing radiation and busulfan inhibit murine bone marrow cell hematopoietic function via apoptosis-dependent and -independent mechanisms. Exp. Hematol. *31*, 1348–1356.

Meng, A., Wang, Y., Van Zant, G., and Zhou, D. (2003b). Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. Cancer Res. *63*, 5414–5419.

Meng, T.-C., Fukada, T., and Tonks, N.K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. Mol. Cell *9*, 387–399.

Merchant, A.A., Singh, A., Matsui, W., and Biswal, S. (2011). The redox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates murine hematopoietic stem cell survival independently of ROS levels. Blood *118*, 6572–6579.

Meyer, A.J., and Dick, T.P. (2010). Fluorescent Protein-Based Redox Probes. Antioxid. Redox Signal. *13*, 621–650.

Miao, W., XuFeng, R., Park, M.-R., Gu, H., Hu, L., Kang, J.W., Ma, S., Liang, P.H., Li, Y., Cheng, H., et al. (2013). Hematopoietic Stem Cell Regeneration Enhanced by Ectopic Expression of ROS-detoxifying Enzymes in Transplant Mice. Mol. Ther. *21*, 423–432.

Miharada, K., Karlsson, G., Rehn, M., Rörby, E., Siva, K., Cammenga, J., and Karlsson, S. (2011). Cripto Regulates Hematopoietic Stem Cells as a Hypoxic-Niche-Related Factor through Cell Surface Receptor GRP78. Cell Stem Cell *9*, 330–344.

Miharada, K., Karlsson, G., Rehn, M., Rörby, E., Siva, K., Cammenga, J., and Karlsson, S. (2012). Hematopoietic stem cells are regulated by Cripto, as an intermediary of HIF-1α in the hypoxic bone marrow niche. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1266*, 55–62.

Milano, F., Nicoud, I., Weber, D., Bernstein, I.D., Heimfeld, S., and Delaney, C. (2011). Infusion of Mismatched Ex Vivo Expanded and Cryopreserved Murine Hematopoietic Progenitors Rescues Mice After Lethal Radiation Exposure,. Blood *118*, 4006–4006.

Milhem, M., Mahmud, N., Lavelle, D., Araki, H., DeSimone, J., Saunthararajah, Y., and Hoffman, R. (2004). Modification of hematopoietic stem cell fate by 5aza 2′deoxycytidine and trichostatin A. Blood *103*, 4102–4110.

Miller, C.L., and Eaves, C.J. (1997). Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 13648–13653.

Millington, M., Arndt, A., Boyd, M., Applegate, T., and Shen, S. (2009). Towards a Clinically Relevant Lentiviral Transduction Protocol for Primary Human CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. PLoS ONE *4*, e6461.

Milone, M.C., and O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. Leukemia *32*, 1529–1541.

Milyavsky, M., Gan, O.I., Trottier, M., Komosa, M., Tabach, O., Notta, F., Lechman, E., Hermans, K.G., Eppert, K., Konovalova, Z., et al. (2010). A distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal. Cell Stem Cell *7*, 186–197.

Min, I.M., Pietramaggiori, G., Kim, F.S., Passegué, E., Stevenson, K.E., and Wagers, A.J. (2008). The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell *2*, 380–391.

Miousse, I.R., Shao, L., Chang, J., Feng, W., Wang, Y., Allen, A.R., Turner, J., Stewart, B., Raber, J., Zhou, D., et al. (2014). Exposure to low-dose (56)Fe-ion radiation induces long-term epigenetic alterations in mouse bone marrow hematopoietic progenitor and stem cells. Radiat. Res. *182*, 92–101.

Miyamoto, K., Araki, K.Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., et al. (2007). Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. Cell Stem Cell *1*, 101–112.

Miyoshi, H., Murao, M., Ohshima, N., and Tun, T. (2011). Three-dimensional culture of mouse bone marrow cells within a porous polymer scaffold: effects of oxygen concentration and stromal layer on expansion of haematopoietic progenitor cells. J. Tissue Eng. Regen. Med. *5*, 112–118.

Mohrin, M., Bourke, E., Alexander, D., Warr, M.R., Barry-Holson, K., Le Beau, M.M., Morrison, C.G., and Passegué, E. (2010). Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. Cell Stem Cell *7*, 174–185.

Mohty, M., Kuentz, M., Michallet, M., Bourhis, J.-H., Milpied, N., Sutton, L., Jouet, J.-P., Attal, M., Bordigoni, P., Cahn, J.-Y., et al. (2002). Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation: long-term results of a randomized study. Blood *100*, 3128–3134.

Mohty, M., Drillat, P., Grouin, J.-M., Bijou, F., Milpied, N., and Chabannon, C. (2017). Addition of plerixafor to G-CSF is useful to achieve efficient collection even in very poor mobilizers: hope for patients with diminished hematopoietic function. Bone Marrow Transplant. *52*, 1049–1050.

Mokhtari, V., Afsharian, P., Shahhoseini, M., Kalantar, S.M., and Moini, A. (2017). A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine. Cell J. Yakhteh *19*, 11–17.

Mombled, M., Rodriguez, L., Avalon, M., Duchez, P., Vlaski-Lafarge, M., Debeissat, C., Pérard, B., Sawai, K.M., Pasquet, J.M., Bijou, F., et al. (2020). Characteristics of cells with engraftment capacity within CD34+ cell population upon G-CSF and Plerixafor mobilization. Leukemia.

Montagner, S., Dehó, L., and Monticelli, S. (2014). MicroRNAs in hematopoietic development. BMC Immunol. *15*, 14.

Montellier, E., and Gaucher, J. (2019). Targeting the interplay between metabolism and epigenetics in cancer. Curr. Opin. Oncol. *31*, 92–99.

Moore, K.A., Deisseroth, A.B., Reading, C.L., Williams, D.E., and Belmont, J.W. (1992). Stromal support enhances cell-free retroviral vector transduction of human bone marrow long-term culture-initiating cells. Blood *79*, 1393–1399.

Moore, K.A., Ema, H., and Lemischka, I.R. (1997). In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. Blood *89*, 4337–4347.

Morikawa, T., and Takubo, K. (2016). Hypoxia regulates the hematopoietic stem cell niche. Pflugers Arch. *468*, 13–22.

Morita, Y., Ema, H., and Nakauchi, H. (2010). Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. J. Exp. Med. *207*, 1173–1182.

Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. Nature *505*, 327–334.

Mortensen, M., Ferguson, D.J.P., Edelmann, M., Kessler, B., Morten, K.J., Komatsu, M., and Simon, A.K. (2010). Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 832–837.

Motta, I., Ghiaccio, V., Cosentino, A., and Breda, L. (2019). Curing Hemoglobinopathies: Challenges and Advances of Conventional and New Gene Therapy Approaches. Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis. *11*, e2019067.

Muller-Sieburg, C.E., Cho, R.H., Thoman, M., Adkins, B., and Sieburg, H.B. (2002). Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. Blood *100*, 1302–1309.

Muller-Sieburg, C.E., Cho, R.H., Karlsson, L., Huang, J.-F., and Sieburg, H.B. (2004). Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. Blood *103*, 4111–4118.

Munoz, J., Shah, N., Rezvani, K., Hosing, C., Bollard, C.M., Oran, B., Olson, A., Popat, U., Molldrem, J., McNiece, I.K., et al. (2014). Concise review: umbilical cord blood transplantation: past, present, and future. Stem Cells Transl. Med. *3*, 1435–1443.

Murakami, S., Suzuki, T., Harigae, H., Romeo, P.-H., Yamamoto, M., and Motohashi, H. (2017). NRF2 Activation Impairs Quiescence and Bone Marrow Reconstitution Capacity of Hematopoietic Stem Cells. Mol. Cell. Biol. *37*.

Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem. J. *417*, 1–13.

Murray, L., Chen, B., Galy, A., Chen, S., Tushinski, R., Uchida, N., Negrin, R., Tricot, G., Jagannath, S., and Vesole, D. (1995). Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood. Blood *85*, 368–378.

Mychaliska, G.B., Muench, M.O., Rice, H.E., Leavitt, A.D., Cruz, J., and Harrison, M.R. (1998). The biology and ethics of banking fetal liver hematopoietic stem cells for in utero transplantation. J. Pediatr. Surg. *33*, 394–399.

Nakada, D., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. Nature *468*, 653–658.

Nakamura, S., Oshima, M., Yuan, J., Saraya, A., Miyagi, S., Konuma, T., Yamazaki, S., Osawa, M., Nakauchi, H., Koseki, H., et al. (2012). Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells. PloS One *7*, e36209.

Nakamura-Ishizu, A., Takizawa, H., and Suda, T. (2014). The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. Dev. Camb. Engl. *141*, 4656–4666.

Nauseef, W.M. (2008). Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. J. Biol. Chem. *283*, 16961–16965.

Navarro, S., Meza, N.W., Quintana-Bustamante, O., Casado, J.A., Jacome, A., McAllister, K., Puerto, S., Surrallés, J., Segovia, J.C., and Bueren, J.A. (2006). Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. *14*, 525–535.

Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., and Daley, G.Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. Nature *460*, 259–263.

Negre, O., Bartholomae, C., Beuzard, Y., Cavazzana, M., Christiansen, L., Courne, C., Deichmann, A., Denaro, M., de Dreuzy, E., Finer, M., et al. (2015). Preclinical Evaluation of Efficacy and Safety of an Improved Lentiviral Vector for the Treatment of β-Thalassemia and Sickle Cell Disease. Curr. Gene Ther. *15*, 64–81.

Neschadim, A., McCart, J.A., Keating, A., and Medin, J.A. (2007). A roadmap to safe, efficient, and stable lentivirus-mediated gene therapy with hematopoietic cell transplantation. Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. *13*, 1407–1416.

Ng, A.P., and Alexander, W.S. (2017). Haematopoietic stem cells: past, present and future. Cell Death Discov. *3*, 17002.

Ngom, M., Imren, S., Maetzig, T., Adair, J.E., Knapp, D.J.H.F., Chagraoui, J., Fares, I., Bordeleau, M.-E., Sauvageau, G., Leboulch, P., et al. (2018). UM171 Enhances Lentiviral Gene Transfer and Recovery of Primitive Human Hematopoietic Cells. Mol. Ther. Methods Clin. Dev. *10*, 156–164.

Nilsson, S.K., Debatis, M.E., Dooner, M.S., Madri, J.A., Quesenberry, P.J., and Becker, P.S. (1998). Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *46*, 371–377.

Nishino, T., Miyaji, K., Ishiwata, N., Arai, K., Yui, M., Asai, Y., Nakauchi, H., and Iwama, A. (2009). Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by a small-molecule agonist of c-MPL. Exp. Hematol. *37*, 1364-1377.e4.

Nolta, J.A., Smogorzewska, E.M., and Kohn, D.B. (1995). Analysis of optimal conditions for retroviral-mediated transduction of primitive human hematopoietic cells. Blood *86*, 101–110.

Nolta, J.A., Thiemann, F.T., Arakawa-Hoyt, J., Dao, M.A., Barsky, L.W., Moore, K.A., Lemischka, I.R., and Crooks, G.M. (2002). The AFT024 stromal cell line supports long-term ex vivo maintenance of engrafting multipotent human hematopoietic progenitors. Leukemia *16*, 352–361.

Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K.J., Harley, B., Mahoney, J.E., Park, S.-Y., Lu, J., Protopopov, A., and Silberstein, L.E. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. Nat. Cell Biol. *15*, 533–543.

Norkin, M., Lazarus, H.M., and Wingard, J.R. (2013). Umbilical cord blood graft enhancement strategies: has the time come to move these into the clinic? Bone Marrow Transplant. *48*, 884–889.

North, T.E., Goessling, W., Walkley, C.R., Lengerke, C., Kopani, K.R., Lord, A.M., Weber, G.J., Bowman, T.V., Jang, I.-H., Grosser, T., et al. (2007). Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis. Nature *447*, 1007–1011.

Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poeppl, A., Jurisica, I., and Dick, J.E. (2011). Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. Science *333*, 218–221.

Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O.I., Wilson, G., Kaufmann, K.B., McLeod, J., Laurenti, E., Dunant, C.F., et al. (2016). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. Science *351*, aab2116.

Nugent, S., Mothersill, C.E., Seymour, C., McClean, B., Lyng, F.M., and Murphy, J.E.J. (2010). Altered mitochondrial function and genome frequency post exposure to γ-radiation and bystander factors. Int. J. Radiat. Biol. *86*, 829–841.

Nunes, D.V., Costa, C.A., De Bem, G.F., Cordeiro, V.S., Santos, I.B., Carvalho, L.C., Jordão, A.K., Cunha, A.C., Ferreira, V.F., Moura, R.S., et al. (2018). Tempol, a superoxide dismutase-mimetic drug, prevents chronic ischemic renal injury in two-kidney, one-clip hypertensive rats. Clin. Exp. Hypertens. N. Y. N 1993 *40*, 721–729.

Obier, N., Uhlemann, C.F., and Müller, A.M. (2010). Inhibition of histone deacetylases by Trichostatin A leads to a HoxB4-independent increase of hematopoietic progenitor/stem cell frequencies as a result of selective survival. Cytotherapy *12*, 899–908.

Oburoglu, L., Tardito, S., Fritz, V., de Barros, S.C., Merida, P., Craveiro, M., Mamede, J., Cretenet, G., Mongellaz, C., An, X., et al. (2014). Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. Cell Stem Cell *15*, 169–184.

Oburoglu, L., Romano, M., Taylor, N., and Kinet, S. (2016). Metabolic regulation of hematopoietic stem cell commitment and erythroid differentiation. Curr. Opin. Hematol. *23*, 198–205.

O'Connell, R.M., Chaudhuri, A.A., Rao, D.S., Gibson, W.S.J., Balazs, A.B., and Baltimore, D. (2010). MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 14235–14240.

Oguro, H., Iwama, A., Morita, Y., Kamijo, T., van Lohuizen, M., and Nakauchi, H. (2006). Differential impact of Ink4a and Arf on hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment in Bmi1-deficient mice. J. Exp. Med. *203*, 2247–2253.

Oguro, H., Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. Cell Stem Cell *13*, 102–116.

Ohishi, K., Varnum-Finney, B., and Bernstein, I.D. (2002). Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+)CD38(-) cord blood cells. J. Clin. Invest. *110*, 1165–1174.

Oike, Y., Takakura, N., Hata, A., Kaname, T., Akizuki, M., Yamaguchi, Y., Yasue, H., Araki, K., Yamamura, K., and Suda, T. (1999). Mice homozygous for a truncated form of CREB-binding protein exhibit defects in hematopoiesis and vasculo-angiogenesis. Blood *93*, 2771–2779.

Okada, S., Nakauchi, H., Nagayoshi, K., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Miura, Y., and Suda, T. (1991). Enrichment and characterization of murine hematopoietic stem cells that express c-kit molecule. Blood *78*, 1706–1712.

Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S.W., Grosveld, G., and Downing, J.R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. Cell *84*, 321–330.

Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., and Nagasawa, T. (2010). The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. Immunity *33*, 387–399.

Ong, L.M., Fan, X., Chu, P.P.Y., Gay, F.P.H., Bari, S., Ang, J.M.L., Li, Z., Chen, J., Lim, S.K., Bunte, R.M., et al. (2012). Cotransplantation of ex vivo expanded and unexpanded cord blood units in immunodeficient mice using insulin growth factor binding protein-2-augmented mesenchymal cell cocultures. Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. *18*, 674–682.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. Science *273*, 242–245.

Palsson, B.O., Paek, S.H., Schwartz, R.M., Palsson, M., Lee, G.M., Silver, S., and Emerson, S.G. (1993). Expansion of human bone marrow progenitor cells in a high cell density continuous perfusion system. Biotechnol. Nat. Publ. Co. *11*, 368–372.

Palsson, B.O., Oh, D.J., and Koller, M.R. (1995). Replating of bioreactor expanded human bone marrow results in extended growth of primitive and mature cells. Cytotechnology *18*, 125–131.

Papa, L., Zimran, E., Djedaini, M., Ge, Y., Ozbek, U., Sebra, R., Sealfon, S.C., and Hoffman, R. (2018). Ex vivo human HSC expansion requires coordination of cellular reprogramming with mitochondrial remodeling and p53 activation. Blood Adv. *2*, 2766–2779.

Papayannopoulou, T., Craddock, C., Nakamoto, B., Priestley, G.V., and Wolf, N.S. (1995). The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 9647–9651.

Park, B., Yoo, K.H., and Kim, C. (2015). Hematopoietic stem cell expansion and generation: the ways to make a breakthrough. Blood Res. *50*, 194–203.

Park, C.S., Lewis, A., Chen, T., and Lacorazza, D. (2019). Concise Review: Regulation of Self-Renewal in Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells by Krüppel-Like Factor 4. Stem Cells Transl. Med. *8*, 568–574.

Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.-A., Sackstein, R., and Down, J.D. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 5431–5436.

Passegué, E., Wagers, A.J., Giuriato, S., Anderson, W.C., and Weissman, I.L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. J. Exp. Med. *202*, 1599–1611.

Pawliuk, R., Eaves, C., and Humphries, R.K. (1996). Evidence of both ontogeny and transplant dose-regulated expansion of hematopoietic stem cells in vivo. Blood *88*, 2852–2858.

Pazhanisamy, S.K., Li, H., Wang, Y., Batinic-Haberle, I., and Zhou, D. (2011). NADPH oxidase inhibition attenuates total body irradiation-induced haematopoietic genomic instability. Mutagenesis *26*, 431–435.

Pearce, M.S. (2011). Patterns in paediatric CT use: an international and epidemiological perspective. J. Med. Imaging Radiat. Oncol. *55*, 107–109.

Pearce, M.S., Salotti, J.A., Little, M.P., McHugh, K., Lee, C., Kim, K.P., Howe, N.L., Ronckers, C.M., Rajaraman, P., Sir Craft, A.W., et al. (2012). Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. Lancet Lond. Engl. *380*, 499–505.

Péault, B., Weissman, I., and Baum, C. (1993). Analysis of candidate human blood stem cells in “humanized” immune-deficiency SCID mice. Leukemia *7 Suppl 2*, S98-101.

Pei, W., Feyerabend, T.B., Rössler, J., Wang, X., Postrach, D., Busch, K., Rode, I., Klapproth, K., Dietlein, N., Quedenau, C., et al. (2017). Polylox barcoding reveals haematopoietic stem cell fates realized in vivo. Nature *548*, 456–460.

Pei, W., Shang, F., Wang, X., Fanti, A.-K., Greco, A., Busch, K., Klapproth, K., Zhang, Q., Quedenau, C., Sauer, S., et al. (2020). Resolving Fates and Single-Cell Transcriptomes of Hematopoietic Stem Cell Clones by PolyloxExpress Barcoding. Cell Stem Cell *27*, 383-395.e8.

van Pel, M., Fibbe, W.E., and Schepers, K. (2016). The human and murine hematopoietic stem cell niches: are they comparable? Ann. N. Y. Acad. Sci. *1370*, 55–64.

Peled, T., Landau, E., Prus, E., Treves, A.J., and Fibach, E. (2002). Cellular copper content modulates differentiation and self-renewal in cultures of cord blood-derived CD34+ cells. Br. J. Haematol. *116*, 655–661.

Peled, T., Landau, E., Mandel, J., Glukhman, E., Goudsmid, N.R., Nagler, A., and Fibach, E. (2004). Linear polyamine copper chelator tetraethylenepentamine augments long-term ex vivo expansion of cord blood-derived CD34+ cells and increases their engraftment potential in NOD/SCID mice. Exp. Hematol. *32*, 547–555.

Peled, T., Shoham, H., Aschengrau, D., Yackoubov, D., Frei, G., Rosenheimer G, N., Lerrer, B., Cohen, H.Y., Nagler, A., Fibach, E., et al. (2012). Nicotinamide, a SIRT1 inhibitor, inhibits differentiation and

facilitates expansion of hematopoietic progenitor cells with enhanced bone marrow homing and engraftment. Exp. Hematol. *40*, 342-355.e1.

Percy, M.E. (1984). Catalase: an old enzyme with a new role? Can. J. Biochem. Cell Biol. Rev. Can. Biochim. Biol. Cell. *62*, 1006–1014.

Perdomo-Arciniegas, A.-M., and Vernot, J.-P. (2011). Co-culture of hematopoietic stem cells with mesenchymal stem cells increases VCAM-1-dependent migration of primitive hematopoietic stem cells. Int. J. Hematol. *94*, 525–532.

Perié, L., Hodgkin, P.D., Naik, S.H., Schumacher, T.N., de Boer, R.J., and Duffy, K.R. (2014). Determining lineage pathways from cellular barcoding experiments. Cell Rep. *6*, 617–624.

Petrillo, C., Thorne, L.G., Unali, G., Schiroli, G., Giordano, A.M.S., Piras, F., Cuccovillo, I., Petit, S.J., Ahsan, F., Noursadeghi, M., et al. (2018). Cyclosporine H Overcomes Innate Immune Restrictions to Improve Lentiviral Transduction and Gene Editing In Human Hematopoietic Stem Cells. Cell Stem Cell *23*, 820-832.e9.

Petrillo, C., Calabria, A., Piras, F., Capotondo, A., Spinozzi, G., Cuccovillo, I., Benedicenti, F., Naldini, L., Montini, E., Biffi, A., et al. (2019). Assessing the Impact of Cyclosporin A on Lentiviral Transduction and Preservation of Human Hematopoietic Stem Cells in Clinically Relevant Ex Vivo Gene Therapy Settings. Hum. Gene Ther. *30*, 1133–1146.

Pettitt, D., Arshad, Z., Smith, J., Stanic, T., Holländer, G., and Brindley, D. (2018). CAR-T Cells: A Systematic Review and Mixed Methods Analysis of the Clinical Trial Landscape. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. *26*, 342–353.

Petzer, A.L., Hogge, D.E., Landsdorp, P.M., Reid, D.S., and Eaves, C.J. (1996). 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. *93*, 1470–1474.

Piacibello, W., Gammaitoni, L., Bruno, S., Gunetti, M., Fagioli, F., Cavalloni, G., and Aglietta, M. (2000). Negative influence of IL3 on the expansion of human cord blood in vivo long-term repopulating stem cells. J. Hematother. Stem Cell Res. *9*, 945–956.

Piacibello, W., Bruno, S., Sanavio, F., Droetto, S., Gunetti, M., Ailles, L., Santoni de Sio, F., Viale, A., Gammaitoni, L., Lombardo, A., et al. (2002). Lentiviral gene transfer and ex vivo expansion of human primitive stem cells capable of primary, secondary, and tertiary multilineage repopulation in NOD/SCID mice. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient. Blood *100*, 4391–4400.

Picard, C., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J.-L., Chatila, T., Conley, M.E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Holland, S.M., Klein, C., et al. (2015). Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. J. Clin. Immunol. *35*, 696–726.

Piccoli, C., Ria, R., Scrima, R., Cela, O., D'Aprile, A., Boffoli, D., Falzetti, F., Tabilio, A., and Capitanio, N. (2005). Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. J. Biol. Chem. *280*, 26467–26476.

Piccoli, C., D'Aprile, A., Ripoli, M., Scrima, R., Lecce, L., Boffoli, D., Tabilio, A., and Capitanio, N. (2007). Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. Biochem. Biophys. Res. Commun. *353*, 965–972.

Pietras, E.M. (2017). Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease. Blood *130*, 1693–1698.

Pietras, E.M., Reynaud, D., Kang, Y.-A., Carlin, D., Calero-Nieto, F.J., Leavitt, A.D., Stuart, J.M., Göttgens, B., and Passegué, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. Cell Stem Cell *17*, 35–46.

Pineault, N., and Abu-Khader, A. (2015). Advances in umbilical cord blood stem cell expansion and clinical translation. Exp. Hematol. *43*, 498–513.

Pineault, N., Helgason, C.D., Lawrence, H.J., and Humphries, R.K. (2002). Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. Exp. Hematol. *30*, 49–57.

Pinho, S., and Frenette, P.S. (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *20*, 303–320.

Pinho, S., Marchand, T., Yang, E., Wei, Q., Nerlov, C., and Frenette, P.S. (2018). Lineage-Biased Hematopoietic Stem Cells Are Regulated by Distinct Niches. Dev. Cell *44*, 634-641.e4.

Porto, M.L., Rodrigues, B.P., Menezes, T.N., Ceschim, S.L., Casarini, D.E., Gava, A.L., Pereira, T.M.C., Vasquez, E.C., Campagnaro, B.P., and Meyrelles, S.S. (2015). Reactive oxygen species contribute to dysfunction of bone marrow hematopoietic stem cells in aged C57BL/6 J mice. J. Biomed. Sci. *22*, 97.

Prasher, J.M., Lalai, A.S., Heijmans-Antonissen, C., Ploemacher, R.E., Hoeijmakers, J.H.J., Touw, I.P., and Niedernhofer, L.J. (2005). Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient Ercc1-/- mice. EMBO J. *24*, 861–871.

Prieto-Bermejo, R., Romo-González, M., Pérez-Fernández, A., Ijurko, C., and Hernández-Hernández, Á. (2018). Reactive oxygen species in haematopoiesis: leukaemic cells take a walk on the wild side. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR *37*, 125.

Psatha, N., Georgolopoulos, G., Phelps, S., and Papayannopoulou, T. (2017). Brief Report: A Differential Transcriptomic Profile of Ex Vivo Expanded Adult Human Hematopoietic Stem Cells Empowers Them for Engraftment Better than Their Surface Phenotype. Stem Cells Transl. Med. *6*, 1852–1858.

Purton, L.E., Bernstein, I.D., and Collins, S.J. (2000). All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells. Blood *95*, 470–477.

Qing, Y., Wang, Z., Bunting, K.D., and Gerson, S.L. (2014). Bcl2 overexpression rescues the hematopoietic stem cell defects in Ku70-deficient mice by restoration of quiescence. Blood *123*, 1002–1011.

Qiu, L., Meagher, R., Welhausen, S., Heye, M., Brown, R., and Herzig, R.H. (1999). Ex vivo expansion of CD34+ umbilical cord blood cells in a defined serum-free medium (QBSF-60) with early effect cytokines. J. Hematother. Stem Cell Res. *8*, 609–618.

Rabe, J.L., Hernandez, G., Chavez, J.S., Mills, T.S., Nerlov, C., and Pietras, E.M. (2020). CD34 and EPCR coordinately enrich functional murine hematopoietic stem cells under normal and inflammatory conditions. Exp. Hematol. *81*, 1-15.e6.

Radtke, S., Görgens, A., Kordelas, L., Schmidt, M., Kimmig, K.R., Köninger, A., Horn, P.A., and Giebel, B. (2015). CD133 allows elaborated discrimination and quantification of haematopoietic progenitor subsets in human haematopoietic stem cell transplants. Br. J. Haematol. *169*, 868–878.

Radtke, S., Görgens, A., Liu, B., Horn, P.A., and Giebel, B. (2016). Human mesenchymal and murine stromal cells support human lympho-myeloid progenitor expansion but not maintenance of multipotent haematopoietic stem and progenitor cells. Cell Cycle Georget. Tex *15*, 540–545.

Radulovic, V., van der Garde, M., Koide, S., Sigurdsson, V., Lang, S., Kaneko, S., and Miharada, K. (2019). Junctional Adhesion Molecule 2 Represents a Subset of Hematopoietic Stem Cells with Enhanced Potential for T Lymphopoiesis. Cell Rep. *27*, 2826-2836.e5.

Raevskaya, A.A., Savvateeva, M.V., Bukhinnik, S.S., Kandarakov, O.F., Butylin, P.A., Zhuk, S.V., Demin, A.M., Zaritsky, V.P.K.A.Y., and Belyavsky, A.V. (2017). Murine and human hematopoietic progenitor cultures grown on stromal layers expressing Notch ligands. Mol. Biol. (Mosk.) *51*, 356–366.

Raghuwanshi, S., Dahariya, S., Kandi, R., Gutti, U., Undi, R.B., Sharma, D.S., Sahu, I., Kovuru, N., Yarla, N.S., Saladi, R.G.V., et al. (2018). Epigenetic Mechanisms: Role in Hematopoietic Stem Cell Lineage Commitment and Differentiation. Curr. Drug Targets *19*, 1683–1695.

Ramachandran, L., and Nair, C.K. (2012). Radioprotection by tempol: studies on tissue antioxidant levels, hematopoietic and gastrointestinal systems, in mice whole body exposed to sub- lethal doses of gamma radiation. Iran J Radiat Res *10*, 1–10.

Ramamoorth, M., and Narvekar, A. (2015). Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. J. Clin. Diagn. Res. JCDR *9*, GE01–GE06.

Rehn, M., Olsson, A., Reckzeh, K., Diffner, E., Carmeliet, P., Landberg, G., and Cammenga, J. (2011). Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor regulates murine hematopoietic stem cell function in the low-oxygenic niche. Blood *118*, 1534–1543.

Reiffers, J., Cailliot, C., Dazey, B., Attal, M., Caraux, J., and Boiron, J.M. (1999). Abrogation of post-myeloablative chemotherapy neutropenia by ex-vivo expanded autologous CD34-positive cells. Lancet Lond. Engl. *354*, 1092–1093.

Reynaud, D., Ravet, E., Titeux, M., Mazurier, F., Rénia, L., Dubart-Kupperschmitt, A., Roméo, P.-H., and Pflumio, F. (2005). SCL/TAL1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment. Blood *106*, 2318–2328.

Ribeil, J.-A., Hacein-Bey-Abina, S., Payen, E., Magnani, A., Semeraro, M., Magrin, E., Caccavelli, L., Neven, B., Bourget, P., El Nemer, W., et al. (2017). Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. N. Engl. J. Med. *376*, 848–855.

Rimmelé, P., Bigarella, C.L., Liang, R., Izac, B., Dieguez-Gonzalez, R., Barbet, G., Donovan, M., Brugnara, C., Blander, J.M., Sinclair, D.A., et al. (2014). Aging-like phenotype and defective lineage specification in SIRT1-deleted hematopoietic stem and progenitor cells. Stem Cell Rep. *3*, 44–59.

Río, P., Navarro, S., and Bueren, J.A. (2018). Advances in Gene Therapy for Fanconi Anemia. Hum. Gene Ther. *29*, 1114–1123.

Rizo, A., Dontje, B., Vellenga, E., de Haan, G., and Schuringa, J.J. (2008). Long-term maintenance of human hematopoietic stem/progenitor cells by expression of BMI1. Blood *111*, 2621–2630.

Rizo, A., Olthof, S., Han, L., Vellenga, E., de Haan, G., and Schuringa, J.J. (2009). Repression of BMI1 in normal and leukemic human CD34(+) cells impairs self-renewal and induces apoptosis. Blood *114*, 1498–1505.

Rodrigues-Moreira, S., Moreno, S.G., Ghinatti, G., Lewandowski, D., Hoffschir, F., Ferri, F., Gallouet, A.-S., Gay, D., Motohashi, H., Yamamoto, M., et al. (2017). Low-Dose Irradiation Promotes Persistent Oxidative Stress and Decreases Self-Renewal in Hematopoietic Stem Cells. Cell Rep. *20*, 3199–3211.

Rodriguez-Fraticelli, A.E., Wolock, S.L., Weinreb, C.S., Panero, R., Patel, S.H., Jankovic, M., Sun, J., Calogero, R.A., Klein, A.M., and Camargo, F.D. (2018). Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. Nature *553*, 212–216.

Rogers, I.M., Yamanaka, N., and Casper, R.F. (2008). A Simplified Procedure for Hematopoietic Stem Cell Amplification Using a Serum-Free, Feeder Cell-Free Culture System. Biol. Blood Marrow Transplant. *14*, 927–937.

Romero-Moya, D., Bueno, C., Montes, R., Navarro-Montero, O., Iborra, F.J., López, L.C., Martin, M., and Menendez, P. (2013). Cord blood-derived CD34+ hematopoietic cells with low mitochondrial mass are enriched in hematopoietic repopulating stem cell function. Haematologica *98*, 1022–1029.

Rongvaux, A., Willinger, T., Martinek, J., Strowig, T., Gearty, S.V., Teichmann, L.L., Saito, Y., Marches, F., Halene, S., Palucka, A.K., et al. (2014). Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. Nat. Biotechnol. *32*, 364–372.

Rönn, R.E., Guibentif, C., Saxena, S., and Woods, N.-B. (2017). Reactive Oxygen Species Impair the Function of CD90+ Hematopoietic Progenitors Generated from Human Pluripotent Stem Cells. STEM CELLS *35*, 197–206.

Rossi, D.J., Bryder, D., Zahn, J.M., Ahlenius, H., Sonu, R., Wagers, A.J., and Weissman, I.L. (2005). Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 9194–9199.

Rossi, D.J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., and Weissman, I.L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. Nature *447*, 725–729.

Rossi, L., Challen, G.A., Sirin, O., Lin, K.K.-Y., and Goodell, M.A. (2011). Hematopoietic stem cell characterization and isolation. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *750*, 47–59.

Rossmanith, T., Schröder, B., Bug, G., Müller, P., Klenner, T., Knaus, R., Hoelzer, D., and Ottmann, O.G. (2001). Interleukin 3 improves the ex vivo expansion of primitive human cord blood progenitor cells and maintains the engraftment potential of scid repopulating cells. Stem Cells Dayt. Ohio *19*, 313–320.

Rouault-Pierre, K., Lopez-Onieva, L., Foster, K., Anjos-Afonso, F., Lamrissi-Garcia, I., Serrano-Sanchez, M., Mitter, R., Ivanovic, Z., de Verneuil, H., Gribben, J., et al. (2013). HIF-2α protects human hematopoietic stem/progenitors and acute myeloid leukemic cells from apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. Cell Stem Cell *13*, 549–563.

Rübe, C.E., Fricke, A., Widmann, T.A., Fürst, T., Madry, H., Pfreundschuh, M., and Rübe, C. (2011). Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging. PloS One *6*, e17487.

Rundberg Nilsson, A., Soneji, S., Adolfsson, S., Bryder, D., and Pronk, C.J. (2016). Human and Murine Hematopoietic Stem Cell Aging Is Associated with Functional Impairments and Intrinsic Megakaryocytic/Erythroid Bias. PloS One *11*, e0158369.

Russell, N., Douglas, K., Ho, A.D., Mohty, M., Carlson, K., Ossenkoppele, G.J., Milone, G., Pareja, M.O., Shaheen, D., Willemsen, A., et al. (2013). Plerixafor and granulocyte colony-stimulating factor for first-

line steady-state autologous peripheral blood stem cell mobilization in lymphoma and multiple myeloma: results of the prospective PREDICT trial. Haematologica *98*, 172–178.

Ryall, J.G., Cliff, T., Dalton, S., and Sartorelli, V. (2015). Metabolic Reprogramming of Stem Cell Epigenetics. Cell Stem Cell *17*, 651–662.

Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E., and Chumakov, P.M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. Nat. Med. *11*, 1306–1313.

Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., et al. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. Cell *131*, 324–336.

Saito, Y., Shultz, L.D., and Ishikawa, F. (2020). Understanding Normal and Malignant Human Hematopoiesis Using Next-Generation Humanized Mice. Trends Immunol. *41*, 706–720.

Sanjuan-Pla, A., Macaulay, I.C., Jensen, C.T., Woll, P.S., Luis, T.C., Mead, A., Moore, S., Carella, C., Matsuoka, S., Bouriez Jones, T., et al. (2013). Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. Nature *502*, 232–236.

Saraf, S., Araki, H., Petro, B., Park, Y., Taioli, S., Yoshinaga, K.G., Koca, E., Rondelli, D., and Mahmud, N. (2015). Ex vivo expansion of human mobilized peripheral blood stem cells using epigenetic modifiers. Transfusion (Paris) *55*, 864–874.

Saran, N., Łyszkiewicz, M., Pommerencke, J., Witzlau, K., Vakilzadeh, R., Ballmaier, M., von Boehmer, H., and Krueger, A. (2010). Multiple extrathymic precursors contribute to T-cell development with different kinetics. Blood *115*, 1137–1144.

Sardina, J.L., López-Ruano, G., Sánchez-Sánchez, B., Llanillo, M., and Hernández-Hernández, A. (2012). Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis? Crit. Rev. Oncol. Hematol. *81*, 257–274.

Sattler, M., Winkler, T., Verma, S., Byrne, C.H., Shrikhande, G., Salgia, R., and Griffin, J.D. (1999). Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. Blood *93*, 2928–2935.

Sauvageau, G., Lansdorp, P.M., Eaves, C.J., Hogge, D.E., Dragowska, W.H., Reid, D.S., Largman, C., Lawrence, H.J., and Humphries, R.K. (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 12223–12227.

Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C.J., Lawrence, H.J., Largman, C., Lansdorp, P.M., and Humphries, R.K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. Genes Dev. *9*, 1753–1765.

Sawai, C.M., Babovic, S., Upadhaya, S., Knapp, D.J.H.F., Lavin, Y., Lau, C.M., Goloborodko, A., Feng, J., Fujisaki, J., Ding, L., et al. (2016). Hematopoietic Stem Cells Are the Major Source of Multilineage Hematopoiesis in Adult Animals. Immunity *45*, 597–609.

Säwen, P., Eldeeb, M., Erlandsson, E., Kristiansen, T.A., Laterza, C., Kokaia, Z., Karlsson, G., Yuan, J., Soneji, S., Mandal, P.K., et al. (2018). Murine HSCs contribute actively to native hematopoiesis but with reduced differentiation capacity upon aging. ELife *7*.

Scala, S., and Aiuti, A. (2019). In vivo dynamics of human hematopoietic stem cells: novel concepts and future directions. Blood Adv. *3*, 1916–1924.

Scala, S., Basso-Ricci, L., Dionisio, F., Pellin, D., Giannelli, S., Salerio, F.A., Leonardelli, L., Cicalese, M.P., Ferrua, F., Aiuti, A., et al. (2018). Dynamics of genetically engineered hematopoietic stem and progenitor cells after autologous transplantation in humans. Nat. Med. *24*, 1683–1690.

Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. Curr. Biol. CB *24*, R453–R462.

Schiedlmeier, B., Santos, A.C., Ribeiro, A., Moncaut, N., Lesinski, D., Auer, H., Kornacker, K., Ostertag, W., Baum, C., Mallo, M., et al. (2007). HOXB4's road map to stem cell expansion. Proc. Natl. Acad. Sci. *104*, 16952–16957.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells *4*, 7–25.

Scoville, S.D., Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2017). Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. Front. Immunol. *8*, 360.

Seet, L.-F., Teng, E., Lai, Y.-S., Laning, J., Kraus, M., Wnendt, S., Merchav, S., and Chan, S.L. (2009). Valproic acid enhances the engraftability of human umbilical cord blood hematopoietic stem cells expanded under serum-free conditions. Eur. J. Haematol. *82*, 124–132.

Semenza, G.L. (2010). Oxygen homeostasis. WIREs Syst. Biol. Med. *2*, 336–361.

Serwold, T., Ehrlich, L.I.R., and Weissman, I.L. (2009). Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. Blood *113*, 807–815.

Shao, L., Luo, Y., and Zhou, D. (2014). Hematopoietic Stem Cell Injury Induced by Ionizing Radiation. Antioxid. Redox Signal. *20*, 1447–1462.

Sharma, S., and Gurudutta, G. (2016). Epigenetic Regulation of Hematopoietic Stem Cells. Int. J. Stem Cells *9*, 36–43.

Sharma, M.B., Limaye, L.S., and Kale, V.P. (2012). Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. Haematologica *97*, 651–660.

Sheng, B., Gong, K., Niu, Y., Liu, L., Yan, Y., Lu, G., Zhang, L., Hu, M., Zhao, N., Zhang, X., et al. (2009). Inhibition of γ-secretase activity reduces Aβ production, reduces oxidative stress, increases mitochondrial activity and leads to reduced vulnerability to apoptosis: Implications for the treatment of Alzheimer's disease. Free Radic. Biol. Med. *46*, 1362–1375.

Shih, C.C., Hu, M.C., Hu, J., Medeiros, J., and Forman, S.J. (1999). Long-term ex vivo maintenance and expansion of transplantable human hematopoietic stem cells. Blood *94*, 1623–1636.

Shima, H., Takubo, K., Iwasaki, H., Yoshihara, H., Gomei, Y., Hosokawa, K., Arai, F., Takahashi, T., and Suda, T. (2009). Reconstitution activity of hypoxic cultured human cord blood CD34-positive cells in NOG mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. *378*, 467–472.

Shimakura, Y., Kawada, H., Ando, K., Sato, T., Nakamura, Y., Tsuji, T., Kato, S., and Hotta, T. (2000). Murine stromal cell line HESS-5 maintains reconstituting ability of Ex vivo-generated hematopoietic

stem cells from human bone marrow and cytokine-mobilized peripheral blood. Stem Cells Dayt. Ohio *18*, 183–189.

Shlush, L.I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W.C., Brandwein, J.M., Gupta, V., Kennedy, J.A., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Yee, K.W., et al. (2014). Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. Nature *506*, 328–333.

Shpall, E.J., Quinones, R., Giller, R., Zeng, C., Baron, A.E., Jones, R.B., Bearman, S.I., Nieto, Y., Freed, B., Madinger, N., et al. (2002). Transplantation of ex vivo expanded cord blood. Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. *8*, 368–376.

Sii-Felice, K., Giorgi, M., Leboulch, P., and Payen, E. (2018). Hemoglobin disorders: lentiviral gene therapy in the starting blocks to enter clinical practice. Exp. Hematol. *64*, 12–32.

da Silva, C.L., Gonçalves, R., Crapnell, K.B., Cabral, J.M.S., Zanjani, E.D., and Almeida-Porada, G. (2005). A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. Exp. Hematol. *33*, 828–835.

Siminovitch, L., Mcculloch, E.A., and Till, J.E. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. J. Cell. Comp. Physiol. *62*, 327–336.

Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C., and Sadek, H.A. (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. Cell Stem Cell *7*, 380–390.

Singh, K.P., Bennett, J.A., Casado, F.L., Walrath, J.L., Welle, S.L., and Gasiewicz, T.A. (2014). Loss of aryl hydrocarbon receptor promotes gene changes associated with premature hematopoietic stem cell exhaustion and development of a myeloproliferative disorder in aging mice. Stem Cells Dev. *23*, 95–106.

Six, E.M., Bonhomme, D., Monteiro, M., Beldjord, K., Jurkowska, M., Cordier-Garcia, C., Garrigue, A., Dal Cortivo, L., Rocha, B., Fischer, A., et al. (2007). A human postnatal lymphoid progenitor capable of circulating and seeding the thymus. J. Exp. Med. *204*, 3085–3093.

Smyth, E.M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y., and FitzGerald, G.A. (2009). Prostanoids in health and disease. J. Lipid Res. *50 Suppl*, S423-428.

Sommerkamp, P., Altamura, S., Renders, S., Narr, A., Ladel, L., Zeisberger, P., Eiben, P.L., Fawaz, M., Rieger, M.A., Cabezas-Wallscheid, N., et al. (2020). Differential Alternative Polyadenylation Landscapes Mediate Hematopoietic Stem Cell Activation and Regulate Glutamine Metabolism. Cell Stem Cell *26*, 722-738.e7.

Sood, R., Kamikubo, Y., and Liu, P. (2017). Role of RUNX1 in hematological malignancies. Blood *129*, 2070–2082.

Spangrude, G.J., and Johnson, G.R. (1990). Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *87*, 7433–7437.

Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. Science *241*, 58–62.

Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G.L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. Cell Stem Cell *9*, 298–310.

Sudo, K., Ema, H., Morita, Y., and Nakauchi, H. (2000). Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. J. Exp. Med. *192*, 1273–1280.

Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. Immunity *25*, 977–988.

Summers, C., Milano, F., Gooley, T.A., Dahlberg, A., and Delaney, C. (2014). Infusion of Ex Vivo Expanded Cord Blood Progenitor Cells Reduces the Risk of Bacteremia after Myeloablative Cord Blood Transplant. Blood *124*, 3860–3860.

Sun, J., Ramos, A., Chapman, B., Johnnidis, J.B., Le, L., Ho, Y.-J., Klein, A., Hofmann, O., and Camargo, F.D. (2014). Clonal dynamics of native haematopoiesis. Nature *514*, 322–327.

Sun, S., Jiang, N., Jiang, Y., He, Q., He, H., Wang, X., Yang, L., Li, R., Liu, F., Lin, X., et al. (2020). Chromatin remodeler Znhit1 preserves hematopoietic stem cell quiescence by determining the accessibility of distal enhancers. Leukemia.

Sun, X.-J., Man, N., Tan, Y., Nimer, S.D., and Wang, L. (2015). The Role of Histone Acetyltransferases in Normal and Malignant Hematopoiesis. Front. Oncol. *5*.

Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K., and Finkel, T. (1995). Requirement for generation of H2O2 for platelet-derived growth factor signal transduction. Science *270*, 296–299.

Suzuki, K. (2009). Anti-oxidants for therapeutic use: why are only a few drugs in clinical use? Adv. Drug Deliv. Rev. *61*, 287–289.

Taguchi, K., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech. *16*, 123–140.

Tahara, E.B., Navarete, F.D.T., and Kowaltowski, A.J. (2009). Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. Free Radic. Biol. Med. *46*, 1283–1297.

Taichman, R.S., Reilly, M.J., and Emerson, S.G. (1996). Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. Blood *87*, 518–524.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell *126*, 663–676.

Takano, H., Ema, H., Sudo, K., and Nakauchi, H. (2004). Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. J. Exp. Med. *199*, 295–302.

Takenaka, K., Prasolava, T.K., Wang, J.C.Y., Mortin-Toth, S.M., Khalouei, S., Gan, O.I., Dick, J.E., and Danska, J.S. (2007). Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. Nat. Immunol. *8*, 1313–1323.

Takihara, Y., Nakamura-Ishizu, A., Tan, D.Q., Fukuda, M., Matsumura, T., Endoh, M., Arima, Y., Chin, D.W.L., Umemoto, T., Hashimoto, M., et al. (2019). High mitochondrial mass is associated with reconstitution capacity and quiescence of hematopoietic stem cells. Blood Adv. *3*, 2323–2327.

Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R.S., Hirao, A., Suematsu, M., et al. (2010). Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell *7*, 391–402.

Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C.I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., Goda, N., Rahimi, Y., Johnson, R.S., Soga, T., et al. (2013). Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell *12*, 49–61.

Talkhoncheh, M.S., Subramaniam, A., Magnusson, M., Kumar, P., Larsson, J., and Baudet, A. (2018). Transient inhibition of NF-κB signaling enhances ex vivo propagation of human hematopoietic stem cells. Haematologica *103*, 1444–1450.

Tan, J., Liu, T., Hou, L., Meng, W., Wang, Y., Zhi, W., and Deng, L. (2010). Maintenance and expansion of hematopoietic stem/progenitor cells in biomimetic osteoblast niche. Cytotechnology *62*, 439–448.

Tao, L., Togarrati, P.P., Choi, K.-D., and Suknuntha, K. (2017). StemRegenin 1 selectively promotes expansion of Multipotent Hematopoietic Progenitors derived from Human Embryonic Stem Cells. J. Stem Cells Regen. Med. *13*, 75–79.

Tatetsu, H., Armant, M., Wang, F., Gao, C., Ueno, S., Tian, X., Federation, A., Qi, J., Bradner, J., Tenen, D.G., et al. (2019). Maintenance and enhancement of human peripheral blood mobilized stem/progenitor cell engraftment after ex vivo culture via an HDACi/SALL4 axis (3465). Exp. Hematol. *75*, 53-63.e11.

Tebas, P., Stein, D., Tang, W.W., Frank, I., Wang, S.Q., Lee, G., Spratt, S.K., Surosky, R.T., Giedlin, M.A., Nichol, G., et al. (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. N. Engl. J. Med. *370*, 901–910.

Tesio, M., Golan, K., Corso, S., Giordano, S., Schajnovitz, A., Vagima, Y., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., Caione, L., Gammaitoni, L., et al. (2011). Enhanced c-Met activity promotes G-CSF–induced mobilization of hematopoietic progenitor cells via ROS signaling. Blood *117*, 419–428.

Thomas, E.D. (2005). Bone Marrow Transplantation from the Personal Viewpoint. Int. J. Hematol. *81*, 89–93.

Thomas, T., Corcoran, L.M., Gugasyan, R., Dixon, M.P., Brodnicki, T., Nutt, S.L., Metcalf, D., and Voss, A.K. (2006). Monocytic leukemia zinc finger protein is essential for the development of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. Genes Dev. *20*, 1175–1186.

Thompson, A.A., Walters, M.C., Kwiatkowski, J., Rasko, J.E.J., Ribeil, J.-A., Hongeng, S., Magrin, E., Schiller, G.J., Payen, E., Semeraro, M., et al. (2018). Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent β-Thalassemia. N. Engl. J. Med. *378*, 1479–1493.

Thompson, B.J., Jankovic, V., Gao, J., Buonamici, S., Vest, A., Lee, J.M., Zavadil, J., Nimer, S.D., and Aifantis, I. (2008). Control of hematopoietic stem cell quiescence by the E3 ubiquitin ligase Fbw7. J. Exp. Med. *205*, 1395–1408.

Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (1999). Enhanced In Vivo Regenerative Potential of HOXB4-Transduced Hematopoietic Stem Cells With Regulation of Their Pool Size. Blood *94*, 2605–2612.

Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. Radiat. Res. *14*, 213–222.

Till, J.E., McCulloch, E.A., and Siminovitch, L. (1964). A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *51*, 29–36.

Tn, N., T, M., and Il, W. (2002). Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 205–210.

Toda, H., Yamamoto, M., Kohara, H., and Tabata, Y. (2011). Orientation-regulated immobilization of Jagged1 on glass substrates for ex vivo proliferation of a bone marrow cell population containing hematopoietic stem cells. Biomaterials *32*, 6920–6928.

Tosello, V., and Ferrando, A.A. (2013). The NOTCH signaling pathway: role in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia and implication for therapy. Ther. Adv. Hematol. *4*, 199–210.

Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., et al. (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. Cell *128*, 325–339.

Trentin, J.J. (1971). Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM). Am. J. Pathol. *65*, 621–628.

Trowbridge, J.J., Snow, J.W., Kim, J., and Orkin, S.H. (2009). DNA methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells. Cell Stem Cell *5*, 442–449.

Tsai, J.J., Dudakov, J.A., Takahashi, K., Shieh, J.-H., Velardi, E., Holland, A.M., Singer, N.V., West, M.L., Smith, O.M., Young, L.F., et al. (2013). Nrf2 regulates haematopoietic stem cell function. Nat. Cell Biol. *15*, 309–316.

Tsuruta, T. (2013). Recent Advances in Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy. Innov. Stem Cell Transplant.

Uchida, N., Hsieh, M.M., Hayakawa, J., Madison, C., Washington, K.N., and Tisdale, J.F. (2011). Optimal conditions for lentiviral transduction of engrafting human CD34+ cells. Gene Ther. *18*, 1078–1086.

Uchida, N., Nassehi, T., Drysdale, C.M., Gamer, J., Yapundich, M., Demirci, S., Haro-Mora, J.J., Leonard, A., Hsieh, M.M., and Tisdale, J.F. (2019). High-Efficiency Lentiviral Transduction of Human CD34+ Cells in High-Density Culture with Poloxamer and Prostaglandin E2. Mol. Ther. Methods Clin. Dev. *13*, 187–196.

Ueda, T., Tsuji, K., Yoshino, H., Ebihara, Y., Yagasaki, H., Hisakawa, H., Mitsui, T., Manabe, A., Tanaka, R., Kobayashi, K., et al. (2000). Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. J. Clin. Invest. *105*, 1013–1021.

Umemoto, T., Hashimoto, M., Matsumura, T., Nakamura-Ishizu, A., and Suda, T. (2018). Ca2+-mitochondria axis drives cell division in hematopoietic stem cells. J. Exp. Med. *215*, 2097–2113.

Unnisa, Z., Clark, J.P., Roychoudhury, J., Thomas, E., Tessarollo, L., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Grimes, H.L., and Kumar, A.R. (2012). Meis1 preserves hematopoietic stem cells in mice by limiting oxidative stress. Blood *120*, 4973–4981.

Upadhaya, S., Sawai, C.M., Papalexi, E., Rashidfarrokhi, A., Jang, G., Chattopadhyay, P., Satija, R., and Reizis, B. (2018). Kinetics of adult hematopoietic stem cell differentiation in vivo. J. Exp. Med. *215*, 2815–2832.

Vanderbeck, A., and Maillard, I. (2020). Notch signaling at the crossroads of innate and adaptive immunity. J. Leukoc. Biol.

Vannini, N., Girotra, M., Naveiras, O., Nikitin, G., Campos, V., Giger, S., Roch, A., Auwerx, J., and Lutolf, M.P. (2016). Specification of haematopoietic stem cell fate via modulation of mitochondrial activity. Nat. Commun. *7*, 13125.

Varnum-Finney, B., Brashem-Stein, C., and Bernstein, I.D. (2003). Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. Blood *101*, 1784–1789.

Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D.W., Katavic, V., Lorenzo, J., and Aguila, H.L. (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. Blood *103*, 3258–3264.

Vlaski-Lafarge, M., and Ivanovic, Z. (2015). Reliability of ROS and RNS detection in hematopoietic stem cells--potential issues with probes and target cell population. J. Cell Sci. *128*, 3849–3860.

Vulcano, F., Milazzo, L., Ciccarelli, C., Barca, A., Agostini, F., Altieri, I., Macioce, G., Di Virgilio, A., Screnci, M., De Felice, L., et al. (2012). Valproic acid affects the engraftment of TPO-expanded cord blood cells in NOD/SCID mice. Exp. Cell Res. *318*, 400–407.

Wagner, J.E., Eapen, M., Carter, S., Wang, Y., Schultz, K.R., Wall, D.A., Bunin, N., Delaney, C., Haut, P., Margolis, D., et al. (2014a). One-unit versus two-unit cord-blood transplantation for hematologic cancers. N. Engl. J. Med. *371*, 1685–1694.

Wagner, J.E., Brunstein, C., McKenna, D., Sumstad, D., Maahs, S., Laughlin, M., Perry, M.S., Boitano, A.E., Cooke, M.P., and Bleul, C.C. (2014b). StemRegenin-1 (SR1) Expansion Culture Abrogates the Engraftment Barrier Associated with Umbilical Cord Blood Transplantation (UCBT). Blood *124*, 728–728.

Wagner, J.E., Brunstein, C.G., Boitano, A.E., DeFor, T.E., McKenna, D., Sumstad, D., Blazar, B.R., Tolar, J., Le, C., Jones, J., et al. (2016). Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft. Cell Stem Cell *18*, 144–155.

Walasek, M.A., Bystrykh, L., van den Boom, V., Olthof, S., Ausema, A., Ritsema, M., Huls, G., de Haan, G., and van Os, R. (2012). The combination of valproic acid and lithium delays hematopoietic stem/progenitor cell differentiation. Blood *119*, 3050–3059.

Walasek, M.A., Bystrykh, L.V., Olthof, S., de Haan, G., and van Os, R. (2013). Sca-1 is an early-response target of histone deacetylase inhibitors and marks hematopoietic cells with enhanced function. Exp. Hematol. *41*, 113-123.e2.

Walenda, T., Bokermann, G., Ventura Ferreira, M.S., Piroth, D.M., Hieronymus, T., Neuss, S., Zenke, M., Ho, A.D., Müller, A.M., and Wagner, W. (2011). Synergistic effects of growth factors and mesenchymal stromal cells for expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. Exp. Hematol. *39*, 617–628.

Walter, D., Lier, A., Geiselhart, A., Thalheimer, F.B., Huntscha, S., Sobotta, M.C., Moehrle, B., Brocks, D., Bayindir, I., Kaschutnig, P., et al. (2015). Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. Nature *520*, 549–552.

Wang, Z., and Ema, H. (2016). Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells. Int. J. Hematol. *103*, 498–509.

Wang, P., Wang, Z., and Liu, J. (2020). Role of HDACs in normal and malignant hematopoiesis. Mol. Cancer *19*, 5.

Wang, Y., Liu, L., Pazhanisamy, S.K., Li, H., Meng, A., and Zhou, D. (2010). Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells. Free Radic. Biol. Med. *48*, 348–356.

Wang, Y., Chang, J., Li, X., Pathak, R., Sridharan, V., Jones, T., Mao, X.W., Nelson, G., Boerma, M., Hauer-Jensen, M., et al. (2017). Low doses of oxygen ion irradiation cause long-term damage to bone marrow hematopoietic progenitor and stem cells in mice. PloS One *12*, e0189466.

Wang, Y., Ai, L., Hai, B., Cao, Y., Li, R., Li, H., and Li, Y. (2019). Tempol alleviates chronic intermittent hypoxia-induced pancreatic injury through repressing inflammation and apoptosis. Physiol. Res. *68*, 445–455.

Wang, Y.-H., Israelsen, W.J., Lee, D., Yu, V.W.C., Jeanson, N.T., Clish, C.B., Cantley, L.C., Vander Heiden, M.G., and Scadden, D.T. (2014). Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. Cell *158*, 1309–1323.

Warr, M.R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., Debnath, J., and Passegué, E. (2013). FoxO3a Directs a Protective Autophagy Program in Hematopoietic Stem Cells. Nature *494*, 323–327.

Warsi, S., Blank, U., Dahl, M., Grahn, T.H.M., Schmiderer, L., Andradottir, S., and Karlsson, S. (2020). BMP signaling is required for postnatal murine hematopoietic stem cell self-renewal. Haematologica.

Wei, Q., and Frenette, P.S. (2018). Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. Immunity *48*, 632–648.

Weisel, K.C., Moore, M.A.S., Kanz, L., and Möhle, R. (2009). Extended in vitro expansion of adult, mobilized CD34+ cells without significant cell senescence using a stromal cell coculture system with single cytokine support. Stem Cells Dev. *18*, 229–234.

Wenger, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O2-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O2-regulated gene expression. FASEB J. *16*, 1151–1162.

Wilkinson, A.C., Ishida, R., Kikuchi, M., Sudo, K., Morita, M., Crisostomo, R.V., Yamamoto, R., Loh, K.M., Nakamura, Y., Watanabe, M., et al. (2019). Long-term ex vivo haematopoietic-stem-cell expansion allows nonconditioned transplantation. Nature *571*, 117–121.

Wilkinson, A.C., Ishida, R., Nakauchi, H., and Yamazaki, S. (2020). Long-term ex vivo expansion of mouse hematopoietic stem cells. Nat. Protoc. *15*, 628–648.

Will, B., Vogler, T.O., Bartholdy, B., Garrett-Bakelman, F., Mayer, J., Barreyro, L., Pandolfi, A., Todorova, T.I., Okoye-Okafor, U.C., Stanley, R.F., et al. (2013). Satb1 regulates the self-renewal of hematopoietic stem cells by promoting quiescence and repressing differentiation commitment. Nat. Immunol. *14*, 437–445.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., Wath, R.C. van der, Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., et al. (2008). Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. Cell *135*, 1118–1129.

Wilson, A., Laurenti, E., and Trumpp, A. (2009). Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. Curr. Opin. Genet. Dev. *19*, 461–468.

Wineman, J., Moore, K., Lemischka, I., and Müller-Sieburg, C. (1996). Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cells. Blood *87*, 4082–4090.

Winkler, I.G., Barbier, V., Wadley, R., Zannettino, A.C.W., Williams, S., and Lévesque, J.-P. (2010). Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. Blood *116*, 375–385.

Winkler, I.G., Barbier, V., Nowlan, B., Jacobsen, R.N., Forristal, C.E., Patton, J.T., Magnani, J.L., and Lévesque, J.-P. (2012). Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. Nat. Med. *18*, 1651–1657.

Winterbourn, C.C. (2014). The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. Biochim. Biophys. Acta *1840*, 730–738.

Wolf, N.S., and Trentin, J.J. (1968). Hemopoietic colony studies. V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. J. Exp. Med. *127*, 205–214.

Wright, D.E., Cheshier, S.H., Wagers, A.J., Randall, T.D., Christensen, J.L., and Weissman, I.L. (2001). Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor causes selective mobilization of bone marrow hematopoietic stem cells into the blood after M phase of the cell cycle. Blood *97*, 2278–2285.

Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J.R., and Turner, N.D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. J. Nutr. *134*, 489–492.

Wu, M., Kwon, H.Y., Rattis, F., Blum, J., Zhao, C., Ashkenazi, R., Jackson, T.L., Gaiano, N., Oliver, T., and Reya, T. (2007). Imaging hematopoietic precursor division in real time. Cell Stem Cell *1*, 541–554.

Xie, Y., Yin, T., Wiegraebe, W., He, X.C., Miller, D., Stark, D., Perko, K., Alexander, R., Schwartz, J., Grindley, J.C., et al. (2009). Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. Nature *457*, 97–101.

Xu, G., Wu, H., Zhang, J., Li, D., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, H., Lu, L., Li, C., Huang, S., et al. (2015). Metformin ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. Free Radic. Biol. Med. *87*, 15–25.

Xu, H., Eleswarapu, S., Geiger, H., Szczur, K., Daria, D., Zheng, Y., Settleman, J., Srour, E.F., Williams, D.A., and Filippi, M.-D. (2009). Loss of the Rho GTPase activating protein p190-B enhances hematopoietic stem cell engraftment potential. Blood *114*, 3557–3566.

Xu, M.J., Tsuji, K., Ueda, T., Mukouyama, Y.S., Hara, T., Yang, F.C., Ebihara, Y., Matsuoka, S., Manabe, A., Kikuchi, A., et al. (1998). Stimulation of mouse and human primitive hematopoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cell lines. Blood *92*, 2032–2040.

Xue, X.-L., Han, X.-D., Li, Y., Chu, X.-F., Miao, W.-M., Zhang, J.-L., and Fan, S.-J. (2017). Astaxanthin attenuates total body irradiation-induced hematopoietic system injury in mice via inhibition of oxidative stress and apoptosis. Stem Cell Res. Ther. *8*, 7.

Yahata, T., Takanashi, T., Muguruma, Y., Ibrahim, A.A., Matsuzawa, H., Uno, T., Sheng, Y., Onizuka, M., Ito, M., Kato, S., et al. (2011). Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. Blood *118*, 2941–2950.

Yalcin, S., Marinkovic, D., Mungamuri, S.K., Zhang, X., Tong, W., Sellers, R., and Ghaffari, S. (2010). ROS-mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3(-/-) mice. EMBO J. *29*, 4118–4131.

Yamaguchi, M., Hirayama, F., Kanai, M., Sato, N., Fukazawa, K., Yamashita, K., Sawada, K., Koike, T., Kuwabara, M., Ikeda, H., et al. (2001). Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. Exp. Hematol. *29*, 174–182.

Yamamoto, R., Morita, Y., Ooehara, J., Hamanaka, S., Onodera, M., Rudolph, K.L., Ema, H., and Nakauchi, H. (2013). Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. Cell *154*, 1112–1126.

Yamazaki, S., Iwama, A., Takayanagi, S., Eto, K., Ema, H., and Nakauchi, H. (2009). TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. Blood *113*, 1250–1256.

Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M.M., Karlsson, S., Iwama, A., and Nakauchi, H. (2011). Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. Cell *147*, 1146–1158.

Yeoh, J.S.G., van Os, R., Weersing, E., Ausema, A., Dontje, B., Vellenga, E., and de Haan, G. (2006). Fibroblast growth factor-1 and -2 preserve long-term repopulating ability of hematopoietic stem cells in serum-free cultures. Stem Cells Dayt. Ohio *24*, 1564–1572.

Yonemura, Y., Ku, H., Lyman, S.D., and Ogawa, M. (1997). In vitro expansion of hematopoietic progenitors and maintenance of stem cells: comparison between FLT3/FLK-2 ligand and KIT ligand. Blood *89*, 1915–1921.

Yoshida, T., Goto, S., Kawakatsu, M., Urata, Y., and Li, T.-S. (2012). Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation. Free Radic. Res. *46*, 147–153.

Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoka, S., Miyamoto, K., et al. (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. Cell Stem Cell *1*, 685–697.

Yu, H., Yuan, Y., Shen, H., and Cheng, T. (2006). Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18 INK4C and p21 Cip1/Waf1 in opposite manners. Blood *107*, 1200–1206.

Yu, V.W.C., Yusuf, R.Z., Oki, T., Wu, J., Saez, B., Wang, X., Cook, C., Baryawno, N., Ziller, M.J., Lee, E., et al. (2016). Epigenetic Memory Underlies Cell-Autonomous Heterogeneous Behavior of Hematopoietic Stem Cells. Cell *167*, 1310-1322.e17.

Yu, W.-M., Liu, X., Shen, J., Jovanovic, O., Pohl, E.E., Gerson, S.L., Finkel, T., Broxmeyer, H.E., and Qu, C.-K. (2013). Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. Cell Stem Cell *12*, 62–74.

Yuan, Y., Shen, H., Franklin, D.S., Scadden, D.T., and Cheng, T. (2004). In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. Nat. Cell Biol. *6*, 436–442.

Yvernogeau, L., Gautier, R., Petit, L., Khoury, H., Relaix, F., Ribes, V., Sang, H., Charbord, P., Souyri, M., Robin, C., et al. (2019). In vivo generation of haematopoietic stem/progenitor cells from bone marrow-derived haemogenic endothelium. Nat. Cell Biol. *21*, 1334–1345.

Zandstra, P.W., Conneally, E., Petzer, A.L., Piret, J.M., and Eaves, C.J. (1997). Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 4698–4703.

Zanjani, E.D., Flake, A.W., Rice, H., Hedrick, M., and Tavassoli, M. (1994). Long-term repopulating ability of xenogeneic transplanted human fetal liver hematopoietic stem cells in sheep. J. Clin. Invest. *93*, 1051–1055.

Zarrabi, M., Afzal, E., and Ebrahimi, M. (2018). Manipulation of Hematopoietic Stem Cell Fate by Small Molecule Compounds. Stem Cells Dev. *27*, 1175–1190.

Zhang, C.C., and Lodish, H.F. (2004). Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver cell population is a growth factor for hematopoietic stem cells. Blood *103*, 2513–2521.

Zhang, C.C., Kaba, M., Ge, G., Xie, K., Tong, W., Hug, C., and Lodish, H.F. (2006). Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. Nat. Med. *12*, 240–245.

Zhang, C.C., Kaba, M., Iizuka, S., Huynh, H., and Lodish, H.F. (2008). Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. Blood *111*, 3415–3423.

Zhang, H., Zhai, Z., Wang, Y., Zhang, J., Wu, H., Wang, Y., Li, C., Li, D., Lu, L., Wang, X., et al. (2013). Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. Free Radic. Biol. Med. *54*, 40–50.

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature *425*, 836–841.

Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., and Dong, W. (2016a). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. Oxid. Med. Cell. Longev. *2016*, 4350965.

Zhang, S., Yajima, H., Huynh, H., Zheng, J., Callen, E., Chen, H.-T., Wong, N., Bunting, S., Lin, Y.-F., Li, M., et al. (2011). Congenital bone marrow failure in DNA-PKcs mutant mice associated with deficiencies in DNA repair. J. Cell Biol. *193*, 295–305.

Zhang, Y., Dépond, M., He, L., Foudi, A., Kwarteng, E.O., Lauret, E., Plo, I., Desterke, C., Dessen, P., Fujii, N., et al. (2016b). CXCR4/CXCL12 axis counteracts hematopoietic stem cell exhaustion through selective protection against oxidative stress. Sci. Rep. *6*, 37827.

Zhang, Y., Shen, B., Guan, X., Qin, M., Ren, Z., Ma, Y., Dai, W., Ding, X., and Jiang, Y. (2019). Safety and efficacy of ex vivo expanded CD34+ stem cells in murine and primate models. Stem Cell Res. Ther. *10*, 173.

Zhao, M., Perry, J.M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X.C., Ahamed, J., and Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. Nat. Med. *20*, 1321–1326.

Zhou, B.O., Yue, R., Murphy, M.M., Peyer, J.G., and Morrison, S.J. (2014). Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. Cell Stem Cell *15*, 154–168.

Zhu, J., Garrett, R., Jung, Y., Zhang, Y., Kim, N., Wang, J., Joe, G.J., Hexner, E., Choi, Y., Taichman, R.S., et al. (2007). Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. Blood *109*, 3706–3712.

Zimran, E., Papa, L., Djedaini, M., Patel, A., Iancu-Rubin, C., and Hoffman, R. (2020). Expansion and preservation of the functional activity of adult hematopoietic stem cells cultured ex vivo with a histone deacetylase inhibitor. Stem Cells Transl. Med. *9*, 531–542.

Zlotoff, D.A., Sambandam, A., Logan, T.D., Bell, J.J., Schwarz, B.A., and Bhandoola, A. (2010). CCR7 and CCR9 together recruit hematopoietic progenitors to the adult thymus. Blood *115*, 1897–1905.

Zonari, E., Desantis, G., Petrillo, C., Boccalatte, F.E., Lidonnici, M.R., Kajaste-Rudnitski, A., Aiuti, A., Ferrari, G., Naldini, L., and Gentner, B. (2017). Efficient Ex Vivo Engineering and Expansion of Highly Purified Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Populations for Gene Therapy. Stem Cell Rep. *8*, 977–990.

Zou, J., Zou, P., Wang, J., Li, L., Wang, Y., Zhou, D., and Liu, L. (2012). Inhibition of p38 MAPK activity promotes ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells. Ann. Hematol. *91*, 813–823.

Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Suda, T. (2011). p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. Cell Stem Cell *9*, 247–261.

Annexes

Annexe 1 : Effets similaires et différentiels des faibles et fortes doses d'irradiations sur les cellules souches hématopoïétiques

Revue bibliographique en révision à Experimental Hematology

How hematopoietic stem cells respond to irradiation: comparison between low versus high doses of ionizing radiation

Elia Henry[1-4] and Marie-Laure Arcangeli[1-4]

1. Team Niche and Cancer in Hematopoiesis, U1274, INSERM, 18 route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France.

2. Laboratory of Hematopoietic Stem Cells and Leukemia/Service Stem Cells and Radiation /iRCM/JACOB/DRF, CEA, 18 route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France.

3. UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Université de Paris, CEA, 18 route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France.

4. UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Université Paris-Saclay, CEA, 18 route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France.

Corresponding author: Marie-Laure Arcangeli

Email: marie-laure.arcangeli@inserm.fr

Address: INSERM U1274-CEA-IRCM, 18 route du Panorama 92260 Fontenay-aux-Roses, France

Phone: +33 1 46547704

Number of figures: 1

Abstract

In this review, we will specifically address the newest insights on the effect of low doses of ionizing radiations on the hematopoietic stem cells, which are prone to long-term deleterious effects. Impact of high doses of irradiation on hematopoietic cells has been widely studied over the years, in line with the risk of accidental or terrorist exposure to irradiation and with a particular attention to the sensitivity of the hematopoietic system. Recently, more studies have focused on lower doses of irradiation on different tissues, due to the increasing exposure caused by medical imaging, radiotherapy or plane travelling for instance. Hence, we will delineate similarities and discrepancies in HSC response to high and low doses of irradiation from these studies.

Introduction

Scientific understanding of radiation effects is a constantly evolving field. However, it can be sometimes tricky to define doses of radiation, given the different units in which it can be expressed. The “absorbed dose” is expressed in Gray (Gy) while the “equivalent dose” and the “efficient dose” are expressed in Sievert (Sv). While they both correspond to the same units in the International Units System (J/kg), the relationship between these parameters implies several multiplicative factors taking into account the type of radiation, the organ sensitivity or the species [1]. For laboratory studies, the unit commonly used is the Gy, while in epidemiology studying human exposure it is the Sv, which makes it uneasy to compare both. Moreover, it also depends on the type of radiation, its energy or linear energy transfer (LET) and its relative biological effectiveness (RBE) [2].

Despite this, effects of high doses of irradiation (HDIR) are quite well characterized. Counteracting their effects involves the activation of pathways of the DNA repair response. In humans, the most sensitive tissue is the hematopoietic system: after exposure to irradiation, changes in blood composition might be evidenced with irradiation doses as low as 1 Gy. Death can occur starting at 2 Gy and is certain above 7 Gy in 4 to 6 weeks due to hematological failure [3]. At higher doses, other organs (intestines, skin) are also touched. It has long been stated, in particular for HDIR, that irradiation implied either a linear dose-dependent effect or threshold effect, relying mainly on DNA damage. However, debates regarding the effects of low doses of irradiation (LDIR) still remain, the definition of a low dose itself being unclear. Doses inferior to 500 mGy, sometimes up to 1 Gy are often considered as low doses, and we will refer to that in what follows.

Recently, more concerns of potential hazardness of LDIR (below the threshold considered dangerous by the authorities, and so authorized for medical imaging for instance) rose due to an increased risk of developing leukemia and brain tumors in children exposed to several CT-scans, with total received doses ranging from 0 to 50 mGy in the BM and 0 to 350 mGy in the brain [4, 5]. It became

56 a European priority (RISK-IR European network) to characterize how LDIR affect these organs,
57 considering their sensitivity, in particular for the blood system and hematopoietic stem cells

58 Hematopoietic stem cells (HSC) are responsible for the sustainability of the blood system
59 during the whole life of an individual. For such long-term maintenance, they physiologically display
60 intrinsic properties such as self-renewal and multipotency, which allows them to differentiate into all
61 blood cell lineages while keeping a pool of HSC. However, HSC are very sensitive to any stress. The
62 smallest perturbation in the system, like infection, blood loss, chemical or physical agents, or genotoxic
63 stress, may trigger cell cycle entry and HSC differentiation to sustain blood cell production.

64 To date, we are able to isolate populations enriched in HSC thanks to the expression of a
65 combination of surface markers. For murine HSC, the accepted phenotype for a population with long-
66 term reconstitution potential is $Lin^{-}Sca1^{+}cKit^{+}$(LSK)$CD150^{+}CD48^{-}CD34^{-}$ [6, 7]. For human HSC, the purest
67 population is $Lin^{-}CD34^{+}CD38^{low}CD45RA^{-}CD90^{+}$ [8, 9], but even in this population only 10% of the cells
68 are "true" HSC in the best conditions [10]. Some additional markers such as CD49f [10] or CD133 [11]
69 can also be used to better characterize human HSC.

70 HSC properties need to be very carefully regulated and preserved to avoid numerous
71 pathological conditions such as their exhaustion, causing hematopoietic failure, or their leukemic
72 transformation. Although all the preservation mechanisms of HSC are not fully understood yet, many
73 pathways were shown to be involved in the maintenance of their quiescence, self-renewal or
74 differentiation properties in physiological conditions. This regulation can be extrinsic, related to
75 surrounding cells (HSC niches) and environmental conditions in the bone marrow [12]. Several
76 adhesion molecules (such as E-selectin[13], VCAM-1/a4b1 integrins [14] and JAM-C/JAM-B [15, 16])
77 and secreted growth factors (SCF [17], CXCL12 [18] ligand of CXCR4, TPO [19], Angiopoietin[20] or
78 BMP4 [21]) have been shown to be involved in the retention of HSC into their niches, therefore
79 contributing to their maintenance. The low level of oxygen (hypoxia) [22] has also been demonstrated
80 by many groups to be highly essential for the regulation of HSC maintenance, together with the of
81 Hypoxia Inducible Factors (HIF) proteins, that regulate, in a cell autonomous way, HSC quiescence and
82 self-renewal properties[23, 24].

83 Other intrinsic factors such as transcription factors (i.e. Gata2, Bmi-1[25, 26], Pbx1 [27] or
84 SCL/TAL1 [28, 29]), cell cycle regulators (i.e. p21[30], p27[31] or p57 [31, 32]), chemokines, cytokines
85 and growth factor receptors (i.e. cKIT, MPL, CXCR4 etc.) also regulate HSC fate. Finally, actors involved
86 in irradiation-induced stress response also play a role in maintaining HSC stemness in steady state
87 conditions as well as after exposure to irradiation or other genotoxic stresses.

88 In this review, we will address the similar and differential effects of high and low dose of radiation
89 (HDIR and LDIR) in regards of the steady-state regulation of HSC properties, focusing on components
90 involved in the DNA-repair response (DRR) and Reactive oxygen species (ROS) pathways.

91 **Involvement of DRR pathways and ROS pathway in HSC maintenance**

92 DRR is composed of several pathways depending of DNA damages generated (for review [33]).
93 In steady state conditions, these pathways also act to preserve DNA integrity, for instance during
94 replication process, and the quiescence and self-renewal properties in HSC. Several proteins, such as
95 DNA-PKc [34, 35], Ligase IV [36, 37] and ku70/80 [34, 37-39] involved in Non-homologous end joining
96 (NHEJ), BRCA2 [40] involved in homologous recombination (HR), XPD[37] and ERCC1[41-43] involved
97 in nucleotide excision repair (NER) or ATM [44] play a role in maintaining HSC functions. In competitive
98 transplantation experiments, HSC mutants show a loss of functionality. In most of knockdown mouse
99 model, HSC number is drastically decreased compared to those in wildtype mice. In particular, *atm*$^{-/-}$
100 mice exhibit a decreased frequency of HSC with a defect in their reconstitution capacity. ROS levels are
101 increased in *atm*$^{-/-}$ HSC compared to WT ones. When mice are treated, in drinking water, with the N-
102 acetylcysteine (NAC), a ROS scavenger, ROS levels of *atm*$^{-/-}$ HSC decrease while their reconstitution
103 potential is restored, in particular their long-term reconstitution capacity [44]. Interestingly, NAC
104 treatment can prevent the activation of the p38MAPK signaling pathway [45]. The same effects can be
105 observed after SB203580 treatment, a p38MAPK inhibitor [45]. These defects in *atm*$^{-/-}$ HSC can be
106 linked to HSC exhaustion since *atm*$^{-/-}$ HSC are less quiescent than WT HSC with an increased expression
107 of gene involved in cell cycle progression (p16^{ink4a} and p19^{arf}). Interestingly, NAC treatment as well as
108 SB203580 also induce decreased expression of these genes and prevent *atm*$^{-/-}$ HSC exhaustion.
109 Altogether, these data demonstrate that in steady state conditions, ATM contributes to protecting HSC
110 quiescence and self-renewal potential by controlling ROS levels and p38MAPK activation[44, 45].

111 In steady state condition and independently of ATM, ROS involvement in loss of self-renewal
112 potential is well documented. HSC have a very specific metabolic activity linked to the hypoxic
113 environment they reside in. Moreover, HSC intrinsic metabolism is correlated with a low level of ROS
114 [46, 47]. Indeed, they mostly rely on anaerobic glycolysis [48] or fatty acid oxidation [49] instead of
115 oxidative phosphorylation. An increase in ROS levels, by deletion of several regulators like AKT [50],
116 mTOR [51], or FoxOs [52, 53] proteins, and ATM as mentioned above, induces an exit of quiescence
117 and loss of self-renewal properties. In wildtype mice, ROS level increases upon serial transplantation
118 [45, 54], and NAC treatment of donor mice as well as recipient mice participates to the reduction of
119 the ROS levels and to the protection of HSC reconstitution capacity during serial transplantations [45,
120 55].

121 Downstream effectors induced by ROS are equally involved in the maintenance of stemness.
122 For instance, inhibiting the degradation of p53 [56] or inducing activation of p38MAPK [57] impairs the
123 functions of HSC, mimicking the effects of elevated ROS. However, important regulators of ROS such
124 as NRF2 [58] can also be involved in a ROS-independent manner in the regulation of HSC properties
125 [59]. Indeed, unlike other tissues, ROS levels are not elevated in *nrf2*$^{-/-}$ mice BM and NAC is not able to

126 rescue the functional defects caused by NRF2 deficiency. Moreover, HSC displaying the highest self-
127 renewal potential were shown to be mainly quiescent, in the G0 state, and even dormant, only dividing
128 a few times in an entire lifetime [7]. As mentioned above, increased ROS levels induce exit of
129 quiescence of HSC and these features are regulated by different members of the Cdkn family, such as
130 p21 [30], p27 or p57 [31, 32], which are themselves targets of effectors previously cited, like p53 [60].
131
132 **HDIR**
133 Radiosensitivity is usually linked to three specificities of a cell: its division speed, the length of
134 its dividing future and its undifferentiated state[61]. Usually acute radiation lethality arises from
135 anemia or infection due to hematopoietic failure and pancytopenia. Long-term delayed effects such as
136 leukemia are also predominant after non-lethal irradiation, as witnessed in an important proportion
137 of Hiroshima and Nagasaki bombings survivors [61]. They occur when DNA of surviving immature cells
138 is damaged. The probability of developing a malignancy usually increases with the dose.
139 The mechanisms by which these short and long-term effects occur are nowadays quite well
140 characterized in hematopoietic stem cells as well as in many other cell types, in several species, and
141 have already been reviewed elsewhere [3]. Mainly, ionizing radiations produce free radicals and
142 reactive oxygen and nitrogen species [62] (ROS and NOS respectively), which in turn induce
143 mitochondrial and DNA damages, mostly double strand breaks (DSB) but also oxidative DNA damage,
144 and eventually lead to apoptosis or senescence if needed. In response to these damages, different
145 pathways, such as NHEJ, HR, base or nucleotide excision repair (BER and NER respectively) or ATM are
146 activated to either repair the DNA damages or induce apoptosis, if the damages are too important.
147 Induction of these pathways leads to activation of p53 and p38MAPK pathways.
148 Total body irradiation (TBI) of mice by ^{137}Cs at 6.5 Gy induces HSC senescence via the cyclin-
149 dependent kinase inhibitors p16, p21 and p19 specifically [63]. It was also shown to induce a decrease
150 in clonogenicity in selectively LSK cells compared to more mature progenitors [64]. HSC frequency and
151 reconstitution potential was also decreased. This is due to a persistent increase of ROS observed
152 several weeks after irradiation, that leads to oxidative DNA damage and DSB, as shown by 8-OH-dG
153 and γH2AX staining which respectively mark the guanine oxidation on DNA and the phosphorylation
154 of γH2AX following DSB [65]. These effects were reversible with the addition of the antioxidant NAC
155 demonstrating the implication of the ROS. Moreover, the authors showed that NOX4 pathway is also
156 involved in these effects using an inhibitor of this protein. The resveratrol, another antioxidant,
157 protects HSC from HDIR via Sirt1 pathway, a histone deacetylase protein involved in response to stress
158 and aging [66]. Another study on mouse cells showed that p53 mutations had important consequences
159 on HSC response to irradiation, conferring resistance [67]. They hypothesized that it was due to either
160 better DNA damage repair or cell cycle arrest properties. More recently, two teams (Passegué's and

161 Dick's) discussed p53 involvement in HDIR effects on murine and human HSC respectively, showing
162 some differences in the way they respond. In Passegué's study, it was shown that after *ex vivo*
163 irradiation between 2 and 4 Gy, HSC clonogenicity improved compared to more mature populations
164 [68]. This seems contradictory with previous papers presented here, but could be explained by the
165 difference in the irradiation protocol (*in vivo* vs *ex vivo* and lower doses 2 vs 6 Gy). Plus, HSC were
166 showed to be less prone to apoptosis than multipotent progenitors (MPP) following irradiation, relying
167 more deeply on p53-mediated growth arrest and NHEJ repair, usually more used than HR in quiescent
168 cells. However, HSC mobilization and activation in culture, provoking cell cycle entry, attenuating p53
169 response and increasing HR, do not change the radiosensitivity nor induce increased apoptosis,
170 mimicking only partially MPP behavior. This may suggest that quiescence is not the only mechanism
171 driving the specific HSC behavior in response to IR. However, John Dick's team showed that contrary
172 to mouse cells, human cord blood HSC ($Lin^-CD34^+CD38^-CD45RA^-CD90^+$) displayed delayed DSB
173 rejoining, γH2AX foci remaining for a longer time, enhanced apoptosis, and diminished clonogenicity
174 compared to more mature populations (MPP, $Lin^-CD34^+CD38^-CD45RA^-CD90^+$ and progenitors, Lin^-
175 $CD34^+CD38^+$) [69]. They confirmed that p53 pathway is essential to the irradiation response also in
176 human HSC. Indeed, in both mouse and human cells, inhibition of p53 leads to radioprotective effects,
177 increased clonogenicity and *in vivo* hematopoietic reconstitution potential. Nevertheless, the
178 mechanisms underlying these protective effects are different, correlating with the way human and
179 mouse HSC respectively deal with IR: apoptosis is decreased in human HSC while cell growth is
180 increased in mouse HSC. Of note, deletion of downstream effectors of p53 like PUMA [70] or BCL2
181 activation [69] suppress apoptosis, and allows respectively mice to survive to irradiation and HSC
182 clonogenic potential to be enhanced. However, radioprotection by p53 downregulation comes at a
183 price, since p53-defective HSC, but not BCL2-overexpressing HSC, show increased γH2AX foci and
184 defective self-renewal upon serial transplantation.

185 To sum up, HSC are strongly affected by high doses of irradiation (HDIR), and display mostly
186 oxidative stress and DNA damage such as DSB. These damages are then handled by either apoptosis
187 or repair, but it may give rise to errors in the DNA code, mainly through NHEJ eventually leading to
188 genomic abnormalities in the progeny [68] and even leukemic transformation. Furthermore,
189 discrepancies in the way HSC deal with DNA damages may differ depending on numerous factors, such
190 as species, HSC ontogenic origin, dose and type of irradiation. Of note, chemotherapeutic agents such
191 as busulfan, implying chemical instead of physical aggressions, can have similar functional effects but
192 different mechanisms of action[71, 72].
193
194
195

196 **LDIR**

197 However, the way HSC deal with lower doses of irradiation might be different. As stated before, doses
198 inferior to 500 mGy, sometimes up to 1 Gy are considered as low doses.

199 As explained earlier, for high doses, irradiation implies either a linear dose-dependent effect or
200 threshold effect, relying mainly on DNA damage. For this type of effect, dose seems to be directly
201 linked to the quantity of damage, the chance to undergo DNA damage becoming extremely low below
202 100 mGy. For the low-dose region, different types of dose-response curves were proposed, one of
203 them being hormesis [73]. This principle presupposes that a phenomenon giving rise to detrimental
204 effects at high-doses (including irradiation) might be beneficial at low-doses [74]. Other propositions
205 included "non-linear quadratic effects", resulting in even lower risks at low doses than linear models
206 [75]. These propositions did not lead to changes in regulatory recommendations for therapy, imaging
207 or working conditions, considering the lack of statistical robustness and the fact that it did not prove
208 any potential danger of LDIR. However, an increased risk of developing leukemia and brain tumors in
209 children exposed to several CT- scans was reported [4, 5], suggesting potential hazardness of low
210 doses. In this part, we will review studies shedding light on LDIR effect on hematopoietic tissues, and
211 more particularly HSC. Mostly, cell-autonomous effects are studied.

212 In mice, one of the most used model for the study of hematopoietic tissues, effects of different
213 types of irradiation were evaluated at low doses, uncovering unexpected effects compared to the
214 linear dose-response model. The effect of low doses of high-LET irradiation (heavy ions) as endured by
215 deep space astronauts, was well studied. In 2014, it was shown that ^{56}Fe ions irradiation impacted HSC
216 epigenetic regulation[76]. It increased the global DNA methylation and decreased methyltransferase
217 levels specifically in HSPC, between 100 and 400 mGy, at 4 weeks after exposure. At 22 weeks, results
218 are more visible at higher doses, mainly 400 mGy, but a diminution of *DNMT3b* methyltransferase is
219 still seen at 200 mGy. However, no "usual" effect such as DNA damage, or elevation of ROS, could be
220 witnessed in any condition with this type of irradiation and at those time points. Recently, a team
221 investigated the immediate (2 weeks) and late (3 months) effects of exposition to more or less low-
222 doses (50-100-250 mGy and 1 Gy) of ^{16}O irradiation – charged particles, very high energy (600 MeV)
223 [77, 78]. For immediate effects, they demonstrated a decrease in hematopoietic stem and progenitor
224 cell (HSPC) frequency and numbers at all doses, with no great difference in the lower doses compared
225 to 1 Gy. Interestingly only higher doses (1 Gy) had an impact on mature cells. *In vitro* functional tests
226 such as CFU-C and CAFC showed a decrease in the clonogenic capacities of HSPC at all doses.
227 Interestingly, for the CAFC test, the effect of the lowest doses 100 mGy on HSPC clonogenic potential
228 was detectable only at 5 weeks post irradiation, suggesting an effect on long-term HSPC properties.
229 Several mechanisms were investigated to explain these effects. In particular, a persistent increase in
230 ROS production, and subsequently an increase of DNA double strand breaks (γH2AX foci) and cell cycle

231 entry were seen in immature populations. For later time points, the same type of effects was
232 detectable and it was exacerbated at lower doses (100 mGy) except for the ROS level in HPC, which
233 has returned to normal levels three months post irradiation. In both cases, low doses of irradiation did
234 not induce cell apoptosis. The authors also compared these effects after 3 months with ^{137}Ce
235 irradiation – γ-ray, low-LET and low energy (0,6 MeV): in this case, no difference could be spotted
236 between irradiated between 100 mGy and 1 Gy and control cells. This could be compared with a study
237 showing that high-LET (150 keV/µm) irradiation with charged particles have more RBE than low-LET (2
238 kEV/µM for a 250 keV X-ray) irradiation.
239 Two other recent studies focused on the effect of even lower doses (20 mGy) of ^{60}Co irradiation
240 – γ-ray, mild energy (4 MeV), low LET (0,2 keV/µm) – on murine and human hematopoietic stem cells
241 [79, 80]. This dose was chosen to match the dose received in the bone marrow during a CT scan, on
242 average. In both studies, a hyper-radiosensitivity was evidenced on HSC clonogenic potential at doses
243 around 20 mGy, immediately for murine HSC and after serial replating for human HSC, which is less
244 important at higher LDIR such as 50 or 250 mGy (Figure 1A). This observation on human cells recalls
245 the results reviewed previously on murine HSPC exposed to ^{16}O irradiation with higher LET [78]. This
246 may also indicate differences in the dose triggering hyper-radiosensitivity in murine HSC compared to
247 human ones. Lower *in vivo* reconstitution potentials of irradiated HSPC were also demonstrated.
248 However, no effect of LDIR was seen on total number of murine HSC 4 months after total body
249 irradiation in mice, except in the case of inflammatory conditioning or G-CSF treatment. It may suggest
250 that LDIR affects mostly stressed cells (inflammatory conditions, replicating cells…). In both cases,
251 unlike HDIR (2-2.5 Gy as controls), no usual effects of irradiation were seen: no DSB damage nor DDR
252 pathway activation was evidenced, as seen by the absence of γH2AX foci and ATM and p53
253 phosphorylation; no difference in cell cycle or apoptosis neither. However, an immediate but transient
254 increase of ROS was observed after irradiation. This oxidative stress was also demonstrated, in human
255 HSC, by the presence of oxidative DNA lesions such as 8-OH-dG and the activation of p38MAPK
256 pathway. In both studies, the NRF2 protein was translocated into the nucleus. Murine cells deficient
257 for NRF2 are more hyper-radiosensitive than WT ones, while Keap1 (a repressor of NRF2) deficient
258 cells show no hyper-radiosensitivity at all, demonstrating the implication of the Keap1-NRF2 pathway
259 in HSC response to LDIR. Also, in murine HSC kept in culture, a second wave of ROS was detectable
260 after a week of culture, compared to sham-irradiated cells. Irradiated HSC transplanted into mice also
261 displayed an elevated level of ROS several months after irradiation, suggesting a persistent oxidative
262 stress. Metabolic changes were observed in human HSC: a decrease in the metabolic activity, as
263 demonstrated by the use of TMRE and MTG probes, was observed in the hours following irradiation;
264 in murine HSC, it was an increase of the autophagy (LC3B staining) (Figure 1B). Treatment with the
265 well-known antioxidant NAC improved HSC potential (recovery of clonogenicity and no activation of

266 p38MAPK in human cells, decrease of autophagy in murine cells and Figure 1A and C). Of note, 20 mGy
267 irradiation using a linear accelerator producing X-rays (1 MeV) produced a similar but milder effect on
268 clonogenicity (unpublished data); also, as stated previously, different low doses (50 mGy and 250 mGy)
269 had few or no effect with ^{60}Co irradiation (Figure 1A). This supports the hypothesis that irradiating
270 particles energy is an important factor to predict cell response to low doses of irradiation, and that
271 there is a sharp non-linear effect at low doses. Globally, these two groups demonstrate that oxidative
272 stress, not high enough to induce apoptotic responses, may be a key element to understand how very
273 low dose of irradiation affect HSC (Figure 1) [79, 80].
274 To conclude with, the type of HSC might also be an important factor to consider. They indeed
275 may behave differently to a same irradiation dose, as shown by a study comparing cord blood, bone
276 marrow and peripheral blood HSC[81].
277
278 **Discussion**
279 Globally, most studies converge to state that oxidative stress is a major driver of irradiation
280 response, both at high and low doses of irradiation. This could be put in comparison with the fact that
281 a global increase of oxidative stress is also a hallmark of aging in HSC that leads to similar
282 consequences, notably defects in self-renewal. Indeed, aged HSC have endured more exits from
283 quiescence than young ones, progressively losing self-renewal properties and accumulating
284 unrepaired defects [82].
285 Moreover, it is also interesting to look at LDIR impact on other types of cells, potentially less
286 sensitive than HSC. For instance, Philip Jones' group recently showed that highly proliferative intestinal
287 stem cells are affected by LDIR (50 mGy, ^{137}Cs irradiation): they show increased oxidative stress which
288 triggers higher differentiation potential at the expense of stem cell proliferation [83]. p53 mutant stem
289 cells are in this case more able to proliferate. However, antioxidant treatment with NAC was able to
290 reverse this effect and to protect the functionality of intestinal stem cells. In gut and brain, low doses
291 of irradiation also produced an increase of ROS and further activation of NFkB and SOD2 signalization
292 [84]. In mesenchymal stem cells, 80 mGy of X-rays induced persistent γH2AX foci, unlike 1 Gy
293 irradiation for which these DSB are repaired more rapidly, mimicking some of the effects witnessed on
294 HSC [85].
295 Obviously, there is still room for more investigations around the effects of low doses of
296 irradiation. Indeed, it appears clear that LDIR have substantial effects especially on stem cells.
297 Moreover, it seems that LET is a more important factor at low doses than at high doses. Hence we
298 suspect that at low doses there might be a specific dose-response curve for each type of irradiation
299 and cell, making it quite difficult to establish a universal model for a specific irradiation dose.

However, the increase of ROS seems to be a major recurrence after LDIR. As discussed, ROS tend to induce defects in self-renewal in quiescent stem cells, such as HSC, while it affects more deeply the differentiation in proliferating stem cells. Since ROS are known to be involved in many pathologic pathways, it would be interesting to dig further in this direction. Nonetheless, ROS are also more and more studied for their role in physiological signaling and may represent a way to cope with irradiation. After LDIR, the ROS increase may be under the threshold considered as a stress and may not trigger adapted responses. In HSC, we believe this could be the reason why low doses result in a differentiation signal at the expense of self-renewal, leading to long-term consequences. Anyway, it may not be useless to consider supplementation in antioxidant molecules to protect HSC and maybe other types of cells, which might be beneficial for people more exposed to LDIR, such a people needing frequent medical imaging, astronauts or frequent flyers.

References:

[1] ICRP. Recommandations 2007 de la Commission internationale de protection radiologique. ICRP publication 103. 2007.

[2] for. Radiation workers university of Wisconsin. 2005.

[3] Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. Antioxid Redox Signal. 2014;20:1447-1462.

[4] Pearce MS. Patterns in paediatric CT use: an international and epidemiological perspective. J Med Imaging Radiat Oncol. 2011;55:107-109.

[5] Pearce MS, Salotti JA, Little MP, et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. Lancet. 2012;380:499-505.

[6] Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell. 2005;121:1109-1121.

[7] Wilson A, Laurenti E, Oser G, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. Cell. 2008;135:1118-1129.

[8] Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. Nat Immunol. 2010;11:585-593.

[9] Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. Cell Stem Cell. 2012;10:120-136.

[10] Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. Science. 2011;333:218-221.

[11] Radtke S, Gorgens A, Kordelas L, et al. CD133 allows elaborated discrimination and quantification of haematopoietic progenitor subsets in human haematopoietic stem cell transplants. Br J Haematol. 2015;169:868-878.

[12] Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. Nature. 2014;505:327-334.

[13] Winkler IG, Barbier V, Nowlan B, et al. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. Nat Med. 2012;18:1651-1657.

[14] Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:9647-9651.

[15] Arcangeli ML, Bardin F, Frontera V, et al. Function of Jam-B/Jam-C interaction in homing and mobilization of human and mouse hematopoietic stem and progenitor cells. Stem Cells. 2014;32:1043-1054.
[16] Arcangeli ML, Frontera V, Bardin F, et al. JAM-B regulates maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. Blood. 2011;118:4609-4619.
[17] Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. Nature. 2012;481:457-462.
[18] Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. Immunity. 2006;25:977-988.
[19] Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. Cell Stem Cell. 2007;1:685-697.
[20] Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell. 2004;118:149-161.
[21] Goldman DC, Bailey AS, Pfaffle DL, Al Masri A, Christian JL, Fleming WH. BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. Blood. 2009;114:4393-4401.
[22] Morikawa T, Takubo K. Hypoxia regulates the hematopoietic stem cell niche. Pflugers Arch. 2016;468:13-22.
[23] Imanirad P, Dzierzak E. Hypoxia and HIFs in regulating the development of the hematopoietic system. Blood Cells Mol Dis. 2013;51:256-263.
[24] Takubo K, Goda N, Yamada W, et al. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell. 2010;7:391-402.
[25] Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. Nature. 2003;423:255-260.
[26] Park IK, Qian D, Kiel M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. Nature. 2003;423:302-305.
[27] Ficara F, Murphy MJ, Lin M, Cleary ML. Pbx1 regulates self-renewal of long-term hematopoietic stem cells by maintaining their quiescence. Cell Stem Cell. 2008;2:484-496.
[28] Correia NC, Arcangeli ML, Pflumio F, Barata JT. Stem Cell Leukemia: how a TALented actor can go awry on the hematopoietic stage. Leukemia. 2016;30:1968-1978.
[29] Reynaud D, Ravet E, Titeux M, et al. SCL/TAL1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment. Blood. 2005;106:2318-2328.
[30] Cheng T, Rodrigues N, Shen H, et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. Science. 2000;287:1804-1808.
[31] Zou P, Yoshihara H, Hosokawa K, et al. p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. Cell Stem Cell. 2011;9:247-261.
[32] Matsumoto A, Takeishi S, Kanie T, et al. p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell. 2011;9:262-271.
[33] Biechonski S, Yassin M, Milyavsky M. DNA-damage response in hematopoietic stem cells: an evolutionary trade-off between blood regeneration and leukemia suppression. Carcinogenesis. 2017;38:367-377.
[34] Shao Z, Flynn RA, Crowe JL, et al. DNA-PKcs has KU-dependent function in rRNA processing and haematopoiesis. Nature. 2020;579:291-296.
[35] Zhang S, Yajima H, Huynh H, et al. Congenital bone marrow failure in DNA-PKcs mutant mice associated with deficiencies in DNA repair. J Cell Biol. 2011;193:295-305.
[36] Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, et al. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. Nature. 2007;447:686-690.
[37] Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. Nature. 2007;447:725-729.
[38] Kenyon J, Gerson SL. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. Nucleic Acids Res. 2007;35:7557-7565.

396 [39] Qing Y, Wang Z, Bunting KD, Gerson SL. Bcl2 overexpression rescues the hematopoietic stem
397 cell defects in Ku70-deficient mice by restoration of quiescence. Blood. 2014;123:1002-1011.
398 [40] Navarro S, Meza NW, Quintana-Bustamante O, et al. Hematopoietic dysfunction in a mouse
399 model for Fanconi anemia group D1. Mol Ther. 2006;14:525-535.
400 [41] Hasty P, Campisi J, Hoeijmakers J, van Steeg H, Vijg J. Aging and genome maintenance: lessons
401 from the mouse? Science. 2003;299:1355-1359.
402 [42] Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, et al. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is
403 required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. Mol Cell Biol.
404 2004;24:5776-5787.
405 [43] Prasher JM, Lalai AS, Heijmans-Antonissen C, et al. Reduced hematopoietic reserves in DNA
406 interstrand crosslink repair-deficient Ercc1-/- mice. EMBO J. 2005;24:861-871.
407 [44] Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal
408 of haematopoietic stem cells. Nature. 2004;431:997-1002.
409 [45] Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan
410 of hematopoietic stem cells. Nat Med. 2006;12:446-451.
411 [46] Bigarella CL, Liang R, Ghaffari S. Stem cells and the impact of ROS signaling. Development.
412 2014;141:4206-4218.
413 [47] Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic
414 stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. Blood. 2007;110:3056-3063.
415 [48] Guo B, Huang X, Lee MR, Lee SA, Broxmeyer HE. Antagonism of PPAR-gamma signaling expands
416 human hematopoietic stem and progenitor cells by enhancing glycolysis. Nat Med. 2018;24:360-367.
417 [49] Ito K, Carracedo A, Weiss D, et al. A PML-PPAR-delta pathway for fatty acid oxidation regulates
418 hematopoietic stem cell maintenance. Nat Med. 2012;18:1350-1358.
419 [50] Juntilla MM, Patil VD, Calamito M, Joshi RP, Birnbaum MJ, Koretzky GA. AKT1 and AKT2
420 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. Blood.
421 2010;115:4030-4038.
422 [51] Chen C, Liu Y, Liu Y, Zheng P. The axis of mTOR-mitochondria-ROS and stemness of the
423 hematopoietic stem cells. Cell Cycle. 2009;8:1158-1160.
424 [52] Hagenbuchner J, Kuznetsov A, Hermann M, Hausott B, Obexer P, Ausserlechner MJ. FOXO3-
425 induced reactive oxygen species are regulated by BCL2L11 (Bim) and SESN3. J Cell Sci. 2012;125:1191-
426 1203.
427 [53] Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell
428 resistance to physiologic oxidative stress. Cell. 2007;128:325-339.
429 [54] Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, et al. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the
430 self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. Blood. 2011;118:2941-2950.
431 [55] Hu L, Cheng H, Gao Y, et al. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine increases engraftment of human
432 hematopoietic stem cells in immune-deficient mice. Blood. 2014;124:e45-48.
433 [56] Liu Y, Elf SE, Miyata Y, et al. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. Cell Stem Cell.
434 2009;4:37-48.
435 [57] Karigane D, Kobayashi H, Morikawa T, et al. p38alpha Activates Purine Metabolism to Initiate
436 Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Cycling in Response to Stress. Cell Stem Cell. 2016;19:192-204.
437 [58] Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the
438 human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1
439 gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:14960-14965.
440 [59] Merchant AA, Singh A, Matsui W, Biswal S. The redox-sensitive transcription factor Nrf2
441 regulates murine hematopoietic stem cell survival independently of ROS levels. Blood. 2011;118:6572-
442 6579.
443 [60] Insinga A, Cicalese A, Faretta M, et al. DNA damage in stem cells activates p21, inhibits p53,
444 and induces symmetric self-renewing divisions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:3931-3936.
445 [61] Dainiak N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. Exp Hematol.
446 2002;30:513-528.

[62] Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Lett. 2012;327:48-60.
[63] Wang Y, Schulte BA, LaRue AC, Ogawa M, Zhou D. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. Blood. 2006;107:358-366.
[64] Wang Y, Liu L, Pazhanisamy SK, Li H, Meng A, Zhou D. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells. Free Radic Biol Med. 2010;48:348-356.
[65] Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In Vivo. 2008;22:305-309.
[66] Zhang H, Zhai Z, Wang Y, et al. Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. Free Radic Biol Med. 2013;54:40-50.
[67] Lee JM, Bernstein A. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:5742-5746.
[68] Mohrin M, Bourke E, Alexander D, et al. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. Cell Stem Cell. 2010;7:174-185.
[69] Milyavsky M, Gan OI, Trottier M, et al. A distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal. Cell Stem Cell. 2010;7:186-197.
[70] Shao L, Sun Y, Zhang Z, et al. Deletion of proapoptotic Puma selectively protects hematopoietic stem and progenitor cells against high-dose radiation. Blood. 2010;115:4707-4714.
[71] Meng A, Wang Y, Brown SA, Van Zant G, Zhou D. Ionizing radiation and busulfan inhibit murine bone marrow cell hematopoietic function via apoptosis-dependent and -independent mechanisms. Exp Hematol. 2003;31:1348-1356.
[72] Meng A, Wang Y, Van Zant G, Zhou D. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. Cancer Res. 2003;63:5414-5419.
[73] Doss M. Linear No-Threshold Model VS. Radiation Hormesis. Dose Response. 2013;11:480-497.
[74] Calabrese EJ. Hormesis: improving predictions in the low-dose zone. Exp Suppl. 2012;101:551-564.
[75] Gonzalez AJ. Biological effects of low doses of ionizing radiation : A fuller picture. IAEA Bulletin. 1994:37-45.
[76] Miousse IR, Shao L, Chang J, et al. Exposure to low-dose (56)Fe-ion radiation induces long-term epigenetic alterations in mouse bone marrow hematopoietic progenitor and stem cells. Radiat Res. 2014;182:92-101.
[77] Chang J, Luo Y, Wang Y, et al. Low Doses of Oxygen Ion Irradiation Cause Acute Damage to Hematopoietic Cells in Mice. PLoS One. 2016;11:e0158097.
[78] Wang Y, Chang J, Li X, et al. Low doses of oxygen ion irradiation cause long-term damage to bone marrow hematopoietic progenitor and stem cells in mice. PLoS One. 2017;12:e0189466.
[79] Henry E, Souissi-Sahraoui I, Deynoux M, et al. Human hematopoietic stem/progenitor cells display ROS-dependent long-term hematopoietic defects after exposure to low dose of ionizing radiations. Haematologica. 2020;105 (8):2044-2055.
[80] Rodrigues-Moreira S, Moreno SG, Ghinatti G, et al. Low-Dose Irradiation Promotes Persistent Oxidative Stress and Decreases Self-Renewal in Hematopoietic Stem Cells. Cell Rep. 2017;20:3199-3211.
[81] Kato K, Kuwabara M, Kashiwakura I. The influence of gender- and age-related differences in the radiosensitivity of hematopoietic progenitor cells detected in steady-state human peripheral blood. J Radiat Res. 2011;52:293-299.
[82] Walter D, Lier A, Geiselhart A, et al. Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. Nature. 2015;520:549-552.
[83] Fernandez-Antoran D, Piedrafita G, Murai K, et al. Outcompeting p53-Mutant Cells in the Normal Esophagus by Redox Manipulation. Cell Stem Cell. 2019;25:329-341 e326.

[84] Veeraraghavan J, Natarajan M, Herman TS, Aravindan N. Low-dose gamma-radiation-induced oxidative stress response in mouse brain and gut: regulation by NFkappaB-MnSOD cross-signaling. Mutat Res. 2011;718:44-55.

[85] Pustovalova M, Astrelina capital Te C, Grekhova A, et al. Residual gammaH2AX foci induced by low dose x-ray radiation in bone marrow mesenchymal stem cells do not cause accelerated senescence in the progeny of irradiated cells. Aging (Albany NY). 2017;9:2397-2410.

Acknowledgements:

Our work is supported by INSERM, CEA, Université de Paris and Université Paris Saclay, Cancéropôle Ile de France, The European network RISK-IR, Electricité de France (EDF) and CEA-Segment radiobiologie. EH is a fellow of Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC). We would like to thank Dr Rima Haddad and Dr Sarah Rodrigues-Moreira for critical reading of the manuscript and valuable advice. We would like to apologize to all colleagues whose work would not be cited in this review.

Figure legend:

Figure 1: Consequences of exposure to low doses of ionizing radiation (LDIR) on hematopoietic stem cell (HSC) properties. (A) Human HSC were pretreated (purple) or not (black) with the antioxidant NAC prior exposure to different low and high doses of IR from no irradiation to 2.5 Gy as indicated. Then HSC were seeded in serial CFU-C assay. Left LDIR (20 to 50 mGy) have no effect on HSC capacities to generate primary CFU-C. Right only 20 mGy and 2.5 Gy-irradiated HSC failed to generate secondary CFU-C in serial CFU-C assay. (B) Model explaining the effect of HSC exposure to LDIR (20 mGy) in humans (blue) and mouse (orange) model. (C) Model explaining how either antioxidants or p38MAPK inhibitor (SB203580) can protect human HSC from LDIR.

figure

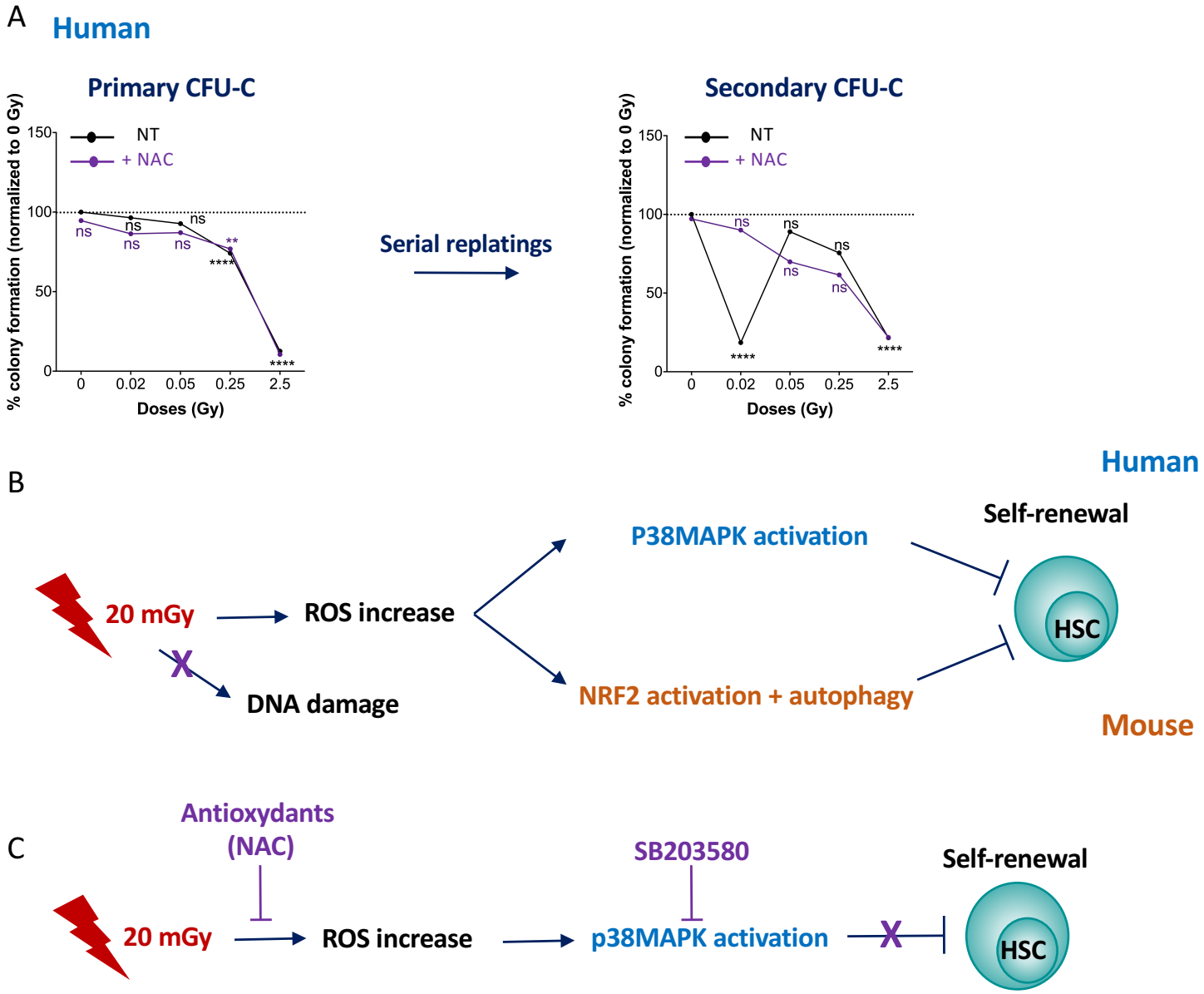


Figure 1:

De: **Experimental Hematology** em@editorialmanager.com
Objet: Experimental Hematology Editorial Decision
Date: 27 septembre 2020 à 23:07
À: Marie-Laure Arcangeli marie-laure.arcangeli@inserm.fr

Ref.: Ms. No. 20-224
How hematopoietic stem cells respond to irradiation: comparison between low versus high doses of ionizing radiation
Experimental Hematology

Dear Dr Arcangeli,

I am pleased to advise you that your manuscript has been well received and will be accepted in principle pending minor revisions. For these please see the Reviewers' Comments provided below.

Note that a detailed response to the reviewers' concerns needs to be uploaded as a separate file labeled "Response to Reviewers". All changes made in the text of the revised manuscript should also be in red font. If you anticipate needing more than our conventional allowance of 2 months for resubmission of a manuscript requiring minor revisions, please contact the editorial office.

To submit your revision, go to https://www.editorialmanager.com/exphem/ and log in as an Author. You will see a menu item call Submission Needing Revision. You will find your submission record there. Please note the following requirements for all resubmissions:
* Your revised manuscript must follow Experimental Hematology formatting guidelines and needs to be uploaded as a source file. PDF files cannot be accommodated. (Please refer to the Guide for Authors for additional information and acceptable file formats at: http://www.elsevier.com/journals/experimental-hematology/0301-472X/guide-for-authors).
* Figures and tables may be embedded within the source file for the submission as long as they are of sufficient visual quality. For any figure that cannot be embedded within the source file (such as *.PSD Photoshop files), the original figure needs to be uploaded separately.
* Inclusion of a "Highlights" file is mandatory. Highlights consist of up to 5 bullet points (maximum 85 characters each, including spaces) that convey the core findings of the article (http://www.elsevier.com/highlights).
* Inclusion of a Graphical Abstract is encouraged but not mandatory. Graphical Abstracts should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online (http://www.elsevier.com/graphicalabstracts).

If you have not already done so, please be sure to provide a completed Authorship Statement, with your signature that assumes responsibility for all aspects of the manuscript on behalf of all co-authors. This will avoid delays in further handling of your manuscript.

We look forward to receiving a revised manuscript.

Yours sincerely,

Professor Tao Cheng
Associate Editor
Experimental Hematology

Reviewers' comments:

Reviewer #1:
The hematopoietic system is the most sensitive tissue upon ionizing radiations and low doses of ionizing radiations surround us in many situations. Therefore, it is of great importance to study the effect of low doses of ionizing radiations on the hematopoietic system and hematopoietic stem cells. The manuscript by Dr. Marie-Laure Arcangeli and Elia Henry provided a short overview of the effects that hematopoietic stem cells display in response to low and high doses of ionizing radiation. They summarized the recent published studies on the effects of low and high doses of ionizing radiation on hematopoietic stem cells, and also discussed the prospects in this area. The manuscript is well written and the matter is of interest. Minor points and suggestions are listed as bellow:

1. Page 3, line 57th: a punctuation should be added in the end of this line.
2. Page 3, line 61-63th: "The smallest perturbation in the system, like infection, blood loss, chemical or physical agents, or genotoxic stress, may trigger cell cycle entry and HSC differentiation to sustain blood cell production", it would be good to provide related reference about "infection", "blood loss", "chemical", "physical agents", "genotoxic stress" that triggers cell cycle entry and HSC differentiation to sustain blood cell production.
3. Page 10, line 315th: please check the correct style of "reference 2"
4. What is of most interest that the clonogenic potential of human hematopoietic stem cells was compromised at doses around 20 mGy, but not at higher LDIR such as 50 or 250 mGy. Meanwhile, the authors suppose a non-linear effect may happen when hematopoietic stem cells suffer ionizing radiations at low doses. However, in the paper "Human hematopoietic stem/progenitor cells display reactive oxygen species-dependent long-term hematopoietic defects after exposure to low doses of ionizing radiations" published by the authors, I only found the "20 mGy" results. Therefore, in Figure 1A, if the data at the doses 50 and 250 mGy are newly presented here, it would be good to give a detailed description in the figure legend, such as the type of radiation source and its energy or LET, how many biological and technical repetitions they done, and statistic method used.

Reviewer #2:
Elia Henry et al., in this manuscript, discuss the effect of high or low doses of ionizing radiations on the hematopoietic stem cells. The effect of high doses of ionizing radiations on the hematopoietic stem cells is well studied. However, the effect of low doses of

The effect of high doses of ionizing radiations on the hematopoietic stem cells is well studied. However, the effect of low doses of ionizing radiations is not very clear. In this manuscript, the newest insights on the effect of low doses of ionizing radiations on the hematopoietic stem cells are discussed, and compare with high doses of ionizing radiation. The detail comments are listed below:

Major points:

The title of this manuscript is "How hematopoietic stem cells respond to irradiation: comparison between low versus high doses of ionizing radiation". But in manuscript, the comparison between low versus high doses of ionizing radiation is insufficient. A section should be added to compare the effect of high and low doses of ionizing radiations on the hematopoietic stem cells. Moreover, the table form is a better way to show the difference between low versus high doses of ionizing radiation on hematopoietic stem cells.

Minor points:

1) The titles "HDIR" and "LDIR" are too simple. "High/Low doses of ionizing radiations" is better than abbreviation.
2) The citation format of the references should be more standardized.
3) This manuscript should be processed by English editing in order to getting smoothly reading experience.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: https://www.editorialmanager.com/exphem/login.asp?a=r). Please contact the publication office if you have any questions.

Annexe 2 : Effet combiné du G-CSF et du Plerixafor sur la reconstitution hématopoïétique en souris NSG de CD34$^+$ issues du sang périphérique de patients mauvais mobilisateurs

Article publié dans Experimental Hematology en 2020

Dans cet article, nous avons étudié les effets de la combinaison du Plerixafor (ou AMD3100) avec le G-CSF sur les CSH dans le cadre de leur mobilisation. Cette méthode est notamment utilisée pour des patients dits mauvais mobilisateurs, pour lesquels un traitement au G-CSF seul ne permet pas d'obtenir une quantité de CSH suffisante pour la transplantation. Cependant, rien n'est connu sur la qualité des CSH obtenues par cette méthode.

Ainsi, nous avons pu montrer que les CSH mobilisées par la combinaison des deux molécules sont non seulement plus nombreuses, mais possèdent également un meilleur potentiel de reconstitution hématopoïétique pour un même nombre de cellules transplantées. La combinaison du Plerixafor avec le G-CSF est donc une méthode thérapeutique particulièrement intéressante pour améliorer le résultat thérapeutique d'une greffe de CSH pour des patients mauvais mobilisateurs.

Experimental Hematology

Experimental Hematology 2020;86:15−20

BRIEF COMMUNICATION

Combined G-CSF and Plerixafor enhance hematopoietic recovery of CD34$^+$ cells from poor mobilizer patients in NSG mice

Marie-Laure Arcangeli[a,b,c,d], Philippe Brault[e], Jean-Henri Bourhis[f], Frédérique Kuhnowskie[e], Elia Henry[a,b,c,d], Vilma Barroca[a,b,c,d], Serge Koscielny[g], Françoise Pflumio[a,b,c,d], and Sophie Amsellem[h]

[a]*Team Niche and Cancer in Hematopoiesis, U1274, INSERM, Fontenay-aux-Roses, France;* [b]*Laboratory of Hematopoietic Stem Cells and Leukemia/Service Stem Cells and Radiation/iRCM/JACOB/DRF, CEA, Fontenay-aux-Roses, France;* [c]*UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Université de Paris, CEA, Fontenay-aux-Roses, France;* [d]*UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Université Paris-Saclay, CEA, Fontenay-aux-Roses, France;* [e]*Curie Institute Hematology Unit, Paris, France;* [f]*Blood and Marrow Transplantation Service, Department of Hematology, U1186, INSERM, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif Cedex, France;* [g]*Department of Biostatistics, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif Cedex, France;* [h]*Hematology/Immunology Unit, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif Cedex, France*

(Received 17 March 2020; revised 12 May 2020; accepted 14 May 2020)

Transplantable CD34$^+$ hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) are currently isolated mainly from peripheral blood after mobilization with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). These mobilized CD34$^+$ cells have the potential to generate all blood cell types. For autologous transplantation, the minimal number of mobilized CD34$^+$ cells is 2×10^6 CD34$^+$ cells/kg body weight. However, up to 30% of patients fail to mobilize enough peripheral CD34$^+$ cells after G-CSF treatment. To overcome this limitation, a combination of G-CSF and Plerixafor, a CXCR4 chemokine receptor inhibitor, is proposed to enhance CD34$^+$ cell mobilization in poor mobilizer patients. However, only limited data are available on quantification of the functional quality of such patients' mobilized hematopoietic stem cells. Here, for six poor mobilizer patients, a head-to-head comparison of their CD34$^+$ cells mobilized without versus with Plerixafor was performed to assess their properties with respect to the reconstitution of human hematopoiesis in vivo in immune-deficient mice. Our results indicate that mobilized CD34$^+$ cells recovered after the G-CSF + Plerixafor mobilization protocol have an enhanced intrinsic hematopoietic reconstitution potential compared with CD34$^+$ cells mobilized with G-CSF alone. **© 2020 ISEH – Society for Hematology and Stem Cells. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.**

Hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) contained in the CD34$^+$ cell compartment give rise to all blood cell types and have been used for decades in transplantation [1,2]. Today, the main source of transplantable hematopoietic stem cells (HSCs) is granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)−mobilized peripheral blood, and the minimal number of mobilized CD34$^+$ cells (mCD34$^+$) for autologous transplantation is 2×10^6 CD34$^+$ cells/kg body weight [3]. Moreover, up to 30% patients fail to mobilize enough CD34$^+$ cells after G-CSF treatment [4−6]. The combination of G-CSF + Plerixafor, a CXCR4 chemokine receptor

FP and SA contributed equally to this article.SA brought the original idea and organized the work. MLA, FP, and SA designed, performed, and analyzed experiments. EH and VB performed experiments. PB, JHB, and FK provided patient samples. SK helped with the statistical analysis. MLA, PB, FP, and SA wrote the article.

Offprint requests to: Marie-Laure Arcangeli, Team Niche and Cancer in Hematopoiesis, U1274, INSERM, 18 route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France; E-mail: marie-laure.arcangeli@inserm.fr

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.05.006.

0301-472X/© 2020 ISEH – Society for Hematology and Stem Cells. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.05.006

inhibitor, has been reported to increase the number of mCD34$^+$ cells [7], and is an improved mobilization protocol for overcoming the mCD34$^+$ number limitation. The combination of G-CSF + Plerixafor was thus extensively and successfully tested in the context of hematologic malignancies [8−12]. Similarly, in poor mobilizer patients, G-CSF + Plerixafor allowed the optimal mCD34$^+$ cell number necessary for transplantation in fewer apheresis days [13−15]. In most patients, effective hematopoietic reconstitution—the ultimate goal of the transplant—was achieved, indicating the functional quality of the so-mobilized graft. Quantitative comparisons of the intrinsic properties of CD34$^+$ cells mobilized by G-CSF alone versus G-CSF + Plerixafor have been made in healthy donors [16,17]. However, in the case of poor mobilizer patients, there is little investigation of this comparison, probably because of the difficulty involved in accessing this type of human cell.

Here, CD34$^+$ cells obtained with G-CSF alone and with the combination G-CSF + Plerixafor from the same poor mobilizer patients were compared head-to-head with respect to their properties in the reconstitution of human hematopoiesis in immune-deficient mice, known as one of the gold standard in vivo assays used to assess human HSC function [16−18]. Our experiments indicated that human mCD34$^+$ cells recovered after G-CSF + Plerixafor treatment of poor mobilizer patients are much more potent in the generation of human hematopoiesis in mice than mCD34$^+$ cells from the same patients recovered after treatment with G-CSF alone, indicating a higher intrinsic hematopoietic reconstitution potential for G-CSF + Plerixafor-mobilized HSPCs.

Methods

Primary cells

Mobilized peripheral blood cell samples were collected from patients treated for different low-grade hemopathies (Table 1) after receipt of their informed written consent based on the Declaration of Helsinki. Autologous HSPCs were mobilized by chemotherapy + G-CSF or by G-CSF in steady state (3 patients each) [19]. mCD34$^+$ cells were quantified at the end of aplasia for patients mobilized by chemotherapy + G-CSF and at days 5 and 6 in the case of mobilization by G-CSF in steady state. The first leukapheresis (control without Plerixafor) was performed when the number of circulating CD34$^+$ cells was greater than 10/μL. With the objective of collection and quality control of the first leukapheresis product, Plerixafor was introduced the next day and administered at dose of 0.24 mg/kg subcutaneously at 2:00 AM while continuing the G-CSF at the dose of 10 μg/kg. A sample of the second leukapheresis (started 8−10 hours after the injection of Plerixafor) product was transmitted to the laboratory.

Table 1. Patient samples and experiments performed*

Patient	Diagnosis	Mobilization protocol	Blood sampleCD34+/μL† (%)		Leukapheresis sample				
					% CD34$^+$CD38^{lo}(% CD90$^+$/CD34$^+$CD38^{lo})		No. of CD34$^+$ cells/mouse	No. of mice positive(%)	
			G-CSF	G-CSF + Plerixafor	G-CSF	G-CSF +Plerixafor		G-CSF	G-CSF +Plerixafor
1	MM	G-CSF in steady state	17.84 (0.165)	44.83 (0.160)	18.0 (4.2)	18.9 (6.5)	312,000	0/1 (0)	0/2 (0)
2	DLBCL	R-ACVBP + G-CSF	16.62 (0.114)	43.03 (0.145)	ND	ND	125,000	7/22 (31.8)	23/28 (82.1)
3	MM	CPMHD + G-CSF	17.88 (0.045)	30.05 (0.051)	56.8 (11.0)	56.5 (11.1)	125,000	9/26 (34.6)	26/26 (100)
		G-CSF in steady state	15.86 (0.07)	56.93 (0.134)					
4	MM	CPMHD + G-CSF	34.42 (0.058)	34.22 (0.046)	23.5 (6.7)	14.8 (10.2)	430,000	0/3 (0)	2/2 (100)
5	MM	G-CSF in steady state	24.17 (0.070)	97.4 (0.234)	60.1 (5.9)	62.3 (6.1)	125,000	2/25 (8.0)	14/26 (53.8)
6	HL	G-CSF in steady state	14.60 (0.048)	17.55 (0.050)	20.0 (27.6)	22.0 (32.9)	730,000	0/3 (0)	3/4 (75.0)
Total								18/76 (23.7)	68/86 (79.1)

MM = multiple myeloma; DLBCL = diffuse large B-cell lymphoma; HL = Hodgkin's lymphoma.

*Patient mCD34$^+$ cells were mobilized by chemotherapy: R-ACVBP (rituximab, doxorubicin, cyclophosphamide, vindesine, bleomycin, and prednisone) or CPMHD (cyclophosphamide high dose) + G-CSF or by G-CSF in steady state [19]. Leukapheresis cells were obtained after G-CSF injection (±CT), and the day after, after G-CSF + Plerixafor injection. Peripheral CD34$^+$ cells were quantified at the end of aplasia for patients mobilized by chemotherapy + G-CSF, and at day 5 and day 6, in case of mobilization by G-CSF in steady state. Blood and leukapheresis samples were analyzed by flow cytometry.

†Absolute count.

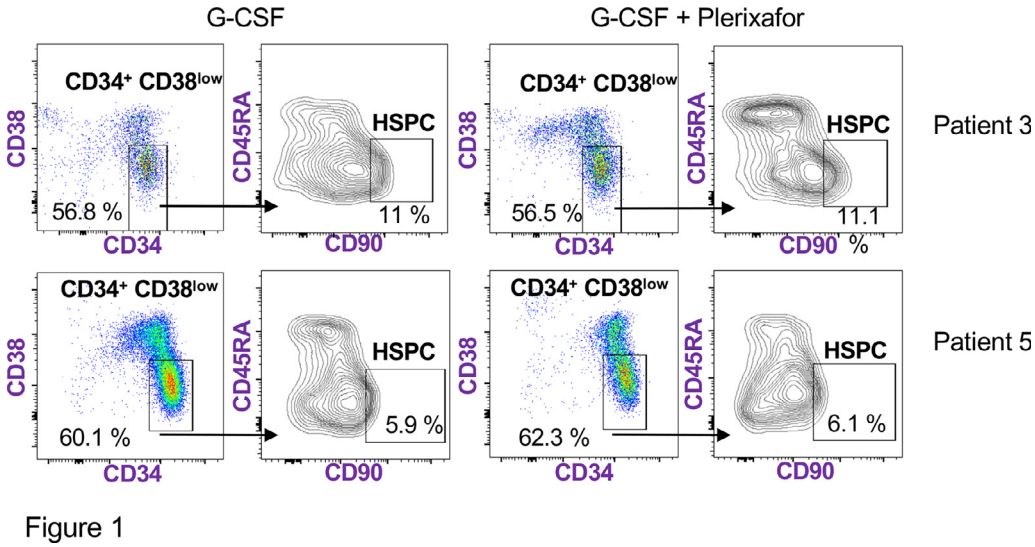


Figure 1. (A) Phenotype analysis of immature progenitors and HSPCs in CD34$^+$ cells mobilized either with G-CSF or with the G-CSF + Plerixafor. Shown are results from patients 3 and 4 before transplantation in NSG mice.

The targeted number of HSC collected was achieved in one mobilization episode for five patients and in two episodes for one patient (multiple myeloma) to achieve three grafts (young patient).

Experimental samples were obtained by taking in the homogenized leukapheresis product in accordance with the Institutional Review Board of INSERM (Opinion No. 13-105-1, IRB00003888). mCD34$^+$ cells were purified by immunomagnetic selection using a CD34 MicroBeads kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) and cryopreserved until use to mimic autologous HSC storage.

Transplantation assays and flow cytometry

Each sample was injected into NOD-SCID-$\gamma C^{-/-}$ (NSG) mice by the intravenous route. Sixteen weeks post transplant, BM cells were recovered from flushed femurs and tibias. Levels of engrafted human CD45$^+$ hematopoietic cells were measured among red cell–lysed bone marrow (BM) cells as described [20]. Monoclonal antibodies are detailed in Supplementary Figure E1 (online only, available at www.exphem.org).

Statistical analysis

A nonparametric statistical analysis, the Mann–Whitney test, was used (**$p < 0.01$, ***$p < 0.0001$).

Results and discussion

Human mCD34$^+$ cells were obtained from six poor mobilizer patients with different low-grade hemopathies (Table 1). For each patient, we compared the functional properties of CD34$^+$ cells mobilized with G-CSF alone with those mobilized with the G-CSF + Plerixafor combination. We observed that the frequency of circulating mCD34$^+$ cells increased after G-CSF + Plerixafor compared with G-CSF alone (Table 1). We further observed that the percentage of HSPCs defined by the phenotype CD34$^+$CD38^{low}CD45RA$^-$CD90$^+$ [21–23] varied between patients (Figure 1 and Table 1). However, the percentages of CD34$^+$CD38^{low}CD45RA$^-$CD90$^+$ cells in the CD34$^+$ cells mobilized with G-CSF alone or in those mobilized with G-CSF + Plerixafor were similar, indicating that Plerixafor, in particular, does not mobilize this HSPC population. To ensure mCD34$^+$ cells would reconstitute human hematopoiesis in NSG mice, we first tested different mCD34$^+$ cell doses for their ability to reconstitute human hematopoiesis. As previously described, female NSG mice had higher hematopoietic cell reconstitution than males (Supplementary Figure E1A) [24] but the percentage of hCD45$^+$ cells still remained low, with 75,000 injected mCD34$^+$ cells (Supplementary Figure 1A,B). Therefore, we increased the dose of mCD34$^+$ cells transplanted per female mouse to a minimum of 125,000 cells/mouse. Then, we directly compared the NSG repopulating function of mCD34$^+$ cells from the same poor mobilizer patients who were mobilized by G-CSF alone versus cells mobilized after G-CSF + Plerixafor treatment (Figure 2). A mouse was considered to be engrafted with human cells (i.e., positive) when the proportions of hCD45$^+$ cells were >0.1% that of total BM cells. The frequency of positive mice was significantly higher (Figure 2A) when G-CSF + Plerixafor mCD34$^+$ cells were injected compared with G-CSF mCD34$^+$ cells. Human chimerism was also drastically enhanced when recipient mice received G-CSF + Plerixafor mCD34$^+$ cells (Figure 2B;Supplementary Figure E2, online only, available at www.exphem.org), indicating that, as far as mCD34$^+$ cells capable of generating a robust human hematopoietic progeny in NSG mice are concerned, mobilization with the

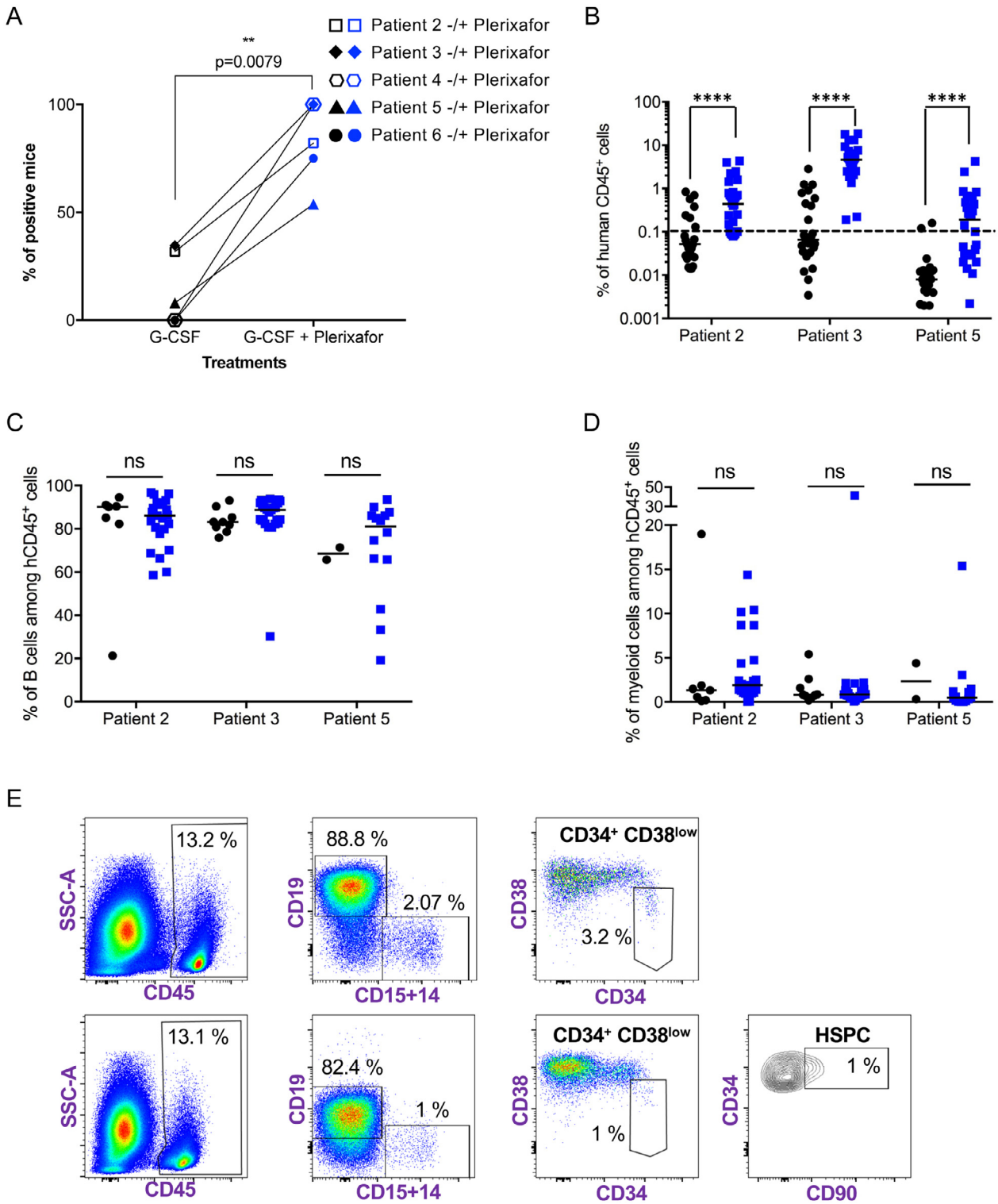


Figure 2. (**A**) Percentage of positive mice, that is, mice engrafted with human CD45$^+$ cells in their bone marrow 16 weeks posttransplantation for all five patients (23.7% vs. 79.1%). Cell doses per mouse are provided in Table 1. Mice were considered positive when >0.1% hCD45$^+$ cells were detected. Statistical test: Mann–Whitney, $^{**}p = 0.0079$. (**B**) Percentage of human CD45$^+$ cells in the bone marrow of NSG mice 16 weeks posttransplantation for patients 2, 3, and 5. Shown are median values from 24–28 mice/patient sample. Cell doses per mouse are provided in Table 1. Mice were considered positive when >0.1% hCD45$^+$ cells (indicated by the *dotted line*) were detected. Proportions of (**C**) B cells and (**D**) myeloid cells in human CD45$^+$ cells. Only positive mice (>0.1% hCD45$^+$ cells) were analyzed. Shown are median values of the positive mice from (**B**) and Table 1. (**E**) Typical phenotype analysis of human immature progenitor cells in the bone marrow of NSG mice 16 weeks posttransplantation. Shown are two representative mice injected with CD34$^+$ mobilized with the combination G-CSF + Plerixafor from patient 3. Statistical test: nonparametric Mann–Whitney test, $^{****}p < 0.000$.

combination G-CSF + Plerixafor is more potent than mobilization with G-CSF alone. When mature hematopoietic cell compartments among human $CD45^+$ cells for positive mice were characterized, the proportions of human B and myeloid cells generated were comparable no matter the mobilization protocol (Figure 2C,D). This observation indicated that HSPCs mobilized under both conditions were equally fully capable of producing B and myeloid cells. The immature cell compartment ($CD34^+$) was only analyzed in the BM of mice transplanted with $CD34^+$ cells mobilized with G-CSF + Plerixafor, as only these mice exhibited a chimerism robust enough to measure the frequency of these rare cells (Figure 2E). We observed that $Lin^-CD34^+CD38^{low}$ immature progenitors were detectable in the BM of all transplanted mice as was an HSPC subset identified using the expression of CD90 in the $Lin^-CD34^+CD38^{low}$ fraction, indicating that $CD34^+$ cells mobilized with G-CSF + Plerixafor were able to regenerate an HSPC compartment in mouse BM. Together these data strongly indicate that, in the case of poor mobilizer patients, $CD34^+$ cells mobilized with G-CSF + Plerixafor have enhanced human hematopoietic reconstitution potential in xenograft models compared with $CD34^+$ cells mobilized with G-CSF only.

HSCs mobilized in both treatments are fully competent to reconstitute hematopoiesis, in agreement with results indicating that Plerixafor alone or in combination with G-CSF can improve $mCD34^+$ engraftment potential [16,17]. In xenograft models using cells from healthy donors, the G-CSF + Plerixafor combination is indeed highly efficient in mobilizing HSCs [16,17]. Only G-CSF alone is used daily in clinics to induce robust $CD34^+$ cell mobilization in the case of good mobilizer patients [1,10,14,25]. In the case of poor mobilizer patients, not only is the quantity of $CD34^+$ cells lower when G-CSF is used alone, but so is the quality, considering the timing of neutrophil and platelet recovery in patients [26]. Here, we found that the quality of HSCs needed to reconstitute hematopoiesis in the xenograft model when $CD34^+$ cells are mobilized during the first round of the mobilization protocol (G-CSF) is drastically lower than the quality of HSCs mobilized by the combination G-CSF + Plerixafor, in six independent patients. Interestingly, our data correlate with the fact that the expression profile of $CD34^+$ cells from patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma mobilized with the combination G-CSF + Plerixafor is more enriched in gene transcripts promoting hematopoietic reconstitution than $CD34^+$ cells mobilized with G-CSF alone [27]. To conclude, our results indicate that Plerixafor provides highly significant added value in combination with G-CSF for autologous transplantation of $mCD34^+$ cells in the case of poor mobilizer patients.

Acknowledgments

We acknowledge the patients for agreeing to use of their $mCD34^+$ HSPCs in this study. We thank Patrick Gonin for his help in NSG mouse handling and husbandry. This work was supported partly by grants from INSERM. EH is a fellow of Ligue Nationale contre le Cancer. We are grateful to Mark Yates, Dr. Franck Yates, and Anne Perrier for correcting the English spelling in our article.

Conflict of interest disclosure

This work was in part supported by a grant from Sanofi, a private company.

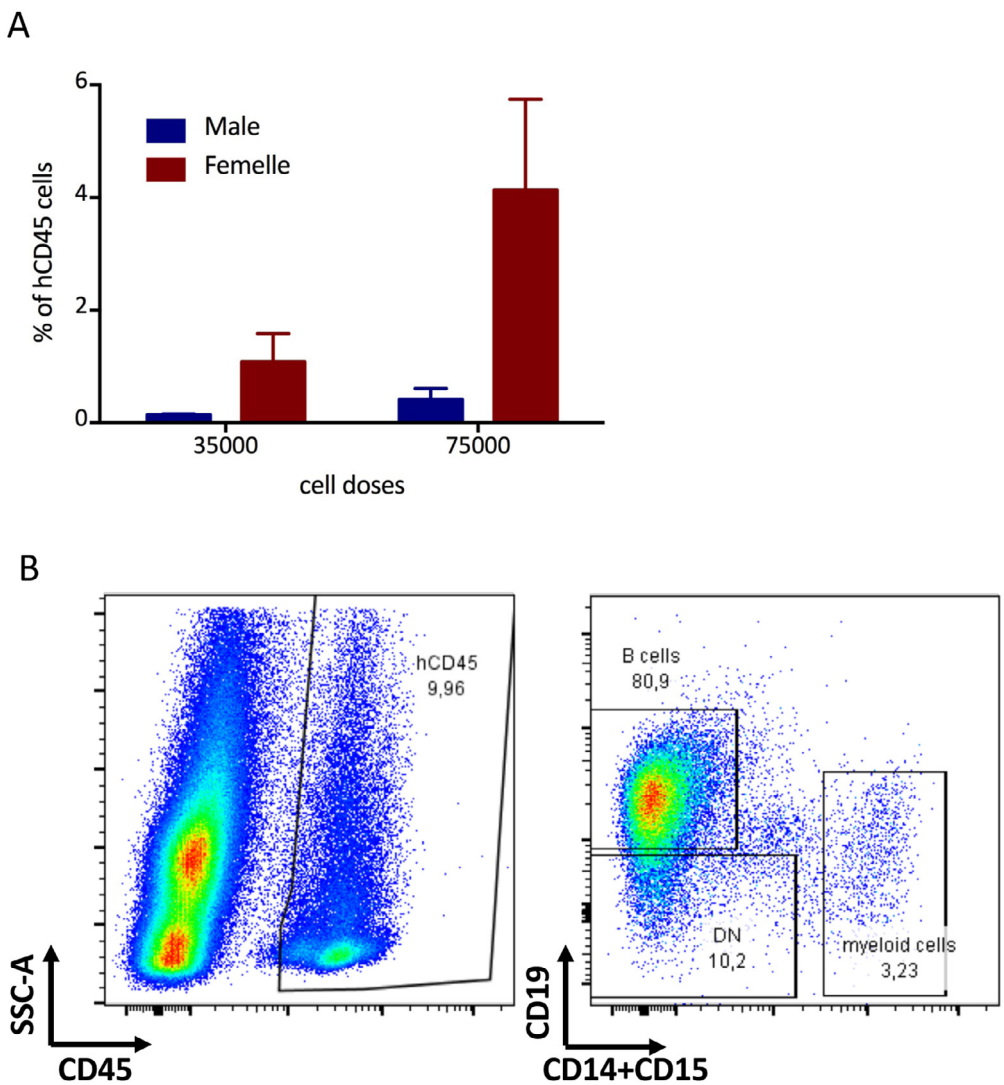
References

1. To LB, Levesque JP, Herbert KE. How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. Blood. 2011;118:4530–4540.
2. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell. 2000;100:157–168.
3. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. Blood. 1997;89:2233–2258.
4. Gertz MA. Current status of stem cell mobilization. Br J Haematol. 2010;150:647–662.
5. Mohty M, Ho AD. In and out of the niche: perspectives in mobilization of hematopoietic stem cells. Exp Hematol. 2011;39:723–729.
6. Morgan SJ, Seymour JF, Grigg A, et al. Predictive factors for successful stem cell mobilization in patients with indolent lymphoproliferative disorders previously treated with fludarabine. Leukemia. 2004;18:1034–1038.
7. Liles WC, Rodger E, Broxmeyer HE, et al. Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. Transfusion. 2005;45:295–300.
8. Cashen A, Lopez S, Gao F, et al. A phase II study of plerixafor (AMD3100) plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization in patients with Hodgkin lymphoma. Biol Blood Marrow Transplant. 2008;14:1253–1261.
9. DiPersio JF, Micallef IN, Stiff PJ, et al. Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for patients with non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 2009;27:4767–4773.
10. DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee A, et al. Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. Blood. 2009;113:5720–5726.
11. Russell N, Douglas K, Ho AD, et al. Plerixafor and granulocyte colony-stimulating factor for first-line steady-state autologous peripheral blood stem cell mobilization in lymphoma and multiple myeloma: results of the prospective PREDICT trial. Haematologica. 2013;98:172–178.
12. Stiff P, Micallef I, McCarthy P, et al. Treatment with plerixafor in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma patients to increase the number of peripheral blood stem cells when given a mobilizing regimen of G-CSF: implications for the heavily pretreated patient. Biol Blood Marrow Transplant. 2009;15:249–256.
13. Duarte RF, Shaw BE, Marin P, et al. Plerixafor plus granulocyte CSF can mobilize hematopoietic stem cells from multiple

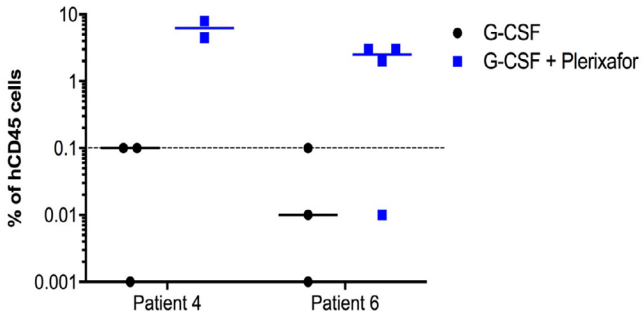
myeloma and lymphoma patients failing previous mobilization attempts: EU compassionate use data. Bone Marrow Transplant. 2011;46:52–58.
14. Hubel K, Ostermann H, Glass B, et al. Plerixafor in non-Hodgkin's lymphoma patients: a German analysis of time, effort and costs. Bone Marrow Transplant. 2019;54:123–129.
15. Mohty M, Duarte RF, Kuball J, et al. Recommendations from the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) for a curriculum in hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2018;53:1548–1552.
16. Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. J Exp Med. 2005;201:1307–1318.
17. Miller PH, Nakamichi N, Knapp D, et al. Quantitation of human cells that produce neutrophils and platelets in vivo obtained from normal donors treated with granulocyte colony-stimulating factor and/or plerixafor. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22:1945–1952.
18. McDermott SP, Eppert K, Lechman ER, Doedens M, Dick JE. Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains. Blood. 2010;116:193–200.
19. Sheridan WP, Begley CG, Juttner CA, et al. Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. Lancet. 1992;339:640–644.
20. Benyoucef A, Calvo J, Renou L, et al. The SCL/TAL1 transcription factor represses the stress protein DDiT4/REDD1 in human hematopoietic stem/progenitor cells. Stem Cells. 2015;33:2268–2279.
21. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. Nat Immunol. 2010;11:585–593.
22. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. Cell Stem Cell. 2012;10:120–136.
23. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. Cell Stem Cell. 2007;1:635–645.
24. Notta F, Doulatov S, Dick JE. Engraftment of human hematopoietic stem cells is more efficient in female NOD/SCID/IL-2Rgc-null recipients. Blood. 2010;115:3704–3707.
25. Giralt S, Costa L, Schriber J, et al. Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations. Biol Blood Marrow Transplant. 2014;20:295–308.
26. De Santis GC, Garcia-Silva AC, Chiaramonte NC, et al. Haematological recovery in poor and good haematopoietic stem cell mobilisers. Transfus Med. 2016;26:297–300.
27. Fruehauf S, Seeger T, Maier P, et al. The CXCR4 antagonist AMD3100 releases a subset of G-CSF-primed peripheral blood progenitor cells with specific gene expression characteristics. Exp Hematol. 2006;34:1052–1059.

Suppl Table 1. Antibodies used for this study

Ab name	Clone	Fluorochrome	Reference	Brand
CD90	5E10	APC	559869	BD Bioscience
CD34	581	PE-Cy7	343516	Biolegend
CD34	581	APC	343510	Biolegend
CD38	HB-7	FITC	356610	Biolegend
CD45RA	HI100	PE	304108	Biolegend
CD45	HI30	BV421	304032	Biolegend
CD3	SK7	PeRCP-Cy5.5	344808	Biolegend
CD19	HIB19	APC-eF780	47-0199-42	ebioscience
CD19	SJ25C1	APC	363006	Biolegend
CD14	61D3	PE	12-0149-42	ebioscience
CD15	HI98	PE	301906	Biolegend
CD3	SK7	FITC	344804	Biolegend
Zombie Aqua viability dye	-	-	423102	Biolegend



Suppl Figure 1. (A) % of human CD45$^+$ cells in the bone marrow of male (blue) and female (red) NSG mice 16 weeks post transplantation. Mice were injected with two different cell doses (35 000 and 75 000 cells) per mouse. (B) Typical example of human hematopoietic reconstitution (B and myeloid cells) obtained in the bone marrow of a female NSG injected with 75 000 mCD34$^+$ cells.



Suppl Figure 2. % of human CD45^{+} cells in the bone marrow of NSG mice 16 weeks post transplantation for patients 4 and 6. Shown are results from 2-4 mice/patient sample. Cell doses/mouse are provided in Table 1. Mice were considered positive when >0.1% hCD45+ cells (dotted line) were detected. No statistics was used due to the small number of injected mice.

Annexe 3 : Les cellules souches hématopoïétiques expriment JAM-C à leur surface

Commentaire soumis à Blood Advances en réponse à l'article « Junctional Adhesion Molecule 2 represents a subset of hematopoietic stem cells with enhanced potential for T lymphopoiesis » (Radulovic et al., 2019)

JAM-C/*Jam3* expression is primarily expressed in mouse hematopoietic stem cells.

Henry Elia[1-4], Barroca Vilma[1-4], Lopez K Cécile[6], Robert Elie[6], Aurrand-Lions Michel[7], Mercher Thomas[6], Lewandowski Daniel[1,3-5] and Arcangeli Marie-Laure[1-4,8].

1. Team Niche and Cancer in Hematopoiesis, U1274, INSERM, 18 route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France.
2. Laboratory of Hematopoietic Stem Cells and Leukemia/Service Stem Cells and Radiation /iRCM/JACOB/DRF, CEA, 18 route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France.
3. UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Université de Paris, CEA, 18 route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France.
4. UMR Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Université Paris-Saclay, CEA, 18 route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France.
5. Laboratory of Repair and transcription in Hematopoietic Stem Cells/Service Stem Cells and Radiation /iRCM/JACOB/DRF, CEA, 18 route du Panorama, 92260 Fontenay-aux-Roses, France.
6. INSERM U1170; équipe labélisée Ligue Nationale Contre le Cancer; Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France
7. Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, équipe labélisée Ligue Nationale Contre le Cancer, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille, France.
8. Lead contact and corresponding author

Corresponding author: Marie-Laure Arcangeli
Email: marie-laure.arcangeli@inserm.fr
Address: INSERM U1274-CEA-IRCM, 18 route du Panorama 92260 Fontenay-aux-Roses, France
Phone: +33 1 46547704

Number of Figures: 2

Introduction

In mouse, hematopoietic stem cells (HSC) and multipotent progenitors (MPP) are enriched in the cell population characterized by the Lin^{neg} $Sca1^{hi}$ Kit^{hi} (LSK) phenotype, which can be further divided using the SLAM markers CD150 and CD48[1,2]. LSK $CD150^{+}$ $CD48^{-}$ population is largely enriched in HSC while LSK $CD150^{+}$ $CD48^{+}$ and $CD150^{-}$ $CD48^{+}$ contain subsets of multipotent progenitor cells[1,3-5]. Several members of the junctional adhesion molecule (JAM) family[6,7] such as JAM-A, JAM4 and ESAM are expressed in mouse HSC[8-11]. Since one group did not detect its expression at the HSC cell surface[12], re-evaluation of the expression of the other member JAM-C is required. Importantly, a discrepancy between human and mouse *Jam3* and *Jam2* gene nomenclature may have generated confusion about which JAM protein was analyzed[6]. Following the current HUGO nomenclature that will be used here, mouse *Jam2* and *Jam3* encode respectively JAM-B and JAM-C. Several studies have shown that the preferential ligand of JAM-B is JAM-C[13,14]. Here, we assessed *Jam3*/JAM-C expression on mouse HSC using publicly available transcriptomic data together with experimental quantification by RT-PCR and flow cytometry using commercially available anti-JAM-C antibodies and the JAM-B recombinant soluble protein. Our analyses indicate that *Jam3* expression is mainly restricted to HSC in mouse.

Methods:

Mice:

C57BL/6 mice were housed in the pathogen-free animal facility of the iRCM-CEA. 6 to 8-week-old female mice were used. All experiments were performed in agreement with the French Guidelines for animal handling (Animal facility registration number A9203202) and were approved by the local ethical committee (#44).

Antibodies for flow cytometry:

The following antibodies used for flow cytometry and cell sorting were purchased from BD Bioscience, eBioscience or Biolegend: biotin anti-CD4, CD8, CD3, DX5, CD11C, CD19, B220, TER119, CD11B and Gr1 (Lineage cocktail), Streptavidin–PerCP-Cy5.5, Kit-BUV395 (clone 2B8), Sca1-PE-CF594 (clone D7), CD150-PE-Cy7 (clone TC15- 12F12.2), CD48-BV421 (clone HM48.1). The recombinant soluble forms of mouse JAM-B (sol-JAM-B) and ICOSL (ref# 988-VJ-50 and ref#158-B7-100, respectively all from Biotechne) were revealed with PE-goat-anti–human FC secondary antibodies (Biolegend). anti-JAM-C antibodies (clone 19H36 and 18F26) coupled to FITC were purchased from Thermofisher (ref #MA5-28230 and #MA5-28229 respectively).

Analysis of JAM-C expression and soluble form of JAM-B binding on hematopoietic progenitors:

BM cells were recovered and treated as previously described[15]. For staining with the recombinant soluble forms of JAM-B (sol-JAM-B) or ICOSL (irrelevant soluble protein, negative control), cells were incubated at 4°C for 30 minutes with 1 µg/mL of recombinant soluble molecules in the presence of normal goat serum. After a wash, cells were incubated with goat–anti-hFc secondary antibody coupled to PE for 30 minutes at 4°C. To analyze JAM-C surface expression, cells were incubated at 4°C for 30 min with 1µg/mL of either 19H36-FITC or 18F26-FITC antibodies or their control isotype in PBS 1X 1.25mM EDTA 2% FCS, then washed. In both cases, after wash, cells were incubated with cell surface antibodies as previously described[15].

Cell sorting:

BM cells were depleted using the direct lineage cell depletion kit (ref 130-111-470, Miltenyi Biotec) following manufacturer instructions. The remaining Lin^{neg} cells were stained with anti-c-KIT-APC, Sca1-PE, CD48-FITC and CD150-PE-Cy7. Lin^{neg} $Sca1^{+}$ KIT^{+} (LSK), LSK $CD48^{+}CD150^{-}$(MPP) and LSK $CD48^{+}CD150^{+}$ (LT-HSC) cell populations were purified by cell sorting using a FACS-INFLUX (BD Bioscience).

Analysis of public databases of Single cell RNAseq and RNAseq on the different LSK subsets.

Analysis of *Jam3* expression on RNA-Seq data generated by[1] and obtained in Gene expression omnibus (GEO) under accession number GSE52709. The heatmap was generated using http://shinyheatmap.com.

On the website http://blood.stemcells.cam.ac.uk/single_cell_atlas.html *Jam3* expression can be followed at the single cell level[16].

Jam gene expression by RT-qPCR:

RNA was extracted from sorted cells using RNEasy Plus Micro Kits (Qiagen) according to manufacturer instructions. cDNA was obtained by reverse transcription using Superscript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen). Real-Time Quantitative PCR was performed using power SYBR-Green I Master Mix (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) and 0.5 µM of forward and reverse primers (Eurogentech) in a StepOne System (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). Primer sequences for *Jam3*: forward GAACTCGGAGACAGGCACTC, reverse CAACAAGGACTCCCCCAATA and primer sequences for *Jam2*: forward TAGTGGCTCCTGCTGTTCCT, reverse GGAGCTGGGTTTCCTTCTTT. Raw data were analyzed on the StepOne software. Obtained CT values were normalized to housekeeping gene GAPDH CT values to give a relative gene expression. For a given gene, expression level for samples with undetermined CT values after 40 cycles is considered 0.

Statistical analysis:

Statistical analysis was performed with a 1-way ANOVA test using Prism Version 7 software (Graphpad Software Inc).

Results and Discussion

We first analyzed *Jam3* on publicly available transcriptomic data. First, we took advantage of transcriptome data on purified HSC and MPP cells produced by the Trumpp' lab (GSE52709)[1]. The analysis showed that *Jam3* was preferentially expressed in HSC and its expression decreased with hematopoietic differentiation along with *Jam2* and *Esam* gene expression (Figure 1A). *Jam3* expression in mouse HSC was also found in other microarray and RNA-Seq analyses[8,17,18]. Importantly, single cell transcriptomes generated by the Gottgens' lab (http://blood.stemcells.cam.ac.uk/single_cell_atlas.html)[16], confirmed that *Jam3* was expressed mainly by LT-HSC (blue, Figure 1B). *Jam2* was also detected in LT-HSC but at lesser extent (Figure 1B). To experimentally confirm expression pattern of *Jam3* in hematopoietic progenitors, LSK cell subsets were purified by cell sorting and *Jam3* expression was analyzed by quantitative RT-PCR. As shown in Figure 1C, *Jam3* was preferentially expressed in HSC and its expression decreased with hematopoietic differentiation. *Jam2* expression could also be detected in HSC (Figure 1D).

Then, to examine the expression of the JAM-C protein encoded by *Jam3*, we performed flow cytometry analyses on LSK cell subsets using two different commercially available antibodies (19H36 and 18F26). As shown in Figure 2A-B, JAM-C was expressed mainly in HSC (blue) and its cell surface expression decreased with HSC differentiation toward MPP cells. The mean of fluorescence intensity (MFI) compared to the one of isotype control (ratio of fluorescence intensity: RFI) was analyzed in each LSK cell subsets (Figure 2C). The highest RFI was found in HSC for both used antibodies. These results further support the reports of JAM-C protein expression on HSC by two independent teams using the same antibodies[4,8] and by us and others using two different homemade rabbit-polyclonal antibodies[15,19]. Finally, JAM-C expression can also be monitored by the binding of a recombinant soluble form of JAM-B (sol-JAM-B) to the extracellular part of the JAM-C protein in a specific manner since this binding is not detected on JAM-C KO cells[15]. Sol-JAM-B binding was detected in > 80% of HSC and the frequency of sol-JAM-B^{+} cells decreased with the hematopoietic differentiation (Figure 2D). Therefore, the expression pattern of JAM-C at cell surface correlates with the *Jam3* gene expression pattern. Notably, both transcriptome and cell surface expression analyses indicate that *Jam3/*JAM-C expression is down-regulated when HSC are mobilized by G-CSF and cyclosphosphamide[18,20].

Altogether, our analyses using publicly available expression data and original experimental approaches[4,8,15,19] demonstrate that JAM-C is mainly expressed by HSC and that its expression correlate with their stem potential and self-renewal properties (Figure 2E). This is important since JAM-C, expressed by HSC, was shown to be involved in HSC maintenance into the BM[15]. Moreover, JAM-C is required for the homing and engraftment potential of HSC in the BM, as well[20]. Finally, interfering with JAM-C/JAM-B interaction by the mean of an anti-JAM-C antibody induces HSC mobilization, this process being enhanced when anti-JAM-C antibody is used in combination with plerixafor[20].

References

1. Cabezas-Wallscheid N, Klimmeck D, Hansson J, et al. Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis. *Cell Stem Cell*. 2014;15(4):507-522.
2. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109-1121.
3. Cabezas-Wallscheid N, Buettner F, Sommerkamp P, et al. Vitamin A-Retinoic Acid Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Dormancy. *Cell*. 2017;169(5):807-823 e819.
4. Morita Y, Ema H, Nakauchi H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med*. 2010;207(6):1173-1182.
5. Pietras EM, Reynaud D, Kang YA, et al. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell*. 2015;17(1):35-46.
6. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*. 2003;24(6):327-334.
7. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):467-477.
8. Forsberg EC, Prohaska SS, Katzman S, Heffner GC, Stuart JM, Weissman IL. Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS Genet*. 2005;1(3):e28.
9. Nagamatsu G, Ohmura M, Mizukami T, et al. A CTX family cell adhesion molecule, JAM4, is expressed in stem cell and progenitor cell populations of both male germ cell and hematopoietic cell lineages. *Mol Cell Biol*. 2006;26(22):8498-8506.
10. Sugano Y, Takeuchi M, Hirata A, et al. Junctional adhesion molecule-A, JAM-A, is a novel cell-surface marker for long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood*. 2008;111(3):1167-1172.
11. Yokota T, Oritani K, Butz S, et al. The endothelial antigen ESAM marks primitive hematopoietic progenitors throughout life in mice. *Blood*. 2009;113(13):2914-2923.
12. Radulovic V, van der Garde M, Koide S, et al. Junctional Adhesion Molecule 2 Represents a Subset of Hematopoietic Stem Cells with Enhanced Potential for T Lymphopoiesis. *Cell Rep*. 2019;27(10):2826-2836 e2825.
13. Cunningham SA, Rodriguez JM, Arrate MP, Tran TM, Brock TA. JAM2 interacts with alpha4beta1. Facilitation by JAM3. *J Biol Chem*. 2002;277(31):27589-27592.
14. Lamagna C, Meda P, Mandicourt G, et al. Dual interaction of JAM-C with JAM-B and alpha(M)beta2 integrin: function in junctional complexes and leukocyte adhesion. *Mol Biol Cell*. 2005;16(10):4992-5003.
15. Arcangeli ML, Frontera V, Bardin F, et al. JAM-B regulates maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *Blood*. 2011;118(17):4609-4619.

16. Nestorowa S, Hamey FK, Pijuan Sala B, et al. A single-cell resolution map of mouse hematopoietic stem and progenitor cell differentiation. *Blood*. 2016;128(8):e20-31.
17. Balzano M, De Grandis M, Vu Manh TP, et al. Nidogen-1 Contributes to the Interaction Network Involved in Pro-B Cell Retention in the Peri-sinusoidal Hematopoietic Stem Cell Niche. *Cell Rep*. 2019;26(12):3257-3271 e3258.
18. Forsberg EC, Passegue E, Prohaska SS, et al. Molecular signatures of quiescent, mobilized and leukemia-initiating hematopoietic stem cells. *PLoS One*. 2010;5(1):e8785.
19. Praetor A, McBride JM, Chiu H, et al. Genetic deletion of JAM-C reveals a role in myeloid progenitor generation. *Blood*. 2009;113(9):1919-1928.
20. Arcangeli ML, Bardin F, Frontera V, et al. Function of Jam-B/Jam-C interaction in homing and mobilization of human and mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*. 2014;32(4):1043-1054.

Contribution

EH, VB, MLA designed and performed experiments. EH and MLA analysed data. CKL analysed RNA-Seq data from the Trumpp's lab, and ER helped analysing single cell RNA-Seq from Gottgens'Lab. MAL and TM corrected the manuscript. MLA and DL wrote the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported partly by grants from INSERM. EH is a fellow of Ligue Nationale contre le Cancer. TM lab is supported by the Ligue Nationale contre le Cancer. We would like to thank F. Pflumio and P-H. Roméo for critical reading of the manuscript and valuable advice.

Disclosure of conflict of interest

No conflict of interest to declare

Figure legend

Figure 1: *Jam3* and *Jam2* gene expression pattern in hematopoietic stem and progenitor cells.

(A) Heatmap generated from RNASeq data from[1] and using the website http://shinyheatmap.com. (B) Dotplots representing, at single cell level, the different clusters corresponding to the different LSK subsets (left) and the expression of *Jam3* and *Jam2* in these different clusters[16] and http://blood.stemcells.cam.ac.uk/single_cell_atlas.html. (C) *Jam3* gene expression coding the JAM-C protein in different LSK cell subsets (4 independent experiments). (D) Comparison of *Jam3* and *Jam2* gene expression in HSC cells. *Jam2* gene codes the JAM-B protein (4 independent experiments).

Figure 2: JAM-C is preferentially expressed on HSC within the LSK cell compartment.

JAM-C surface expression was examined on total LSK cells (black) and on different LSK cell subsets. SLAM-HSC (Red) are LSK CD150^{+} CD48^{-}, MPP2 cells (dark blue) are LSK CD150^{+} CD48^{+} and MPP3-4 cells (light blue) cells are LSK CD150^{-} CD48^{+2} (A) Representative FACS Histograms showing JAM-C expression using 19H36 (left) or 18F26 (center) antibodies on different LSK cell subsets. Dark line

represent signals obtained with isotype control. (B) Recapitulation for 6 independent mice showing the % of JAM-C expressing cells in LSK cell population 3 mice using 19H36 antibody (left) and 3 using 18F26 antibody (right). (C) Ratio of mean fluorescence intensities (RFI) are calculated by the mean fluorescence intensity (MFI) of anti-JAM-C antibodies divided by the MFI of the control isotype. RFI for 19H36 (left) and 18F26 (right) in LSK cells and LSK cells subsets. (D) Representative FACS histograms showing the binding of recombinant soluble JAM-B compared to irrelevant soluble protein (dark line) on LSK cells (left) or on the different LSK cell subsets (center). Right recapitulation for 6 independent mice showing soluble JAM-B binding on LSK cells and LSK cell populations. (E) Schema representing JAM-C expression on the different LSK cells in correlation with their self-renewal potential and with their state of differentiation and cell cycle state.

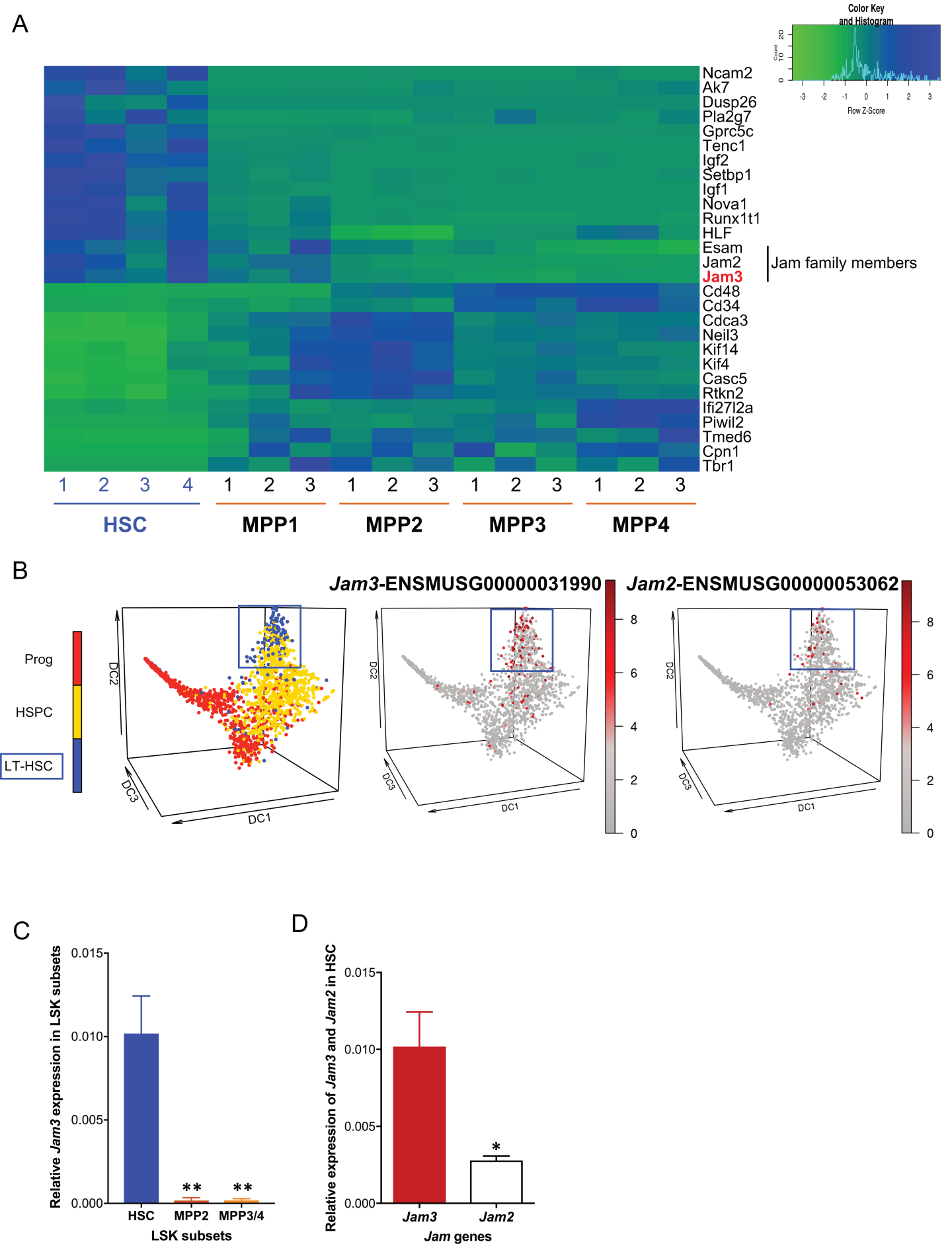
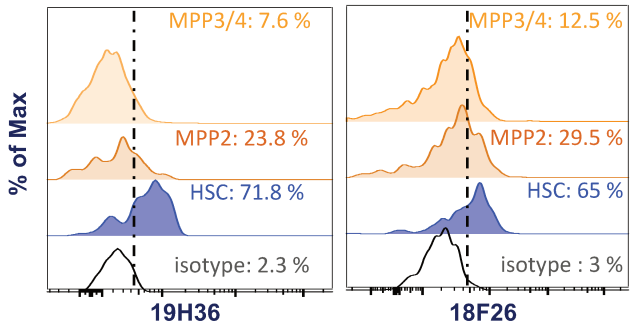
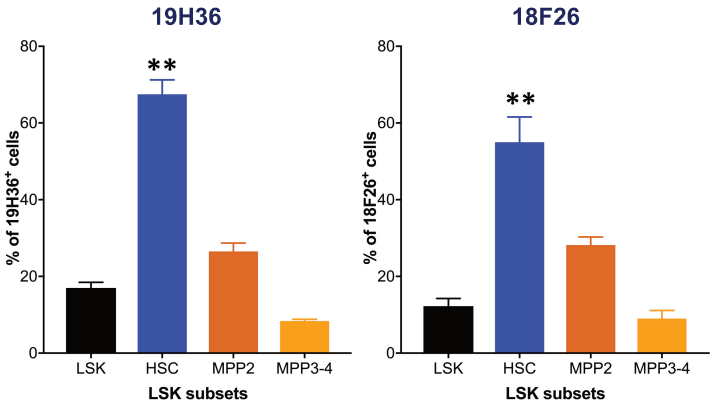

A
Color Key and Histogram
Count
Row Z-Score
Ncam2
Ak7
Dusp26
Pla2g7
Gprc5c
Tenc1
Igf2
Setbp1
Igf1
Nova1
Runx1t1
HLF
Esam
Jam2
Jam3
Jam family members
Cd48
Cd34
Cdca3
Neil3
Kif14
Kif4
Casc5
Rtkn2
Ifi27l2a
Piwil2
Tmed6
Cpn1
Tbr1
HSC
MPP1
MPP2
MPP3
MPP4
B
Jam3-ENSMUSG00000031990
Jam2-ENSMUSG00000053062
Prog
HSPC
LT-HSC
DC1
DC2
DC3
C
Relative Jam3 expression in LSK subsets
HSC
MPP2
MPP3/4
LSK subsets
D
Relative expression of Jam3 and Jam2 in HSC
Jam3
Jam2
Jam genes

Figure 1

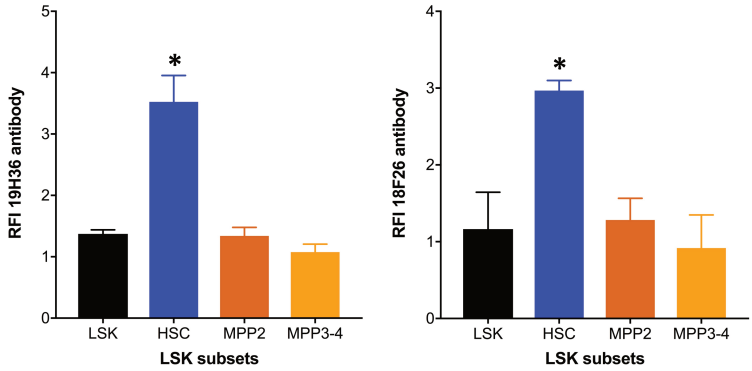
A



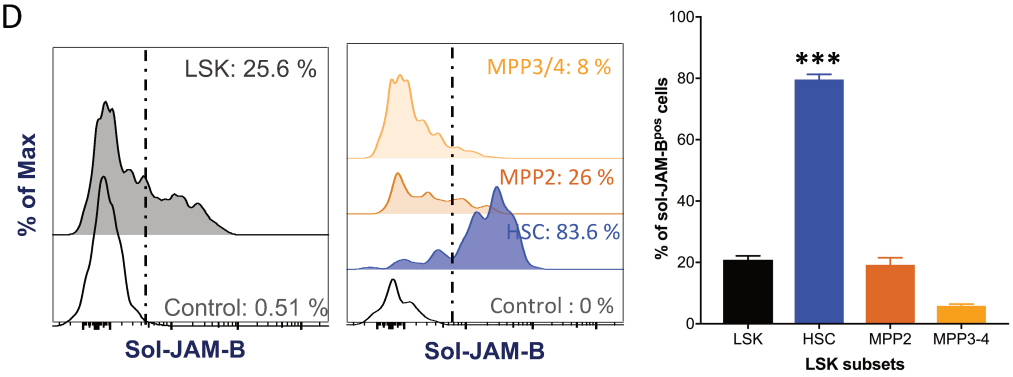
B



C



D



E

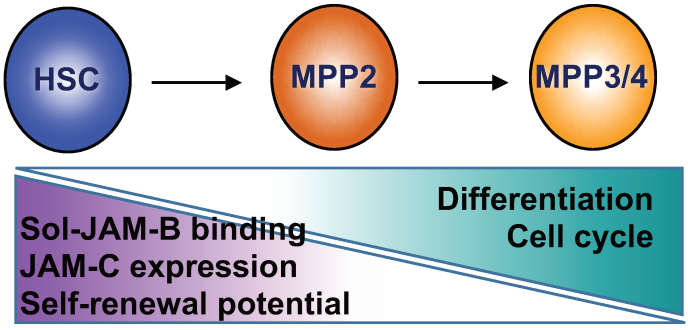


Figure 2

Résumé

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont garantes de l'homéostasie du système hématopoïétique tout au long de notre vie. Leurs propriétés essentielles de multipotence, quiescence et auto-renouvèlement sont finement régulées par un ensemble de facteurs, à la fois intrinsèques et liés à leur microenvironnement. Parmi ces facteurs, le taux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est crucial pour le maintien des propriétés des CSH, une augmentation de ROS étant associée à une différenciation des cellules voire à leur sénescence. De nombreux stress induisent une augmentation du taux de ROS. Dans ce travail, nous avons étudié le rôle des ROS sur les CSH humaines selon deux approches.

Tout d'abord, nous avons caractérisé l'impact de faibles doses de radiations ionisantes sur les CSH. Celles-ci, contrairement aux fortes doses, n'induisent pas de dommages immédiats de type cassures double-brin et apoptose, mais diminuent drastiquement les capacités de clonogénicité *in vitro* et de reconstitution hématopoïétique après transplantation secondaires. Nous avons montré que ces effets sont dus à une augmentation transitoire des ROS et à une activation de la voie p38MAPK. De plus, il est possible de restaurer les capacités fonctionnelles des CSH par un traitement antioxydant ou par un inhibiteur de la voie p38MAPK.

Par ailleurs, les CSH sont d'une utilité clinique majeure pour la thérapie cellulaire et génique. Dans ce cadre, les étapes de transduction virale et les tentatives d'expansion du nombre de CSH se font dans des milieux enrichis en cytokines qui favorisent la différenciation, en partie via une augmentation des ROS. Ainsi, nous avons étudié la faisabilité d'un traitement antioxydant pour limiter ces effets. Nous avons démontré que dès deux jours de culture, la signalisation liée à une augmentation du taux ROS est déjà activée. Nous avons également observé une amélioration significative des capacités fonctionnelles des CSH traitées avec des antioxydants, via une diminution de l'activité métabolique et de l'activation de p38MAPK.

L'ensemble de ces résultats pourra amener à des améliorations des protocoles cliniques existant, à la fois dans le cadre de la prévention des effets des faibles doses de radiations ionisantes (imagerie médicale, radiothérapie…) mais aussi de la thérapie génique et cellulaire, afin de préserver au mieux les propriétés fondamentales des CSH.

Mots-clés : cellules souches hématopoïétiques ; espèce réactives de l'oxygène ; antioxydants ; faible dose d'irradiation ; culture *ex vivo* ; thérapie cellulaire et génique ; p38MAPK

Abstract

Hematopoietic stem cells (HSC) are warrant of the hematopoietic system homeostasis throughout our life. Their essential properties of multipotency, quiescence and self-renewal are tightly regulated by different factors, both intrinsic and due to their mictoenvironment. This includes the level of reactive oxygen species (ROS) level, which is crucial for the maintenance of HSC core properties. An increase in the ROS level is indeed associated to cell differentiation and even to their senescence. Many stress signals can induce a ROS increase. In this work, we have studied ROS impact on human HSC following two different approaches.

First, we have characterized the impact of low doses of ionizing radiations (LDIR) on HSC. LDIR, contrary to high doses, do not induce immediate damages such as DNA double-strand breaks or apoptosis, but drastically decrease *in vitro* clonogenic and *in vivo* hematopoietic reconstitution capacities in secondary replating or transplantation. We showed that these effects were due to a transient increase in ROS levels and p38MAPK activation. In addition, a rescue of HSC functional capacities is possible by a treatment with an antioxidant or with a p38MAPK inhibitor.

Furthermore, HSC use in clinical cell and gene therapy is major. In this context, viral transduction and expansion trials require cytokine-enriched media that favor differentiation, in part by a ROS increase. We studied the feasibility of an antioxidant treatment to circumvent this. We demonstrated that after only two days of culture, oxidative stress signaling was already activated. We observed a significative enhancement of functional capacities of antioxidant-treated HSC, via metabolic activity and p38MAPK activation decrease.

Overall, these results could lead to improvements in clinical protocols, both in the prevention of LDIR effects due to medical imaging or radiotherapy for instance; and in cell and gene theray, in order to better preserve HSC fundamental properties.

Keywords : hematopoietic stem cells ; reactive oxygen species ; antioxydants ; low dose of irradiation ; *ex vivo* culture ; gene and cell therapy ; p38MAPK