



**UNIVERSITÉ
D'ORLÉANS**



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES
LABORATOIRE Gamétogenèse Apoptose et Génotoxicité

THÈSE présentée par :

Vilma BARROCA

soutenue le : **8 Juillet 2009**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : **Biologie**

**Renouvellement des cellules souches :
plasticité des progéniteurs germinaux et rôle
du gène *Fancg* dans la fonction des cellules
souches hématopoïétiques**

THÈSE dirigée par :

Mme Valérie Quesniaux
Mr Pierre FOUCHET

Directeur de recherche, CNRS - Orléans
Chargé de recherche, CEA - Fontenay-aux-Roses

RAPPORTEURS :

Mr Filippo ROSSELLI
Mr Dominique ROYERE

Directeur de recherche, CNRS, IGR - Villejuif
Professeur Associé, praticien hospitalier, Université Tours

JURY

Mr Daniel LOCKER
Mr Jean-Paul LOUIS
Mme Chrystèle RACINE
Mr Jean SOULIER

Professeur des universités, CNRS Orléans. Président du jury
Docteur d'Etat, CNRS - Orléans
Maître de conférences, Paris VII – CEA Fontenay-aux-Roses
Professeur Associé, praticien hospitalier, Université Paris 10

REMERCIEMENTS

Je tenais tout d'abord à remercier M. Filippo Raselli et M. Dominique ROTERE d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon mémoire, ainsi que M. Jean SAILIER et M^{me} Chrystèle RACINE d'avoir accepté d'être les examinateurs. Mais aussi M. Daniel LOCKER d'avoir accepté de présider le jury. Je tenais à vous remercier pour le temps précieux que vous m'avez accordé.

Sans oublier M. Jean-Paul LOUIS, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Je vous souhaite une bonne et heureuse retraite. Ainsi que Pierre FOUCHET. Un grand merci à mes deux directeurs de thèse.

Voici la partie que tout le monde attend et lit avec impatience. J'ai été heureuse et ravi de faire ma thèse ici, ça aura été une bonne expérience. Je remercie l'ensemble du bât 05 où j'aurai passé 4 ans et demi de ma vie (et oui le demi est important). J'ai rencontré plein de gens super et je vous souhaite à tous pleins de réussites personnelles et professionnelles.



Un grand merci au rez-de-chaussée :

A Isabelle, sans qui rien de tout ça n'aurait été possible. Merci, merci pour ton soutien de tous les instants, pour tes encouragements et un énorme merci pour ton aide lors de ma rédaction. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite, une grande réussite.

A Chrytèle et Evelyne : "une équipe de choc". Tout d'abord, merci pour tous les coups de main, vos précieux conseils et surtout pour vos encouragements. Et pour Chrytèle, merci d'avoir accepté d'être mon examinatrice. Et Evelyne je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite, tu l'as bien méritée.

A Stéphanie : pour nos discussions du matin et des jours fériés ; mais aussi et surtout pour tes précieux conseils et ta grande aide lors de la rédaction de ma thèse ; un énorme merci. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite : une grande réussite dans tous les domaines.



Un grand merci aussi à "boulet" ou encore "tu fais quoi??" ou de son vrai prénom Jean-Philippe. Merci pour tes tours de magie, le charme, le conseil : et oui grand magicien et imitateur dans l'âme. Déblé pour les fois où je t'ai envoyé boulet. Alors tu vas y aller ??? Dans l'écriture de la thèse?? Si oui, je te souhaite une grande réussite et pleins de bonheur.

Je tenais à remercier mon chef, Pierre, qui m'a supporté pendant 2 ans. Et oui tu es en vacances, sa y est je vais te laisser tranquille !!!
Obais aussi Bruno et Lydie, ainsi que Virginie

Aurélien, merci pour ton aide administrative et pour tout le reste

Un immense merci à Jean-Baptiste, mon camarade de bureau. J'espère que je n'ai pas été trop dur à supporter pendant ma rédaction de thèse!!!

Un grand merci à Ali allez t'inquiète pour le prochain sur la liste c'est toi. Je te souhaite plein de bonnes choses et beaucoup de courage pour la dernière ligne droite. Au fait désolé de t'avoir baissé ton score au jeu de boules!!!

Merci à Sébastien dit M. Histologie, merci pour ton soutien et les conseils. Mais je tenais aussi à te remercier pour m'avoir accompagné à la Salsa et à la course à pied. Au fait tu t'y remet l'année prochaine??!!!

Et puis aussi Obathieu, qui a su m'aider dans mes choix. Dit donc 2009 est un bon œil pour toi!!! T'as cassé la baraque! Félicitations!!!

Un immense merci au rez-de-chaussée en général pour m'avoir supporté pendant ces 21 années et demi. Désolé pour le bruit parfois. Merci à Delphine, Catie, Nelly, Jacqueline, Clotilde, Benoît, Adrien, Gabriel, Ronan, Charlotte, Vincent

Mais aussi à François, qui vient se réfugier ici. Alors "il est tout malade le chéri pépère!!!" ça te rappelle quelque chose!!!

Et à Marc-André, pour ses précieux conseils.
Et au reste du LRP.

Un grand merci aux filles du 1^{er} étage: Sylvie, Marie-No, Catie et Kristell; pour vos conseils et vos encouragements.

Un grand merci à Flo. Plein de bonnes choses pour la suite et encore une fois Désolé de t'avoir oublié!!! Tu vas toujours toujours ma mie??!!! J'en veux toujours pas!!!

Je voulais aussi remercier Zahra et Béatrix du bâtiment 60 pour leur gentillesse

Un grand merci au 2^e étage, et plus particulièrement à Sophie avec notre hymne "des p'tites sœurs la la la la la" ou encore "t'as retrouvé les poches ??". Mais il y a aussi Dhanka, future championne de course; Nathalie, notre maman à toutes; Agnieszka, une future actrice; un super italien: le plus beau Fabio; Philippe, qui nous a abandonné mais heureux là où il est alors ça va!!!; le plus gentil et calme de tous: Julien; Daniel et les autres....

Un immense merci à Antoine de me laisser corrompre sa femme dans mes délire, et de ne pas trop m'en vouloir. N'oublie pas le déguisement!!!

Un grand merci à Paul-Henri Roméo pour son soutien (et de croire en moi!). Grand chef du 2^{ème} étage et de l'IRCM.

Sans oublier les deux nouveaux arrivant du 2^e Yannick & David, qui goûtent aux joies de la sœur.

Mais à cet étage il y a aussi Emilie, allez t'inquiète pas c'est bientôt fini....., Rachette: c'est qui la prochaine sur la liste..... c'est toi!!! Et mon nouveau camarade de course Fred, au fait on y va quel jour??!!!

Un énorme, immense merci à Vincent de m'avoir supporté pendant cette dure étape de rédaction, mais aussi de me supporter au quotidien!!!

Un merci aussi à Marie, que j'ai été ravi de rencontrer.

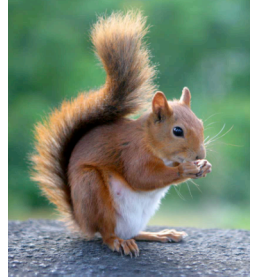
Je tenais aussi à dire merci à Aude et Sylviane pour gentillesse et leur soutien.

Un grand merci à Stéphane Prost (et oui tu vas y passer toi aussi!!!), Thibaut (bon rétablissement et puis tu as vu sa y est Bip Bip elle est docteur!!!) pour leur aide, sans oublier l'inénarrable chausson Francis!!!

Je tenais à dire un immense merci aux agents de la FZS, qui m'ont soutenu pendant les moments difficiles et m'ont permis de me changer les idées.

Un immense merci à mes 3 camarades de courses à pied:

Meumeu, mon écureuil peureux; **Flauro**, qui a son étiquette qui sort; et **Frank** dit Tub, le coach. Merci beaucoup pour ma demi-heure de détente.



Momo le mois de novembre est loin.... tu ne devais pas venir courir!!! Ah oui c'est vrai tu n'as pas précisée l'année!!!



Ludo ou plutôt Ludat l'eau il y en a qu'un; heureusement!!!) avec sa super tenue de sport!

Frank avec qui j'aime bien discuter **Dom**, son coéquipier de l'annexe

Caouète (je sais pas comment ça s'écrit) et son "fauvage de Dinde; qu'est-ce-qu'on a rigolé!!!"



Faut pas oublié leur chef **Alain**; DS, Dauville ça le rappelle quelque chose, il y a aussi baskettes, short ??? Tu connaissais!!!!



Et puis **Dudu** et **Stéphane**



Un grand merci à **Nanaud**, mon fidèle compagnon de course à pied; merci pour ton soutien et tes conseils.

Un grand merci à **Dédé** pour sa bonne humeur et ses encouragements

Un grand merci à **Sébastien** dit "le beau Séb", pour ses encouragements et sa présence et son soutien.

Ainsi qu'à Hubert, au fait tu as retrouvé tes baskets car
il me semble que tu dois venir..... faut te préparé pour le mois
d'Août..... !!!

J'ai aussi à Christophe (T'aime pas les bonbons !!!), Philippe
(encore désolé pour le PTI!!!), Bruno, Tim, Paul et Bruno

Un grand merci à Pascal pour ces conseils lecture et nos
conversations. Ainsi qu'à Stéphane, Jérôme, Salvador et le
plus beau Alain (Alors mon tour de voiture ??!!)

Un grand merci à Fabrice, et désolé pour l'autre fois,
c'était pas contre toi mais aussi à Jo et Didier

Je tenais aussi à remercier l'équipe de l'animaterie qui
nous donne un sacré coup de main : Véronique, Sarah, Claire
(qui est partie), Julien, Stéphanie et Diana. Et sans oublier
leu chef Christophe.

Et aussi à Luis et Bruno, leu 2 coéquipier.

J'espère que je n'ai oublié personne. Sinon, j'en suis
vraiment désolé. Un grand merci à tous ceux qui m'ont
aidé de près ou de loin. Je vous souhaite à tous plein
de bonnes choses dans votre travail et votre vie privée.

{ P.S: Désolé si vous trouvez des fautes d'orthographe mais mon
stylo n'a pas de correcteur inclus et l'orthographe et moi on
est fâché depuis longtemps! }

Abréviations

AF : Anémie de Fanconi
AGM : Aorte Gonades Mésonéphros
A_{int} : Spermatogonies Intermédiaire
A_{al} : Spermatogonies A aligned
A_{pr} : Spermatogonies A paired
A_s : Spermatogonies single
ATM : Ataxia telangiectasia mutated
ATR : Ataxia-Telangiectasia Related
Bclb6 : B cellCLL/lymphoma 6
BER : Réparation par Excision de Base
BHT : Barrière Hémato Testiculaire
CAR : CXCL12-abundant reticular cell
Cdc42 : cell division cycle 42
CFC : Colony-Forming Cells
CFU : Unité Formant Colonies
CMH-I : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de Classe I
CGP : Cellule Germinale Primordiale
CSF-1 : Colony Stimulating Factor 1
CSG : Cellule Souche Germinale
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
CXCR4 : Chemokine (C-X-C motif) Receptor 4
CXCL12 : Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12
EGF : epidermal growth factor
EGFP : Enhanced Green Fluorescent Proteins
ERM : ETS-Related Molecule
ETS : E-twenty-six Transcription Factor
Etv5 : Ets variant gene 5, Erm
βFGF : beta Fibroblast growth factor
GATA-2 : GATA binding protein 2
G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GDNF : Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
GEMM : Granuleuse, Erythrocytaire, Macrophage, Mégacaryocytaire
Gfi-1 : Growth Factor Independent 1
GFR-α1 : GDNF family receptor-α1

GPR125 : type-G-Protein-coupled Receptor
GSTP1 : Glutathione-S-Transférase
Gy : gray
Ho : Hoechst 33342
HoxB4 : homeobox B4
INF- γ : Interféron- γ
Ig : ImmunoGlobuline
iPS : induced pluripotent stem cells
LEF1 : Lymphoïde Enhancer binding Factor 1
Lhx1 : Lim homeobox protein 1
LIF : Leukemia inhibitory factor
Lin- : Fraction négative pour les lignages hématopoïétiques
LMPP : progéniteurs multipotents lymphoïdes
LT-CSH : Long Terme Cellules Souches Hématopoïétiques
M-CSFR : Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor
mGSC : Cellules Souches Germinales multipotentes
maGSC: Cellules Souches Germinales multipotentes adultes
MMC : Mitomycine C
MMR : MisMatch Repair
NAC : N-acéty-cystéine
NER : Réparation par Excision de Nucléotide
NF- γ B : Nuclear Factor-Kappa B
NHEJ : Non Homologous End-Joining
Ngn3 : Neurogenin 3
Oct4 : Octamer-4
PCL : progéniteurs communs lymphoïdes
Plzf : Promyelotic Leukemia Zinc-Finger
PMP : progéniteurs multipotents
PRDX3 : pioredoxine-3
RED : NADPH cytochrome-P450 Reductase Sca-1
ROS : espèces Réactives de l'Oxygène
Sca-1 : Stem cell Antigen1
SCF : Stem Cell Factor
SDF-1 : Stromal-Derived Factor 1
SFK : voie des kinases de la famille Src
shRNA : Short-Hairpin RNA
SOD : Cu/Zn Supéroxyde Dismutase

SOP : Phenotype Sertoli-only

Sox3 : Sry-related HMG box

SP : Side Population

ST-CSH : Short Terme Cellules Souches Hématopoïétiques

Stra8 : Stimulated by Retinoïc Acid gene 8

Taf4b : TBP-Associated Factors

TCF : T Cell specific Factor

TEL : Translocation-ETS-Leukemia

TGF- β : Transforming growth factor beta

TLS : Trans Lesion Synthesis

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

Trx : Thiorédoxine

Upd : Unpaired

VLA6 : Very Late Activation Antigen

W/W^v : locus W dominant White Spotting

SOMMAIRE

A- PREAMBULE.....	3
B- INTRODUCTION	5
B-I LES CELLULES SOUCHES.....	5
B-I.1 L'hématopoïèse et la spermatogenèse	5
B-I.1.1 L'hématopoïèse	5
B-I.1.1.1 L'origine de l'hématopoïèse	5
B-I.1.1.2 L'hématopoïèse adulte	6
B-I.1.2 La spermatogenèse.....	6
B-I.1.2.1 L'origine de la spermatogenèse	7
B-I.1.2.2 La spermatogenèse	7
B-I.2 Les grandes caractéristiques des cellules souches.....	9
B-I.2.1 L'auto-renouvellement et l'entrée en différenciation.....	9
B-I.2.2 La notion de niche	10
B-I.3 Les niches hématopoïétiques et germinales	11
B-I.3.1 La niche hématopoïétique	11
B-I.3.2 La niche testiculaire.....	13
B-I.4 Caractérisation des cellules souches.....	16
B-I.4.1 Les CSH-Caractérisation phénotypique	16
B-I.4.1.1 La population LSK.....	17
B-I.4.1.2 Les progéniteurs multipotents ou ST-CSH	18
B-I.4.1.3 Les LT-CSH	18
B-I.4.2 Les CSG-Caractérisation phénotypique.....	19
B-I.4.3 Les Cellules souches hématopoïétiques - Caractérisation moléculaire.....	21
B-I.4.3.1 Les signaux autocrines et paracrines	21
B-I.4.3.2 Les facteurs de transcription	23
B-I.4.4 Les Cellules souches germinales - Caractérisation moléculaire.....	25
B-II LA PLASTICITE DES CELLULES SOUCHES	28
B-II.1 La plasticité des tissus adultes.....	29
B-II.2 Reprogrammation des CSG	29
B-II.3 Reprogrammation des progéniteurs germinaux	31
B-III L'AUTO-RENOUVELLEMENT DES CELLULES SOUCHES ET LES VOIES DE REPONSE AUX DOMMAGES A L'ADN	32
B-III.1 Altération des voies de réponse aux dommages de l'ADN et atteinte du stock de cellules souches.....	32
B-III.1.1 Les protéines de transduction du signal.....	33

B-III.1.2 Quelques protéines effectrices de la réparation	34
B-III.2 Le modèle de la voie de l'Anémie de Fanconi	35
B-III.2.1 L'Anémie de Fanconi.....	35
B-III.2.2 Les modèles murins	36
B-III.3 Une maladie de la réparation : le complexe nucléaire et le recrutement de la recombinaison homologue	37
B-III.4 Les voies alternatives de régulation par la voie de l'Anémie de Fanconi	37
B-III.4.1 Le stress oxydatif.....	38
B-III.4.2 Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) et l'INF- γ (Interféron- γ)	39
B-III.4.3 Relation avec les CSH.....	40
B-III.4.3.1 Le stress oxydatif	40
B-III.4.3.2 Le TNF- α et l'IFN- γ	41
B-III.4.3.3 Mobilisation/logement des CSH AF.....	42
C- RESULTATS	44
C-I ARTICLE 1 : DEDIFFERENCIATION DES PROGENITEURS GERMINAUX EN CELLULE SOUCHE.....	44
C-I.1 Introduction.....	44
C-I.2 Article 1 : Dédifférenciation des progéniteurs germinaux en cellules souches germinales	46
C-I.3 Conclusion.....	54
C-II ARTICLE 2 : ROLE DU GENE FANCG DANS LA FONCTIONNALITE DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES	57
C-II.1 Introduction.....	58
C-II.2 Article 2 : Impaired quiescence, migration and engraftment of hematopoietic stem cells and progenitors in Fanconi anemia-type G deficient mice	60
C-II.3 Conclusion.....	87
D- DISCUSSION	90
E- ANNEXE I : LA TRANSPLANTATION.....	97
E-I LA TRANSPLANTATION DE CSH	97
E-II LA TRANSPLANTATION DE CSG	97
F- BIBLIOGRAPHIE	99

A- Préambule

Dans un tissu normal, la balance entre la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire assure le maintien des fonctions de ce tissu. Cet équilibre est maintenu grâce à une population de cellules, appelée cellules souches, dont la fréquence est rare dans le tissu. Ces cellules souches possèdent une capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en cellules progénitrices qui aboutit à la production de cellules matures et fonctionnelles, assurant ainsi le remplacement des cellules en fin de vie (vieillesse). De plus, les cellules souches sont mobilisées rapidement pour régénérer le tissu endommagé en cas de stress (choc thermique) ou de lésions induites (par des agents génotoxiques comme l'irradiation) entraînant une perte massive de cellules progénitrices. Ces cellules doivent également maintenir leur intégrité génétique car toute mutation dans ces cellules peut avoir des conséquences plus importantes en comparaison à une mutation touchant des cellules matures (cancérisation, diminution de l'auto-renouvellement...). Ce maintien de la stabilité génomique est d'autant plus primordial pour les cellules souches germinales car elles sont responsables du maintien de l'intégrité et du transfert des informations génétiques à la descendance. L'absence de correction des lésions de l'ADN des cellules souches germinales induit des mutations dans le génome de la descendance et pourrait avoir une incidence sur l'occurrence de maladies génétiques chez les descendants.

La maîtrise des cellules souches offrirait ainsi la possibilité d'une source « infinie » de cellules capables de régénérer des tissus mal formés, endommagés ou simplement sénescents. L'étude de ces cellules présente donc un intérêt médical majeur et explique l'essor de ce domaine de recherche ces dernières années. Comprendre les mécanismes de renouvellement des cellules souches dans le tissu est primordial pour des applications futures. Le mécanisme principal, par lequel le stock de cellules souches se maintient, est l'auto-renouvellement des cellules souches. Cependant des études récentes dans le tissu germinale de *Drosophila* soulignent la possibilité pour des progéniteurs, descendants des cellules souches, de réacquérir le potentiel d'autorenouvellement et de régénération à long terme des cellules souches (Brawley and Matunis, 2004 ; Kai and Spradling, 2004). Il était jusqu'alors couramment admis que ces progéniteurs perdaient cette capacité. Ces nouvelles données amenaient donc à l'hypothèse d'une coexistence potentielle de ces deux mécanismes, l'autorenouvellement et la reprogrammation des progéniteurs, afin de maintenir le pool de cellules souches au sein des tissus chez les mammifères.

La problématique de cette thèse porte sur l'étude de ces deux mécanismes de régénération des cellules souches dans le modèle murin. Dans une première partie de mon travail, j'ai cherché à savoir si le mécanisme de reprogrammation des progéniteurs en cellules souches pouvait participer au renouvellement ces cellules souches dans le lignage germinale mâle chez les mammifères. Dans une seconde partie, j'ai étudié le rôle du gène *Fancg* de la voie de l'Anémie de Fanconi dans l'auto-renouvellement des cellules souches dans le lignage hématopoïétique, cette voie étant impliquée dans le contrôle de l'intégrité génétique *via* son interaction avec les mécanismes de réparation de l'ADN.

Nous avons choisi ce modèle d'étude car le phénotype d'aplasie médullaire et les problèmes de fertilité liés à une déplétion des cellules germinales rencontrés dans l'anémie de Fanconi évoquent un déficit fonctionnel des cellules souches hématopoïétiques et des cellules souches germinales. Un des nos objectifs à long terme est de déterminer si la voie Fanconi est une voie moléculaire impliquée dans la régulation des fonctions de différentes cellules souches, somatiques comme germinales. Certains mécanismes moléculaires seraient en effet partagés par les cellules souches de différents lignages cellulaires, et diverses études tendent à définir un réseau commun de voies moléculaires afin de caractériser les cellules souches.

Dans la partie bibliographique de ce manuscrit, je comparerai les propriétés et les capacités de régénération de deux processus de différenciation distincts : l'hématopoïèse et la spermatogenèse. Dans un premier temps, je développerai les caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques et germinales ainsi que leurs micro-environnements respectifs ; puis je m'intéressai aux trois processus qui permettent de conserver le pool de cellules souches qui sont, leur auto-renouvellement, leur plasticité ainsi que celle des progéniteurs les plus immatures. Enfin je présenterai la voie de l'Anémie de Fanconi.

B- Introduction

B-I Les cellules souches

Les cellules souches se développent dès le stade embryonnaire, où elles sont dites pluripotentes, car chacune d'entre elles est capable, d'une part de s'auto-renouveler afin de maintenir le pool, et d'autre part de se différencier dans les trois feuillets embryonnaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Au cours du développement de l'embryon, leur nombre et leurs potentialités se restreignent progressivement de sorte que chez l'adulte, elles sont peu nombreuses et dispersées dans l'organisme et ne peuvent produire qu'un seul type de cellules spécialisées pour un tissu donné.

B-I.1 L'hématopoïèse et la spermatogénèse

Ces deux processus ont lieu chacun dans des tissus dont la population cellulaire peut être divisée en quatre sous-populations selon leur état de maturation :

- ☞ les cellules souches,
- ☞ les progéniteurs,
- ☞ les précurseurs, cellules en cours de maturation, identifiables morphologiquement (taille, granulosité, noyau,...),
- ☞ les cellules matures qui signent un tissu fonctionnel.

B-I.1.1 L'hématopoïèse

L'hématopoïèse vient du grecque *haimatôpoiein*, d'après *poiein* « faire ». Ce processus permet à l'organisme de produire et de renouveler les éléments figurés du sang, c'est-à-dire les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. C'est l'un des exemples les plus remarquables, et probablement le mieux connu, de l'aptitude des organismes supérieurs à renouveler les différents tissus qui les composent.

B-I.1.1.1 L'origine de l'hématopoïèse

Contrairement au développement d'autres lignages, l'hématopoïèse embryonnaire et fœtale se déroule successivement dans plusieurs organes distincts, selon un calendrier précis.

Le premier tissu hématopoïétique est le sac vitellin embryonnaire, qui est actif entre le 7^{ème} et le 12^{ème} jour de gestation chez la souris. L'activité hématopoïétique est alors restreinte à une érythropoïèse primitive intense. Les premiers signes d'une hématopoïèse sont l'apparition d'îlots sanguins qui fusionnent en un réseau vasculaire qui se connecte aux vaisseaux sanguins intra-embryonnaires : une circulation est alors établie. Ensuite, la mise en place de l'hématopoïèse définitive se fait dans la région de l'AGM (de l'Aorte, des Gonades et du Mésonéphros). Les précurseurs de cette région possèdent une capacité de reconstitution à long terme et peuvent générer *in vitro* des cellules des compartiments myéloïdes, lymphoïdes et érythroïdes : c'est la génération des premières cellules souches hématopoïétiques définitives (Cumano *et al.*, 1996) (Sanchez *et al.*, 1996). Ensuite les

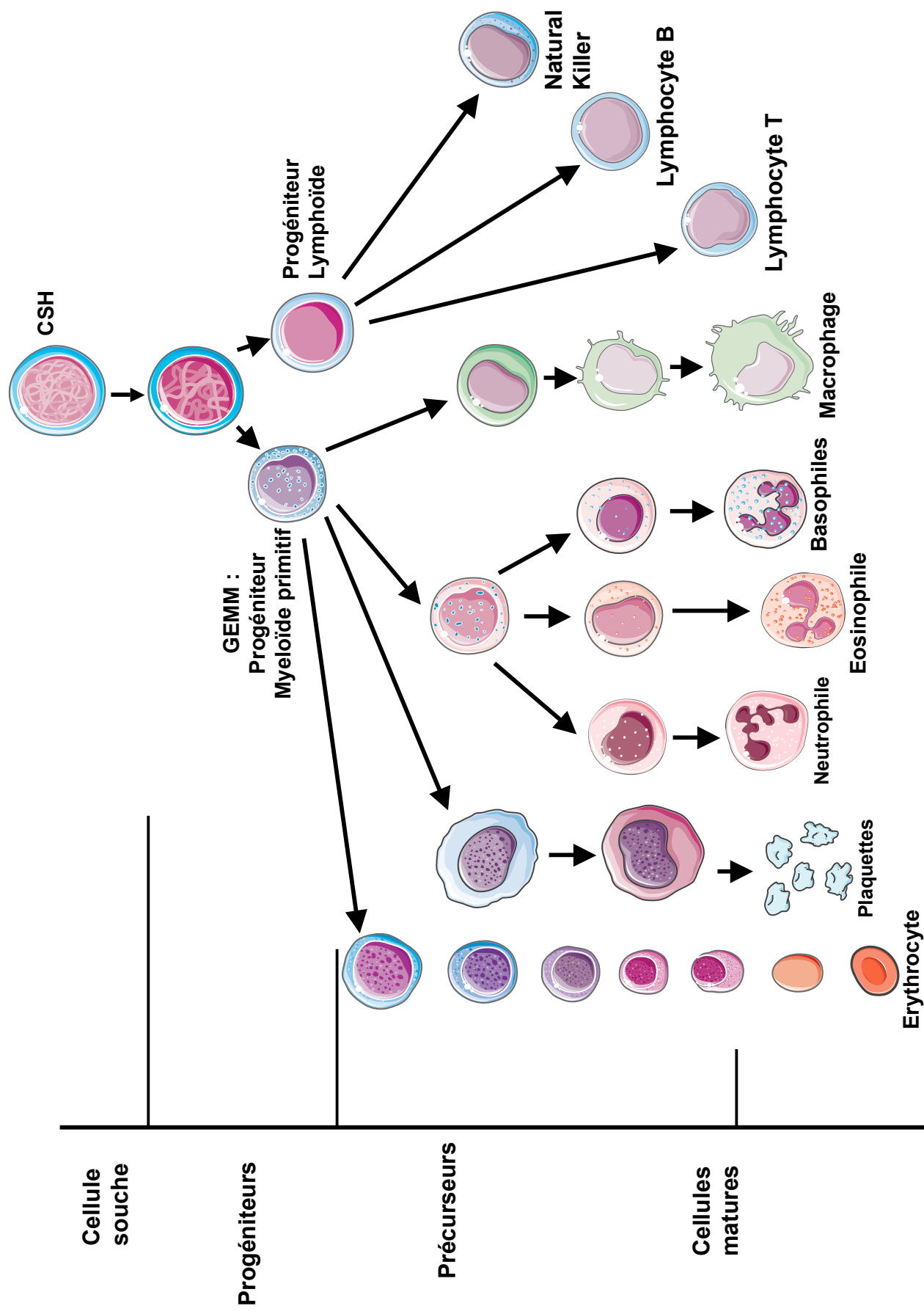


Figure 1 : L'hématopoïèse simplifiée (adapté de Metcalf, 2007)

cellules de l'AGM colonisent le foie (vers le 10^{ème} jour), où l'hématopoïèse est très active (vers les 12-14^{ème} jour) pour décroître à partir du 16^{ème} jour et s'arrêter complètement quelques semaines après la naissance. L'hématopoïèse hépatique est le siège d'une hématopoïèse myéloérythroïde dominante et d'une production de lymphocytes B. C'est à partir du 15^{ème} jour de gestation que les cellules hématopoïétiques gagnent la rate, et enfin vers le 16-17^{ème} jour, le potentiel hématopoïétique gagne la moelle osseuse qui sera tout au long de la vie de l'individu le siège de la production des cellules hématopoïétiques.

Toutefois, en cas de stress, l'hématopoïèse peut se déplacer dans la rate (Cock *et al.*, 2004).

B-I.1.1.2 L'hématopoïèse adulte

Chez l'adulte, toutes les cellules sanguines (lymphocytes, érythrocytes, polynucléaires, monocytes et plaquettes) sont produites à partir d'une même cellule indifférenciée dite cellule souche multipotente.

Sous l'influence de facteurs stimulants, une cellule multipotente va se différencier progressivement vers plusieurs lignages cellulaires. Cette cellule multipotente va se diviser en progéniteurs, eux-mêmes multipotents. Puis au fur et à mesure des divisions, ce progéniteur va devenir monopotent c'est-à-dire capable de générer un seul lignage. Ce dernier va se différencier en précurseurs (ce sont des cellules identifiables morphologiquement dans un prélèvement de moelle osseuse) qui vont subir des mitoses puis une étape de maturation pour aboutir à la production de cellules fonctionnelles qui passent dans le sang.

La cellule souche hématopoïétique (CSH) va s'orienter soit vers la lignée lymphoïde, soit vers la lignée myéloïde (Figure 1). Si cette dernière a reçu un stimulus lymphoïde, elle donnera soit des lymphocytes T ou B, soit des « Natural Killers » (NK). En revanche si elle reçoit un stimulus myéloïde, elle se différenciera en progéniteur myéloïde primitif, qui s'engagera soit dans la lignée mastocytaire pour aboutir à la formation de mastocytes, soit dans la lignée GEMM (Granuleuse, Erythrocytaire, Macrophage, Mégacaryocytaire) (Metcalf, 2007).

Le progéniteur GEMM (Progéniteur myéloïde primitif) se différencie dans quatre lignages différents afin de former la totalité des éléments figurés :

- ☞ Progéniteur Granuleux pour aboutir à la formation de granulocytes neutrophiles, éosinophiles
- ☞ Progéniteur Erythrocytaire pour aboutir à la formation d'érythrocytes
- ☞ Progéniteur Macrophagique pour aboutir à la formation de macrophages
- ☞ Progéniteur Mégacaryocytaire pour aboutir à la formation de plaquettes

B-I.1.2 La spermatogenèse

La gamétogenèse est le processus de différenciation des gamètes, durant lequel les cellules germinales subissent la méiose. Chez le mâle, ce processus, appelé spermatogenèse, aboutit à la formation de spermatozoïdes haploïdes. Après le tout premier cycle de spermatogenèse qui s'établit

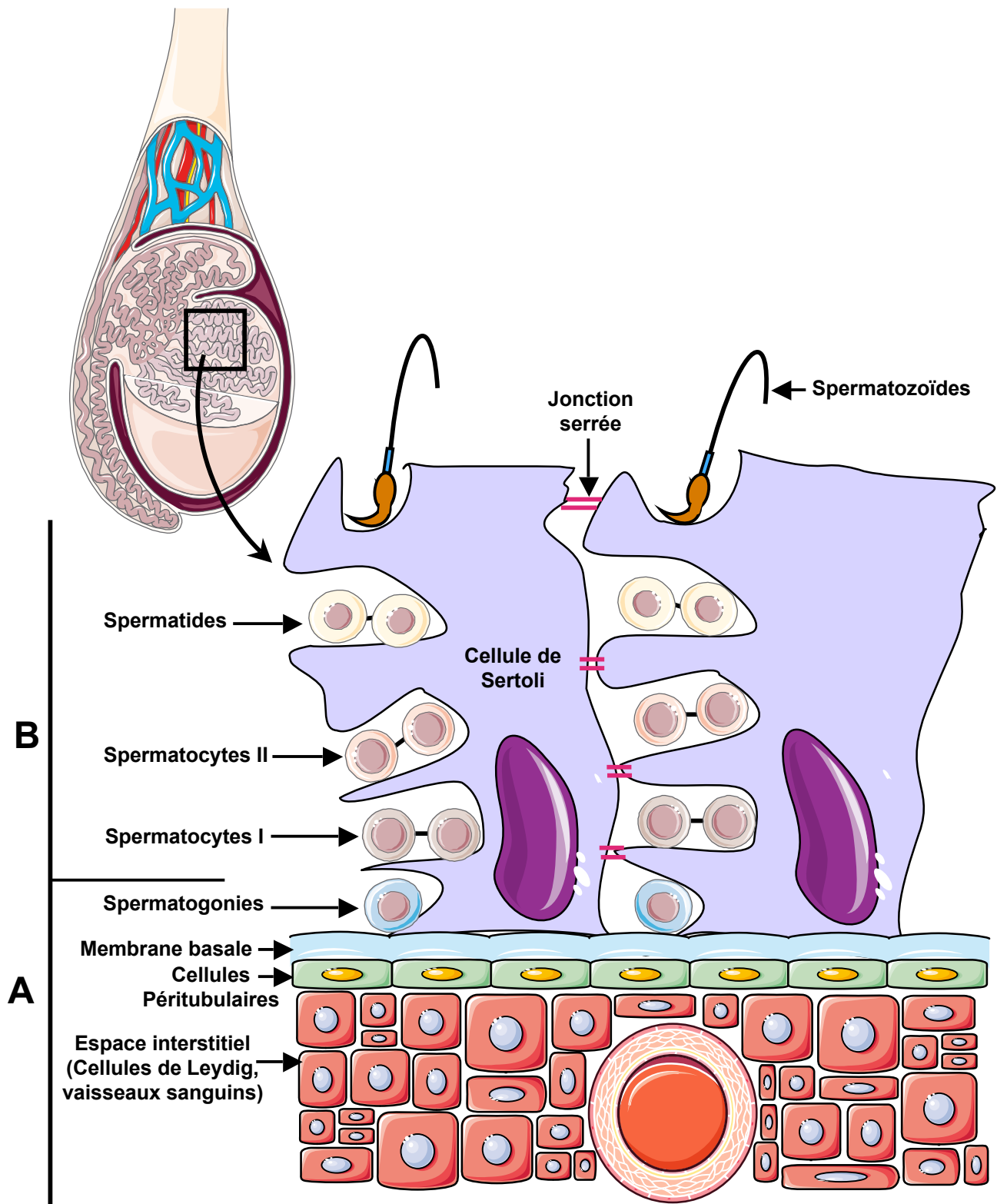


Figure 2 : Organisation de la spermatogenèse dans les tubules séminifères

A : Compartiment basal, **B** : compartiment Adluminal (adapté de Oatley *et al.*, 2008)

à la puberté, le processus de différenciation se déroule de manière cyclique, stable et continue dans le testicule et pendant toute la vie de l'individu mâle. Un cycle de spermatogenèse dure 70 jours chez l'homme (31 jours chez la souris) (Thibault et Levasseur, 2001).

B-I.1.2.1 L'origine de la spermatogenèse

Chez la souris, les Cellules Germinales Primordiales (CGP) apparaissent au 7,5^{ème} jour de gestation. Ce sont les précurseurs communs des lignées germinales mâle et femelle. Elles dérivent d'une petite population cellulaire de l'épiblaste (l'ectoderme embryonnaire) et migrent de la base de l'allantoïde pour atteindre les crêtes génitales autour des 10-11^{ème} jour de gestation. Dans les crêtes génitales mâles, les CGP sont entourées par des cellules somatiques de support : les cellules précurseurs des cellules de Sertoli. Ensuite les CGP et les cellules de Sertoli immatures forment de solides cordons cellulaires appelés cordons séminifères. Au cours du développement, ces cordons forment le lumen et deviennent les tubules séminifères. Une fois dans les cordons séminifères, les CGP changent de morphologie et sont ensuite appelées gonocytes. Les gonocytes prolifèrent pendant quelques jours puis s'arrêtent en phase G₀/G₁ de leur cycle vers le 15,5^{ème} jour. Chez la souris, les gonocytes reprennent leur prolifération quelques jours après la naissance pour se différencier en spermatogonies chez le jeune. Ces dernières entreront dans le processus de spermatogenèse pour donner des spermatozoïdes matures (Thibault et Levasseur, 2001).

B-I.1.2.2 La spermatogenèse

La spermatogenèse (figure 2) débute à la puberté et persiste tout le long de la vie de l'individu mâle. C'est un processus cyclique et continu qui se déroule dans les tubules séminifères. Elle comprend différentes étapes de prolifération et de différenciation afin de produire plusieurs millions de spermatozoïdes par jour à partir d'une faible quantité de cellules souches (1 sur 3 000 cellules germinales). Il y a donc environ 10 000 cellules souches dans un testicule adulte de souris (Tegelenbosch and de Rooij, 1993).

Le testicule est constitué de tubules séminifères maintenus par du tissu interstitiel composé des cellules de Leydig et de vaisseaux sanguins. Les tubules séminifères sont constitués d'une membrane basale (composée principalement de laminine), de cellules myoïdes (cellules péritubulaires) et enfin d'un épithélium germinale qui comprend deux populations cellulaires différentes : les cellules somatiques de soutien (cellules de Sertoli qui représentent 3% des cellules du testicule adulte chez la souris) et les différents stades des cellules germinales en division et en différenciation. Les cellules de Sertoli forment une couche unistratifiée qui s'étend de la membrane basale vers la lumière des tubes. Elles entourent les cellules germinales plus ou moins complètement par leurs prolongements cytoplasmiques.

La spermatogenèse s'effectue ainsi au contact étroit des cellules de Sertoli qui n'ont pas seulement une fonction de soutien et de nutrition, mais aussi une activité sécrétrice et phagocytaire. Elles sont reliées les unes aux autres un peu au-dessus de la membrane basale par des jonctions serrées ou « tight junctions ». Il en résulte deux compartiments dans l'épithélium : un compartiment basal et un adluminal

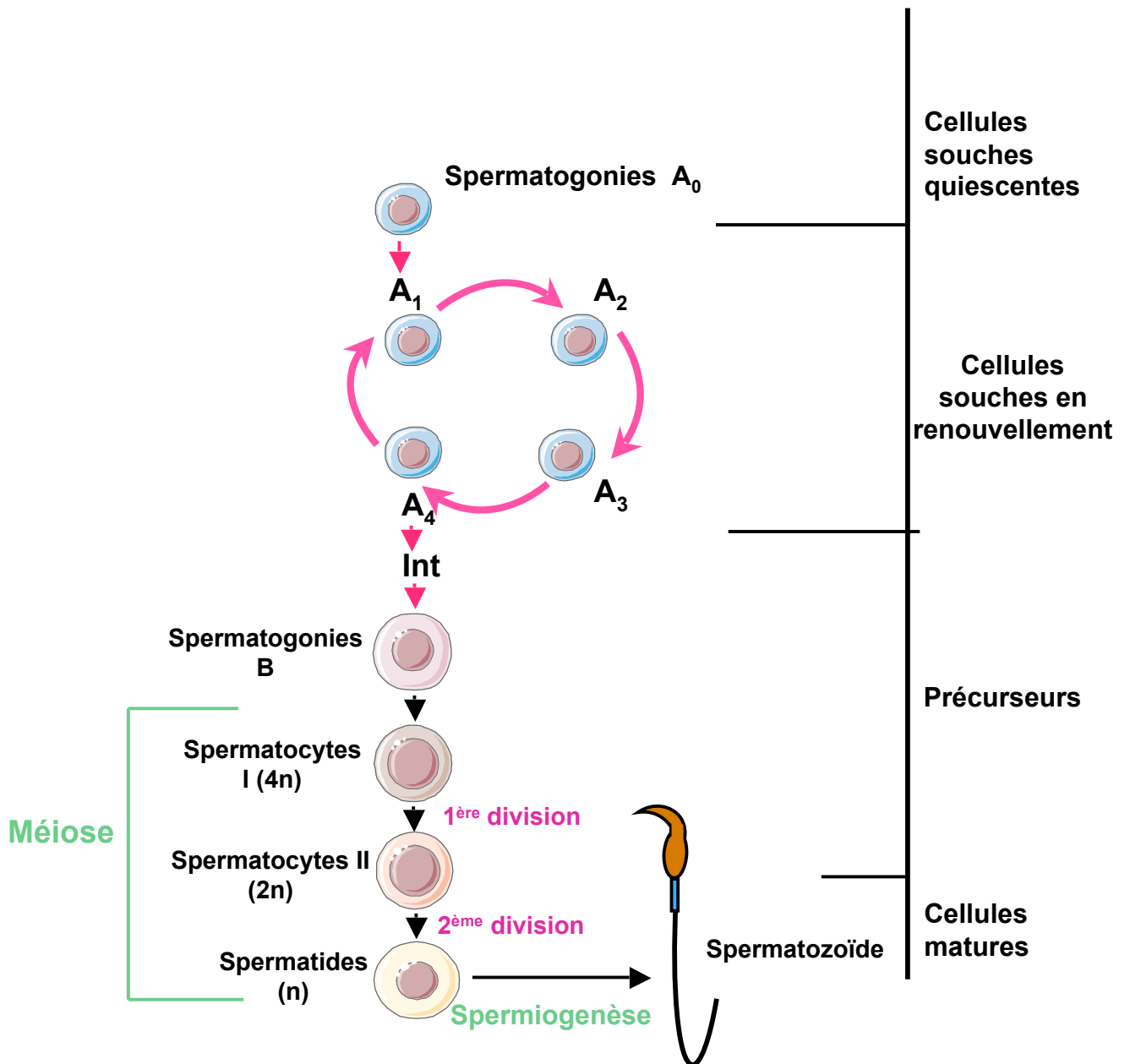


Figure 3a : Schéma simplifiée de la spermatogenèse – Modèle de la phase d'expansion
proposé par Clermont et Bustos-Obregon (Clermont and Bustos-Obregon, 1968)

→ Divisions par mitoses

☞ Le compartiment basal situé entre la lame basale et les jonctions serrées dans lequel sont alignées les spermatogonies, leur donnant accès aux éléments sanguins.

☞ Le compartiment adluminal où se développent les cellules des différents stades de la spermatogenèse. Les cellules de ce compartiment sont nourries par les prolongements cytoplasmiques des cellules de Sertoli.

Ces deux zones sont délimitées par la Barrière Hémato-Testiculaire (BHT : Blood Testis Barrier), qui a une fonction protectrice. Comme les spermatozoïdes ne se forment pas avant la puberté, ils sont absents lorsque le système immunitaire apprend à reconnaître les tissus de l'individu (au début de la vie). Toutes les cellules formées à la fin de la première division méiotique, possèdent un matériel génétique différent de celui des cellules somatiques. Si la BHT n'existait pas, les antigènes des spermatozoïdes pourraient pénétrer dans le sang, et provoquer une réponse auto-immune. Les anticorps, ainsi produits pourraient s'attaquer aux spermatozoïdes et conduire à une stérilité. Au cours de la spermatogenèse, les cellules germinales en voie de différenciation se déplacent entre les cellules de Sertoli adjacentes en direction de la lumière.

La spermatogenèse peut se diviser en trois phases successives :

- ☞ phase de multiplication (phase mitotique)
- ☞ la méiose
- ☞ la maturation terminale (spermiogenèse)

Un modèle de la phase d'expansion mitotique a été décrit dans les années 60, par Clermont et Bustos-Obregon (Clermont and Bustos-Obregon, 1968). Ce modèle postulait l'existence de deux classes de cellules souches spermatogoniales : une population réserve de cellules souches supposées quiescentes (dénommées spermatogonies A_0 , correspondant aux spermatogonies A single) et une population de cellules souches en renouvellement : les spermatogonies A_1 à A_4 , formant une boucle d'amplification. Dans ce modèle, les spermatogonies A_1 à A_4 conservent leurs propriétés souche et les spermatogonies A_4 sont capables soit de redonner une spermatogonie A_1 soit de poursuivre le processus de différenciation et donner des spermatogonies A intermédiaire (A_{int}) puis B (Figure 3a).

Un autre modèle est apparu dans les années 70 : le modèle de Huckins et Oakberg (Huckins and Oakberg, 1978), la phase mitotique débute à partir des cellules souches germinales (CSG), classiquement nommées A_s (spermatogonies A single). Elles sont localisées à la membrane basale des tubules séminifères, et prolifèrent lentement par mitose. La spermatogonie A_s va entrer en mitose pour s'autorenouveler. Elle peut également entrer en différenciation et se diviser de manière incomplète pour former deux spermatogonies A_{pr} (spermatogonies A paired) reliées par un pont intercytoplasmique. Ensuite, ces dernières se divisent pour former des chaînes de 4, 8 ou 16 spermatogonies A_{al} (A aligned), dites spermatogonies indifférenciées. Puis elles progressent durant une série de six divisions mitotiques en spermatogonies A_1 (c'est la première génération de spermatogonies différenciées), A_2 , A_3 , A_4 puis A_{int} et enfin en spermatogonies B ($2n$) qui entrent en

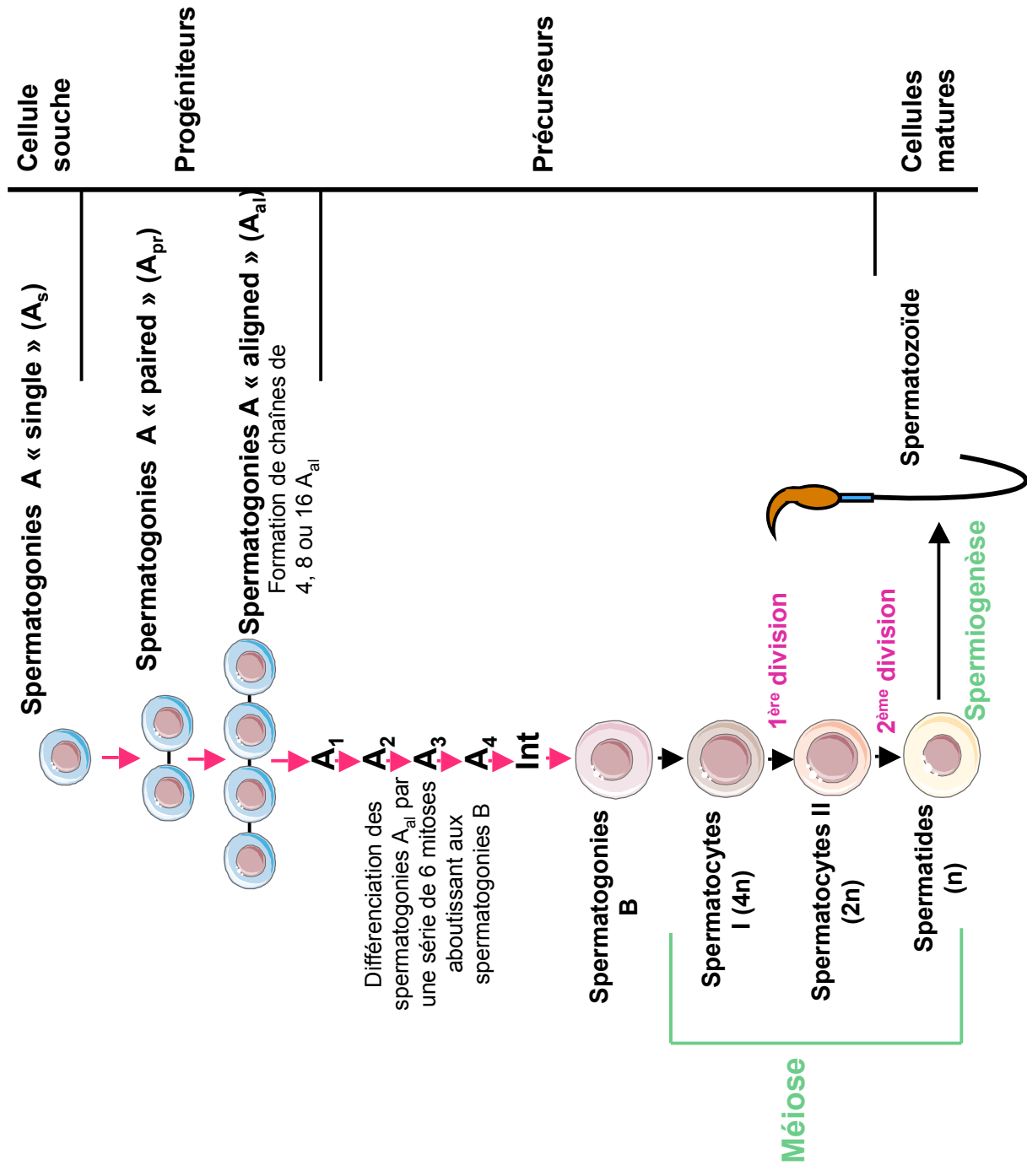


Figure 3b : Schéma simplifié de la spermatogenèse – Modèle de la phase d'expansion proposé par Huckins et Oakberg (Huckins and Oakberg, 1978)

→ Divisions par mitoses

méiose et se différencient en spermatocytes I (4n). A l'heure actuelle, le modèle de Huckins et Oakberg prévaut pour décrire la phase mitotique de la spermatogenèse (Figure 3b).

La phase mitotique débute à partir des cellules souches germinales (CSG), classiquement nommées A_s (spermatogonies A single). Elles sont localisées à la membrane basale des tubules séminifères, et prolifèrent lentement par mitose. La différenciation commence par une série de mitoses : une spermatogonie A_s va se diviser de manière incomplète pour former deux spermatogonies A_{pr} (spermatogonies A paired) reliées par un pont inter-cytoplasmique. Ensuite, ces dernières se divisent pour former des chaînes de 4, 8 ou 16 spermatogonies A_{al} (A aligned), dites spermatogonies indifférenciées. Puis elles progressent durant une série de six divisions mitotiques en spermatogonies A_1 (c'est la première génération de spermatogonies différenciées), A_2 , A_3 , A_4 puis A_{int} (A intermédiaire) et enfin en spermatogonies B (2n) qui entrent en méiose et se différencient en spermatocytes I (4n). La première division méiotique, aboutit à la formation de spermatocytes II (2n) et la deuxième aux spermatides (n). Ces dernières subissent la différenciation terminale ou spermiogenèse aboutissant à la formation de spermatides allongées, puis de spermatozoïdes. C'est au cours de cette étape que les spermatozoïdes vont acquérir les outils nécessaires à la fécondation et à leur mobilité : allongement de la cellule, condensation de la chromatine, formation de l'acrosome et du flagelle, et perte d'une partie du cytoplasme (Bellve *et al.*, 1977).

Ces deux processus, la spermatogenèse et l'hématopoïèse, sont initiés par des cellules souches qui entrent en différenciation afin de produire les différentes cellules nécessaires à l'obtention d'un tissu fonctionnel. Pour la spermatogenèse, les cellules souches sont dites monopotentes alors que les CSH sont dites multipotentes. La bonne régulation extra-cellulaire et intra-cellulaire de ces cellules est importante pour le maintien de la fonctionnalité du testicule et de la moelle osseuse.

B-I.2 Les grandes caractéristiques des cellules souches

Les voies biochimiques et moléculaires qui régulent le devenir des CSG et CSH restent encore mal connues. Aucun marqueur phénotypique unique n'a été décrit jusqu'à présent. Toutefois un test d'activité a été établi permettant d'identifier inmanquablement ces cellules. Cette technique consiste à transplanter des cellules souches candidates et à observer si elles sont capables de régénérer le tissu dont elles sont issues (Annexe 1).

B-I.2.1 L'auto-renouvellement et l'entrée en différenciation

Dans un tissu sain, un équilibre nécessaire à son homéostasie, s'établit entre deux mécanismes : le maintien du stock de cellules souches par auto-renouvellement et l'entrée en différenciation.

Plusieurs études montrent que dans de nombreux tissus adultes (comme l'épiderme et la moelle osseuse), les cellules souches se divisent de façon non régulière, c'est-à-dire qu'elles peuvent rester quiescentes pendant plusieurs semaines voire des mois (Fleming *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2003). Puis en réponse à un signal physiologique normal ou suite à un stress important, elles sortent de leur quiescence et entrent en cycle pour s'auto-renouveler et se différencier.

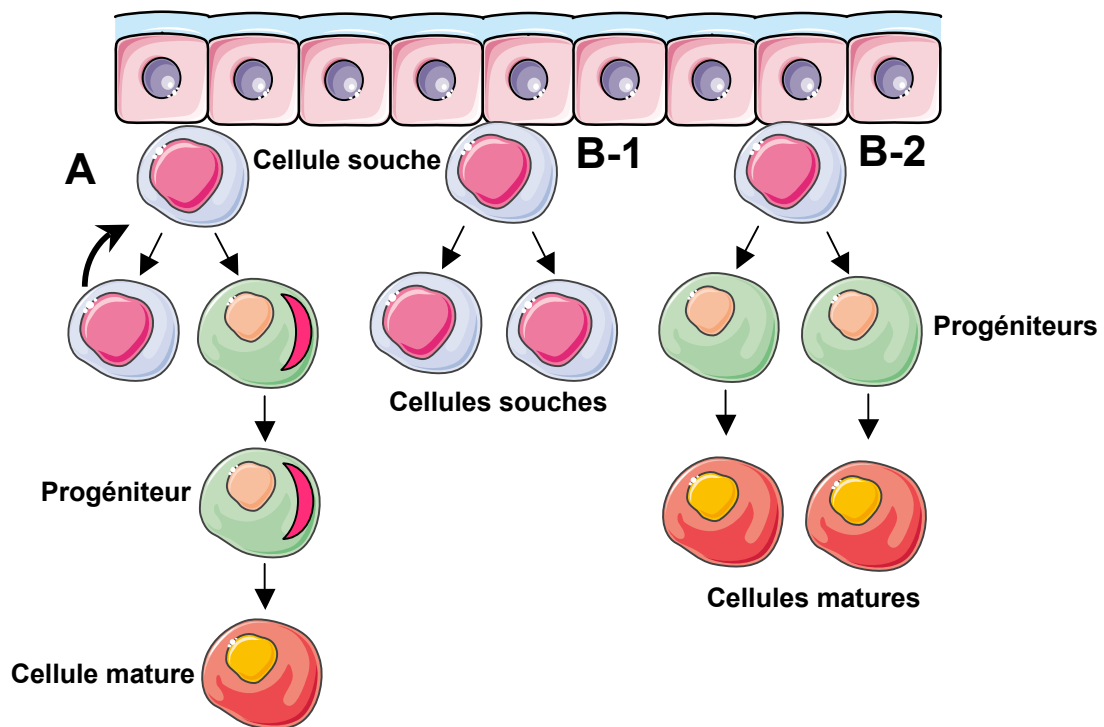


Figure 4 : Théorie de la division symétrique et asymétrique des cellules souches (adapté de Morrison *et al.*, 2006).

A: la division asymétrique

B (1 et 2) : les deux possibilités de la division symétrique

Deux modèles théoriques existent sur le renouvellement du pool de cellules souches et leur entrée en différenciation : la division asymétrique et la division symétrique (Figure 4).

Lors de la division mitotique asymétrique, les ARNm et/ou protéines du cytoplasme seraient répartis inégalement entre les deux cellules filles. Cette répartition cytoplasmique des facteurs d'auto-renouvellement dessine le devenir de la cellule, c'est-à-dire soit renouveler le pool de cellules souches, soit entrer en différenciation. Un autre mécanisme consisterait au cours de la mitose à orienter le fuseau mitotique de la cellule souche de telle sorte qu'une des cellules filles reste au contact de la niche pour renouveler le pool alors que la plus éloignée de la niche va entrer en différenciation afin de donner les cellules matures du tissu.

En revanche lors de la division symétrique, la cellule souche donne deux cellules filles au destin identique, en produisant alternativement soit deux cellules filles souches, soit deux progéniteurs.

Ces deux systèmes ont été mis en évidence au cours du développement et chez l'adulte dans des organismes modèles comme *Drosophila* et *Caenorhabditis elegans* (Morrison and Kimble, 2006). Notamment, la division asymétrique est le mécanisme principal de renouvellement des neuroblastes (cellules souches du système nerveux central). Les premiers travaux ont en effet montré qu'une protéine Numb ségrégeait dans seulement une des deux cellules filles au cours de la division des précurseurs neuronaux (Yu *et al.*, 2006a). Dans la spermatogenèse de *Drosophila*, il a également été montré que l'orientation du centrosome au cours de la division des CSG résulte en une asymétrie qui détermine le sort de chaque cellule fille (Yamashita *et al.*, 2003).

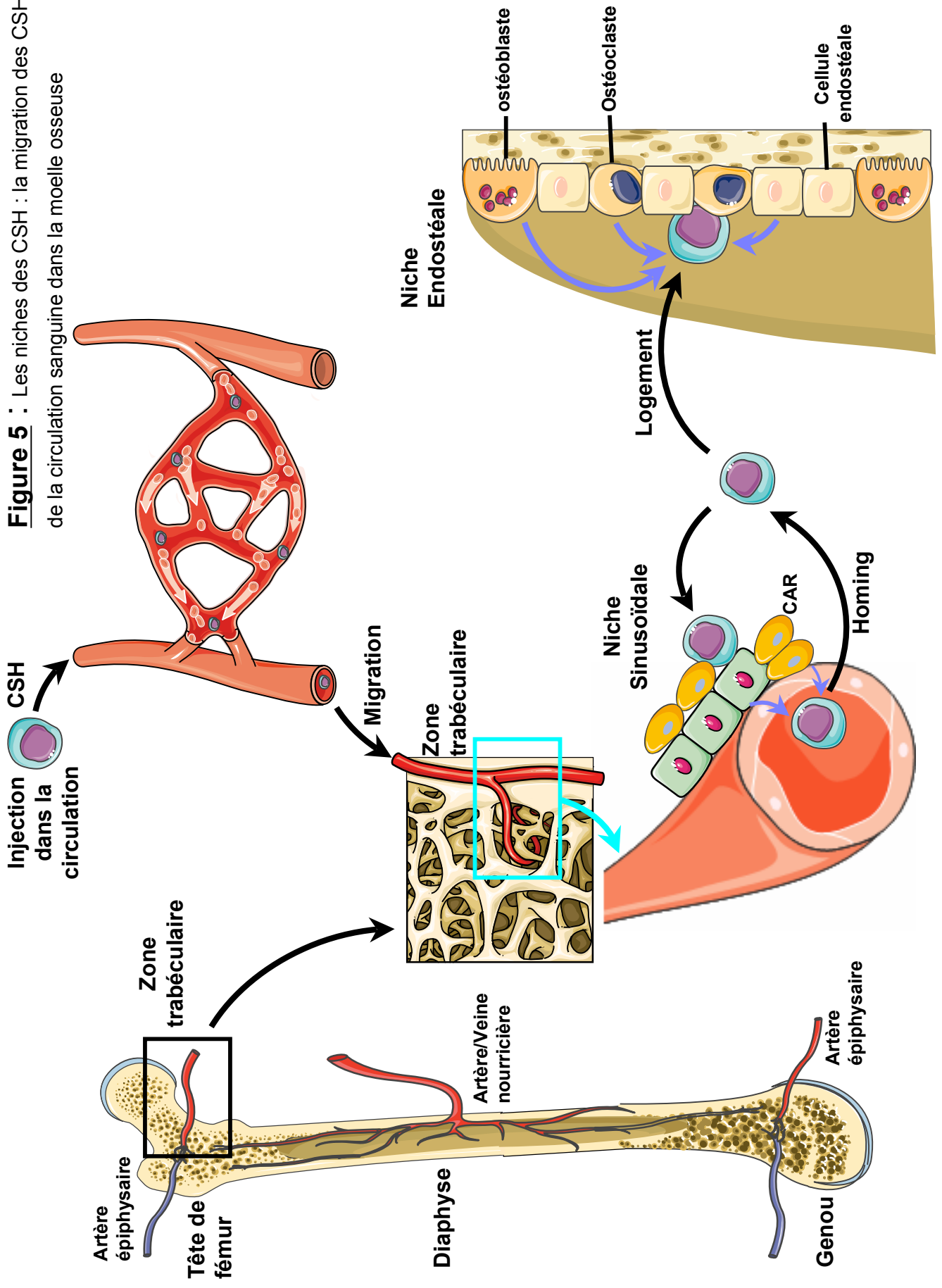
De nombreux travaux suggèrent la cohabitation de ces deux modèles au cours du développement et chez l'adulte (Morrison and Kimble, 2006). Les cellules souches pourraient choisir leur mode de division en fonction des besoins tissulaires : asymétrique en condition d'homéostasie ou symétrique en cas de régénération tissulaire et d'un besoin d'expansion. Un déséquilibre en faveur de la division symétrique pourrait également conduire à une expansion importante des cellules souches et à une incidence plus élevée de la tumorigenèse. Il y aurait donc certainement une implication du micro-environnement dans le choix du mécanisme d'auto-renouvellement.

B-I.2.2 La notion de niche

De nombreux travaux soulignent la régulation du sort des cellules souches par des mécanismes intrinsèques. Cependant, l'étude de la transplantation des CSH dans des receveurs irradiés létalement ou traités par des drogues a permis à Schofield (Schofield, 1978) de proposer une hypothèse selon laquelle il existe une structure qui héberge les cellules souches et les engage soit vers l'auto-renouvellement soit vers la différenciation.

Cette stratégie a permis de montrer qu'une cellule souche injectée dans un organisme lésé est capable d'aller se loger dans son organe cible et de le recoloniser afin de le rendre fonctionnel. Dans un organe, les cellules souches se localisent dans un lieu précis. Or une fois les cellules transplantées, elles sont retrouvées dans la même région, ce qui suggère qu'elles reconnaissent cette structure et que cette dernière est capable de les recruter et de réguler leur devenir : régénérer le tissu lésé (Brinster and Zimmermann, 1994 ; McCulloch and Till, 1962; Ogawa *et al.*, 1997).

Figure 5 : Les niches des CSH : la migration des CSH de la circulation sanguine dans la moelle osseuse



Le concept du micro-environnement, qui régule de manière extrinsèque le destin des cellules souches était né.

Les études menées chez les mammifères n'ont pas déterminé la localisation exacte des cellules souches ainsi que la structure *in vivo* de leur niche. C'est pourquoi d'autres modèles plus faciles d'utilisation comme *Drosophila* ou *Caenorhabditis elegans* ont permis d'avancer dans la compréhension de la relation établie entre les cellules souches et leur niche.

Bien que la notion de niche ait été proposée à partir des études sur les CSH, la première niche de cellules souches a été caractérisée dans les gonades de *Drosophila* et de *Caenorhabditis elegans* (Xie and Spradling, 2000).

Les études sur les ovaires et les testicules de *Drosophila* ont défini que la fonction de la niche est de protéger les cellules souches des signaux extérieurs de différenciation, d'apoptose ou de prolifération qui pourraient dépléter le stock (sénescence précoce), ou induire une production excessive de cellules souches qui mèneraient à une tumorigénèse. Ce modèle a aussi permis de démontrer que la niche est composée de cellules somatiques, physiquement en contact avec les CSG, grâce à des molécules d'adhésion, et produisant de nombreux facteurs indispensables pour les cellules souches. Cette proximité et le dialogue de la cellule souche avec sa niche permettent la transduction de signaux assurant le renouvellement du pool, alors que l'éloignement de la niche favorise l'engagement en différenciation.

La communication entre la niche et la cellule souche se fait par des interactions ligand/récepteur, qui vont générer des signaux intra-cellulaires et réguler la cellule souche en fonction des besoins, c'est à dire rester en quiescence ou proliférer. Ces récepteurs et voies de signalisation permettent de caractériser les cellules souches. Dans un premier temps, je décrirai les marqueurs des CSH, puis dans un deuxième temps ceux des CSG.

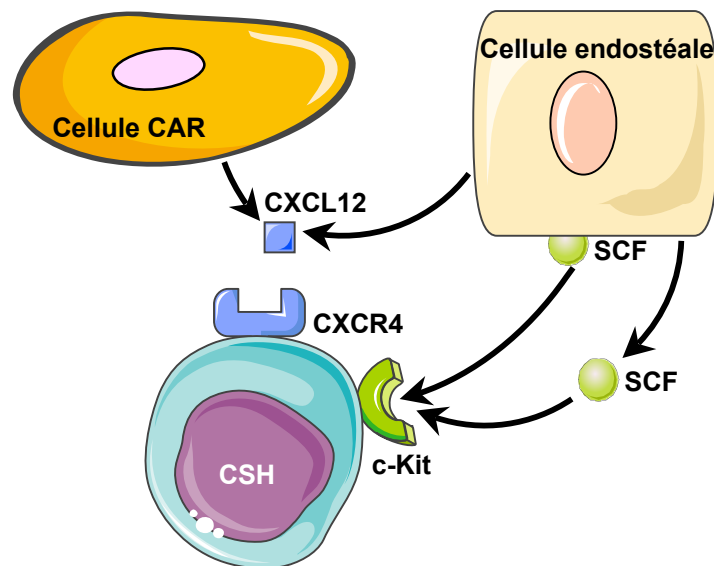
B-I.3 Les niches hématopoïétiques et germinales

B-I.3.1 La niche hématopoïétique

Après la transplantation de CSH chez la souris, la moelle osseuse reste l'organe privilégié du nichage des CSH et du développement des foyers hématopoïétiques, même si on observe également un nichage dans la rate (Cao *et al.*, 2004). Dans la moelle osseuse, il existe deux types de niches : l'une est dite endostéale et l'autre sinusoidale (Figure 5).

☞ La niche endostéale :

L'endostéum est la partie osseuse entre la moelle et l'os. Il est constitué de fibroblastes stromaux, d'ostéoblastes (cellules mesenchymateuses qui produisent la matrice osseuse qui constitue l'os après minéralisation) et d'ostéoclastes (grandes cellules multi-nucléées dérivées des macrophages qui résorbent l'os). L'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes forme un équilibre qui maintient l'homéostasie et le remodelage de l'os. Ces cellules sécrètent des facteurs de croissance et de



Facteurs	Cellule sécrétrice	Processus
CXCL12	Cellule CAR	Nichage
	Cellule endostéale	Adhésion à la niche Quiescence
SCF	Cellule endostéale	Adhésion niche

Figure 6 : Les facteurs maintenant les CSH dans la niche

régulation pour les CSH. Cette niche est considérée comme hébergeant les CSH quiescentes (Wilson *et al.*, 2008).

☞ La niche sinusoïdale :

D'autres CSH ont été retrouvées en position adjacente aux vaisseaux sanguins sinusoïdaux : ce sont des vaisseaux sanguins spécialisés dans le tissu hématopoïétique dans lesquels a lieu la circulation veineuse. Ces vaisseaux ont une paroi fine, formée d'un endothélium discontinu et irrégulier, ce qui permet aux cellules de pouvoir entrer et sortir de la circulation. Les cellules péri-vasculaires sécrètent des facteurs de croissance pour attirer les CSH hors de la circulation sanguine afin qu'elles colonisent cette niche. Cette niche semble héberger les cellules en prolifération (Wilson *et al.*, 2008).

☞ La transplantation des CSH (Figure 5)

Après transplantation dans la circulation sanguine, les CSH atteignent le fémur *via* les artères nourricières qui arrivent dans la diaphyse du fémur ou par les artères métaphysères ou épiphysères qui les mènent dans l'épiphyse (fémorale ou du genou). On appelle cette étape la migration. Ces épiphyses, zones d'os spongieux, sont constituées de trabécules (lamelles formant une trame irrégulière de minces colonnes de tissus osseux). La moelle osseuse se localise dans les espaces macroscopiques entre les trabécules. Ces zones d'os spongieux sont riches en vaisseaux sanguins et sont des zones de nichage préférentiel des CSH. La vascularisation est fréquemment localisée près des ostéoblastes qui expriment la N-Cadhérine (Xie *et al.*, 2009). Il a été décrit qu'après transplantation, les CSH ont une préférence pour se nicher dans les zones trabéculaires fémorales et du genou plutôt que dans la diaphyse qui semblerait être plutôt le lieu de la différenciation hématopoïétique.

Dans un premier temps, il y a un « appel » de la part de la niche sinusoïdale par sécrétion de facteurs chimottractants (comme CXCL12 : Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12) par les cellules péri-vasculaires et les cellules CAR (CXCL12-abundant reticular cell) afin de recruter les CSH présentes dans la circulation : on appelle cette étape le homing ou nichage. La chimiokine CXCL12 est également exprimée par les ostéoblastes et les cellules endothéliales. Les CSH expriment son récepteur : CXCR4 (Chemokine (C-X-C motif) Receptor 4). L'inactivation de l'un des deux partenaires entraîne une diminution de la translocation des CSH du foie fœtal vers la moelle osseuse durant l'embryogenèse (Sugiyama *et al.*, 2006). La délétion induite de CXCR4 entraîne une diminution du nombre de CSH mais ne diminue pas l'expansion des progéniteurs matures et entraîne une diminution de la greffe des CSH après transplantation (Nie *et al.*, 2008). Il a été observé que les CSH sont au contact des cellules CAR, qui expriment fortement CXCL12. Ces cellules se localisent autour des cellules endothéliales sinusoïdales ou endostéales, et apparaissent être un élément clé de la niche des CSH. Donc la voie de signalisation CXCL12/CXCR4 est essentielle pour maintenir les CSH dans leur niche et contrôler leur prolifération (Figure 6) (Sugiyama *et al.*, 2006).

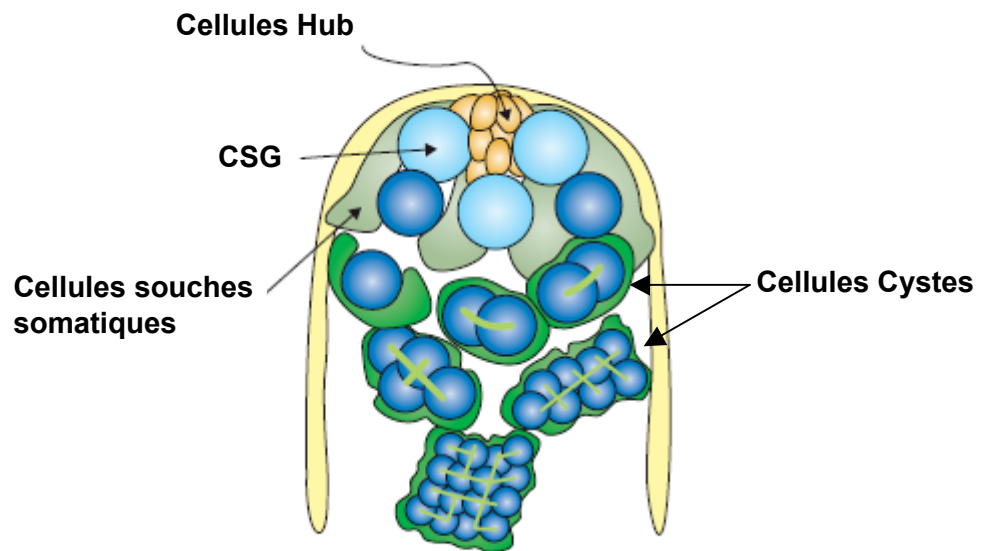


Figure 7 : Représentation schématique de la niche testiculaire chez *Drosophila*
(D'après Van Doren, 2007)

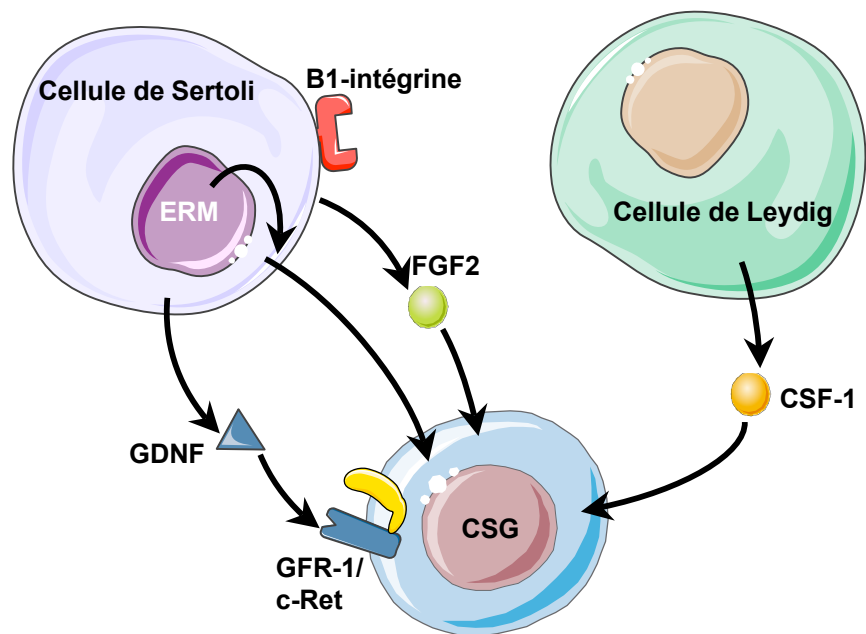
On peut supposer qu'une fois les CSH recrutées, soit elles restent dans cette niche afin de proliférer et de se différencier, soit elles migrent vers la niche endostéale. On appelle cette étape le logement (« lodgment »), grâce notamment à la sécrétion de facteurs chimotactants (comme le SCF membranaire : Stem Cell Factor).

Les rôles respectifs des niches endostéales et sinusoidales dans la régulation de la balance quiescence/prolifération des CSH, ainsi que dans la balance autorenouvellement/ différenciation restent très controversés.

Le couple c-Kit/SCF est important pour l'activité de la niche endostéale des CSH qui expriment le récepteur c-Kit. Il existe une forme soluble et membranaire du SCF. Le SCF membranaire est exprimé par les ostéoblastes et possède une plus forte capacité d'activation du récepteur c-Kit que le SCF soluble. Ce SCF membranaire est un puissant stimulateur d'adhésion des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques aux cellules stromales et à la matrice extracellulaire *in vitro* grâce à l'activation des intégrines VLA4 et VLA5. Le SCF permet ainsi d'affecter les propriétés d'adhésion de la niche endostéale *in vitro*. De plus, il y a une diminution (environ 30%) du logement des cellules transplantées dans la région endostéale de la moelle osseuse dans des receveurs déficients pour le SCF membranaire. Ce dernier est donc un composant de la niche endostéale qui maintient l'activité des CSH à long terme dans la moelle osseuse adulte et semble important pour le logement des CSH après transplantation. Il est aussi requis pour la prolifération et l'activité des ostéoblastes *in vivo*. Le SCF membranaire ne semble pas impliqué dans la migration des CSH transplantées mais dans leur logement dans la niche endostéale (Driessen *et al.*, 2003). Par contre, le SCF soluble libéré après clivage par la métallo-protéase MMP9 semble jouer un rôle dans le recrutement des CSH dans la niche (Heissig *et al.*, 2002).

B-I.3.2 La niche testiculaire

Les niches sont composées de cellules de soutien qui génèrent un microenvironnement complexe maintenant l'état indifférencié et la quiescence des cellules souches. Le modèle de base de la niche germinale a été réalisé chez *Drosophila*. La niche germinale dans le testicule de *Drosophila* constitue une des meilleures illustrations de ce concept de micro-environnement spécialisé et de compartimentation des cellules souches dans une zone spatialement et physiologiquement définie. Ce confinement régule la quiescence et l'entrée en différenciation des cellules souches germinales. Les cellules souches sont ancrées à la niche, constituée d'une structure de cellules somatiques, le « hub », qui produit le facteur Upd (Unpaired) à un pôle de la gonade. Le ligand Upd contrôle la maintenance des cellules souches *via* l'activation de la voie de signalisation Jak/STAT (Kiger *et al.*, 2001). Elles se divisent de manière asymétrique : une cellule fille reste au contact du « hub » et conserve le caractère souche, alors que l'autre cellule fille s'écarte de la niche et entre en différenciation (Yamashita *et al.*, 2007). La cellule fille qui s'écarte du « hub », va alors subir plusieurs divisions pour former des groupes de spermatogonies interconnectées appelés cystes, entourés de cellules somatiques (Figure 7).



Nom	Nature	Cellule excrétrice	Processus
CSF-1	Facteurs excrétés par les cellules de la niche, action paracrine	Cellule de Leydig	Auto-renouvellement
GDNF		Cellule de Sertoli	Auto-renouvellement
FGF2		Cellule de Sertoli	Auto-renouvellement
ERM	Facteur de transcription	Cellule de Sertoli	Auto-renouvellement
B1-intégrine	Facteur membranaire	Cellule de Sertoli	Nichage

Figure 8 : Les facteurs impliqués dans l'auto-renouvellement et le nichage des CSG

Chez les mammifères, le testicule est composé de tissu interstitiel et de tubules séminifères qui hébergent les cellules de Sertoli et les cellules germinales. Toutes ces cellules paraissent être des constituants importants de la niche testiculaire. La BHT permet aussi de diviser le tube séminifère en un compartiment basal et un compartiment adluminal et elle conditionne les échanges entre l'épithélium germinatif et le compartiment interstitiel. Cette barrière contribue aussi à maintenir les CSG dans un environnement spécifique isolé. Lors de la transplantation, les CSG injectées vont dans le compartiment basal par chimiotraction (migration en réponse à un gradient ou une interaction attractive), puis atteignent la niche testiculaire où elles pourront proliférer et se différencier. Seulement 10 % des CSG transplantées peuvent accomplir ce processus de migration (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2008b). Le rôle de la niche testiculaire a été clairement montré au cours du développement chez la souris. Des études de transplantation menées sur des testicules de souris jeunes et adultes ont en effet montré des changements importants des capacités fonctionnelles des niches testiculaires au cours du développement (Shinohara *et al.*, 2001). Une augmentation de la régénération testiculaire d'un facteur 10 est observée après transplantation dans un receveur jeune par rapport au receveur adulte. Ces capacités régénératrices de la niche prépubère pourraient être liées à l'absence de jonctions serrées entre les cellules de Sertoli à cet âge (apparition à 10 jours postpartum), facilitant ainsi l'accès des CSG aux niches de la membrane basale. On ne peut pour autant exclure que les propriétés régénératrices de la niche du testicule prépubère soient liées également à un environnement hormonal particulier et à la production d'une combinaison spécifique de facteurs de croissance. L'adhésion de la CSG dans sa niche est nécessaire pour qu'elle garde ses caractéristiques. Par exemple, le récepteur d'adhésion $\beta 1$ -intégrine a été identifié comme essentiel pour le nichage des CSG après transplantation (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2008b). Son association avec la laminine est nécessaire dans plusieurs étapes du nichage.

Contrairement au modèle décrit chez *Drosophila*, une définition anatomique précise de la niche testiculaire, la définissant comme un sous-compartiment du tube séminifère, n'a pas encore été proposée chez les mammifères. Grâce à différentes techniques associant notamment l'imagerie confocale, la technique « time lapse » (en temps réel), Yoshida *et coll.* ont récemment montré la localisation préférentielle des spermatogonies indifférenciées (comprenant les cellules souches et les progéniteurs les plus immatures) à la membrane basale dans des zones en contact avec le tissu interstitiel contenant des vaisseaux sanguins (Yoshida *et al.*, 2007b). Ces travaux montrent aussi de manière élégante la migration des spermatogonies le long de la membrane basale au cours de leur différenciation. La vascularisation du tissu interstitiel joue donc un rôle important dans la régulation des spermatogonies indifférenciées. Ces niches ne semblent pas fixes et s'adaptent aux modifications de vascularisation du tissu, suggérant ainsi que la vascularisation du tissu pourrait diriger la localisation des niches dans le tissu. Malgré l'importance des données de cette étude, la niche anatomique des CSG reste néanmoins à définir.

Certains modèles de souris génétiquement modifiées et des analyses de transcriptomique de fractions enrichies en CSG ont montré l'influence primordiale des différents composants de la niche testiculaire sur les cellules souches (Figure 8).

Par exemple, l'analyse transcriptomique de la fraction Thy.1 positive (la plus enrichie en CSG) a révélé une augmentation de l'expression du gène *Csf1r* (Colony Stimulating Factor-1 Receptor) par rapport à la fraction Thy.1 négative. De plus, l'addition de CSF-1 recombinant dans le milieu de culture des CSG augmente leur auto-renouvellement sans affecter l'expansion des cellules germinales totales. *In vivo*, le CSF-1 est exprimé par les cellules de Leydig et les cellules péritubulaires. Par conséquent, le CSF-1 est identifié comme un stimulateur extrinsèque de l'auto-renouvellement des CSG et implique les cellules de Leydig et les cellules péritubulaires comme des contributeurs à la niche testiculaire (Oatley *et al.*, 2009).

Le GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) est un facteur de croissance, membre de la superfamille du TGF- β . Il joue un rôle dans la morphogenèse du rein et dans la régulation de la fonction des progéniteurs neuronaux. Dans le testicule, il est exprimé par les cellules de Sertoli il est régulé par la gonadotropine FSH, régulateur majeur de la capacité des cellules de Sertoli à supporter quantitativement la spermatogenèse (Tadokoro *et al.*, 2002). Les souris invalidées pour le gène *Gdnf*, meurent quelques jours après la naissance à cause d'anomalies rénales et neuronales, mais leurs testicules sont normaux (Moore *et al.*, 1996). En revanche, les souris *Gdnf*^{+/-} survivent jusqu'à l'âge adulte et sont fertiles. Cependant, dans les testicules de souris *Gdnf*^{+/-} âgées (à partir de huit semaines), on observe des tubules vides et une déplétion en cellules germinales. D'autre part, une accumulation de spermatogonies indifférenciées (A_{pr} et A_{al}) est observée dans les testicules des souris qui surexpriment le GDNF, menant à long terme à l'apparition de tumeurs germinales (Meng *et al.*, 2000). En conclusion, le GDNF contribue par une régulation paracrine à l'auto-renouvellement des spermatogonies et à leur différenciation, ce qui confirme que les cellules de la niche régulent bien le devenir des CSG, et donc qu'une niche défectueuse mène à une altération du tissu (Naughton *et al.*, 2006).

En revanche, le SCF (Stem Cell Factor) ou Kit Ligand est exprimé par les cellules de Sertoli et existe sous deux formes : l'une soluble et l'autre membranaire. Il existe deux mutants murins dans lesquels le SCF est invalidé : les souris Sl/Sl^d où le SCF est inexistant et les souris Sl^{17H}/Sl^{17H} où le SCF est tronqué de son domaine cytoplasmique, seul le domaine extracellulaire est exprimé à la surface des cellules de Sertoli. Dans ces deux mutants, lorsque l'on transplante des CSG, on observe une accumulation de spermatogonies indifférenciées. Ces données suggèrent que le SCF est nécessaire à la différenciation, mais ni à la prolifération ni à l'auto-renouvellement et donc qu'il n'est pas un composant de la niche testiculaire contrairement à la niche hématopoïétique (Ohta *et al.*, 2000).

D'autre part, un dysfonctionnement des cellules de Sertoli joue un rôle sur la capacité de la niche à supporter les CSG. Par exemple, si l'on considère le facteur de transcription ERM (ou ETV5 : ETS-Related Molecule), il est exprimé par les Sertoli et appartient à la sous-famille des facteurs de transcription ETS (E-twenty-six Transcription Factor). Ce facteur est impliqué dans la régulation des processus de tumorigénèse et du développement. En effet, les souris invalidées pour *Erm* présentent une déplétion progressive en cellules germinales avec une perte du maintien de l'auto-

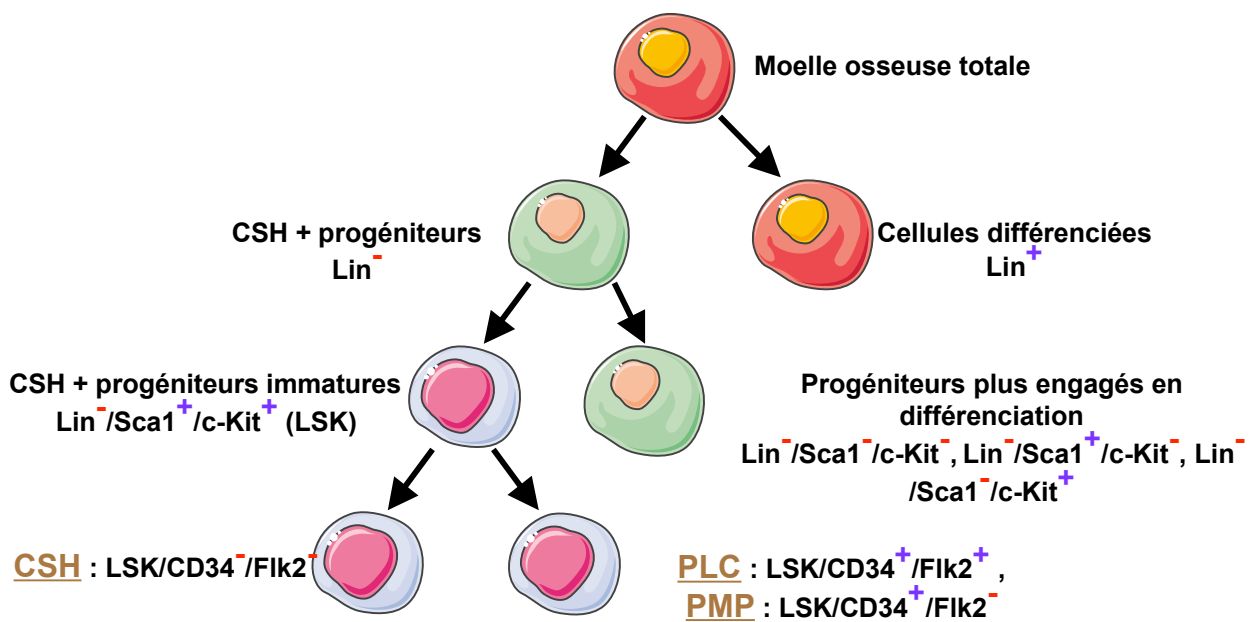


Figure 9 : Les différentes populations de la moelle osseuse (adapté de Wilson *et al.*, 2008)

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques, **PMP** : Progéniteurs Multipotents, **PLC** : Progéniteurs Lymphoïdes communs

renouvellement mais sans blocage de la différenciation. Donc l'expression de ERM régule l'expression de gènes cibles dans les cellules de Sertoli et agit de façon paracrine sur les spermatogonies. Si *Erm* est inactivé, il n'y a plus d'expression de ces protéines cibles, ce qui entraîne un défaut de l'auto-renouvellement des CSG (Chen *et al.*, 2005).

Le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2), est exprimé par les cellules de Sertoli et est impliqué dans le développement et le maintien du testicule de nombreuses espèces comme l'Homme, les rongeurs, les bovins, poissons. Il possède un rôle important dans la production des gamètes. Son expression est régulée en fonction de l'âge. Il est aussi exprimé par les spermatogonies A, les cellules pré et post méiotiques (Gonzalez-Herrera *et al.*, 2006). Ce facteur semble indispensable pour le maintien des CSG en culture à court et long terme (Kubota *et al.*, 2004b).

Dans les gonades de *Drosophila* et de souris, différents travaux tendent à montrer un rôle crucial du vieillissement de la niche dans la déplétion progressive lié à l'âge en CSG et dans l'apparition de problèmes de fertilité (Boyle *et al.*, 2007 ; Pan *et al.*, 2007; Ryu *et al.*, 2006). Une étude a récemment montré que l'insuline pourrait supprimer, *via* son activité sur les cellules de la niche, le déclin des cellules souches avec l'âge (la sénescence) (Hsu and Drummond-Barbosa, 2009). Cette sénescence des tissus ne serait donc pas principalement due à un défaut intrinsèque aux cellules souches, même si l'apparition d'un défaut d'orientation de leurs centrosomes a été rapporté (Cheng *et al.*, 2008).

Tous les éléments de la niche testiculaire : cellules de Leydig, péritubulaires et cellules de Sertoli jouent un rôle dans la niche. Dès qu'un de ces éléments est perturbé, la niche perd sa capacité de maintien des CSG. Cependant, les niches et leurs capacités à maintenir les fonctions des CSG restent encore mal définies chez les mammifères. Ces données suggèrent que même si les cellules souches sont compétentes la niche doit l'être également. C'est la collaboration des deux qui permet d'obtenir un tissu fonctionnel.

B-I.4 Caractérisation des cellules souches

Afin d'isoler les cellules souches pour mieux comprendre la physiologie, des études ont été menées afin d'identifier des marqueurs membranaires, permettant d'obtenir des cellules viables. Les CSH ont été les premières cellules souches caractérisées par des marqueurs membranaires. Ces marqueurs ont également été testés sur les autres types de cellules souches notamment pour les CSG selon la théorie de la conservation des propriétés et des marqueurs.

B-I.4.1 Les CSH-Caractérisation phénotypique

Au fur et à mesure des études de phénotypage des CSH, trois populations ont été caractérisées.

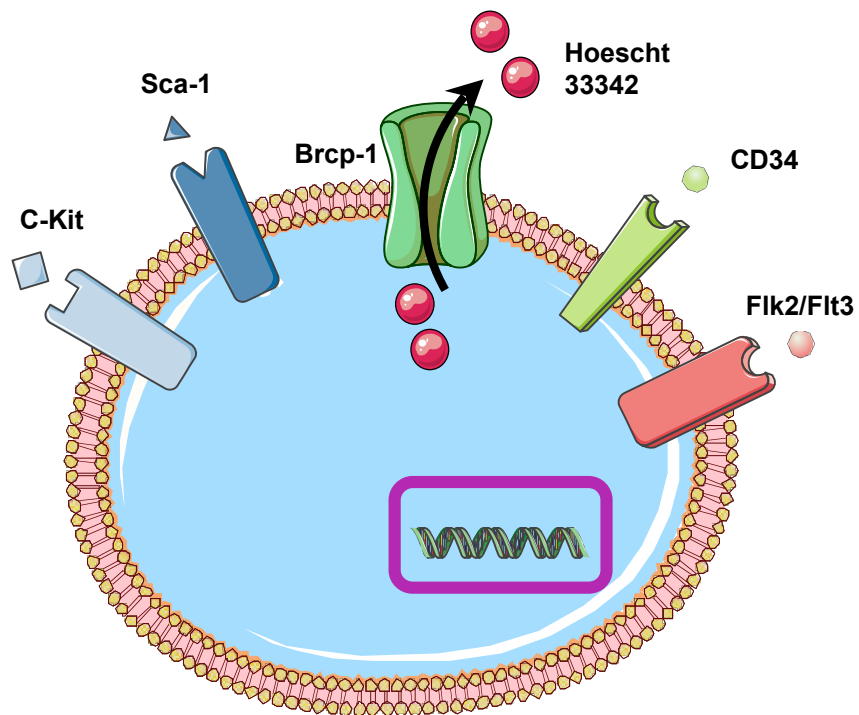


Figure 10 : Les marqueurs pour le phénotypage des CSH court-terme (ST-CSH) ou PMP (adapté de Wilson *et al.*, 2008)

B-I.4.1.1 La population LSK

Les CSH fonctionnelles n'expriment pas les marqueurs de surface normalement présents sur les cellules déjà entrées en différenciation dans les différents lignages (Figure 9). Pour la cytométrie en flux, un « Cocktail » d'anticorps a été développé afin d'exclure les cellules entrées en différenciation : le Lin⁺, qui est composé des anticorps anti-CD5 (Lymphocytes T), anti-CD11b (granulocytes et monocytes), anti-CD45R (B220, lymphocytes B), anti-7-4 (neutrophiles), anti-Gr1 (granulocytes) et anti-Ter-119 (lignée érythrocytaire). Les CSH sont dans la fraction Lin⁻.

Après la déplétion en progéniteurs, deux autres marqueurs sont utilisés : Thy.1 et Sca1. La transplantation de trente cellules Lin⁻/Thy.1^{low}/Sca-1⁺ sont suffisantes pour sauver 50% des receveurs irradiés létalement, c'est-à-dire qu'elles sont capables de recoloniser la moelle dans ces receveurs survivants, de proliférer et de se différencier dans tous les types cellulaires sanguins (Spangrude *et al.*, 1988). Les CSH présentent donc à leur surface l'antigène Sca-1 ("Stem cell antigen-1") et expriment à un faible niveau ("low") le récepteur Thy-1, glycoprotéine liée au phosphatidyl-inositol glycosylé de la superfamille des Immunoglobulines (Spangrude *et al.*, 1988). Le rôle de ces marqueurs reste peu connu même si Sca-1 semble intervenir dans l'auto-renouvellement des CSH (Ito *et al.*, 2003).

Un marqueur supplémentaire a été identifié : c-Kit. Le phénotype des CSH est alors devenu : Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺ (LSK). Cent cellules suffisent pour recoloniser tous les receveurs irradiés létalement. En revanche, la transplantation de la fraction Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit¹⁻ ne permet pas de reconstitution de l'hématopoïèse. La fraction LSK représente 0,08% de la moelle osseuse (Okada *et al.*, 1992). Les modèles murins de mutation spontanée pour le gène *SCF* (souris *Sl/Sl^d*) ou de son récepteur *c-Kit* (souris *W/W^v*) déclarent des anémies aplasiques mais la cause de ce phénotype est différente. Les souris *W/W^v* ont un défaut des CSH, alors que les souris *Sl/Sl^d* ont des CSH normales mais leur micro-environnement ne peut pas supporter la différenciation des CSH. Donc le couple *SCF/c-Kit* n'est pas essentiel pour la génération et l'initiation de l'expansion clonale des CSH dans l'embryon et le foie fœtal, mais ils sont importants pour la maintenance à long terme et pour l'auto-renouvellement des CSH adultes (Keller and Phillips, 1984).

Le marquage LSK est le plus couramment utilisé depuis les années 2000 pour caractériser les CSH et les progéniteurs immatures. Cette population peut être divisée en deux types de sous-population de CSH : les cellules souches avec un potentiel de reprise à court terme, ST-CSH (Short Term CSH - mise en évidence entre deux et quatre mois après transplantation) et les cellules souches avec un potentiel de renouvellement à long terme : LT-CSH (Long Term CSH - mise en évidence par les transplantations en séries ou par une observation de la reprise de l'hématopoïèse six mois après transplantation). Les LT-CSH engagées en différenciation donnent naissance aux ST-CSH qui possèdent alors un potentiel d'auto-renouvellement plus restreint (Wilson and Trumpp, 2006). Les CSH se divisent peu : 60-70% des LSK sont en G₀ et 5% sont en phase S-G₂M. D'autres études montrent que les cellules souches LSK ne se divisent *in vivo* que tous les 30 à 60 jours. Ce faible

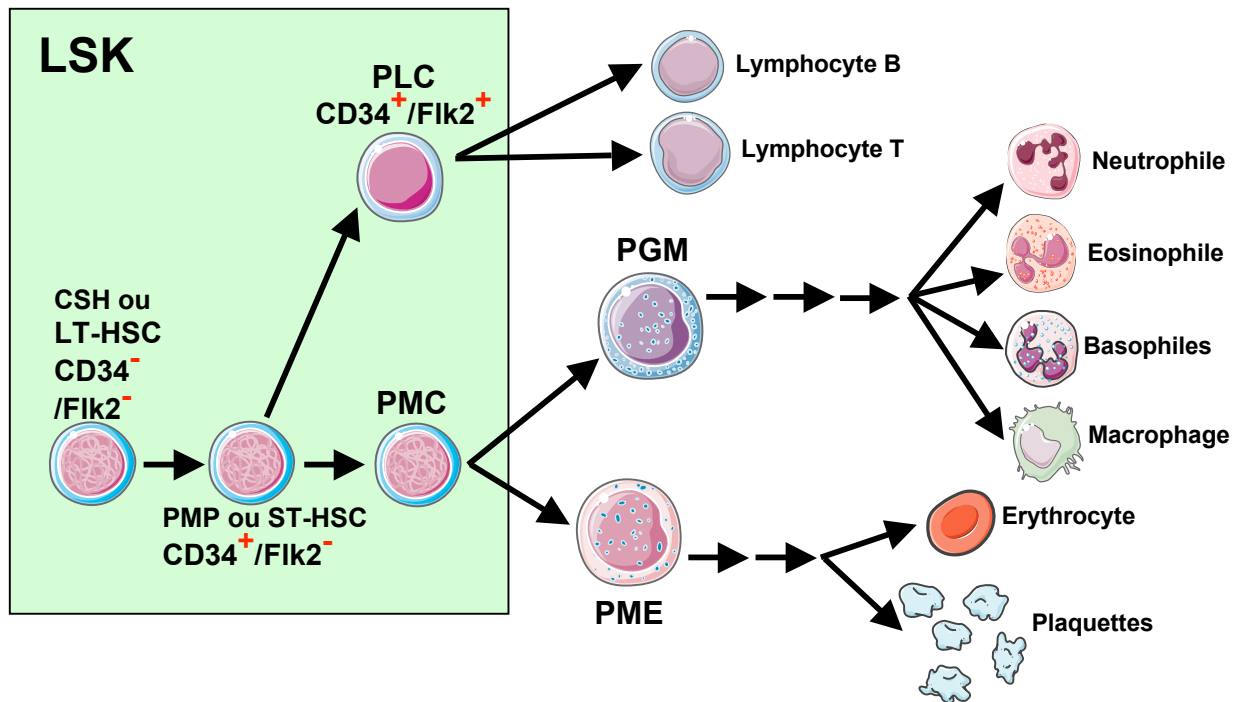


Figure 11 : Caractérisation des CSH et des progéniteurs en fonction des récepteurs membranaires (adapté de Wilson *et al.*, 2008)

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique, **PMP** : Progéniteurs Multipotents, **PMC** : Progéniteurs Myéloïdes Communs, **PLC** : Progéniteur Lymphoïde Communs, **PGM** : Progéniteurs Granulocyte-Macrophage, **PME** : Progéniteurs Mégakaryocyte-érythroïde

taux de cellules cyclantes expliquerait la résistance significative de ces cellules aux drogues (Bradford *et al.*, 1997 ; Cheshier *et al.*, 1999).

B-I.4.1.2 Les progéniteurs multipotents ou ST-CSH

Les ST-CSH, encore appelées progéniteurs multipotents (PMP) par certains auteurs (Blank *et al.*, 2008), ont la capacité de se différencier dans les lignages myéloïdes et lymphoïdes, mais une capacité restreinte à s'auto-renouveler. Ils permettent uniquement une reconstitution transitoire de l'hématopoïèse (Figure 10) (Wilson and Trumpp, 2006).

Cette population peut être identifiée à l'aide de deux récepteurs membranaires, CD34 et Flk2/Flt3.

Le récepteur CD34⁺ (ou sialomucine) est une mucine : glycoprotéine de surface, fortement glycosylée. Elle est présente sur les cellules endothéliales et sur les cellules hématopoïétiques. Le modèle murin invalidé pour le gène *CD34* a un développement et un profil sanguin normal ; en revanche, il présente une diminution significative des progéniteurs hématopoïétiques. Il apparaît que la glycoprotéine CD34 joue un rôle dans la formation des progéniteurs durant l'hématopoïèse embryonnaire et adulte (Cheng *et al.*, 1996).

Flk2/Flt3 (fms-like tyrosine kinase 3) est un récepteur à tyrosine kinase. Ce récepteur est exprimé par les Progéniteurs Lymphoïdes Communs (PLC). La surexpression de Flk2 dans les LSK est accompagnée d'une perte de la capacité d'auto-renouvellement, mais les LSK conservent un potentiel de reconstitution restreint à la lignée lymphoïde (Adolfsson *et al.*, 2001).

Ces deux marqueurs définissent deux sous-populations : LSK/CD34⁺/Flk2⁻ et LSK/CD34⁺/Flk2⁺. La population LSK/CD34⁺/Flk2⁻ contiendrait les ST-CSH et les PMP, alors que la fraction LSK/CD34⁺/Flk2⁺ correspondrait aux PLC (Adolfsson *et al.*, 2001). Ces PLC conservent un potentiel de reconstitution restreint à la lignée lymphoïde (Figure 11).

Ces deux marqueurs définissent les CSH au potentiel de régénération à court terme. Maintenant je vais vous présenter les caractéristiques des CSH avec un potentiel de régénération à long terme.

B-I.4.1.3 Les LT-CSH

Les LT-CSH (figure 12) sont présentes dans la fraction LSK négative pour les récepteurs CD34 et Flt3/Flk2. Elles sont responsables de la reconstitution multi-lignage à long terme (Osawa *et al.*, 1996) (Adolfsson *et al.*, 2001), et représentent environ 10 % de la fraction KLS. Cette fraction est la plus enrichie en CSH, la transplantation d'une seule cellule de phénotype Lin⁻/c-Kit⁺/Sca-1⁺/Flk2⁻/CD34⁻ est capable de reconstituer à long terme le système lympho-hématopoïétique dans 21% des receveurs transplantés par rapport à la transplantation d'une cellule de la fraction Lin⁻/c-Kit⁺/Sca-1⁺/Thy.1-2⁻ qui ne donne une reconstitution à long terme que dans quelques receveurs (2%) (Smith *et al.*, 1991). Donc cette population purifiée devrait permettre l'analyse de l'auto-renouvellement et de la différenciation en multi-lignages d'une CSH individuelle (Osawa *et al.*, 1996).

Deux nouveaux marqueurs ont été identifiés pour caractériser les CSH : les glycoprotéines CD150 (SLAM) et CD48. Le CD150 est exprimé à la surface des CSH et non sur les PMP, alors que le CD48 est exprimé sur les progéniteurs mais ni sur les CSH ni sur les PMP. Donc les CSH sont LSK/CD34⁻

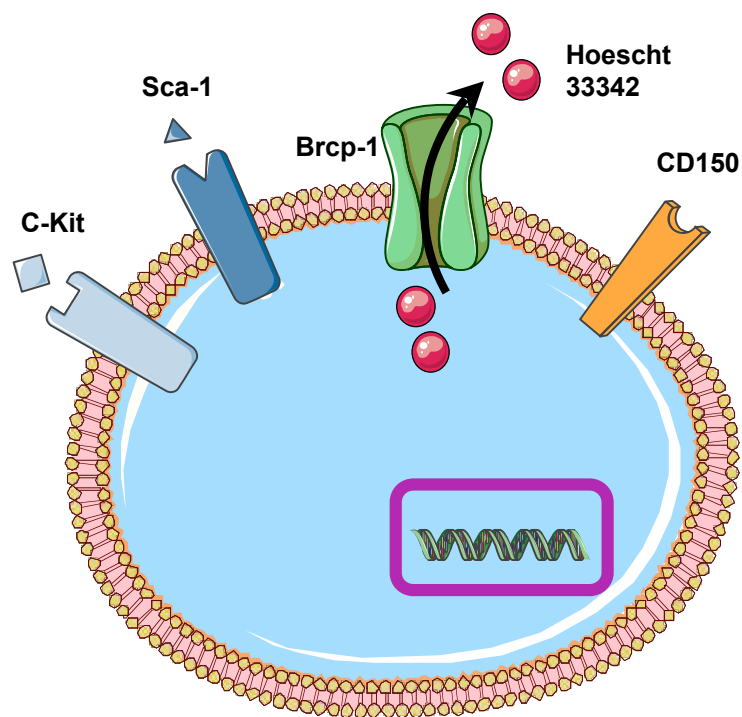


Figure 12 : Marqueurs pour le phénotypage des CSH long terme (LT-CSH) (Adapté de Wilson *et al.*, 2008)

/Flk2⁺/CD150⁺/CD48⁻ (Kiel *et al.*, 2005). Soixante dix pour cent des cellules de cette fraction sont en phase G₀ et moins de deux pour cent cyclent activement, ce qui confirme que les CSH sont bien dans cette fraction (Wilson *et al.*, 2008).

Les CSH présentent le phénotype « Side population » (SP), c'est-à-dire qu'elles ont la propriété d'effluer le Hoescht 33342 (Ho, un colorant vital de l'ADN) grâce à la protéine Bcrp1 appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette). Il a été montré que l'expression de l'ARNm *Bcrp1* (ou *Abcg2*) est forte dans les CSH et réprimée au cours de la différenciation. L'expression forcée de l'ADNc de *Abcg2* confère directement le phénotype SP aux cellules de la moelle osseuse et cause une réduction dans la maturation des progéniteurs *in vitro* et *in vivo*. Des expériences de transplantation montrent que la fraction SP est enrichie en CSH. De plus cette fraction contribue à la reconstitution des lignages lymphoïdes et myéloïdes. Ces résultats montrent que l'expression du gène *Bcrp1/Abcg2* est un déterminant important pour le phénotype SP et qu'il est un marqueur des CSH. L'expression de ce gène est un caractère conservé dans les cellules souches de nombreux tissus comme les muscles squelettiques, les CSH ou encore les cellules souches de la peau (Zhou *et al.*, 2001).

Certains de ces marqueurs phénotypiques ont été étudiés sur les CSG comme « SP », c-Kit et Thy.1, afin de les caractériser et de les purifier.

B-I.4.2 Les CSG-Characterisation phénotypique

Nous avons montré au laboratoire (figure 13) (Lassalle *et al.*, 2004) que les CSG mâles présentaient également un phénotype « Side Population » (Goodell *et al.*, 1996). Ce phénotype, qui caractérise 1% de la population totale testiculaire, est fondé sur l'efflux du Ho. Les cellules SP purifiées par cytométrie en flux ont été transplantées dans des testicules de souris stériles receveuses. On a observé une régénération de la spermatogenèse chez ces souris, démontrant ainsi que la population SP est enrichie en CSG. Des travaux de l'équipe du Dr. Brinster sur des modèles de souris cryptorchides ont montré que les CSG ne possédaient pas le phénotype SP (Kubota *et al.*, 2003). Ces résultats contradictoires avec les précédents pourraient s'expliquer par une dérégulation de l'expression des transporteurs de la famille ABC, responsables du phénotype SP, dans le modèle particulier de cryptorchidie (choc thermique). En effet, une autre équipe a montré, chez des souris normales mâles de 20 jours (premier cycle de spermatogenèse), que les CSG présentaient également le phénotype SP (Falcioni *et al.*, 2004).

Le récepteur c-Kit joue un rôle dans l'établissement de la lignée germinale au cours de la vie fœtale (Mauduit *et al.*, 1999). Dans le testicule adulte, les spermatogonies indifférenciées sont c-Kit négatives alors que les spermatogonies différenciées expriment le récepteur (Schrans-Stassen *et al.*, 1999). D'autre part, des transplantations de cellules c-Kit positives ou c-Kit négatives de souris cryptorchides ont montré que les CSG n'expriment pas ce récepteur (Shinohara *et al.*, 2000). Donc le marqueur c-Kit n'est pas commun aux CSG et aux CSH, puisque les CSH sont c-Kit positives.

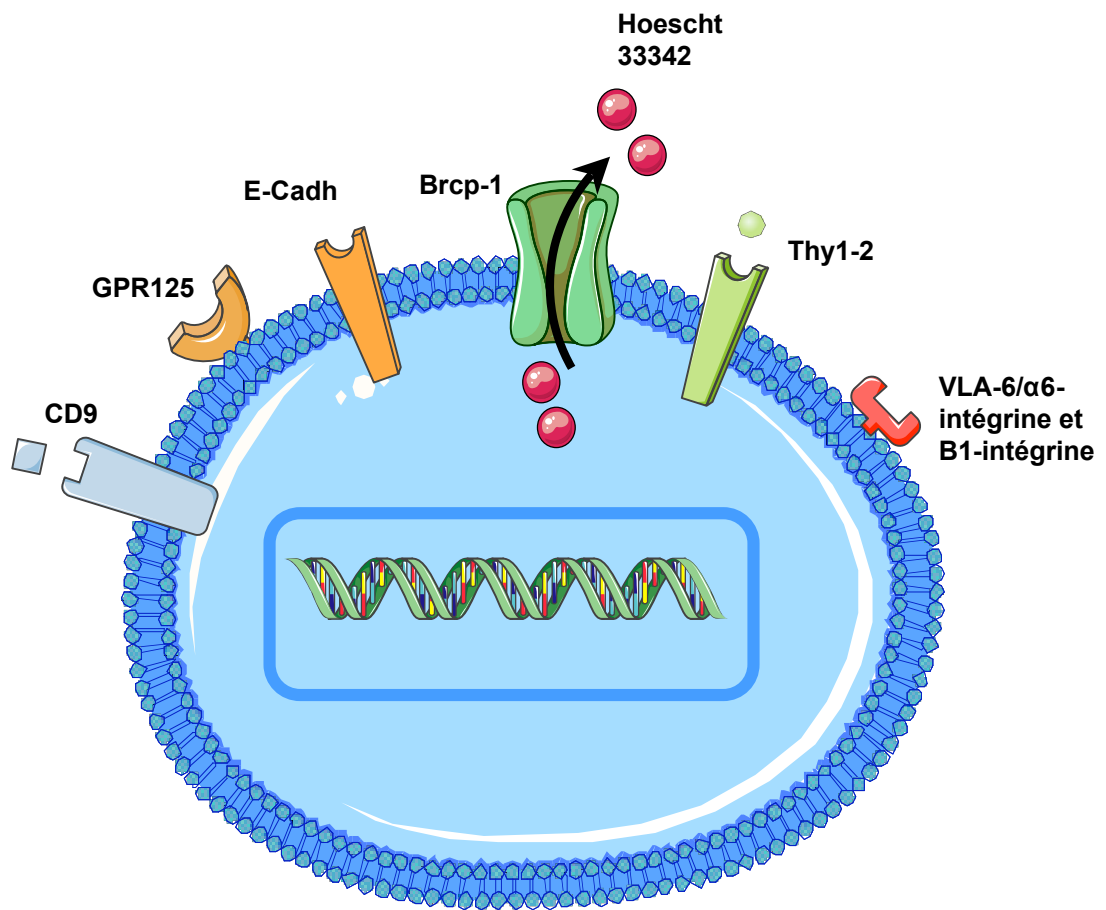


Figure 13 : Les récepteurs exprimés par les CSG

Le récepteur Thy-1 est un marqueur des cellules souches (CSH, mésenchymateuses et ES) (Pittenger *et al.*, 1999; Spangrude *et al.*, 1988). Des cellules germinales exprimant le récepteur Thy-1 ont été transplantées et une régénération de la spermatogenèse a été observée, montrant que le récepteur Thy-1 est exprimé à la surface des CSG (Kubota *et al.*, 2003). L'activité des CSG a été détectée exclusivement dans la fraction CMH-I négative (CMH-I : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de Classe I), qui est un marqueur des cellules somatiques.

Les CSG sont associées à la membrane basale. Elles expriment à leur surface le récepteur de la laminine : le VLA6 (Very Late Activation Antigen) constitué des chaînes intégrines α_6 et β_1 . La population exprimant les intégrines α_6 et β_1 a été transplantée dans des testicules de souris stériles et une restauration de la spermatogenèse a été observée (Shinohara *et al.*, 1999 ; Shinohara *et al.*, 2000).

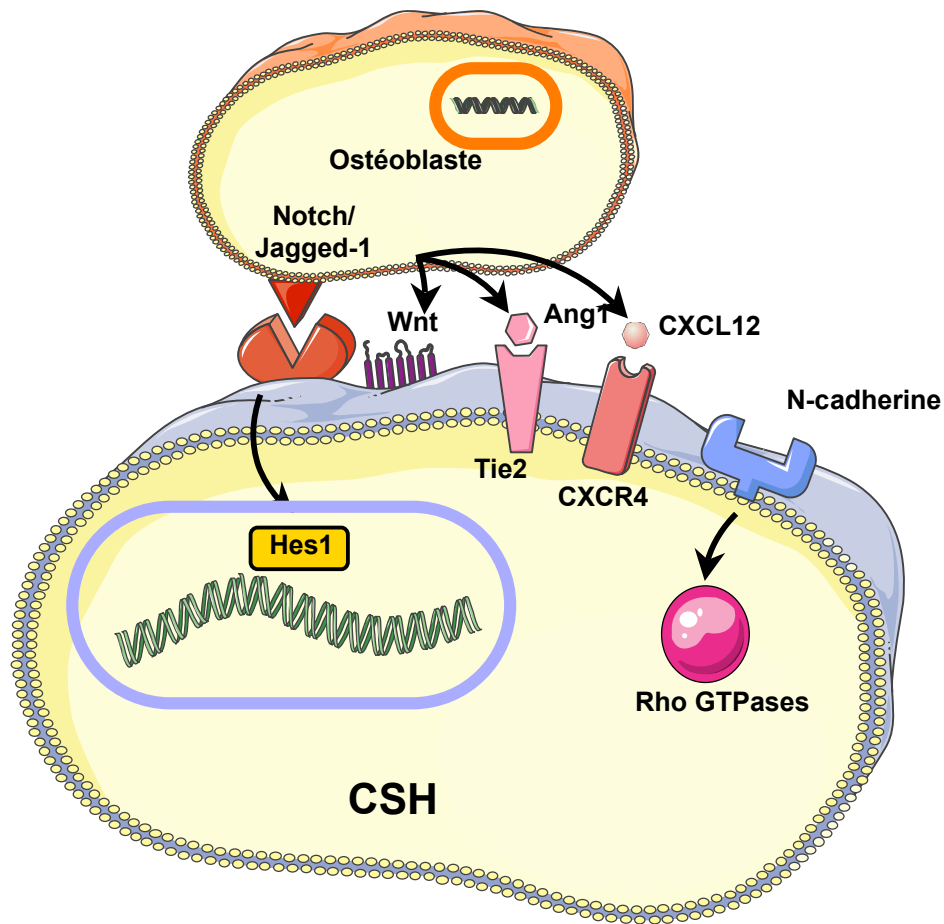
CD9, un récepteur interagissant avec l'intégrine α_6 a été décrit également comme étant un marqueur des CSG (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004b).

Des analyses histologiques montrent que les spermatogonies A expriment CDH1 (ou E-cadhérine) et forment des chaînes de 2, 4 ou 8 cellules. Les cellules E-cadh⁺ survivent après traitement des souris par des agents cytotoxiques comme le busulfan. Enfin, une fois transplantées dans des testicules receveurs irradiés, les cellules E-cadh⁺ sont capables de régénérer une spermatogenèse. Ces résultats montrent que les CSG expriment l'E-cadh (Tokuda *et al.*, 2007).

Un nouveau marqueur a été identifié à la surface des CSG et des progéniteurs chez l'adulte : le récepteur d'adhésion GPR125 (type-G-Protein-coupled Receptor 125). Des souris « knock-in », exprimant la protéine de fusion GPR125- β -galactosidase sous le contrôle du promoteur natif *Gpr125* ont été générées. La coloration histologique des testicules de ces souris par le substrat X-gal révèle que l'expression de GPR125 est restreinte aux spermatogonies. De plus, les cellules GPR125⁺ possèdent une expansion clonale en culture et lorsqu'elles sont transplantées, elles régénèrent une spermatogenèse. Ces cellules possèdent donc une activité de CSG (Seandel *et al.*, 2007).

Des fractions enrichies en cellules souches ont pu être obtenues à partir de mâles transgéniques exprimant un marqueur de surface hétérologue sous le contrôle du promoteur du gène *Stra8* (Stimulated by Retinoïc Acid gene 8) (Giuli *et al.*, 2002). Ce gène code une protéine exprimée lors de l'embryogenèse dans les gonades mâles, et chez l'adulte dans les cellules préméiotiques. *Stra8* semble jouer un rôle dans la phase préméiotique de la spermatogenèse (Oulad-Abdelghani *et al.*, 1996).

L'ensemble des marqueurs décrits ne permet cependant pas d'obtenir des populations pures de CSG. Toutes ces fractions restent hétérogènes et sont composées de cellules souches mais également de spermatogonies engagées en différenciation. Des stratégies combinant différents marqueurs permettent d'obtenir des fractions très enrichies en CSG : la fraction CMH-I⁻ Thy-1⁺ α -6⁺ reste la plus enrichie (1 CSG pour 30 cellules purifiées) (Kubota *et al.*, 2004a).



Voies de signalisation	Adhésion à la niche	Favorise la quiescence	migration	Auto-renouvellement
Tie2/Ang	●	●		
CXCL12/CXCR4	●	●	●	
Rho GTPases		●	●	
Notch		●		
Hes1: facteur de transcription régulé par Notch		●		
Wnt				●

Figure 14 : Les voies de signalisation importantes pour les CSH

On ne peut pas dire que les cellules souches germinales et hématopoïétiques ont un phénotype commun, en revanche, elles partagent certains marqueurs comme le phénotype « SP », l'expression de Thy.1 et des marqueurs d'adhésion.

B-I.4.3 Les Cellules souches hématopoïétiques - Caractérisation moléculaire

Un sujet central dans la biologie des cellules souches est de comprendre les mécanismes (voies de signalisation et facteurs de transcription) qui régulent leur auto-renouvellement.

Dans la niche de la moelle osseuse, les CSH sont considérées comme quiescentes, état qui jouerait un rôle déterminant dans la prévention de l'épuisement du stock de cellules souches. Elles entreraient de manière stochastique en cycle afin de remplir leurs fonctions d'auto-renouvellement et de différenciation (6 à 8 % des CSH cyclent par jour donc l'ensemble des CSH murines ont cyclé après 57 jours) (Morrison and Kimble, 2006). Cependant, des travaux récents suggèrent qu'il existerait deux compartiments dans la population de CSH définis par des cinétiques bien distinctes d'entrée en cycle (Wilson *et al.*, 2008) : une population quiescente (une division tous les 145 jours) et une population se divisant activement (tous les 36 jours).

La population quiescente possède les caractéristiques fonctionnelles des CSH (transplantation secondaire, reconstitution de tous les lignages) et la majorité du potentiel de reconstitution à long terme. Elle est activée en cas d'atteinte du tissu, après retour à l'homéostasie tissulaire, une fraction retourne à la quiescence. A l'état normal, la fraction quiescente serait ainsi le réservoir sanctuaire de CSH et le maintien de l'hématopoïèse serait assuré par la fraction se divisant activement. Les CSH quiescentes n'entreraient donc pas de manière stochastique en cycle, mais passeraient de la quiescence à l'auto-renouvellement en fonction des besoins tissulaires : maintien du tissu ou en réponse à un stress. Ces événements sont régulés par des signaux extrinsèques et intrinsèques.

B-I.4.3.1 Les signaux autocrines et paracrines

Une étude sur la signature moléculaire des CSH a révélé qu'environ 40% des produits de gènes sont impliqués dans des voies de signalisation *via* la fixation d'un ligand sur son récepteur (Ivanova *et al.*, 2002). Les CSH sont très influencées par l'environnement, seulement quelques voies de signalisation vont être décrites (Figure 14).

Les CSH expriment le récepteur Tie2, un récepteur à tyrosine kinase (Iwama *et al.*, 1993), dont le ligand est l'angiopoïétine-1 (Ang1), est exprimé par les ostéoblastes de la niche. Le couple Tie2/Ang1 permet le maintien en quiescence des CSH dans la niche, en préservant leur capacité d'auto-renouvellement. L'Ang1 augmente la capacité des CSH à devenir quiescentes, les souris qui surexpriment Ang1, possèdent deux fois plus de LSK quiescentes que les souris contrôles. De plus, dans les LSK/Tie2⁺, on observe une diminution de l'expression des gènes de mobilisation et l'ajout d'Ang1 dans leur milieu de culture entraîne une augmentation de l'expression de la β 1-intégrine, qui favorise leur adhésion aux ostéoblastes. Le traitement d'une souris avec un adénovirus exprimant l'Ang1 augmente de 37% sa survie après injection d'une dose létale de 5-FU (5-Fluoro-Uracile)

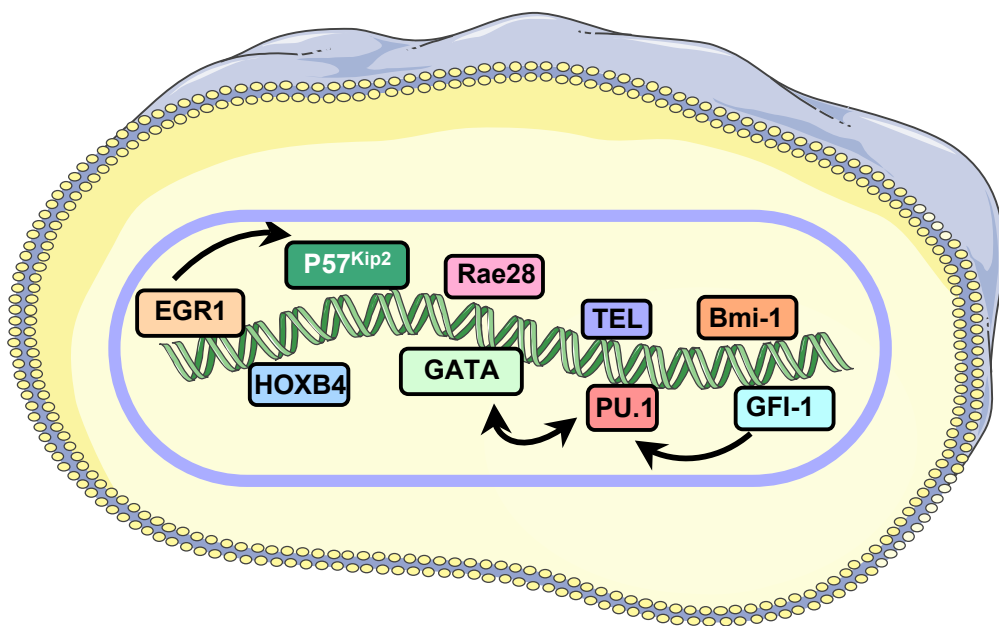
(myelosuppresseur). Donc la voie de signalisation Tie2/Ang1 protège les CSH du stress myelosuppressif, par induction de la quiescence (Arai *et al.*, 2004).

La voie de signalisation CXCL12/CXCR4, est également impliquée dans la régulation des CSH. L'expression de l'ARNm CXCR4 est plus forte dans la fraction LSK/CD34⁻ (fraction CSH quiescentes) que dans la fraction LSK/CD34⁺ (fraction CSH proliférantes). Lorsque *Cxcr4* est invalidé, une réduction massive du nombre de CSH (LSK/CD34⁻) et de la quiescence sont observées (augmentation du nombre de cellules cyclantes), ainsi qu'une augmentation de la sensibilité aux agressions myélotoxiques (5-FU) (Sugiyama *et al.*, 2006).

Les récepteurs Tie2 et CXCR4 sont importants pour la migration des CSH de la circulation sanguine vers la moelle osseuse, aussi bien que pour leur maintien dans leur micro-environnement.

D'autres protéines sont importantes pour la migration, comme les Rho GTPases (Guanosine TriPhosphatases), petites protéines G, membres de la superfamille Ras, et régulateurs essentiels de la fonction cellulaire et des voies de transduction du signal dans les cellules eucaryotes. Les membres de cette famille les plus étudiés sont Rho, Rac et Cdc42. Ces protéines jouent des rôles importants et distincts dans l'assemblage de l'actine, du cytosquelette et dans la mobilité. Ainsi, dans le modèle de souris conditionnelles invalidées pour le gène *Cdc42*, les CSH entrent en cycle plus activement entraînant une augmentation du nombre et de la fréquence des CSH/progéniteurs dans la moelle osseuse. Les CSH *Cdc42*^{-/-} ont une diminution de leur capacité d'adhésion, de migration et d'interaction avec la niche. La protéine Cdc42 semble être un coordinateur du maintien en quiescence et de l'interaction avec la niche (Yang *et al.*, 2007). De plus, dans les souris invalidées pour les gènes *Rac1* ou *Rac2*, on observe une mobilisation massive des CSH et des progéniteurs de la moelle osseuse dans le sang, due à un défaut dans l'adhésion des CSH à la niche. Les CSH et les progéniteurs *Rac1*^{-/-}, contrairement aux *Rac2*^{-/-} ont un défaut de repopulation après transplantation. Ces deux protéines agissent à la fois sur l'organisation de l'actine dans le cytosquelette, et sur la survie cellulaire et la prolifération (Gu *et al.*, 2003).

La voie Notch est une voie de transduction du signal hautement conservée. Elle est activée par Jagged-1, exprimé par les ostéoblastes, qui se lie à Notch-1 présent sur les CSH. Cette voie est active dans les CSH *in vivo* et est réprimée dans les cellules différenciées ; son inhibition entraîne une accélération de la différenciation *in vitro* et une diminution des CSH *in vivo* (Duncan *et al.*, 2005). De plus, le répresseur transcriptionnel Hes1 (Hairy Enhancer of Split 1) est un effecteur majeur de la voie Notch. Ce facteur de transcription est fortement exprimé dans les CSH et peu dans les progéniteurs (Yu *et al.*, 2006b). Dans les cellules tumorales, la voie Hes1 est activée afin d'éviter la différenciation et l'arrêt irréversible du cycle cellulaire. La surexpression de Hes1 dans les CSH entraîne une inhibition du cycle cellulaire *in vitro* et de l'expansion cellulaire *in vivo*, ce phénomène est associé avec une augmentation de p21^{cip1/waf1} (inhibiteur du cycle cellulaire). Hes1 induit par la voie Notch inhibe l'activité de GATA-1 afin d'empêcher la différenciation érythroïde/mégakaryocytaire



Facteurs de transcription	Auto-renouvellement	Favorise la quiescence	migration	Autre
Bmi-1	●			Induit senescence
Rae28	●			
HoxB4	●			
GFI-1	●	●		
PU.1	●			
GATA	●			différenciation
TEL	●		●	
EGR1		●	●	
P57 ^{Kip2}		●		

Figure 15 : Les facteurs de transcription importants pour les CSH

(Ishiko *et al.*, 2005). Donc Hes1 permet que l'arrêt du cycle cellulaire soit réversible durant la quiescence normale (Sang *et al.*, 2008 ; Yu *et al.*, 2006b).

De même pour la voie de signalisation Wnt, qui semble impliquée dans l'auto-renouvellement des CSH. Cette voie est active pendant le développement embryonnaire et chez l'adulte. Elle active les β -caténines. La surexpression de la β -caténine augmente le pool de CSH dans les cultures à long-terme. De plus, dans leur micro-environnement normal, les CSH sont activées par LEF1/TCF (Lymphoïde Enhancer binding Factor 1 ; T Cell specific Factor), facteur de transcription cible de la voie Wnt *via* les β -caténines. Lorsque la voie Wnt est inhibée, on observe une diminution de la croissance des CSH *in vitro* et une diminution de la reconstitution *in vivo*. Enfin, l'activation de la voie Wnt dans les CSH induit l'augmentation de l'expression de *HoxB4* et *Notch1*, deux gènes impliqués dans l'auto-renouvellement des CSH. Donc la voie de signalisation Wnt est importante pour l'auto-renouvellement des CSH *in vitro* et *in vivo* (Reya *et al.*, 2003).

B-I.4.3.2 Les facteurs de transcription

Ces voies de signalisation précédemment décrites régulent notamment la transcription génique qui joue un rôle important dans les CSH (Ivanova *et al.*, 2002). Je ne décrirai que l'implication de quelques facteurs de transcription (Figure 15)

Certains membres de la famille des gènes Polycombs (PcG) jouent un rôle dans l'auto-renouvellement des CSH. Ces gènes, répresseurs transcriptionnels par remodelage de la chromatine des homéogènes *Hox*, sont impliqués dans le développement embryonnaire.

Le proto-oncogène *Bmi-1*, membre de la famille des PcG, est exprimé par les CSH fœtales et adultes de souris. Il est impliqué dans la sénescence des fibroblastes, le développement des lymphocytes, l'auto-renouvellement des cellules souches neurales et la transformation maligne. L'expression de *Bmi-1* diminue au cours de la mise en place de l'hématopoïèse, et il est fortement exprimé dans les CSH. Dans le foie fœtal des souris invalidées pour *Bmi-1*, on observe un nombre normal de CSH, alors que dans la moelle osseuse leur nombre est nettement réduit. Ce modèle de souris présente une anémie aplasique, due à une diminution progressive des CSH, létale vers la vingtième semaine post natale. Les progéniteurs dérivant des CSH *Bmi-1*^{-/-} diminuent et ont un plus faible potentiel de prolifération (van der Lugt *et al.*, 1994). La transplantation de CSH *Bmi-1*^{-/-} du foie fœtal ou de la moelle osseuse montre une hématopoïèse transitoire avec un déficit de régénération à long terme. L'expression des gènes de survie cellulaire, des facteurs de transcription et de gènes modulant la sénescence est modifiée. Par exemple, l'expression des gènes de sénescence *p16^{nk4a}* et *p19^{Arf}* est augmentée dans les CSH *Bmi-1*^{-/-}. Ces résultats confirment que Bmi-1 est essentiel pour l'auto-renouvellement des CSH, lié à leur épuisement par induction de la sénescence (Park *et al.*, 2003).

Un autre membre de cette famille joue un rôle dans l'autorenouvellement des cellules souches : Rae28 (aussi appelé Mph1). Les souris invalidées pour *Rae28* meurent à la naissance. L'activité hématopoïétique est diminuée dans le foie fœtal de ces animaux, avec une diminution progressive des PMP et une faible expansion des CFU (Colony Forming Units) de la rate durant le

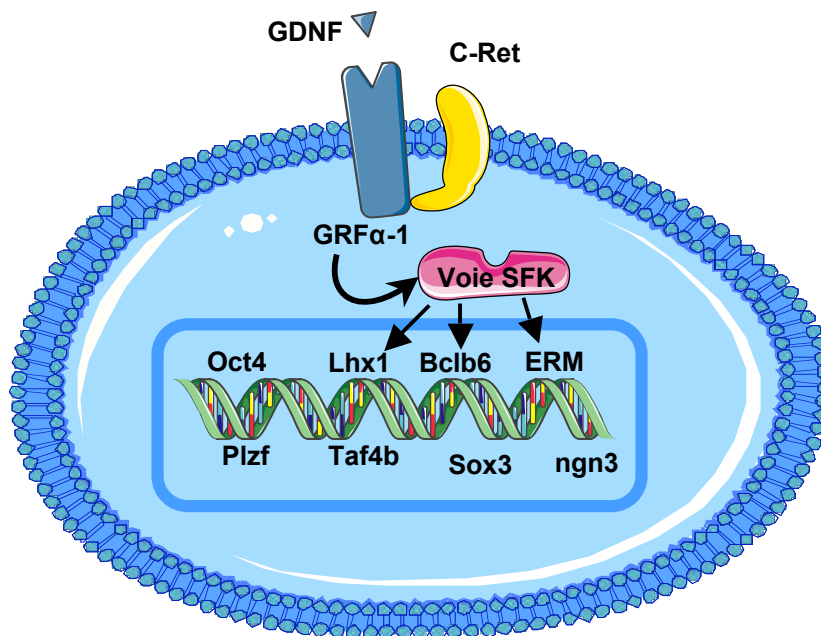
développement. La capacité de repopulation après transplantation des cellules *Rae28*^{-/-} issues du foie fœtal est diminuée d'un facteur 20 et leur activité d'auto-renouvellement est diminuée de 15 fois. *Rae28* semble jouer un rôle important dans le maintien de l'activité des CSH et de l'hématopoïèse, et pourrait être impliqué dans la régulation de l'expression des gènes *Hox* (Takahara *et al.*, 1997) (Ohta *et al.*, 2002).

D'autre part, les gènes homéogènes de la famille *Hox* jouent un rôle important dans le développement embryonnaire et dans l'auto-renouvellement des cellules souches chez l'adulte. Lorsque le facteur de transcription *HoxB4* est surexprimé dans la moelle osseuse, on observe une augmentation des CSH *in vivo* et *in vitro* : des CSH humaines en culture sur des cellules stromales exprimant *HoxB4* augmente leur croissance et leur capacité de repopulation. Il apparaît ainsi comme un régulateur positif de l'auto-renouvellement des CSH (Sauvageau *et al.*, 1995) (Amsellem *et al.*, 2003).

Le gène *Gfi-1* (Growth Factor Independent 1) code une oncoprotéine à doigt de zinc, répresseur transcriptionnel. Il est exprimé dans les CSH, dans les progéniteurs communs lymphoïdes (PCL) et dans les progéniteurs granulo/monocytaires. L'inactivation de *Gfi-1* chez la souris entraîne une augmentation de la prolifération des CSH et donc un épuisement de leur pool, ainsi que l'absence des PCL. Ces CSH *Gfi-1*^{-/-} ont une faible capacité de recolonisation à long terme et montrent une plus forte proportion de CSH cyclantes dans les receveurs. Ces résultats montrent que *Gfi-1* restreint la prolifération des CSH afin de réguler leur auto-renouvellement et préserver leur intégrité fonctionnelle. *In vitro*, *GFI-1* module l'activité transcriptionnelle de PU.1 et interagit physiquement avec ce dernier. Ceci souligne un rôle potentiel de PU.1 même si le défaut de CSH est toujours présent dans les souris *Gfi-1*^{-/-} *PU.1*^{+/-} (Dahl *et al.*, 2007).

Le facteur de transcription PU.1 est un régulateur clé du développement hématopoïétique mais son rôle à chaque stade est mal connu. C'est pourquoi un modèle de knock-out conditionnel murin a été réalisé. Ce modèle a permis de démontrer que les CSH expriment PU.1 et que son expression constitutive est nécessaire au maintien du pool de CSH dans la moelle osseuse. PU.1 joue un rôle indispensable et distinct dans le développement hématopoïétique *via* un soutien dans l'auto-renouvellement des CSH et en les engageant vers la maturation des lignées myéloïdes et lymphoïdes (Iwasaki *et al.*, 2005). De plus, PU.1 semble interagir physiquement *via* son domaine ETS avec GATA-1 et GATA-2. Cette interaction permet de réguler l'engagement des CSH dans le lignage myéloïde (PU.1) ou érythroïde (GATA) : GATA-1 inhibe PU.1 lors de l'érythropoïèse et réciproquement PU.1 inhibe GATA-1 durant la myélopoïèse (Zhang *et al.*, 1999).

Les membres de la famille GATA, se lient à l'ADN sur une séquence à motif GATA et jouent un rôle important dans l'érythropoïèse, l'inactivation *in vivo* des gènes *GATA-1* ou *GATA-2* entraîne une mort embryonnaire due à une anémie. Ces gènes semblent donc être impliqués très tôt dans le développement mais aussi pendant l'hématopoïèse adulte car la surexpression de *GATA-2* dans les CSH entraîne un blocage de leur expansion et différenciation. Il semble que l'effet de *GATA-2* soit



Nom	Type	Auto-renouvellement	différenciation	Autre
GFRα-1	Récepteurs			
c-RET				
SFK	Voie de signalisation			Bloque l'expression de BCL6B, ERM, LHX1
ERM	Facteurs de transcription			
BCL6B				
LHX1				
PLZF				
TAF4B				Régule PLZF et c-RET
SOX3				Interaction NGN3
NGN3				Interaction SOX3
OCT4				Colonisation

Figure 16 : Les récepteurs, les voies de signalisation et les facteurs de transcription impliqués dans l'auto-renouvellement et la différenciation des CSG.

dose-dépendant car les souris *GATA-2*^{+/-} montrent deux fois moins de LSK/CD34⁺ dans leur moelle osseuse. De plus les LSK présentent une diminution de leur capacité à régénérer une hématopoïèse. On observe une augmentation de la quiescence des LSK *GATA-2*^{+/-} ainsi qu'une augmentation de leur apoptose, due à une diminution de Bcl-x_L (protéine anti-apoptotique qui est deux fois moins exprimée). La quantité de *GATA-2* régule les CSH adultes en affectant certaines de leurs fonctions (Persons *et al.*, 1999 ; Rodrigues *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 1994).

Similairement, le gène *Tel* (Translocation-ETS-Leukemia) ou *Etv6*, code un facteur de transcription de la famille ETS. L'invalidation de *Tel* induit une mort embryonnaire due à un problème d'angiogenèse. Des souris chimères ont été générées à partir de cellules ES *Tel*^{-/-}, ce qui a permis de déterminer que la fonction de *Tel* est essentielle à l'établissement de l'hématopoïèse. Chez les chimères, le défaut se manifeste dans la première semaine post-natale c'est-à-dire pendant la transition des CSH du foie fœtal vers la moelle osseuse. Ceci reflète une incapacité des CSH et progéniteurs *Tel*^{-/-} à migrer et/ou à se loger dans la niche de la moelle osseuse (Wang *et al.*, 1998). Donc *Tel* est un régulateur essentiel et sélectif des CSH adultes (Hock *et al.*, 2004).

Des facteurs sont impliqués dans la quiescence et le maintien des CSH dans leur niche, mais aussi dans la migration des CSH vers leur niche. Par exemple, lorsque *Egr1* est invalidé, le nombre de CSH en prolifération est augmenté, une mobilisation spontanée et frappante des CSH dans le sang périphérique est observée. EGR1 (Early Growth Response 1) est un facteur de transcription qui intervient dans la croissance, le développement et la réponse au stress dans plusieurs tissus. Dans la moelle osseuse, il régule l'homéostasie des CSH où il est fortement exprimé puis son expression diminue fortement lorsque la division ou la migration sont activées. La capacité de ce simple facteur à réguler la prolifération et la mobilisation des CSH suggère qu'EGR1 commande un programme génétique qui coordonne la division et la migration des CSH afin que leur nombre et leur fonction soient optimisés (Min *et al.*, 2008). Par exemple, on sait qu'EGR1 active l'inhibiteur de cycle p57^{Kip2}, un régulateur du cycle cellulaire, exprimé dans les CSH (Roeb *et al.*, 2007; Umemoto *et al.*, 2005).

B-I.4.4 Les Cellules souches germinales - Caractérisation moléculaire

Tout d'abord, nous décrivons quelques gènes impliqués dans l'auto-renouvellement puis ceux impliqués dans la différenciation (Figure 16).

Le GDNF (exprimé par les cellules de Sertoli) va se lier à son complexe récepteur, formé des récepteurs GFR- α 1 (GDNF family receptor- α 1) et c-Ret (récepteur à tyrosine kinase). Les souris invalidées pour les gènes *Gfr- α 1* et *C-ret* ont le même phénotype que les souris *Gdnf*^{-/-} : les souris meurent quelques jours après la naissance à cause d'anomalies rénales et neuronales (Moore *et al.*, 1996), indiquant que le signal GDNF passe par le complexe GFR- α 1/c-Ret essentiel à la survie post natale chez la souris. Avant la naissance, les testicules des souris *Gfr- α 1*^{-/-} ou *c-Ret*^{-/-} sont normaux. La transplantation de testicules néonataux de souris *Gfr- α 1*^{-/-} et *c-Ret*^{-/-} dans des souris immunodéficientes, a permis de révéler que l'invalidation de la voie de signalisation GDNF *via* c-Ret entraîne une perte de l'auto-renouvellement des CSG et induit une déplétion progressive des

testicules en cellules germinales. Donc GDNF, GFR- α 1 et c-Ret sont importants pour le maintien des CSG (Naughton *et al.*, 2006).

La rareté des CSG dans le testicule est la raison majeure de la limitation des expériences *in vivo* dans l'analyse de leur auto-renouvellement et de leur différenciation. L'utilisation d'un système *in vitro* qui conserve cet auto-renouvellement permet d'analyser directement l'effet de la perte d'une molécule spécifique sur l'activité des CSG sans l'effet de facteurs secondaires (qui pourraient agir *in vivo*). La combinaison de ce système de culture avec le test fonctionnel de transplantation permet d'étudier l'auto-renouvellement des CSG. Grâce à toutes les études sur les systèmes de culture, on sait que le GDNF est un facteur essentiel de l'auto-renouvellement des CSG de souris. Des études de transcriptomiques sur des CSG en culture après stimulation au GDNF ont permis d'établir une liste de gènes régulés par le GDNF. Ces études ont identifié la sur-régulation transcriptionnelle de facteurs de transcription comme *Bcl6b* (B cellCLL/lymphoma 6), *Erm* (ou ETV5 : Ets variant gene 5) et *Lhx1* (Lim homeobox protein 1) (Oatley *et al.*, 2006). Chacun de ces facteurs a une fonction dans d'autres types cellulaires. Par exemple, l'invalidation de *Bcl6b* entraîne une diminution de la prolifération des lymphocytes B, *Erm* affecte la croissance globale et le développement lorsqu'il est inhibé et *Lhx1* inactivé induit des déformations cranofaciales et une inhibition morphologique des gonades (Schlessner *et al.*, 2008; Shawlot and Behringer, 1995). Afin de voir l'implication de ces facteurs, leur expression a été transitoirement inhibée grâce à des RNAi. Une diminution de l'expansion *in vitro* des CSG a été observée dans les trois cas, ce qui suggère fortement que ces facteurs de transcription jouent un rôle important dans l'auto-renouvellement des CSG. De plus, l'invalidation *in vivo* des gènes *Bcl6b* ou *Erm* (qui est aussi exprimé par les cellules de Sertoli, comme décrit précédemment) entraîne une défaillance de la spermatogenèse : une perte du maintien de l'auto-renouvellement des CSG mais sans blocage de la différenciation spermatogoniale, des tubules séminifères ont un phénotype de cellule de Sertoli-Cell-Only (SCO). On observe donc une déplétion progressive du tissu germinale qui mène à une stérilité. Ces observations phénotypiques suggèrent que la fonction des CSG est altérée lorsque *Bcl6b* ou *Erm* sont invalidés (Chen *et al.*, 2005; Oatley *et al.*, 2007).

De plus, la stimulation *in vitro* des CSG par le GDNF, entraîne l'activation de la voie de signalisation SFK c'est-à-dire *via* les kinases de la famille Src. Une diminution pharmacologique de cette voie bloque complètement l'induction de l'expression des gènes *Bcl6b*, *Erm* et *Lhx1* par le GDNF, sans affecter la survie cellulaire. La régulation extrinsèque par le GDNF active la voie intrinsèque SFK qui stimule à son tour l'expression des gènes *Bcl6b*, *Erm* et *Lhx1*. En revanche, dans les mêmes conditions, un blocage pharmacologique de la voie Akt entraîne une augmentation de l'apoptose et une diminution de l'expression de gènes qu'ils soient ou non régulés par le GDNF. Donc la voie Akt semblerait impliquée dans la survie, mais pas dans la régulation de l'auto-renouvellement induit par le GDNF (Lee *et al.*, 2007; Oatley *et al.*, 2007 ; Oatley *et al.*, 2006).

L'expression de plusieurs régulateurs de la transcription a été associée à la fonction des CSG comme *Plzf* et *Taf4b* qui sont exprimés dans une sous-population de spermatogonies, incluant les CSG. L'invalidation de ces gènes entraîne une défaillance de la spermatogenèse avec une perte progressive en cellules germinales, dépendante de l'âge.

Récemment, il a été montré que le répresseur transcriptionnel *Plzf* (Promyelotic Leukemia Zinc-Finger) est impliqué dans l'auto-renouvellement des CSG : dans les testicules des souris mâles *Plzf*^{-/-}, on observe un phénotype SCO. Lorsque l'on transplante des cellules germinales *Plzf*^{-/-}, on n'observe pas de recolonisation du testicule, suggérant ainsi un défaut intrinsèque des CSG. De plus, l'analyse transcriptomique des spermatogonies *Plzf*^{-/-} a révélé une altération dans le profil d'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, le métabolisme, le cytosquelette et des facteurs de transcription (Buaas *et al.*, 2004 ; Costoya *et al.*, 2004)

D'autre part, le facteur TAF4b (TBP-Associated Factors) est un facteur spécifique des gonades qui est impliqué dans le complexe TFIID (noyau du complexe de l'ARN Polymérase). Ce facteur est requis pour le maintien de la spermatogenèse. Les souris mâles invalidées pour *Taf4b* sont fertiles à la naissance (avec des tubules séminifères normaux), mais à trois mois, ces mâles deviennent stériles avec l'apparition de tubules vides, une diminution de 10 fois du nombre de spermatozoïdes, et ces derniers possèdent un défaut de mobilité et de maturation. Une analyse transcriptomique suggère que ce défaut soit dû à une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement des CSG comme *Stra8*, *Plzf*, *c-Ret* et *Gfr-α1*, entraînant une diminution de la prolifération des spermatogonies et de l'expression de gènes de méiose. Lorsque l'on transplante des CSG dans des testicules de souris *Taf4b*^{-/-} on observe une reprise de la spermatogenèse et une expression normale du GDNF, confirmant que l'infertilité des souris est due à une défaillance des CSG et non du micro-environnement (Falender *et al.*, 2005).

D'autres gènes ont été décrits pour participer à la différenciation des CSG.

Sox3 (Sry-related HMG box) est un facteur de transcription exprimé dans les progéniteurs neuronaux et dans les gonades. Lors de la spermatogenèse, il est exprimé dans les spermatogonies A_s à A_{al}, et colocalise avec *Ngn3* (Neurogénine 3). L'expression de *Sox3* est limitée aux cellules germinales en prolifération. Les souris invalidées pour *Sox3* ont un développement embryonnaire normal, en revanche on observe une stérilité précoce chez le mâle et la femelle, observée 10 jours après la naissance. On observe un hypogonadisme (le poids des testicules est réduit de 42%), et une diminution du nombre de spermatozoïdes (Weiss *et al.*, 2003). L'invalidation de *Sox3* entraîne une diminution de l'expression de *Ngn3* et une augmentation d'*Oct4*, marqueur des spermatogonies indifférenciées, indiquant que la régulation *via Sox3* pourrait passer par *Ngn3*. Ce facteur est donc indispensable pour la spermatogenèse et serait impliqué dans la différenciation des spermatogonies (Raverot *et al.*, 2005).

D'autre part, *Ngn3*, un facteur de transcription de la classe bHLH (basic hélice-boucle-hélice), exprimé dans les spermatogonies indifférenciées (c-Kit⁺), c'est-à-dire dans les spermatogonies (A_s à A_{al}). Les cellules *Ngn3*⁺ forment des chaînes de 2, 4, 8, 16 ou 32 cellules reliées par des ponts inter-

cytoplasmiques. Il n'est pas exprimé dans les CGP. Des expériences de transplantations ont montré que les CSG expriment le marqueur Ngn3. Ce facteur semble également impliqué dans la différenciation des spermatogonies (Yoshida *et al.*, 2004).

Le facteur de transcription Oct4 est un membre de la famille POU. Il est exprimé dans de nombreux tissus embryonnaires et associé à la totipotence. Une souris transgénique a été réalisée où la séquence codante EGFP est fusionnée aux séquences régulatrices d'*Oct4*. Ce modèle a permis de mettre en évidence que les spermatogonies A expriment Oct4 et la transplantation de la fraction EGFP⁺ possède une capacité de régénération de la spermatogenèse trente fois supérieure à la fraction EGFP négative. Donc le facteur de transcription Oct4 est exprimé dans les spermatogonies A et notamment dans les CSG. Ce facteur semble être une molécule cruciale à la propriété souche des spermatogonies mais pas dans leur survie (Ohmura *et al.*, 2004). De plus, l'invalidation de *Oct4* par un shRNA dans des cultures de CSG, induit une diminution de leur capacité de colonisation. *Oct4* joue donc un rôle dans le maintien et dans la capacité de colonisation des CSG en culture. Cette invalidation n'affecte pas l'expression de *Plzf*, suggérant qu'*Oct4* ne le régule pas directement. Cette étude propose un modèle dans lequel Oct4 et Plzf maintiennent les CSG dans un état indifférencié et l'acide rétinolique induit la différenciation spermatogoniale par l'inhibition directe ou indirecte de Oct4 et Plzf (Dann *et al.*, 2008).

Dans cette partie du manuscrit, que ce soit pour les CSH ou pour les CSG, je n'ai développé que l'implication de quelques voies et facteurs. De part mon étude, on pourrait croire que les CSH et CSG ne possèdent pas les mêmes voies de régulation. Or, il y a d'autres voies et facteurs qui sont communs et importants dans ces tissus.

Par exemple, la voie de signalisation Notch est aussi impliquée dans le tissu germlinal car la délétion de *Hes1* entraîne un blocage de la voie Notch dans les cellules de Leydig, ce qui mène à une augmentation de leur nombre. De même lorsque cette voie est sur-exprimée, on a une diminution du nombre de cellules de Leydig. Cette variation cellulaire entraîne une perte de cellules germinales et un défaut dans la structure du testicule, qui devient non fonctionnel. Ces données confirment que la régulation des cellules somatiques est cruciale pour la bonne fonctionnalité tissulaire (Tang *et al.*, 2008).

De même, le facteur de transcription Bmi-1, est exprimé dans les spermatogonies indifférenciées, lorsqu'il est sur-exprimé dans des cultures de CSG, il induit une prolifération des spermatogonies et son inhibition par des RNAi entraîne une diminution de la prolifération (Zhang *et al.*, 2008a).

On peut donc dire que les cellules souches possèdent certainement des voies et des facteurs communs pour réguler leurs fonctions d'auto-renouvellement, de migration/nichage et de différenciation.

B-II La plasticité des cellules souches

Le dogme sur les cellules souches qui a été longuement admis est que chaque tissu adulte possède un type de cellule souche spécifique qui assure son renouvellement. Mais depuis quelques années,

une notion de « plasticité » des cellules souches a émergé. Cette « plasticité » est la capacité des cellules souches spécifiques d'un organe à régénérer d'autres tissus par un processus de trans-différenciation offrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques (Orkin, 2000).

B-II.1 La plasticité des tissus adultes

Au début des années 2000, de nombreuses études ont illustré cette notion de plasticité. Par exemple, il a été montré que des CSH hautement purifiées peuvent participer à la régénération hépatique dans un modèle de souris tyrosinémique (Lagasse *et al.*, 2000).

La transplantation des CSH dans des souris *mdx* (modèle de dystrophie musculaire de Duchenne) entraîne la reconstitution du compartiment hématopoïétique et une incorporation des cellules dérivées du donneur dans le muscle. Dans ces muscles affectés, on observe alors une restauration partielle de l'expression de la dystrophine car les cellules donneuses sont fonctionnelles (Gussoni *et al.*, 1999).

Dans des souris irradiées létalement rendues ensuite ischémiques par occlusion/reperfusion de l'artère coronaire, la transplantation de CSH purifiées entraîne la différenciation de ces cellules en cardiomyocytes et en cellules endothéliales afin de contribuer à la réparation du tissu et à sa fonctionnalité (Goodell *et al.*, 2001).

D'après ces différents résultats, les CSH de la moelle osseuse en plus de générer les différentes cellules sanguines, peuvent aussi générer des cellules matures différenciées non-hématopoïétiques de multiples tissus incluant le cœur (myocytes), le poumon, la peau et le muscle squelettique (Herzog *et al.*, 2003).

En conclusion les cellules souches et des progéniteurs engagés dans un lignage donné pourraient encore manifester une grande souplesse de développement.

Cependant cette notion de plasticité a été très controversée et en 2002, plusieurs conclusions antérieures qui plaidaient en faveur d'une « plasticité » des cellules adultes ont été réfutées. Des études récentes de transplantation de cellules de la moelle osseuse dans différents tissus ont montré qu'il existait un mécanisme de fusion cellulaire entre les cellules du donneur et celles du receveur (entraînant la production d'hétérocaryon), qui seraient responsable du chimérisme observé et non pas un réel processus de trans-différenciation (Herzog *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003).

En revanche, des travaux analogues sur le tissu germinale adulte ont montré une plasticité de ce tissu : plasticité des CSG chez la souris et l'homme, et plasticité des progéniteurs chez *Drosophila* qui seront développés par la suite.

B-II.2 Reprogrammation des CSG

La spermatogenèse est un processus complexe qui est initié par une petite population de CSG. Bien que ces cellules soient dites unipotentes, c'est-à-dire qu'elles sont restreintes à la production de gamètes au cours du développement normal de l'individu, plusieurs observations suggèrent que dans certaines conditions, les CSG sont capables de devenir des cellules multipotentes.

Plusieurs cas de plasticité des CSG ont été observés. Tout d'abord, Boulanger et al. ont montré qu'une population de CSG et de progéniteurs spermatogoniaux pouvaient se différencier en cellules épithéliales mammaires après transplantation (Boulanger et al., 2007).

D'autre part, les CSG issues de testicules de souris néonatales mises en culture pendant une longue période (5 mois environ) en présence de GDNF, EGF, FGF2 et LIF sont capables de proliférer et de générer des colonies germinales. Ces colonies restaurent la fertilité des testicules stériles de souris dans lesquels elles ont été transplantées (Kanatsu-Shinohara et al., 2003). Cependant, un autre type de colonies morphologiquement différentes apparaît avec une faible fréquence. Ces colonies atypiques peuvent être amplifiées après transfert dans un milieu de culture pour cellules ES en présence de LIF (Kanatsu-Shinohara et al., 2004a). De plus, ces cellules injectées en sous-cutané ou dans des tubules séminifères de souris receveuses stériles donnent des tératomes, qui est une des caractéristiques des cellules ES (Brinster and Avarbock, 1994). Elles se différencient *in vitro* dans les trois feuillets embryonnaires. Enfin, lorsque ces cellules sont injectées dans des blastocytes, elles participent au développement embryonnaire normal, et un chimérisme est observé dans différents lignages dont la lignée germinale. Ce deuxième type de colonies possède les caractéristiques des cellules ES sauf qu'elles sont issues de cellules germinales, ces cellules sont appelées des mCSG (Cellules Souches Germinales multipotentes ou »ES-like «) (Kanatsu-Shinohara et al., 2004a). Il a été démontré que les deux types de clones, CSG et mGSC, sont obtenus à partir d'une cellule fondatrice souche commune (Kanatsu-Shinohara et al., 2008a).

Cette multipotentialité acquise par les CSG est également décrite à partir de cellules souches adultes (Seandel et al., 2007) (Guan et al., 2006). Des fractions enrichies en CSG positives pour les marqueurs de cellules souches GPR125 ou *stra8* sont cultivées dans des milieux spécifiques. Les colonies atypiques formées sont transférées dans les conditions de culture de cellules ES. Elles s'amplifient et acquièrent les propriétés des cellules ES. Les mCSG ainsi formées sont capables de redonner les trois feuillets embryonnaires et elles contribuent à la formation de différents organes (tissu cardiaque, vasculaire, neuronal).

La mise en culture d'une fraction enrichie en CSG issues de biopsies de testicules adultes humains a permis de mettre en évidence que les CSG humaines (tous comme les CSG murines) sont également capables de se reprogrammer *in vitro* en cellules mCSG humaines. Ces dernières sont capables de donner *in vitro* des tératomes et de se différencier prouvant la multipotence des CSG humaines adultes (Conrad et al., 2008).

Les CSG (qu'elles soient murines ou humaines) en culture ont à la fois la capacité de reconstituer une spermatogenèse et de se transformer en mCSG. Ces cellules sont donc des cellules souches unipotentes qui ont la capacité de réacquérir la multipotence sous certaines conditions. Ces mCSG pourraient également constituer une source alternative aux ES et aux iPS (« induced Pluripotent Stem cells ») récemment décrites pour la thérapie cellulaire (Hanna et al., 2008) (Aoi et al., 2008). En effet, des cardiomyocytes et des cellules endothéliales ont été obtenues à partir de ces cellules pluripotentes « ES-like » issues de culture de GSC (Baba et al., 2007) (Guan et al., 2007).

B-II.3 Reprogrammation des progéniteurs germinaux

Les progéniteurs sont considérés comme étant définitivement engagés en différenciation et plus proliférants. Ils perdent ainsi la capacité d'autorenouvellement et de régénération à long terme d'un tissu, qui est la propriété des cellules souches.

Cependant, les progéniteurs germinaux mâles et femelles chez *Drosophila* révèlent une certaine plasticité et une capacité à modifier leur destin cellulaire. Ces progéniteurs peuvent en effet se dédifférencier pour contribuer à la régénération du stock de CSG (Brawley and Matunis, 2004) (Kai and Spradling, 2004).

Dans la lignée germinale mâle de *Drosophila*, la voie de signalisation Jak/Stat contrôle l'autorenouvellement des CSG. Dans des expériences, ils ont utilisé un mutant conditionnel réversible de cette voie, inductible par la température. L'invalidation de Jak/Stat induit la différenciation des CSG sans auto-renouvellement ce qui entraîne la déplétion du pool de CSG. Après réactivation de cette voie en changeant la température, ils ont observé le repeuplement des niches vides par les spermatogonies entrées en différenciation. Ce phénomène est lié à la rupture des cystes (groupes de spermatogonies interconnectées). Elles réacquièrent alors un statut de cellules souches et contribuent à la régénération du tissu (Brawley and Matunis, 2004).

Récemment, des travaux suggèrent que de nouvelles CSG sont produites régulièrement par dédifférenciation des progéniteurs au cours du vieillissement pour maintenir le stock de CSG. Ce processus de dédifférenciation semble également important dans le maintien du stock de CSG après irradiation (Cheng *et al.*, 2008).

De la même manière, la surexpression de la protéine BAM (Bag of Marbles, protéine impliquée dans la différenciation) dans la lignée germinale femelle de la *Drosophila* entraîne la différenciation des CSG en progéniteurs (cystes) sans autorenouvellement. A l'aide d'un transgène *Bam* inductible par la température, ils ont montré que les progéniteurs pouvaient se dédifférencier en CSG après séparation des progéniteurs du cyste (Kai and Spradling, 2004).

Chez la souris, il a été récemment montré que les descendants directs des CSG (spermatogonies A_{pr}) avaient le potentiel d'acquérir à nouveau les fonctions de CSG (Yoshida *et al.*, 2007a). Les auteurs ont développé un modèle original afin de tracer les spermatogonies indifférenciées. Ils ont utilisé une souris exprimant une version inductible par le tamoxifène de la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de Ngn3 (Ngn3/CreERTM), ainsi que des souris transgéniques CAG-CAT-LACZ et CAG-CAT-EGFP. Les protéines rapportrices β -Galactosidase et EGFP ne sont pas exprimées dans ces souris à cause de l'insertion du gène *CAT* qui est flanqué de sites loxP. Dans les doubles souris transgéniques mâles Ngn3/CreERTM;CAG-CAT-LacZ, l'administration de tamoxifène active transitoirement l'activité de la CreERTM qui excise alors le gène *CAT* et induit irréversiblement l'expression de protéines rapportrices sous le promoteur CAG. Grâce à ce marquage de brève durée, les spermatogonies indifférenciées (Ngn3⁺) sont tracées ainsi que leurs descendants. Les auteurs ont

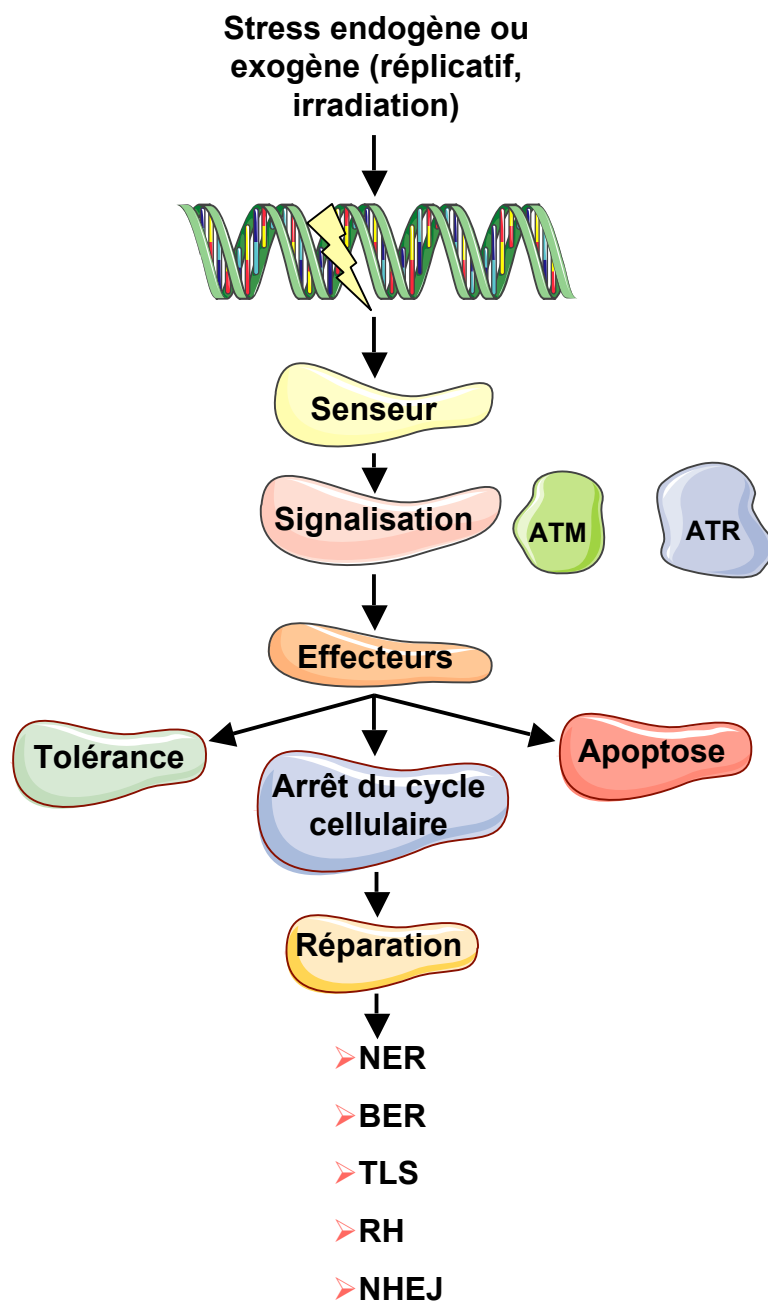


Figure 17 : Schéma général simplifié de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN

montré que les spermatogonies A_{pr}, bien qu'engagées en différenciation, conservaient un potentiel à former des colonies et à s'auto-renouveler après transplantation testiculaire et dans des conditions de spermatogenèse normale (Nakagawa *et al.*, 2007). Elles ont été dénommées « cellules souches potentielles » et pourraient jouer un rôle dans le maintien du stock de CSG en cas de lésion du tissu germinale.

B-III L'auto-renouvellement des cellules souches et les voies de réponse aux dommages à l'ADN

Les cellules souches assurent le maintien des fonctions d'un organe à long terme et persistent au niveau du tissu tout au long de la vie de l'individu. Pour cela, l'intégrité du génome des cellules souches doit être préservée. Des dommages à l'ADN peuvent être générés à la suite de stress endogènes (d'erreurs de réplication) ou exogènes (l'exposition à des agents génotoxiques). La déficience avec l'âge des mécanismes de contrôle de l'intégrité du génome et/ou l'action chronique de génotoxiques peuvent également engendrer l'accumulation de dommages à l'ADN dans les cellules souches et entraîner une dérégulation des fonctions biologiques. Les conséquences pourront être l'activation d'un processus :

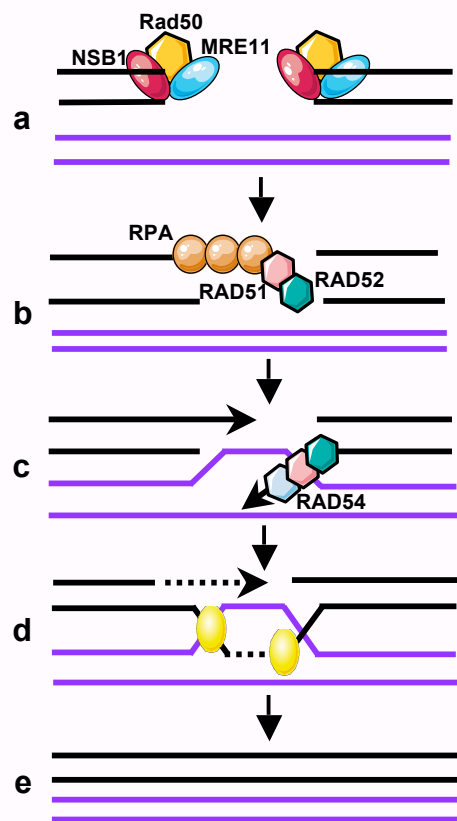
- ☞ de sénescence prématurée et la perte du pouvoir d'auto-renouvellement
- ☞ de mort par apoptose
- ☞ d'acquisition d'un avantage prolifératif et une transformation maligne.

Si le système de réparation est ralenti voire inhibé (invalidation naturelle ou induite d'une protéine impliquée dans les voies de réparation), on observe une accumulation des dommages à l'ADN, suite à une exposition à un stress aigu, conduisant à la sénescence et diminuant la capacité à revenir à l'homéostasie tissulaire normale et donc à un vieillissement tissulaire prématuré (Rossi *et al.*, 2007).

B-III.1 Altération des voies de réponse aux dommages de l'ADN et atteinte du stock de cellules souches

Différents travaux montrent l'implication des gènes des voies de réponse aux dommages à l'ADN dans les syndromes de sénescence prématurée, d'anomalies du développement et de cancérisation, et ont été décrits également dans la régulation des fonctions d'auto-renouvellement des CSH et des CSG. Les cellules souches, à la base de la différenciation tissulaire, doivent avoir un système de réparation efficace, afin de limiter les mutations dans les cellules matures, pour faire face aux différents types de dommages induits.

La réparation est l'ensemble des processus par lesquels une cellule identifie et corrige les dommages de son génome. Schématiquement, suite à un stress (irradiation, réplication,...) la cellule a développé un système complexe qui lui permet de repérer les dommages grâce à des protéines « senseurs », qui activent des protéines signalisatrices (comme les kinases ATM ou ATR), activant à leur tour par une cascade de phosphorylation soit les voies d'apoptose soit les voies de réparation (Figure 17).



Recombinaison Homologue : adapté de (Downs *et al.*, 2007)

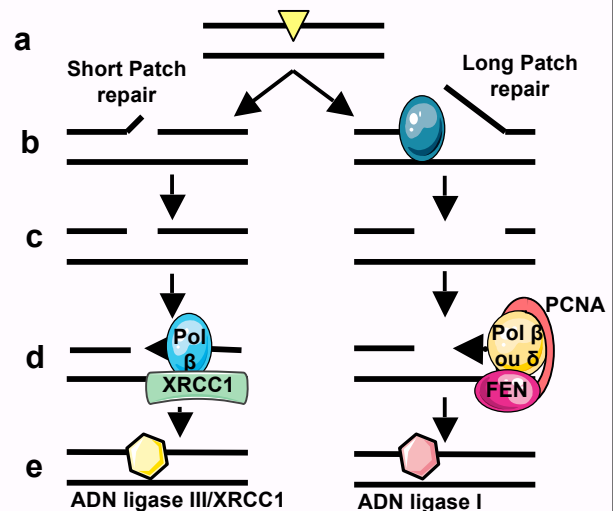
a- Le complexe MRN (MRE11, Rad50 et NSB1) se fixe sur les extrémités de la cassure double brin et expose des fragment simple brin 3'

b- Puis d'autres protéines comme Rad52 sont recrutées sur les extrémités

c- Formation d'un hétéroduplex par invasion d'une chromatide sœur ou d'un chromosome homologue par l'extrémité simple brin

d- Le brin intact sert de matrice pour une élongation par une ADN polymérase

e- Enfin, les deux brins du duplex se séparent et sont ligués entre eux afin de restaurer un ADN double brin.



BER : adapté de (Averbeck, 2000)

a- Il y a deux types de BER : le « Short Patch Repair » où quelques nucléotides sont remplacés et le « Long Patch Repair » où des fragments plus grands sont remplacés.

b- Excision des bases par des glycosylase spécialisées

c- Action des endonucléases pour éliminer toutes les bases endommagées

d- Synthèse du brin d'ADN par des polymérases adaptées

e- Enfin, la jonction entre les deux brins est assurée par la ligase adaptée.

Figure 18 : Schémas simplifiés de la Recombinaison Homologue et de la Réparation par Excision de Bases (BER)

La cellule dispose de cinq voies de réparation dont trois pour les cassures simple brin (NER, BER et MMR) et deux pour les cassures double brin (RH et NHEJ) :

☞ La réparation par excision de nucléotides : le NER (Nucleotid Excision Repair) est la plus efficace pour éliminer les lésions encombrantes causant des distorsions structurales de l'ADN. Ce système permet de remplacer les nucléotides modifiés par les rayonnements UV ou ionisants, les mutagènes et carcinogènes.

☞ La réparation par excision de base (Figure 18) : le BER (Base Excision Repair) permet de réparer une base modifiée (lors de méthylation, oxydation, réduction ou fragmentation) par les radiations ionisantes et le métabolisme normal oxydatif de la cellule.

☞ Le système de réparation de mésappariements : le MMR (Mismatch Repair) permet de rétablir les erreurs causées par l'infidélité des polymérases répliquatives.

☞ La TLS (la Trans Lesion Synthesis) permet de synthétiser le brin complémentaire d'un brin endommagé, mais elle est potentiellement mutagène et très peu fidèle.

☞ La réparation par recombinaison homologue (figure 18): la RH répare les dommages sévères impliquant les deux brins d'ADN, comme les cassures radio-induites ou les pontages inter-brins induits par des agents thérapeutiques. Elle permet le retour à la séquence initiale par copie d'un brin homologue du chromosome homologue, sans perte d'informations génétiques.

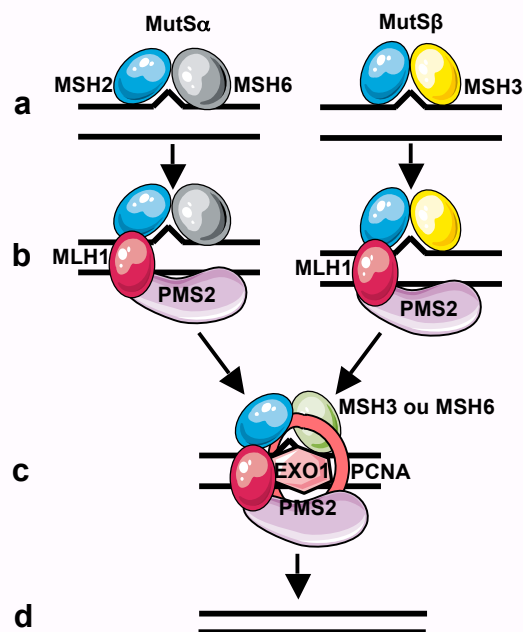
☞ La réparation par jonction d'extrémités non-homologues : le NHEJ (Non Homologous End-Joining) permet le collage direct des extrémités de la lésion entraînant une perte d'information génétique. Ce mécanisme est préférentiellement utilisé dans les cellules de mammifères pour réparer les cassures double brin et probablement les dommages multiples localisés.

De nombreux modèles murins, dans lesquels une protéine des différents systèmes de réparation a été invalidée, montrent un même phénotype à savoir un épuisement et une sénescence prématurée des cellules souches.

B-III.1.1 Les protéines de transduction du signal

Les premières étapes de la réparation des lésions ADN sont la reconnaissance du dommage et la transduction du signal qui aboutira à l'activation des voies soit de mort, soit d'arrêt du cycle puis de réparation (Figure 17). Cette reconnaissance se fait par des protéines spécifiques qui reconnaissent des dommages précis et vont activer les voies de transduction du signal. Par exemple, les sérine/thréonine kinases ATM (Ataxia telangiectasia mutated) et ATR (ATM and Rad3 related), membres de la même famille des phosphoinoside-3-kinase-related kinases (PIKKs), font partie de ces facteurs de transduction et sont conservés chez les eucaryotes.

La protéine kinase ATR intervient dans l'initiation de la réponse à un stress répliquatif. La délétion du gène *Atr* dans un modèle murin entraîne une mortalité embryonnaire très tôt dans le développement (7,5^{ème} jour post-conception). Les souris *Atr*^{+/-} ont une diminution de la survie et une augmentation de la prédisposition tumorale (Brown and Baltimore, 2000). Dans un modèle d'invalidation conditionnelle d'*Atr* (induction de la délétion par injection de Tamoxifène qui induit la Cre), les souris adultes présentent un défaut de l'homéostasie tissulaire avec l'apparition rapide d'un phénotype lié à l'âge comme la chute de poils, des poils grisonnants, de l'ostéoporose, de la fibrose, une



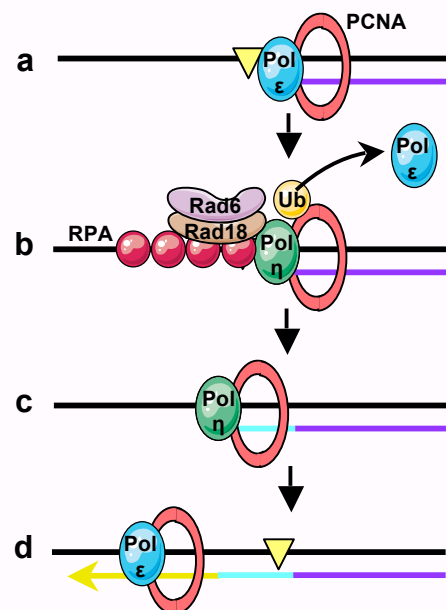
Mismatch Repair : adapté de (wei *et al.*, 2002)

a-Le complexe MutSα reconnaît les mésappariements de base formant boucle délétion/insertion (BDI) d'1pb, alors que le complexe MutSβ reconnaît les BDI de 2-4pb.

b-Interaction du complexe MutLα avec le complexe MutSα ou MutSβ qui active la réparation.

c-Recrutement de la machinerie de réparation, afin d'exciser le brin portant la mésappariement.

d-Resynthèse du brin coupé et ligation.



Trans Lesion Synthesis

:adapté de (Chang, *et al* 2009)

a-L'ADN polε s'arrête au niveau de la lésion de l'ADN matrice.

b-RPA se lie à l'ADN simple brin, qui recrute Rad6 et Rad18 (Enzymes ubiquitin E2 et E3) qui ubiquitine le PCNA, et recrute l'ADN polη (qui interagit avec ces trois protéines *via* trois motifs différents).

c-L'ADN polη synthétise au travers de la lésion.

d-Enfin la synthèse processive reprend après échange de l'ADN polη pour l'ADN polε.

Figure 19 : Schémas simplifiés de la réparation des mésappariements (MMR) et de la Synthèse par Trans Lésion (TLS)

spermatogenèse déficiente, et une baisse du nombre de CSH et progéniteurs hématopoïétiques (Ruzankina *et al.*, 2007). Les analyses tissulaires indiquent que la délétion d'*Atr* cause une perte aiguë dans les tissus où il y a une prolifération continue pour la maintenance. Cette perte cellulaire tissu spécifique touche les cellules souches et les progéniteurs avec une diminution de leur auto-renouvellement et de leur capacité homéostatique. Ces données suggèrent que la diminution de la capacité régénérative dans les souris adultes *via* la délétion d'un gène de réponse aux dommages à l'ADN est suffisant pour induire l'apparition d'un phénotype de vieillissement prématuré (Ruzankina *et al.*, 2007).

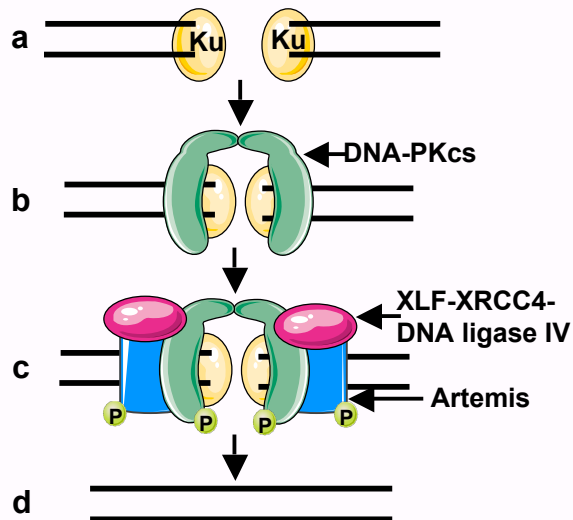
Quand à la protéine ATM, elle joue un rôle essentiel dans la réponse aux cassures double brin. La délétion du gène *Atm* chez la souris mime la maladie AT (Ataxie Téléangiectasie) caractérisé par une hypersensibilité aux rayonnements et une prédisposition aux cancers. Les souris *Atm*^{-/-} présentent une déplétion progressive du tissu hématopoïétique due à un épuisement progressif des CSH (Ito *et al.*, 2004). Ce phénotype est accompagné par une augmentation des ROS (Espèces réactives de l'oxygène) dans les CSH. Une administration d'un agent anti-oxydant comme le N-acétyl-cystéine (NAC) permet la restauration de la capacité de reconstitution des CSH *Atm*^{-/-} et donc de prévenir un défaut de la moelle osseuse. Dans les CSH *Atm*^{-/-}, on observe également une augmentation de l'expression du gène *p16^{Ink4a}* ce qui corrèle avec l'augmentation des ROS (Ito *et al.*, 2004). Ce défaut des cellules souches n'est pas spécifique du tissu hématopoïétique car dans ce modèle, on observe aussi un défaut d'auto-renouvellement et de différenciation (du à une accumulation des dommages ADN) des CSG, induisant une stérilité. On observe alors une déplétion progressive des spermatogonies indifférenciées, accompagnée d'un arrêt du cycle cellulaire. (Takubo *et al.*, 2008).

B-III.1.2 Quelques protéines effectrices de la réparation

☞ Dans la TLS, (figure 19) la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) joue un rôle primordial, et l'ubiquitination de PCNA est effectuée par les enzymes RAD6/RAD18. Chez les souris *Rad18*^{-/-}, on observe une diminution progressive du tissu germinal. Ces souris naissent normales, puis une stérilité apparaît avec le vieillissement : la diminution des CSG mène à une perte de tout le tissu germinal (Sun *et al.*, 2009).

☞ Le gène *Msh2* code une protéine impliquée dans le MMR (figure 19). Les CSH des souris invalidées pour le gène *Msh2* présentent une diminution de la capacité à repeupler les receveurs après transplantation sérielle et une augmentation de l'instabilité des séquences microsatellites (Reese *et al.*, 2003).

La protéine ERCC1, qui est impliquée dans le NER (figure 20) semble maintenir les CSH afin de conserver l'intégrité génomique. ERCC1 forme un complexe avec XPF. Cet hétérodimère est essentiel pour la voie du NER et permet l'élimination de lésions distordants l'hélice d'ADN. Ces lésions peuvent être induites par irradiation UV ou des agents chimiques. Les souris invalidées pour *Ercc1* présentent un vieillissement accéléré, une cytopénie multilignage (observée à trois semaines dans les souris *Ercc1*^{-/-}). Cependant, ces caractéristiques ne sont pas observées dans d'autres mutants du NER (comme *Xpa*^{-/-}). En revanche, ce sont les caractéristiques de l'Anémie de Fanconi



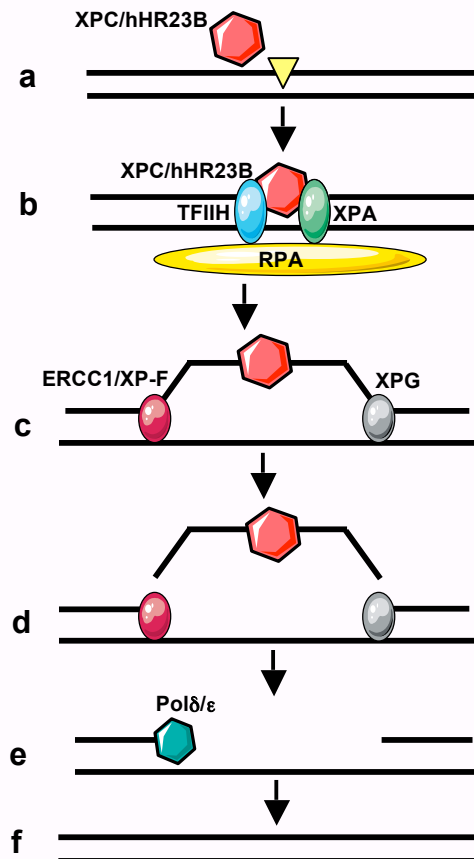
NHEJ : adapté de (Downs, *et al* 2007)

a-La cassure double brin est reconnue par l'hétérodimère Ku (Ku60 et Ku80)

b-La kinase DNA-PKcs se lie au dimère Ku et les deux terminaisons d'ADN forment des synapses.

c-DNA-PKcs et Artemis sont phosphorylées. Les deux terminaisons d'ADN sont préparées par Artemis et un complexe comprenant XRCC4 (X-Ray-Repair-Cross-Complementing Protein 4), XLF (XRCC4-like complex ou NHEJ1), et l'ADN ligase IV.

d-Les deux terminaisons d'ADN sont liées par l'ADN ligase IV et les facteurs du système réparation de l'ADN se dissocient.



NER : adapté de (Averbeck, 2000)

a-Reconnaissance du dommage par le complexe XPC/hHR23B, qui recrute le complexe protéique de réparation

b-Séparation des brins par une ouverture locale de l'ADN grâce à XPA et TFIIH

c et d-Double incision par ERCC1/XPF (5') et XPG (3') : excision d'un brin de 24 à 32 nucléotides contenant la lésion

e-f Synthèse du brin pour combler la lésion simple brin par des facteurs de la réplication processive

Figure 20 : Schémas simplifiés de la réparation non homologue des cassures double brin (NHEJ) et de la Réparation par Excision de Nucléotides (NER)

(AF), pathologie humaine causée par un défaut de réparation des ICL (Interstrand Cross-Link, pontages inter-brins) (Prasher *et al.*, 2005). En dehors du NER, le complexe ERCC1/XPF (Rad10-Rad1) paraît en effet aussi essentiel pour la réparation des ICL par la voie du NHEJ. Une hypothèse serait la formation d'une cassure intermédiaire double brin afin d'engager la voie NHEJ. En effet, l'invalidation de *Ercc1-Xpf in vitro* (dans des fibroblastes) ou *in vivo* (dans un modèle murin) entraîne une hypersensibilité aux irradiations- γ , ainsi qu'une persistance des foyers γ -H2AX (marqueur des cassures double brin). Ces deux événements sont dus à un défaut de la réparation des cassures doubles brins. Ces résultats montrent le rôle essentiel de ERCC1-XPF dans la protection contre les cassures double brins *in vivo* (Ahmad *et al.*, 2008).

☞ La ligase IV, une protéine du NHEJ (figure 20), impliquée dans la maintenance des CSH. La mutation *Lig4*^{Y288C} chez la souris correspond au syndrome humain Lig4 montrant une immunodéficience et un retard de la croissance. Ces souris *Lig4*^{Y288C} ont une perte progressive des CSH liée à une défaillance sévère de l'auto-renouvellement des CSH due à une accumulation des dommages ADN (foyers γ -H2AX) via une déficience de la réparation des cassures double brin (Nijnik *et al.*, 2007).

B-III.2 Le modèle de la voie de l'Anémie de Fanconi

B-III.2.1 L'Anémie de Fanconi

L'anémie de Fanconi est une maladie génétique récessive rare caractérisée par un phénotype extrêmement complexe et hétérogène. Le pédiatre suisse Guido Fanconi a été le premier à décrire cette maladie en 1927 en publiant un rapport sur une fratrie dont les membres présentaient une grave anémie aplasique associée à plusieurs malformations congénitales. La pathologie a été appelée Anémie de Fanconi (AF) quelques années plus tard suite à la description d'autres malades avec un phénotype similaire à celui de la fratrie décrite par le Dr Fanconi. Chez l'Homme, elle se caractérise par des anomalies du développement du squelette, de la peau, du rein et du cœur. Les patients atteints d'AF montrent un retard de croissance, un hypogonadisme et une anémie aplasique due un défaut progressif de la moelle osseuse. De plus, ces patients ont des prédispositions aux cancers comme les leucémies. C'est aussi un syndrome d'instabilité génomique : les cellules de patients montrent des aberrations chromosomiques et sont hypersensibles aux agents pontants comme la Mitomycine C (MMC) ou le Diépoxybutane (DBE). Ce phénotype est devenu la base du diagnostic de l'AF *in vitro*, en testant la sensibilité des lymphocytes ou des fibroblastes de patients à la MMC. Les manifestations cliniques sont variables : des cas sévères et asymptomatiques peuvent coexister dans une même famille.

L'hétérogénéité phénotypique peut être expliquée par le nombre élevé de groupes de complémentation : en 1985, il a été décrit deux groupes de complémentation, quatre en 1992, huit en 1997, et onze en 2004. Actuellement on considère qu'il y a au moins treize groupes de complémentations différents : A, B, C, D₁, D₂, E, F, G, I, J, L, M et N. Les treize gènes correspondants ont été clonés et sont présents sur les autosomes, sauf le gène *Fancc* qui est porté par le chromosome X. Huit de ces protéines forment un complexe nucléaire appelé Complexe Core

Fanconi, régulant cette voie. Ces protéines isolées ne présentent pas d'activités particulières, à l'exception de FancM et FancJ (activité hélicase) et FancL (E3 ubiquitine ligase). Le groupe de AF-A est le plus commun, représentant 65% des individus. Les groupes AF-C et G représentent chacun 15% des individus. Bien que l'évaluation soit difficile, la fréquence du syndrome est estimée à 1/100 000 naissances.

Protéines	Fréquence des mutations	Appartenance au core
Fanc A	60-70%	oui
Fanc B	>2%	oui
Fanc C	10-15%	oui
Fanc D1	1-5%	non
Fanc D2	1-5%	non
Fanc E	>2%	oui
Fanc F	>2%	oui
Fanc G	8-12%	oui
Fanc I	>2%	non
Fanc J	>2%	non
Fanc L	>2%	oui
Fanc M	>2%	oui

(Mace *et al.*, 2007)

B-III.2.2 Les modèles murins

Afin d'étudier cette maladie plus facilement, différents modèles murins ont été créés : *Fanca*^{-/-} (Wong *et al.*, 2003), *Fancc*^{-/-} (Whitney *et al.*, 1996), *Fand1/Brca2* (Navarro *et al.*, 2006), *Fancd2*^{-/-} (Houghtaling *et al.*, 2003), *Fancg*^{-/-} (Koomen *et al.*, 2002) et *Fanci* (Lu and Bishop, 2003). Des MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) ont été ensuite isolées, et possèdent bien le phénotype de l'AF c'est-à-dire une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques qui sont encore augmentées après traitement à la MMC. Une microphthalmie, une mortalité périnatale et une augmentation de l'incidence de cancers (épithélium, lymphome) ont également été décrites (Carreau, 2004). En revanche, les souris *Fanc*^{-/-} ne possèdent pas de problèmes majeurs de croissance et ne montrent pas d'anomalies du squelette, contrairement aux patients. De plus on n'observe pas d'anémie chez les souris invalidées même si cette dernière peut être induite par l'administration d'agents pontants (à des doses sans effets pour les animaux normaux) (Carreau *et al.*, 1998). Cependant, les CSH des souris *Fancc*^{-/-} présentent un défaut de régénération à long terme de l'hématopoïèse après transplantation (Haneline *et al.*, 1999). On observe donc une différence entre le phénotype murin et celui des patients humain pour l'aplasie médullaire, cependant le modèle murin reste un bon modèle pour étudier l'implication des gènes Fanconi dans les cellules souches.

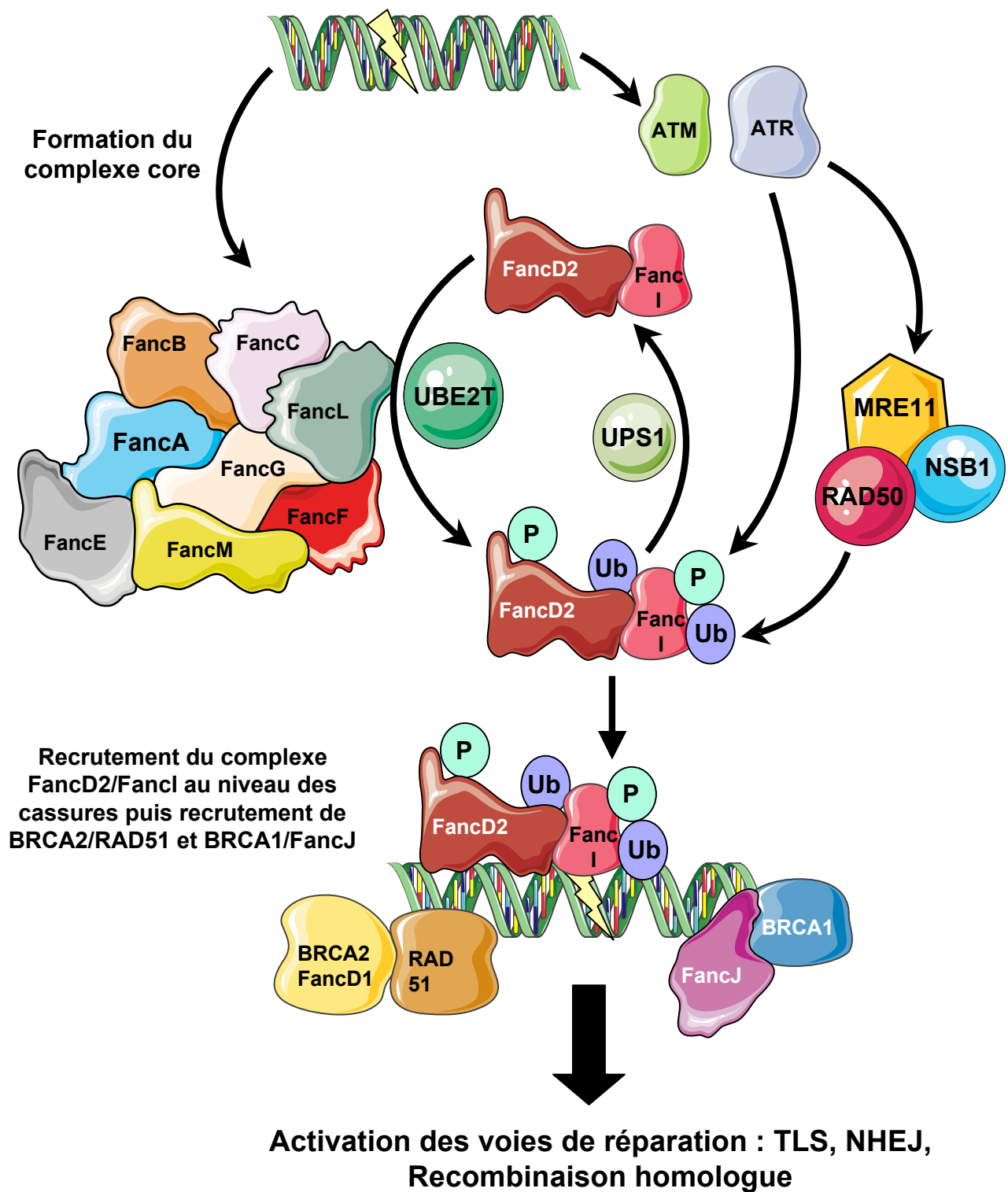


Figure 21 : Formation du complexe Fanconi en réponse aux dommages de l'ADN

Chez les patients humains atteints d'AF, on observe un hypogonadisme qui entraîne une diminution du nombre de spermatozoïdes chez l'homme, et une ménopause prématurée chez les femmes (Alter *et al.*, 1991). Ceci explique que ces patients se reproduisent peu. Ce phénotype de baisse de la fertilité est observé également chez les souris *Fanc*^{-/-}. Les femelles sont plus touchées que les mâles. Dans les modèles murins d'AF, on retrouve une réduction significative du nombre de CGP, qui sont les précurseurs embryonnaires des CSG et des ovocytes chez l'adulte (Whitney *et al.*, 1996).

B-III.3 Une maladie de la réparation : le complexe nucléaire et le recrutement de la recombinaison homologue

Au moment de l'entrée en phase S ou suite à des lésions de l'ADN (comme des pontages inter-brins), les protéines cytoplasmiques de Fanconi sont recrutées dans le noyau, afin de former un complexe nucléaire multimérique. Ce dernier est composé des protéines : FancA, B, C, E, F, G, L et M (Figure 21). En l'absence d'un des membres, il n'y a pas formation de ce complexe. L'ubiquitination implique trois protéines : les ligases E1, E2 et E3. Le complexe core, grâce à l'activité E3 ligase de FancL (Meetei *et al.*, 2003) et l'activité E2 ligase de UBE2T (Machida *et al.*, 2006), va permettre la mono-ubiquitination des protéines FancD2 et FancI (qui forment le complexe ID) (Smogorzewska *et al.*, 2007). Ce dernier va se lier à l'ADN, au niveau du foyer de la lésion, et activer les voies de réparation en recrutant notamment la protéine RAD51 (pour la réparation homologue) *via* BRCA2. L'interaction entre FancD2 et FancI est intéressante car ils se colocalisent au niveau des foci et se lient à la chromatine. Cependant, FancD2 et FancI sont dépendantes des autres protéines Fanconi pour leur mono-ubiquitination respective, mais sont indépendantes entre elles car FancD2 n'est pas modifiée dans les cellules *Fanci*^{-/-} et inversement. UPS1 dé-ubiquitine FancD2, FancI et PCNA car dans les cellules où UPS1 est inhibé, on observe une augmentation de l'ubiquitination de FancD2 et FancI (Nijman *et al.*, 2005).

Cette modification post-traductionnelle de FancD2 est utilisée pour diagnostiquer les patients atteints d'AF (Joenje and Patel, 2001) (Papadopoulo and Moustacchi, 2005) (Grompe and van de Vrugt, 2007).

La phosphorylation de FancD2 par des protéines kinases comme ATR ou ATM semble également impliquée dans la transduction du signal. Cette phosphorylation serait responsable de l'activation de points de contrôle de la phase S radio-induite. La protéine NSB1 (protéine du complexe MRN impliqué dans la recombinaison homologue) est requise pour la phosphorylation de FancD2 par ATM. Les protéines RPA1 (protéine impliquée dans les voies de réparation comme la recombinaison homologue ou le TLS) et ATR sont requis pour la mono-ubiquitination de FancD2. Cela suggère la coopération de la voie Fanc/BRCA et du complexe MRE11/RAD50/NBS1. Ces deux complexes coopèrent lors de la réparation de lésions (Andreassen *et al.*, 2004) (Pichierri and Rosselli, 2004).

B-III.4 Les voies alternatives de régulation par la voie de l'Anémie de Fanconi

Outre son implication dans la réparation des lésions d'ADN *via* le recrutement de la réparation homologue, différents travaux suggèrent la participation des protéines Fanconi dans la régulation

d'autres voies biochimiques et physiologiques. Tout d'abord je vais vous présenter les données sur le rôle des protéines Fanconi dans des lignées cellulaires invalidées ou sur des cellules de patients (fibroblastes ou lymphocytes) puis nous verrons les données obtenues grâce à l'étude des CSH de modèles murins invalidés pour les protéines Fanconi.

B-III.4.1 Le stress oxydatif

Une caractéristique des cellules AF est l'augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques. Dans des cultures de lymphocytes AF, un lien a été fait entre la fréquence des aberrations chromosomiques et la tension en oxygène : plus le pourcentage en oxygène est élevé et plus la fréquence d'aberrations augmente. Ce qui suggère que la première cible de la mutation AF est le système de défense (la protection et la réparation) contre la toxicité génétique de l'oxygène (Joenje *et al.*, 1981). En milieu normal, les fibroblastes AF ont une durée de vie plus courte et leur capacité de clonage est plus faible. Les fibroblastes AF cultivés en milieu hypoxique (5% v/v), possèdent une croissance normale *in vitro*. En revanche, l'exposition de ces cellules à une tension en oxygène accrue (35% v/v) induit une accumulation significative des cellules en phases S et G₂/M du cycle (Schindler and Hoehn, 1988). Les cellules AF présentent ainsi une hypersensibilité à l'oxygène se manifestant par une incapacité à « faire face » à un stress oxydatif. Ces résultats suggèrent un lien entre les protéines Fanconi et les protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif comme celles qui permettent la détoxification en éliminant entre autre l'H₂O₂ et les ROS produits.

Des études ont montré une relation entre des protéines Fanconi et des enzymes de détoxification. Par exemple, la protéine FancC se lie à la GSTP1 (Glutathione-S-Transférase), enzyme qui catalyse la détoxification des xénobiotiques et des sous-produits du stress oxydatif. La surexpression des deux protéines FancC et GSTP1 dans une lignée cellulaire myéloïde inhibe l'apoptose même en privation d'IL-3. FancC augmente l'activité de la GSTP1 après induction de l'apoptose par privation de facteur (comme IL-3). FancC protège la GSTP1 de l'oxydation afin de maintenir son activité enzymatique durant l'apoptose (Cumming *et al.*, 2001).

D'autre part, un phénotype d'hypersensibilité à la MMC similaire à l'AF a été observé en surexprimant la protéine RED (NAPDH cytochrome-P450 Reductase) dans des cellules normales. La résistance à la MMC corrèle avec une diminution de l'activité de la RED. La protéine FancC est capable de se lier à un domaine de la RED, ce qui *in vivo* supprime la fonction catalytique de cette dernière. Sans atténuation appropriée de l'activité de la RED par FancC, les espèces réactives comme la MMC et les métabolites de l'oxygène s'accumulent et peuvent affecter la viabilité cellulaire (Kruyt *et al.*, 1998).

L'activation de la voie NF-κB (Nuclear Factor-Kappa B) est responsable de la survie cellulaire. Le Facteur de transcription NF-κB est notamment induite par les ROS ou la cytokine pro-apoptotique TNF-α, qui active l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse cellulaire au stress (Wang *et al.*, 2002). Son activité a été déterminée comme constitutivement induite dans les cellules AF transformées et dans des fibroblastes AF, probablement une conséquence de l'augmentation du

niveau des ROS dans ces cellules (Briot *et al.*, 2008). En effet, lorsque l'on ajoute un anti-oxydant, on observe une diminution de l'induction NF- κ B et de l'instabilité chromosomique (Kontou *et al.*, 2003). Les cellules de patients AF ont un faible taux de thiorédoxine (Trx), qui est un important anti-oxydant intracellulaire. La transfection de cellules AF avec un cDNA Trx diminue l'instabilité chromosomique spontanée et induite par la MMC (Kontou *et al.*, 2002). La Trx interagit avec des enzymes comme la RiboNucléotide Réductase (RNR) ou la tyrosinase hydroxylase. Cette dernière assure notamment la production de mélanine. La RNR est une enzyme clé du métabolisme des nucléotides et de la synthèse d'ADN (Reichard, 1993). Une diminution de la Trx peut entraîner une diminution de l'activité enzymatique de la RNR et ainsi altérer la réparation des dommages de l'ADN. D'autre part l'activité de la tyrosinase hydroxylase est influencée par le taux de Trx. Une faible activité de la Trx et de fortes concentrations de superoxyde activent la tyrosinase hydroxylase causant une hyperpigmentation de la peau, qui est observée chez les patients AF (Kontou *et al.*, 2002).

La peroxydase mitochondriale piredoxine-3 (PRDX3), un important antioxydant cellulaire, régule le niveau physiologique d'H₂O₂. Elle induit une diminution de la croissance cellulaire afin de protéger les cellules de l'apoptose induite par des taux élevés d'H₂O₂. L'invalidation de *Prdx3* entraîne une augmentation de l'apoptose (Chang *et al.*, 2004). Il a été démontré que la PRDX3 interagit physiquement avec la protéine FancG et que ces deux protéines colocalisent à la mitochondrie (Mukhopadhyay *et al.*, 2006). Dans les lymphoblastes de patients *Fanca*^{-/-}, *Fancc*^{-/-} et *Fancg*^{-/-}, la PRDX3 est clivée par une calpaïne perdant ainsi son activité. Ce défaut est associé avec des déformations de la structure mitochondriale. La surexpression transitoire de la PRDX3 supprime la sensibilité des cellules AF à l'H₂O₂. Si elle est sous-régulée dans des cellules normales, elle entraîne une augmentation de la sensibilité à la MMC, suggérant que la diminution de l'activité de la PRDX3 est à la base de la sensibilité des cellules AF au stress oxydatif. Cette étude souligne un rôle des protéines Fanconi dans la diminution de l'activité de la PRDX3 et donc dans la sensibilité au stress oxydatif (Mukhopadhyay *et al.*, 2006).

B-III.4.2 Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) et l'INF- γ (Interféron- γ)

Dans plusieurs groupes de complémentation de l'AF, une surproduction de TNF- α sérique a été mesurée (Rosselli *et al.*, 1994), et il a été détecté huit fois plus de TNF- α dans le milieu de croissance de lymphoblastes AF. L'ajout d'un anticorps anti-TNF- α corrige partiellement l'hypersensibilité des cellules AF à la MMC. En revanche, il n'y a d'anomalies ni au niveau du gène *Tnf- α* , ni au niveau de son ARNm. L'augmentation de l'activité du TNF- α dans le sérum de patients AF semble être une caractéristique de cette maladie (Rosselli *et al.*, 1992) (Rosselli *et al.*, 1994). D'autre part, la surexpression de TNF- α soluble semble liée à une activation des voies MAP Kinases et à la surexpression de la métalloprotéase MMP-7, responsable du clivage du TNF- α membranaire (Briot *et al.*, 2008).

Les cellules AF ont une intolérance au stress oxydatif et aux cytokines, induisant l'apoptose. Les cellules de patients AF sont hypersensibles à l'apoptose induite par l'INF- γ et le TNF- α (Whitney *et*

al., 1996) (Rosselli *et al.*, 1994). Après traitement par l'INF- γ ou le TNF- α , on observe une augmentation des ROS dans les MEFs *Fancc*^{-/-}, induisant les voies d'apoptose *via* les protéines du système rédox comme Ask1 (Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1). Cette protéine est une kinase activatrice de la voie des MAP Kinases, directement inhibée par la liaison aux protéines de la détoxification comme la thioredoxine, la GSTP-1, la glutarédoxine. Ces dernières la séquestrent sous une conformation inactive. En réponse au stress, ces protéines se lient aux ROS et libèrent Ask1, qui peut alors initier un programme apoptotique grâce à son activité sérine-thréonine kinase. Les MEFs et les progéniteurs hématopoïétiques de souris *Ask1*^{-/-} sont résistants au TNF- α et à l'apoptose induite par H₂O₂ (Tobiume *et al.*, 2001). Dans les MEF *Fancc*^{-/-}, le TNF- α , va se lier à son récepteur, il y aura alors un stress endogène induisant l'activation de la kinase Ask1, qui active p38, puis à la fin de la cascade de phosphorylation, l'activation de l'apoptose. De même, lorsqu'on utilise un inhibiteur de p38 ou un anti-oxydant, c'est-à-dire lorsque l'on inactive la voie Ask1, on observe une protection des MEF *Fancc*^{-/-} et des cellules hématopoïétiques c-Kit⁺ contre l'apoptose induite par le TNF- α . Ces données suggèrent que la prédisposition des cellules *Fancc*^{-/-} à l'apoptose est en partie due à l'altération de la régulation rédox mais aussi due à une hyperactivation de la voie Ask1 (Bijangi-Vishehsaraei *et al.*, 2005).

B-III.4.3 Relation avec les CSH

B-III.4.3.1 Le stress oxydatif

La voie de l'AF semble être impliquée directement dans les fonctions des cellules souches comme l'auto-renouvellement et/ou l'engagement en différenciation à travers la régulation des ROS. Les ROS apparaissent comme des déterminants pour la durée de vie et l'auto-renouvellement des CSH, suggérant que leur niveau intracellulaire détermine la balance entre quiescence et prolifération du pool de cellules souches. D'autre part, le micro-environnement des CSH dans la moelle osseuse a une particularité qui est sa nature hypoxique. Il a été montré que les CSH et les cellules de la niche se situent au plus bas du gradient d'oxygène dans la moelle osseuse, suggérant un rôle fondamental de l'oxygène dans la régulation de la fonction des CSH (Parmar *et al.*, 2007).

Comme il a été précédemment mentionné pour la protéine ATM, un lien entre les ROS et le déficit de CSH a été décrit chez les souris mutées dans des voies de réparation de dommages à l'ADN (Ito *et al.*, 2004).

D'autres modèles murins possèdent aussi un phénotype hypersensibilité au stress oxydatif, comme les souris *FoxO*^{-/-}. Les facteurs de transcription de la sous famille FoxO sont impliqués dans la réponse aux facteurs de croissance et appartiennent à la voie de signalisation PI3K/AKT. De plus, récemment ils ont été impliqués dans la régulation de l'auto-renouvellement des CSH. Les souris *FoxO*^{-/-} présentent une prolifération et une différenciation normale des progéniteurs hématopoïétiques, par contre le nombre de CSH est réduit. De plus la reconstitution de l'hématopoïèse après transplantation est défailante. Les CSH *FoxO*^{-/-} présentent un niveau de ROS élevé, une augmentation de la phosphorylation de p38MAPK, un défaut de maintien en quiescence et

une sensibilité accrue aux agents myélotoxiques spécifique du cycle cellulaire (Miyamoto *et al.*, 2007). Un traitement par le NAC de ces souris permet une restauration du phénotype (Tothova *et al.*, 2007). Une concentration de ROS élevée pourrait activer la voie p38MAP Kinase, ce qui entraîne la sortie de quiescence des CSH. Leur entrée en cycle plus fréquente conduirait à un épuisement des CSH, et à une sénescence prématurée des cellules *via* l'expression du gène *p16^{Ink4a}* (une accumulation des dommages entraîne l'activation de point de contrôle du cycle cellulaire comme *p16^{Ink4a}* qui induit l'entrée en sénescence).

L'ajout de SOD (Cu/Zn superoxyde dismutase cytosolique) dans des cultures de cellules AF diminue l'instabilité chromosomique et la toxicité à la MMC. Afin d'étudier les conséquences du potentiel pathologique d'une altération *in vivo* de l'état rédox, des double transgéniques *Fancc*^{-/-} *Sod1*^{-/-} ont été étudiées. Ces souris développent une pathologie hépatique (stéatose micro-vasculaire) mais aussi une hypocellularité de la moelle osseuse et une cytopénie du sang périphérique (érythrocytes et leucocytes), accompagnée d'une profonde réduction de la croissance clonogénique des précurseurs hématopoïétiques *in vitro*. En revanche, ces souris ne présentent pas de diminution des progéniteurs les plus immatures. Seuls les progéniteurs différenciés sont touchés. Ces résultats suggèrent que l'altération de l'état rédox des souris *Fancc*^{-/-} *Sod1*^{-/-}, est responsable de la défaillance de la prolifération ou de la survie cellulaire des progéniteurs hématopoïétiques (Hadjur *et al.*, 2001).

B-III.4.3.2 Le TNF- α et l'IFN- γ

La cytokine pro-inflammatoire TNF- α inhibe l'expansion des CSH en interférant avec l'auto-renouvellement et en diminuant la capacité des CSH à reconstituer l'hématopoïèse (Bryder *et al.*, 2001). Dans les souris *Fancc*^{-/-}, le traitement des souris au TNF- α induit une sénescence prématurée des CSH et des progéniteurs de la moelle osseuse. L'induction de la sénescence par le TNF- α corrèle avec l'accumulation des ROS et des dommages à l'ADN oxydatifs. En revanche, la neutralisation du TNF- α ou la délétion de son récepteur (TNF-R) dans les *Fancc*^{-/-} (des souris *Fancc*^{-/-} *Tnfr1*^{-/-}), limitent la production excessive de ROS et la sénescence hématopoïétique (Zhang *et al.*, 2007). En outre, les souris *Fancc*^{-/-} présentent une forte sensibilité à un choc septique provoqué par un traitement au lipopolysaccharide (LPS). Cette réaction est médiée par le TNF- α et les ROS (Sejas *et al.*, 2007). D'autre part, on observe une diminution des BFU-E dans les souris *Fancc*^{-/-} qui surexpriment le TNF- α (Otsuki *et al.*, 1999). Ces résultats indiquent un lien entre les cytokines pro-inflammatoires, les ROS, la sénescence prématurée des CSH et des progéniteurs car une accumulation des dommages peut induire un arrêt du cycle cellulaire puis l'activation des voies de sénescence.

L'IFN- γ également joue un rôle dans la régulation des CSH. Les CSH humaines en culture cyclent en gardant leur fonction et leur capacité d'auto-renouvellement. Si l'on ajoute de l'IFN- γ , elles perdent leur capacité de reconstitution à long terme (*in vitro*) et *in vivo*, la prise de greffe dans les NOD-SCID est diminuée de 90%. Les études *in vitro* suggèrent que l'IFN- γ accélère la différenciation des CSH et des progéniteurs, diminuant ainsi l'activité d'auto-renouvellement des CSH humaines (Yang *et al.*,

2005). Les CSH et progéniteurs *Fanca*^{-/-} et *Fancg*^{-/-} sont hypersensibles à l'IFN-γ que se soit *in vivo* ou *in vitro*. Lorsque l'on perfuse en continu de l'IFN-γ (en sous-cutané et à des concentrations cliniques) à des souris *Fanc*^{-/-}, on facilite la greffe des progéniteurs et CSH sauvages montrant ainsi qu'il y a eu déplétion des CSH endogènes *Fanc*^{-/-} par l'IFN-γ. Ces résultats suggèrent que l'IFN-γ peut être utilisé comme un myélosuppresseur dans les protocoles de conditionnement de greffe pour beaucoup de groupes de complémentation de l'AF (Si *et al.*, 2006).

Les cytokines pro-inflammatoires pourraient jouer un rôle dans l'émergence de cellules préleucémiques dans la pathologie Fanconi. Les CSH invalidées pour le gène *Fancc* présentent une instabilité chromosomique et une hypersensibilité aux cytokines comme l'IFN-γ et le TNF-α. Une exposition au TNF-α inhibe *in vitro* la croissance des cellules souches *Fancc*^{-/-}. En revanche si cette exposition est faite sur du long terme, il y a apparition de clones cytogénétiquement anormaux qui, une fois transplantés, mènent à des leucémies myéloïdes aiguës. Ces clones sont résistants au TNF-α mais gardent leurs caractéristiques AF à savoir une sensibilité à la MMC et une forte instabilité chromosomique. En outre, si on corrige les cellules *Fancc*^{-/-} à l'aide d'un vecteur d'expression *Fancc*, on a une protection contre l'évolution clonale induite par le TNF-α (Li *et al.*, 2007).

B-III.4.3.3 Mobilisation/logement des CSH AF

Les capacités de rétention dans la niche et de migration des CSH semblent jouer un rôle important dans la physiologie de ces cellules au cours de l'homéostasie tissulaire, mais également en cas de mobilisation dans le sang périphérique. Le CXCL12 est un facteur décrit pour être impliqué dans la rétention des CSH et des progéniteurs dans la moelle osseuse. Le G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) et l'AMD-3100, antagoniste sélectif de CXCL12, empêchent la rétention des CSH et des progéniteurs dans la moelle osseuse, qui peuvent alors migrer dans le sang.

La mobilisation par le G-CSF a été utilisée sur des patients AF et seul un faible nombre de CSH et progéniteurs ont été mobilisés dans le sang périphérique. Cette faible mobilisation de cellules CD34⁺ (CSH humaines) résulte soit d'une hypoplasie de la moelle osseuse, soit d'une incapacité du G-CSF à mobiliser correctement les CSH et les progéniteurs AF. La mobilisation des CSH et progéniteurs a aussi été analysée sur deux modèles murins d'AF : *Fanca*^{-/-} et *Fancc*^{-/-}. Une fois les cellules mobilisées, par un traitement au G-CSF seul ou couplé à l'AMD3100 (mobilisateur des CSH), les cellules sont transplantées dans des receveurs primaires et secondaires. Lorsque l'on utilise en synergie l'AMD3100 et de G-CSF, on observe une mobilisation des CSH, tandis que lorsque l'on utilise le G-CSF seul, la mobilisation des CSH est moins importante, même en absence d'hypoplasie (Pulliam *et al.*, 2008), suggérant donc un déficit de mobilisation et de migration des CSH AF.

De plus une augmentation du transcript *Cxcr4* est observée lorsque des progéniteurs hématopoïétiques sauvages ou AF sont mis en culture dans des conditions d'hypoxie. On observe alors une diminution du stress oxydatif *in vitro* qui paraît améliorer la migration par chimiotactisme des cellules progénitrices des souris *Fanca*^{-/-}, *Fancc*^{-/-} et *Fancc2*^{-/-}, permettant ainsi le « homing » des CSH AF lors de la transplantation (Skinner *et al.*, 2008).

Des progéniteurs de moelle osseuse de patients *Fanca*^{-/-} ont été transplantés dans des souris NOD/SCID et un défaut de régénération, plus précisément de homing, dans la moelle osseuse a été observé. De plus, les cellules de patients *Fanca*^{-/-} montrent un défaut d'adhésion qu'il soit de cellules à cellules ou de cellules sur la matrice extracellulaire. Lorsqu'on ré-exprime la protéine FancA dans ces cellules, on récupère cette adhésion. Ce défaut d'adhésion est dû à une diminution significative dans l'activité de la Rho GTPase Cdc42, qui est une protéine cruciale dans la migration et le « homing » des CSH (Yang *et al.*, 2007). Une expression constitutive de Cdc42 dans les cellules Fanconi leur permet de ré-acquérir des capacités d'adhésion. Les protéines Fanconi semblent donc avoir une influence sur le homing dans la moelle osseuse et l'adhésion des progéniteurs hématopoïétiques via la voie de signalisation de la Rho GTPases Cdc42 (Zhang *et al.*, 2008b).

C- Résultats

C-I Article 1 : Dédifférenciation des progéniteurs germinaux en cellule souche

C-I.1 Introduction

Dans la recherche sur les cellules souches, la gamétogenèse représente un système utile pour l'identification et la caractérisation de ces cellules. Il existe en effet des modèles faciles d'utilisation comme *Drosophila melanogaster* dont les gamètes mâles et femelles possèdent une organisation cellulaire qui permet de distinguer clairement les cellules souches des cellules différenciées. Chez la souris et d'autres mammifères, la gamétogenèse mâle ou spermatogenèse est supportée par un système robuste de cellules souches. Depuis les années 1950, les observations morphologiques ont permis d'établir une hiérarchisation de la spermatogenèse dans les tubes séminifères. Comme chez *Drosophila*, les spermatogonies forment des chaînes de cellules $2n$, dont la longueur représente l'avancement dans les stades (plus une chaîne est longue et plus les cellules sont différenciées). Par contre, il est plus difficile de différencier les cellules souches des premiers stades de différenciation chez la souris par rapport à *Drosophila*.

La spermatogenèse adulte est initiée par les CSG ou spermatogonies A_s qui sont localisées sur la membrane basale des tubules séminifères. Ces CSG ont deux destins : soit elles s'auto-renouvellent pour entretenir le pool de CSG, soit elles entrent en différenciation afin de donner des gamètes matures. Les CSG qui entrent en différenciation se divisent par mitose pour donner des spermatogonies A paired (A_{pr}), puis ces dernières vont subir une série de mitoses pour former des chaînes de 4, 8, 16 spermatogonies A aligned (A_{al}), appelées spermatogonies « indifférenciées ». Lorsque les CSG se divisent par mitoses, les cellules filles qui en découlent restent liées entre elles par un pont cytoplasmique, c'est pourquoi on parle de chaînes. Ensuite, ces spermatogonies A_{al} , subissent une série de mitoses pour donner des spermatogonies A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , A intermédiaire et enfin des spermatogonies B dénommées « différenciées ». Puis ces dernières subissent la méiose et la spermiogenèse pour finalement produire les spermatozoïdes.

Concernant la caractérisation phénotypique, plusieurs marqueurs nous permettent de différencier les deux populations de spermatogonies « indifférenciées » et « différenciées ». Tout d'abord, le marqueur membranaire c-Kit, récepteur à tyrosine-kinase, n'est exprimé que sur les cellules « différenciées ». Précédemment, il a été montré par transplantation que les cellules c-Kit⁻ issues de souris cryptorchides possèdent la capacité de régénérer la spermatogenèse. En revanche, la fraction c-Kit⁺ issue de ces même souris ne possède pas cette capacité de régénération (Shinohara *et al.*, 2000). Les CSG n'expriment donc pas c-Kit. Par contre elles expriment l' $\alpha 6$ -intégrine (Shinohara *et al.*, 2000), Thy-1 (Kubota *et al.*, 2004a) et appartiennent à la SP (Side Population) (Lassalle *et al.*,

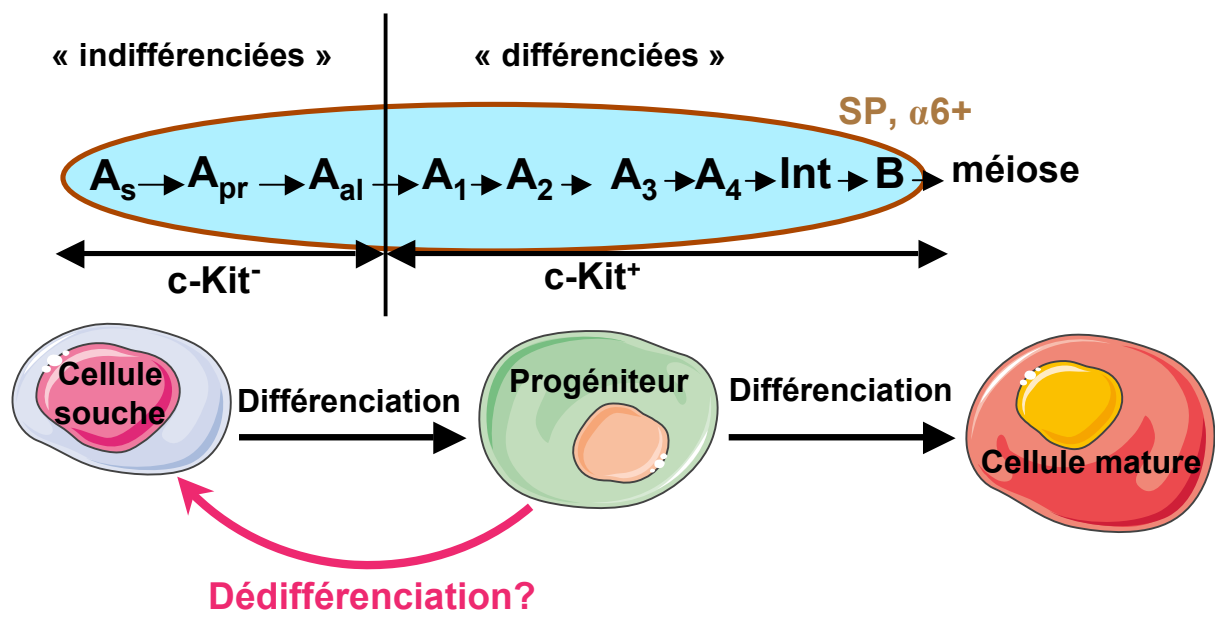


Figure 22 : Représentation schématique de l'expérience

2004). Cependant l' α 6-intégrine et la SP sont aussi des marqueurs des spermatogonies « différenciées ». Il existe également des marqueurs des spermatogonies « indifférenciées » comme les facteurs de transcriptions Sox3, Ngn3, ainsi que l'E-cadhérine (CDH1, E-Cadh) (Raverot *et al.*, 2005 ; Tokuda *et al.*, 2007).

Les cellules souches sont les seules cellules capables de régénérer un tissu grâce à leur capacité d'auto-renouvellement (permettant un maintien du pool de cellules souches) et de différenciation (pour obtenir un tissu avec des cellules matures). Donc, il est admis que seules les cellules souches ont cette capacité d'auto-renouvellement et qu'un progéniteur (une cellule engagée en différenciation) est une cellule qui n'a qu'un seul devenir : finir sa différenciation afin de devenir une cellule mature. Le processus d'engagement en différenciation d'une cellule souche est donc dit irréversible. En revanche, chez *Drosophila*, il a été montré que dans certaines conditions, les progéniteurs avaient la capacité de redevenir des CSG. La voie jak-STAT permet le maintien des CSG. Lorsque cette voie est invalidée de manière transitoire, les CSG se différencient en spermatogonies sans auto-renouvellement. Lorsque l'on ré-active cette voie, les progéniteurs engagés en différenciation sont capables de redevenir des CSG, de repeupler la niche et de régénérer un tissu fonctionnel (Brawley and Matunis, 2004). De même chez la larve de la femelle *Drosophila*, les progéniteurs des cystes (cellules en différenciation) sont capables de se dédifférencier en CSG afin d'assurer la production continue d'ovocytes (Kai and Spradling, 2004). Ces résultats montrent une nouvelle source abondante de précurseurs, capables de redevenir des CSG, et ainsi soutenir la régénération du tissu germinale après une déplétion par des agents génotoxiques, une irradiation ou simplement un vieillissement tissulaire (Cheng *et al.*, 2008).

Cette dédifférenciation des progéniteurs germinaux en CSG était possible chez les mammifères (Figure 22). Pour cela, nous avons utilisé le modèle murin, et purifié la fraction qui contient les progéniteurs germinaux engagés en différenciation, c'est-à-dire la fraction c-Kit⁺. Ces cellules ont notamment été transplantées (Annexe1) dans des receveurs irradiés létalement (déplétés en cellules germinales), et une régénération de la spermatogenèse a été observée. Une sous-population des progéniteurs germinaux murins posséderait ainsi une capacité à se dédifférencier en CSG et à recoloniser un testicule lésé.

C-I.2 Article 1 : Dédifférenciation des progéniteurs germinaux en cellules souches germinales

Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells *in vivo*.

Vilma Barroca, Bruno Lassalle, Mathieu Coureuil, Jean Paul Louis, Florence Le Page, Jacques Testart, Isabelle Allemand, Lydia Riou, Pierre Fouchet

Nature Cell Biology, 2009, volume 11, numéro 2, pages 190-196

DOI: 10.1038/ncb1826

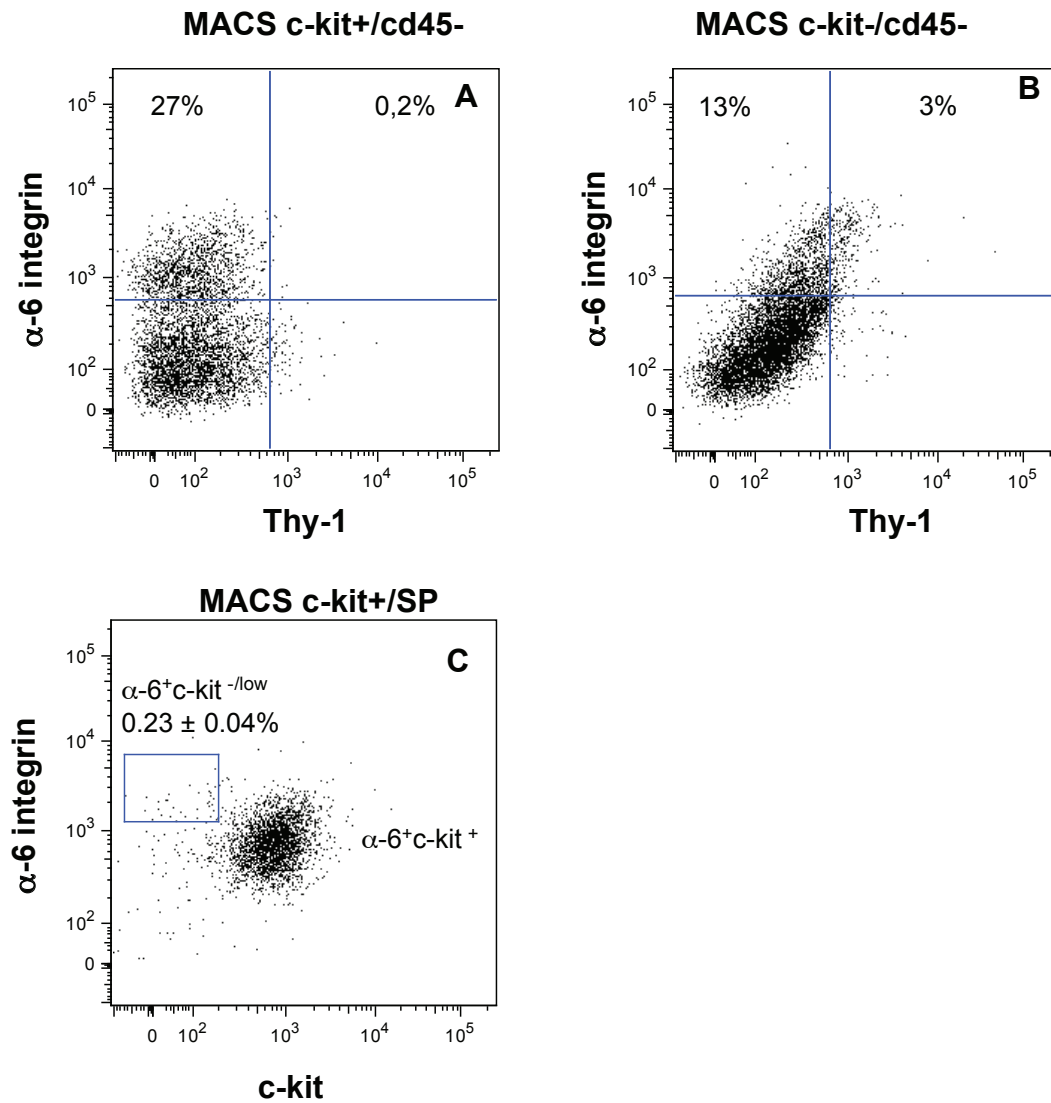


Figure S1 GSCs are found at a very low frequency in the MACS c-kit-positive cell population as shown by the absence of the joint expression of the GSC markers Thy-1 and α -6 integrin. Thy-1 and α -6 integrin expression in CD45 negative MACS c-kit-positive cell population (**a**) and CD45 negative MACS c-kit-negative cell population (**b**). As expected, Thy-1⁺ α -6⁺ positive cells were present at a low frequency (3%) in the c-kit-negative fraction. Quadrants were placed according to the IgG controls. Flow cytometry data are representative of three independent experiments. (**c**). c-kit and α -6 integrin expression in MACS c-kit-positive cell

population gated on the Side Population. The frequency of SP α -6⁺c-kit^{-/low} cells was $0.23 \pm 0.04\%$ ($n=4$), corresponding to 230 cells for 10^5 donor cells. Given that the stem cell activity of the SP α -6⁺c-kit^{-/low} is 151 colonies/ 10^5 donor cells (see Figure 2), 230 SP α -6⁺c-kit^{-/low} contaminating cells would generate only 0.35 clone ($230 \times 151 / 10^5$ clones), and this contribution is minor compared to the 4.7 clones generated from 10^5 SP α -6⁺c-kit⁺ donor cells. Therefore, the contamination by GSCs cannot be responsible for the regeneration that we observed for differentiating spermatogonia.

Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells *in vivo*

Vilma Barroca^{1,3}, Bruno Lassalle^{1,3}, Mathieu Coureuil¹, Jean Paul Louis², Florence Le Page¹, Jacques Testart¹, Isabelle Allemand¹, Lydia Riou¹ and Pierre Fouchet^{1,4}

In adults, stem cells are responsible for the maintenance of many actively renewing tissues, such as haematopoietic, skin, gut and germinal tissues. These stem cells can self-renew or be committed to becoming progenitors. Stem-cell commitment is thought to be irreversible but in male and female *Drosophila melanogaster*, it was shown recently that differentiating germ cells can revert to functional stem cells that can restore germinal lineage^{1,2}. Whether progenitors are also able to generate stem cells in mammals remains unknown. Here we show that purified mouse spermatogonial progenitors committed to differentiation can generate functional germinal stem cells that can repopulate germ-cell-depleted testes when transplanted into adult mice. We found that GDNF, a key regulator of the stem-cell niche, and FGF2 are able to reprogram *in vitro* spermatogonial progenitors for reverse differentiation. This study supports the emerging concept that the stem-cell identity is not restricted in adults to a definite pool of cells that self-renew, but that stemness could be acquired by differentiating progenitors after tissue injury and throughout life.

In adult mouse testes, germinal stem cells (GSCs), also called A_{single} (A_s) spermatogonia, are located on the basal membrane of seminiferous tubules. GSCs can self-renew or produce A_{paired} (A_p) spermatogonia. After successive divisions, A_p spermatogonia differentiate and form chains of 4, 8 or 16 aligned spermatogonia (A_{al}) and migrate along the basal membrane. On the basis of morphological criteria, GSCs and committed A_p and A_{al} spermatogonia are classically called undifferentiated spermatogonia, although this classification can be confusing because this population contains progenitors undergoing differentiation. A_{al} spermatogonia differentiate into more committed A_1 spermatogonia that will divide and differentiate into A_2 , A_3 , A_4 , intermediate and B spermatogonia, which will undergo meiosis after a final mitosis³. 'Undifferentiated' (GSC- A_s , A_p and A_{al}) and 'differentiating' (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , intermediate and B) spermatogonia differ according to the expression of genes for the receptor tyrosine kinase c-kit, the HMG transcription factor Sox3, the bHLH transcription factor

neurogenin-3 (Ngn3) and E-cadherin (E-cadh) (Fig. 1a)^{4–8}. In particular, GSCs do not express c-kit, as shown by transplantation of c-kit-negative and c-kit-positive cells from adult mouse cryptorchid testes in which c-kit-positive differentiating spermatogonia are absent⁹.

We assessed the potential of mouse spermatogonial progenitors to regenerate spermatogenesis after transplantation. c-kit-positive differentiating spermatogonia from enhanced green fluorescent protein (EGFP)-transgenic mice were purified and transplanted into seminiferous tubules of γ -irradiated germ-cell-depleted testes. Ten weeks later, the donor EGFP-c-kit-positive cells had colonized the seminiferous tubules of the recipient testes (Fig. 1b). In testicular single-cell suspensions, EGFP-positive cells could easily be distinguished from recipient cells by flow cytometry (Fig. 1c). They showed the Hoechst 33342 profile, which characterizes normal spermatogenesis^{10,11}, and included meiotic and haploid spermatid cells (Fig. 1d). Elongated spermatids were observed by histology in EGFP-positive tubules (Fig. 1e). Thus, c-kit positive cells were able to colonize, proliferate and differentiate in recipient testes. Spermatogonial transplantation provides a functional and quantitative assay to estimate GSC activity, by the formation of a clonal spermatogenic colony¹². The number of EGFP-positive spermatogenic colonies generated 10 weeks after transplantation of total testicular cells and c-kit-positive cells was compared (Fig. 1f). The colony-forming activity of c-kit-positive cells was 1.57-fold higher than the activity of total cells (Fig. 1g, $P < 0.02$). Consistent with this result, previous work has suggested that c-kit-positive germ cells, purified using immunomagnetic microbeads, retained colony-forming activity that was slightly higher (1.7-fold higher) than total cells, although this increase was not statistically significant¹³. We then checked whether the selected c-kit-positive donor cells simultaneously expressed the GSC markers, Thy-1 and α -6 integrin^{9,14}. GSCs were present at a very low frequency in this fraction and, therefore, were not responsible for the observed regeneration (Supplementary Information, Fig. S1). These results show that adult c-kit-positive spermatogonial progenitors, although committed to differentiate, retain the potential to regenerate spermatogenesis after transplantation, but with a low efficiency.

¹Laboratoire Gamétogénèse, Apoptose et Génotoxicité, INSERM U566, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, Direction des Sciences du Vivant, CEA, 92265 Fontenay aux Roses, France. ²UMR 6218, CNRS, 45071 Orléans, France.

³These authors contributed equally to this work

⁴Correspondence should be addressed to P.F. (e-mail: pierre.fouchet@cea.fr)

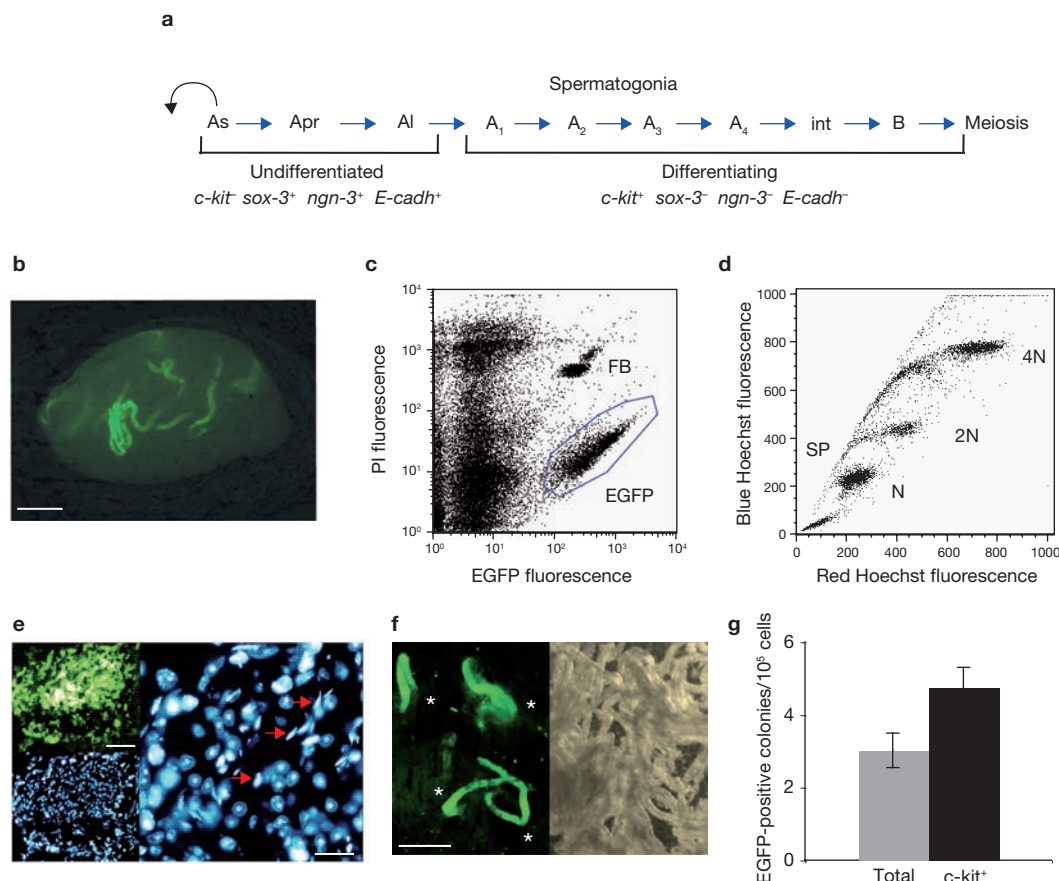


Figure 1 Adult *c-kit*-positive spermatogonial progenitors selected by MACS have the potential to regenerate spermatogenesis after transplantation in germ-cell depleted testis. **(a)** Diagram showing the first steps of the differentiation process of GSCs and spermatogonia, and the expression pattern of several markers of differentiation. **(b)** Detection by fluorescence microscopy of fluorescent seminiferous tubules in a recipient testis 10 weeks after transplantation with germinal EGFP-*c-kit* positive cells. Scale bar, 1 mm. **(c)** EGFP and propidium iodide (PI) fluorescence analysis of testicular cell suspension from a recipient testis. EGFP-positive cells (EGFP) and TruCount fluorescent beads (FB) are indicated. **(d)** Hoechst fluorescence (red/blue Hoechst fluorescence) analysis of EGFP-positive cells in a recipient testis gated from **c**. Side Population (SP), meiotic

spermatocytes I (4N) and spermatocytes II (2N), and postmeiotic spermatids (N) are indicated. **(e)** Frozen section of a colony derived from EGFP-*c-kit* positive cells, analysed for EGFP (upper left) and DAPI staining (right and lower left). Arrows show elongated spermatids. Scale bar, 0.1 mm (left) and 25 μm (right). **(f)** Typical whole-mount EGFP fluorescence (left) and brightfield (right) observation of some seminiferous tubules from recipient testes 2 months after transplantation (asterisks indicate EGFP-positive colonies). Scale bar, 1 mm. **(g)** Colonization of a recipient testis by transplanted *c-kit* positive fraction, compared with total. The colonization efficiency is represented by the number of EGFP-positive spermatogenic colonies generated per 10⁵ cells injected. The values are mean ± s.e.m. (n = 9 testes).

We have previously shown that GSCs and spermatogonial progenitors in adult mice express α -6 integrin and harbour the side population (SP) phenotype, based on the Hoechst 33342 efflux by the ABC transporter *Bcrp1*^{10,11}. To further characterize the *c-kit*-positive cells responsible for regeneration, we analysed testicular populations according to Hoechst staining, α -6 integrin and *c-kit* expression (Fig. 2a–c). α -6⁺*c-kit*⁺ cells and α -6⁺*c-kit*^{low} cells represented 55 ± 9% and 10 ± 2%, respectively, of the SP. SP α -6⁺*c-kit*⁺ cells and SP α -6⁺*c-kit*^{low} cells were sorted and the expression of *sox3*, *E-cadherin*, and *ngn3* markers^{6–8} confirmed that the SP α -6⁺*c-kit*^{low} fraction consisted of undifferentiated spermatogonia (Fig. 2d). The absence of expression of these markers in the SP α -6⁺*c-kit*⁺ fraction further indicated that these cells were differentiating spermatogonia.

As expected, SP α -6⁺*c-kit*^{low} undifferentiated spermatogonia cells, which contain GSCs, showed a regenerative potential when transplanted into the seminiferous tubules of germ-cell-depleted testes. EGFP-donor SP α -6⁺*c-kit*^{low} cells colonized the seminiferous tubules of the recipient testes after ten weeks (Fig. 2e) and produced normal spermatogenesis

(Fig. 2f). We observed a 50-fold increase in the colony-forming activity of SP α -6⁺*c-kit*^{low} cells, compared with total cells (Fig. 2g–2h; *P* = 0.003). Given that 151 clones were generated per 10⁵ donor cells, and that colonization efficiency is around 5% in the GSC transplantation assay¹⁵, it means that 1 in 33 SP α -6⁺*c-kit*^{low} cells (10⁵/151 × 20) is GSC. The stem-cell activity of this population (151 colonies/10⁵ donor cells) is very close to previously published data of transplantation with adult wild-type MHC-I⁺Thy-1⁺ α -6⁺ donor cells (162 colonies/10⁵ donor cells)¹⁴. These data show that SP α -6⁺*c-kit*^{low} population is highly enriched in GSCs and confirm our previous data and other data showing that SP contains the GSCs in normal adult and immature mice^{11,16}, although it has been reported that SP does not contain GSCs in the cryptorchid mouse model¹⁷.

Transplanted SP α -6⁺*c-kit*⁺ cells, that is, differentiating spermatogonia, from EGFP-transgenic mice also showed a regenerative potential, colonized the seminiferous tubules of the recipient testes (Fig. 3a) and generated normal spermatogenesis (Fig. 3b). The colony-forming activity was about 5-fold higher in SP α -6⁺*c-kit*⁺ cells, compared with total

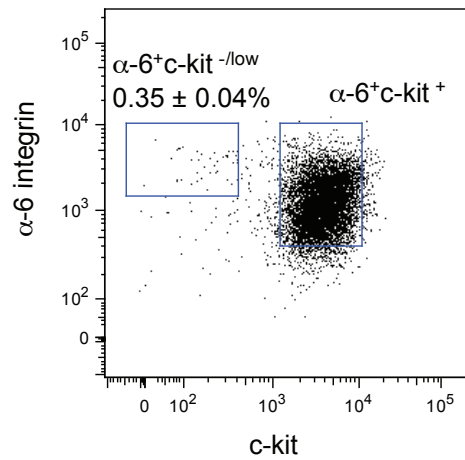


Figure S2 Analysis by flow cytometry of the sorted SP α -6⁺c-kit⁺ fraction according to α -6 integrin and c-kit expression, in order to determine the contamination by SP α -6⁺c-kit^{-/low} cells (containing GSC) before

transplantation. Cells are gated on SP. α 6+c-kit⁺ and α -6⁺c-kit^{-/low} populations and cell distribution are indicated (mean ± SEM, n=7).

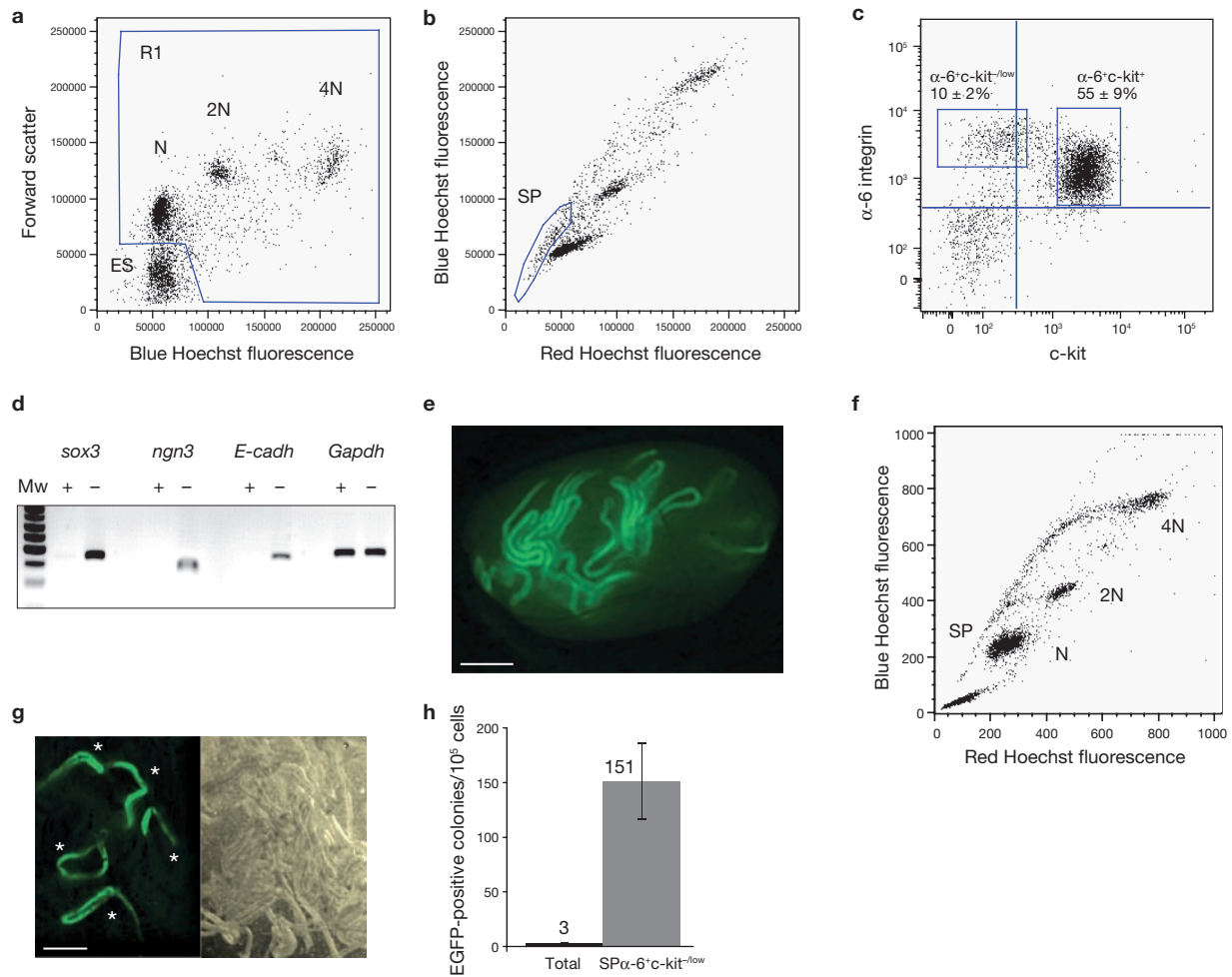


Figure 2 Flow cytometric analysis of c-kit and stem-cell activity in SPα-6+c-kit^{low} subpopulation of wild-type adult testes cells. (a) Blue Hoechst 33342 fluorescence/forward scatter analysis of viable cells. Diploid (2N), meiotic (4N) and postmeiotic (N) cells are indicated, as elongated spermatids (ES). A fraction of the population was gated (R1) to discard elongated cells from further analysis. (b) Red/blue Hoechst 33342 fluorescence of cells gated in R1. Side population (SP) is indicated. (c) α-6 integrin and c-kit expression of the SP cells. SPα-6+c-kit⁺ and SPα-6+c-kit^{low} populations, and cell distribution are indicated (mean ± s.e.m., $n = 6$). (d) RT-PCR analysis of *sox3*, *E-cadherin*, *ngn3* markers of SPα-6+c-kit⁺ (+) and SPα-6+c-kit^{low} (-) populations. (e) Detection of fluorescent

seminiferous tubules in a recipient testis transplanted with EGFP SPα-6+c-kit^{low} cells 10 weeks after transplantation. Scale bar, 1 mm. (f) Red/blue Hoechst 33342 fluorescence analysis of EGFP-positive cells in a recipient testis. (g) Whole-mount EGFP fluorescence (left) and brightfield (right) observation of some seminiferous tubules from recipient testis 2 months after transplantation (asterisks indicate EGFP-positive colonies). Scale bar, 1 mm. (h) Enhanced colonization of recipient testis by transplanted SPα-6+c-kit^{low} ($n = 7$) fraction, compared with total ($n = 9$). The colonization efficiency is represented by the number of EGFP-positive spermatogenic colonies generated per 10⁵ cells transplanted (values are mean ± s.e.m.).

cells (Fig. 3c; $P < 0.002$). To evaluate the production of differentiated daughter cells by stem cells and the expansion of the colony, we calculated the number of spermatids generated per clone for each recipient testis. The clones generated by SPα-6+c-kit⁺ cells showed a lower capacity to produce spermatids, compared with clones derived from total cells 10 weeks after transplantation ($P < 0.02$; Fig. 3d), suggesting that colonies generated from c-kit-positive cells should expand with less efficiency. To exclude the possibility that the sorted SPα-6+c-kit⁺ fraction was contaminated with GSCs, we determined the percentage of SPα-6+c-kit^{low} (containing GSCs) in these sorted fractions before transplantation (Supplementary Information, Fig. S2). The frequency of SPα-6+c-kit^{low} cells was $0.35 \pm 0.04\%$ (mean ± s.e.m., $n = 7$), corresponding to 350 cells for 10⁵ donor cells. This number of SPα-6+c-kit^{low}-contaminating cells generated only 0.5 clones ($350 \times 151/10^5$ clones), a minor contribution

when compared with the 14 clones generated for 10⁵ SPα-6+c-kit⁺ donor cells. Hence, the contamination by GSCs cannot be responsible for the regeneration that we observed for differentiating spermatogonia. These data confirm that the late spermatogonial progenitors, the differentiating spermatogonia SPα-6+c-kit⁺, which are already committed to differentiate, still retain regenerative potential.

The regeneration of spermatogenesis by differentiating c-kit-positive spermatogonia could result from at least two mechanisms. Differentiating spermatogonia could pursue their differentiation process after transplantation and produce meiotic and postmeiotic cells, a process that could be compared with short-term repopulating processes of progenitors in haematopoiesis. However, we analysed the testes repopulation 10 weeks after transplantation. This interval corresponds to two cycles of spermatogenesis, which means that the differentiated postmeiotic spermatids

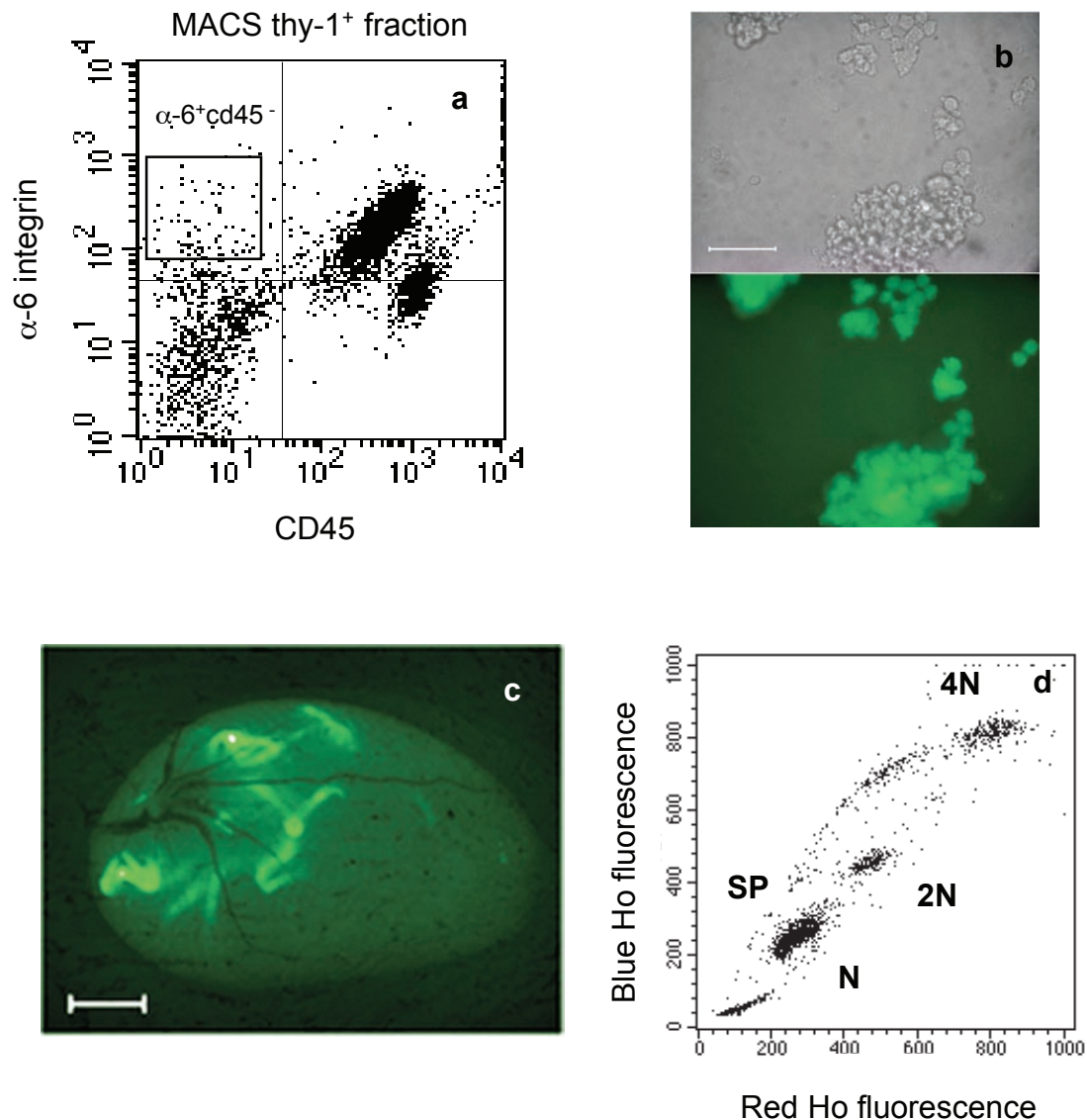


Figure S3 Long term growth of adult GSC. **a**, α -6 integrin and CD45 expression analysis of MACS Thy-1 positive cell fraction from adult testis. Thy-1⁺ α -6⁺cd45⁻ cells were flow sorted and cultivated on MEF feeder in the GSC medium supplemented with GDNF, GFRalpha1 and FGF2. **b**, Observation of three dimensional germ cell cluster after 1 month of culture. Upper, phase microscopy. Lower, EGFP fluorescence. (Scale bar, 50 μ m). **c**, Adult GSCs after two months of culture have the potential to regenerate spermatogenesis.

Detection of fluorescent seminiferous tubules in a recipient testis transplanted with EGFP GSC cultivated two months as determined by fluorescence microscopic analysis of whole testis 10 weeks after transplantation. (Scale bar, 1 mm). **d**, Hoechst fluorescence (red/blue Hoechst fluorescence) analysis of EGFP positive cells in recipient testis from Fig. 1c shows that regenerated spermatogenesis is normal. Side Population (SP), meiotic spermatocytes I (4N) and spermatocytes II (2N) and postmeiotic spermatids (N) are indicated.

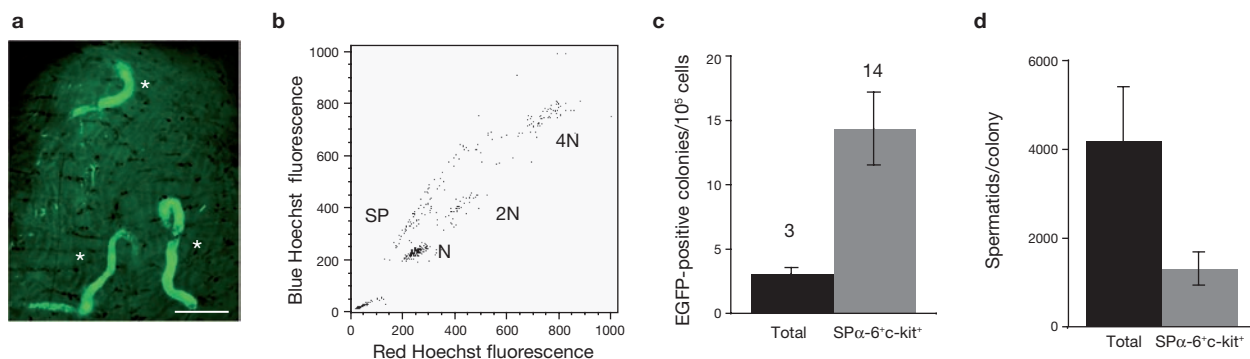


Figure 3 Adult SPα6+c-kit⁺ cells differentiating spermatogonia have the potential to regenerate spermatogenesis after transplantation. (a) Typical whole-mount EGFP fluorescence of some seminiferous tubules from a recipient testis 2 months after transplantation (asterisks indicate EGFP-positive colonies; scale bar, 1 mm). (b) Red/blue Hoechst fluorescence analysis of EGFP-positive cells in recipient testes. (c) Enhanced colonization of recipient testes by transplanted SPα6+c-kit⁺ fraction ($n = 7$), compared with total ($n = 9$). The colonization efficiency

is represented by the number of EGFP-positive spermatogenic colonies generated per 10^5 cells injected (values are mean $\pm$ s.e.m.). (d) Levels of production of spermatids per colonies in recipient testes transplanted with SPα6+c-kit⁺ fraction ($n = 7$) and total population ($n = 9$). For each transplanted testis, the number of EGFP-positive spermatids per recipient testis was determined by flow cytometry, and was divided by the number of EGFP-positive colonies generated (number of spermatids produced/number of colonies generated; values are mean $\pm$ s.e.m.).

are derived from cells with self-renewal potential and that a steady-state spermatogenesis is established. Consistent with this, we have observed EGFP-donor-derived spermatogenesis one year after transplantation with donor EGFP-c-kit-positive fraction (Fig. 4a), and spermatogenic colonies could be clearly identified (Fig. 4b). Spermatogenesis regeneration could also result from a de-differentiation process of differentiated germ cells to revert to stem cells, as previously observed in genetic models of male and female *Drosophila*^{1,2}. To test this hypothesis, the EGFP-c-kit positive fraction was transplanted into depleted recipient testes and ten weeks later, EGFP-positive cells were analysed according to the SP phenotype, α-6 integrin and c-kit expression. We found that $30 \pm 4\%$ (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$) of EGFP-positive SP cells did not express the c-kit receptor (Fig. 4c), demonstrating that differentiating spermatogonia reverted to early undifferentiated spermatogonia during the regenerative process after transplantation. This observation was strengthened by the detection of a subpopulation ($26 \pm 4\%$) that expresses the GSCs markers SP, α-6 integrin and Thy-1 (Fig. 4d).

Serial transplantations were also performed to examine the self-renewal capacity of cells derived from transplanted EGFP c-kit-positive differentiating spermatogonia. Total EGFP-positive cells from two primary recipient testes were transplanted into new germ-cell-depleted recipient testes. Colonization of seminiferous tubules of the secondary recipient by EGFP-donor c-kit-positive derived cells from the primary recipient was observed ten weeks after transplantation (Fig. 4e); diploid, meiotic tetraploid and haploid spermatid cells were detected after DNA staining of EGFP cells (Fig. 4f). These serial transplantations demonstrated the long-term repopulating ability and the self-renewal of cells derived from the c-kit-positive spermatogonia transplanted in the first recipient testis. Together, our data demonstrate that c-kit-positive differentiating spermatogonia de-differentiate in functional stem cells after transplantation.

Stem cells reside in a local tissue microenvironment or niche, which regulates their cell fate. The somatic Sertoli cells are a major component of the GSC niche, and factors produced by these cells, such as the glial-cell-derived neurotrophic factor (GDNF) and the transcription factor ets-related molecule (ERM), are crucial for GSC maintenance^{18,19}. The tyrosine kinase receptor c-kit and its ligand KitL,

which is expressed by the Sertoli cells as a soluble or transmembrane isoform, have been previously shown to be involved in proliferation, survival and migration of gonocytes and spermatogonia²⁰. Moreover, soluble KitL, released after cleavage by MMP-9, has a role in directing haematopoietic stem- and progenitor-cell recruitment, promoting haematopoietic reconstitution²¹. Hence, we investigated whether KitL and c-kit are involved in the recruitment of differentiating spermatogonia to the testicular stem-cell niche. First, we examined *in vitro* the influence of KitL on the migration of c-kit-positive spermatogonia using Transwell chambers. When the lower chamber was loaded with 10 or 40 ng ml⁻¹ of KitL, we observed an increase in chemotactic migration of differentiating spermatogonia, which was impaired by the addition of the ACK45 antibody, which neutralizes c-kit (Fig. 5a). A weak chemokinetic response (enhanced cellular motility) was noted when the lower and upper chambers were loaded with KitL. Thus, KitL acts mainly as a chemoattractant to differentiating spermatogonia. We studied the effects of c-kit/KitL interaction *in vivo* by transplantation of SPα-6+c-kit⁺ pre-treated with the ACK45 neutralizing antibody to c-kit. We did not observe any effects of c-kit neutralization on the regenerative potential by this strategy (data not shown).

GSCs can be maintained and propagated in long-term culture in serum-free medium in the presence of specific growth factors^{14,22}. The *in vitro* germinal cluster formation assay provides a reliable technique to detect GSCs and to study the effects of specific components of the niche²³. We developed a culture method on a MEF feeder that supports long-term growth of adult GSCs in presence of GDNF, FGF2 and GFRα1 (Supplementary Information, Fig. S3). We examined the potential of SPα6+c-kit⁺ differentiating spermatogonia to grow and form germ-cell clumps in long-term culture. EGFP-SPα6+c-kit⁺ were sorted and seeded on the MEF feeder in GSC medium. After 2 weeks, germ-cell clumps were clearly observed in cultures of EGFP-SPα6+c-kit⁺ cells (Fig. 5b). However, the capacity of SPα-6+c-kit⁺ cells (K⁺) to form germ-cell clumps was low, compared with the GSC-enriched SPα-6+c-kit^{-low} population (K⁻), (2 clusters/500 cells versus 46 clusters/500 cells, respectively; Fig. 5c). Contamination with SPα-6+c-kit^{-low} cells of the sorted SPα-6+c-kit⁺ fraction should only contribute to 0.16 cluster ($[0.35 \times 500/100] \times [46/500]$

Number of EGFP SP α -6 ⁺ c-kit ^{-low} cells	Number of SP α -6 ⁺ c-kit ⁺ cells	Contamination level (%)	Number of EGFP clusters/500 cells (mean $\pm$ SEM)
8	2000	0.4	0.12 $\pm$ 0.04

Table S1 Number of clusters generated after 8 days of culture by SP α -6⁺c-kit^{-low} cells in a mixture of C57Bl6J SP α -6⁺c-kit⁺ and EGFP SP α -6⁺c-kit^{-low} cells. This mixture reproduces the level of contamination (0.4 %) by SP α -6⁺c-kit^{-low} cells in flow sorted SP α -6⁺c-kit⁺ experiments. The cells were cultivated on MEF feeder which supports long term growth of adult GSCs in presence of GDNF, FGF2, and GFRalpha1, as *in vitro* germinal cluster formation assay provides a reliable technique to detect GSCs within one week²³. After 8 days of culture, the number of EGFP germ cell clumps was determined. The frequency of EGFP clones was 0.12 $\pm$ 0.04 (n=15). Thus, SP α -6⁺c-kit^{-low} contamination can not be responsible for the formation of the germ cell clumps observed with SP α -6⁺c-kit⁺ cells (2 $\pm$ 0.3 clusters/500 cells).

This result (0.12 clusters/500 input cells) is very close to the expected contribution of the contamination with SP α -6⁺c-kit^{-low} cells that we calculated: 0.16 cluster/500 input cells ([0.35 X 500/100] X [46/500] clusters). Hence, it validates our methodology to calculate the expected contribution of the SP α -6⁺c-kit^{-low} cells contamination to the cluster formation assay and to the regenerative capacity of the SP α -6⁺c-kit⁺ cells.

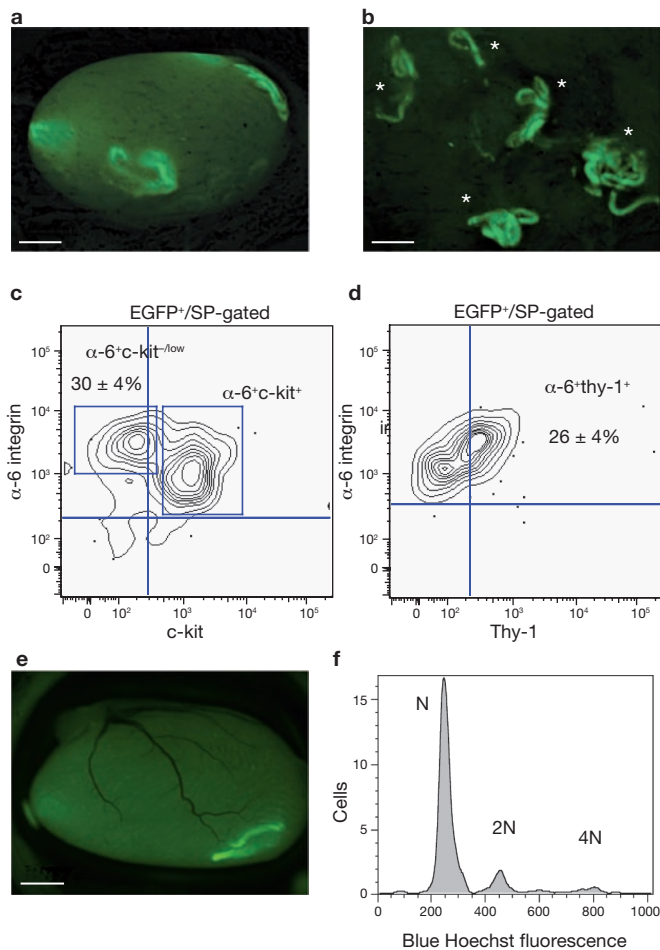


Figure 4 Differentiating c-kit-positive spermatogonia de-differentiate and act as functional GSCs after transplantation. (a, b) Macroscopic observation of fluorescence in recipient testes (a) and whole-mount observation of the seminiferous tubules (b) 1 year after transplantation with donor EGFP c-kit positive spermatogonia (asterisks indicate donor-derived EGFP-positive spermatogenic colonies; scale bar, 1 mm). (c, d) SP/EGFP-positive cells from recipient testes showing α-6 integrin and c-kit expression (c), and α-6 integrin and thy-1 (d) expression 10 weeks after transplantation with donor EGFP–c-kit positive spermatogonia. α-6⁺c-kit⁺, α-6⁺c-kit^{low} and α-6⁺thy-1⁺ populations are indicated, as the cell distribution of α-6⁺c-kit^{low} and α-6⁺thy-1⁺ populations (mean ± s.e.m., $n = 7$). (e) Detection of fluorescent seminiferous tubules in a secondary recipient testis after serial transplantation of cells from a primary recipient transplanted with c-kit positive differentiating spermatogonia. Scale bar, 1 mm. (f) Hoechst fluorescence analysis of EGFP-positive cells from the secondary recipient testis after serial transplantation. Diploid (2N), meiotic (4N) and postmeiotic (N) cells are indicated.

clusters) and, therefore, is not responsible for the observed germ-cell clumps (Supplementary Information, Table S1). Five hundred cells from SPα-6⁺c-kit⁺ and SPα-6⁺c-kit^{low} 2-week cultures were seeded on new feeders. Two weeks later, cells derived from SPα-6⁺c-kit⁺ (DK⁺) continued to form germ-cell clumps, showing their long-term growth and maintenance. They also showed a capacity to generate cell clusters similar to SPα-6⁺c-kit^{low} cells (DK⁻) (Fig. 5c). In a culture experiment, germ-cell clumps derived from SPα-6⁺c-kit⁺ after 4 weeks of culture were collected and cells were transplanted into seminiferous tubules of germ-cell-depleted testes. They colonized the seminiferous tubules of the recipient testes (Fig. 5d), and normal spermatogenesis was observed with the

presence of spermatids (Fig. 5e). Hence, differentiating spermatogonia could be reprogrammed *in vitro* in the presence of GDNF and FGF2 to acquire the same capacity of GSCs to grow and form germ-cell clumps in the long-term, and regenerate spermatogenesis after transplantation. In addition, we observed that two other growth factors, KITL and LIF, did not improve *in vitro* the formation of germinal cluster, and therefore seem not to be involved in the reprogramming of SPα-6⁺c-kit⁺ cells (Fig. 5f).

Undifferentiated spermatogonia Ap-A1, which are considered to be early steps of differentiation, could still retain stem-cell properties when the intracellular cytoplasmic bridges are broken after irradiation^{3,24}. A recent study suggested that actual and potential stem cells could be found in this compartment and that potential stem cells should be the immediate descendants of the stem cells, that is, a fraction of A_s and A_p spermatogonia²⁵. However, mouse differentiating spermatogonia are considered so far to be irreversibly committed to differentiation, leading to meiosis and production of spermatozoa³. Here we show that c-kit-positive differentiating spermatogonia can reverse their differentiation program and act as functional stem cells, contributing to clonogenic activity and regeneration of spermatogenesis after transplantation in depleted recipient testes.

Recent landmark studies reported the possibility of reprogramming differentiated cells to pluripotency after genetic modification^{26,27}. Our results underscore the remarkable plasticity of the late c-kit transit-amplifying progenitors in mouse and the conservation of the de-differentiation ability of spermatogonial progenitors between *Drosophila* and mouse². The testicular niche, which controls the fate of GSCs, could also modulate reversibility of the commitment process of spermatogonial progenitors, notably in the case of tissue injury. After busulphan treatment, damaged testes devoid of germ cells showed a strong increase in GDNF expression²⁸, which appears to be a crucial factor in the *in vitro* reprogramming of differentiating spermatogonia that we observed. c-kit/KitL could also have a role in the chemotactic migration of differentiating spermatogonia to the niche. In addition, it will be interesting to test the regenerative potential of the A₁ progenitors of the undifferentiated spermatogonia population, when specific markers are available.

Many unanswered questions remain about the contribution of progenitors to regeneration of the stem-cell pool in normal steady spermatogenesis, about the regenerative potential of specific differentiation stages among the pool of spermatogonial progenitors, and their potential use as an alternative source of cells for regenerative medicine. Moreover, mechanisms regulating this reprogramming are unknown. In this regard, the acquisition of long-term reconstitution capacity by multipotent progenitors in the haematopoietic lineage from triple *p16^{Ink4a}p19^{Arf}Trp53* mutant mice is promising²⁹. Whether the ability of spermatogonial progenitors to de-differentiate could be shared by other mammalian self-renewing tissues, remains to be further investigated. Nevertheless, the germinal lineage seems to have a remarkable and singular plasticity, compared with other tissues in mice, as also shown by the recent derivation of pluripotent embryonic stem-like cells from adult spermatogonia^{30,31}, and the switch of developmental fate of spermatogonia into cells with mammary epithelial progenitor properties when transplanted into mammary fat pads³². □

METHODS

Mice. Adult male C57BL/6 (Charles River) and EGFP-transgenic mice³³ (C57BL/6-TgN(β-act-EGFP)01Os, a gift from M. Okabe, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka, Japan) were raised in our animal facility. All animal procedures reported in this paper were carried out in accordance with French

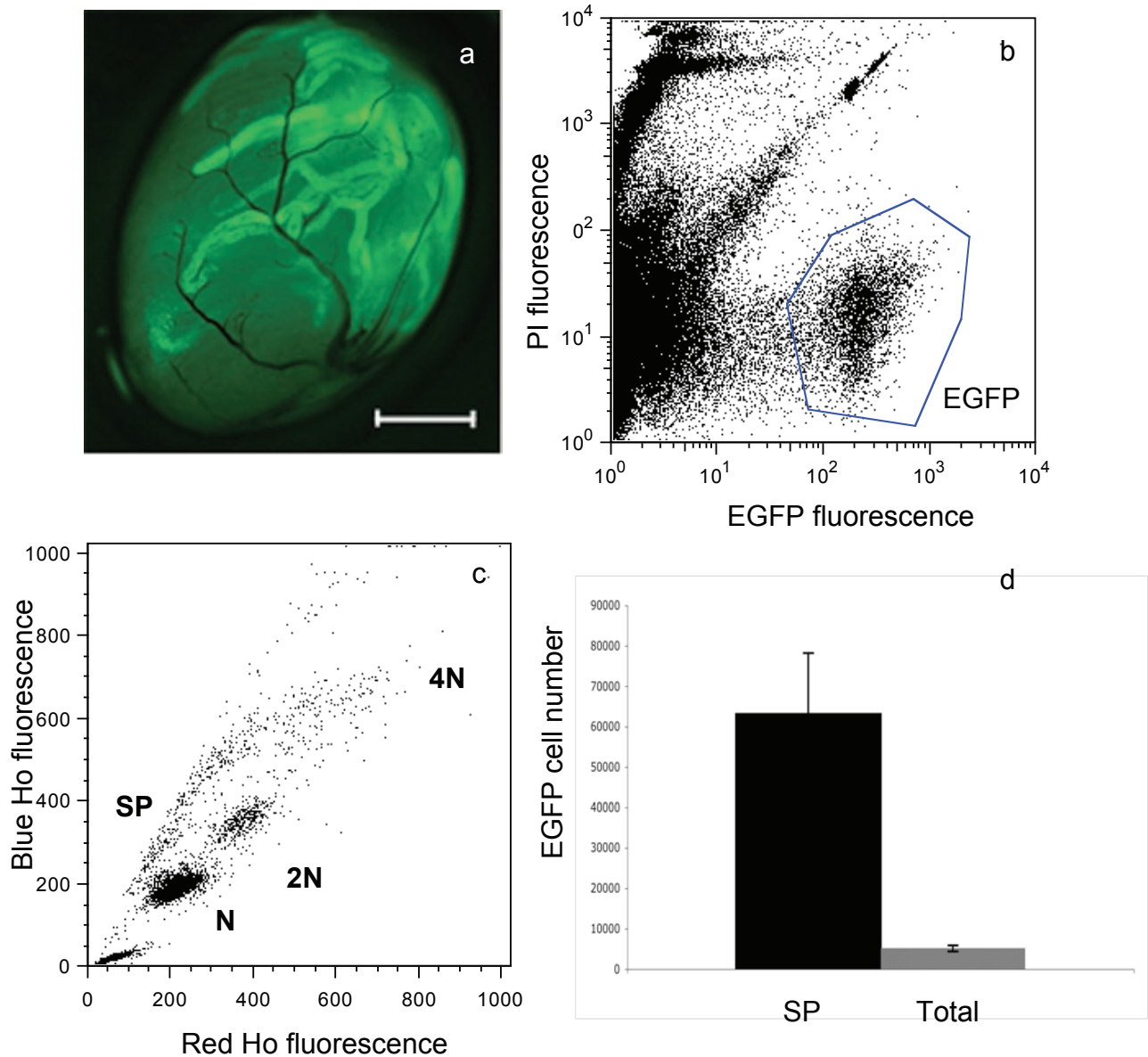


Figure S4 Efficiency of the γ -irradiation conditioning of recipient testis for the transplantation and regeneration of spermatogenesis. **a**, Detection of fluorescent seminiferous tubules in a recipient testis transplanted with EGFP total testicular cells 10 weeks after transplantation. (Scale bar, 1 mm). **b**, EGFP and propidium iodide (PI) fluorescence analysis of testicular cell suspension from recipient testis in order to determine EGFP positive cell number per recipient testis by flow cytometry. EGFP positive cells

(EGFP) are boxed **c**, Hoechst fluorescence (red/blue Hoechst fluorescence) analysis of EGFP positive cells in recipient testis gated from Fig. S4b. Side Population (SP), meiotic spermatocytes I (4N) and spermatocytes II (2N) and postmeiotic spermatids (N) are indicated. **d**, Enhanced colonization of recipient testis by transplanted SP cells compared to total population. EGFP positive cell number per recipient testis was normalized to 10^5 cells injected. The values are mean $\pm$ SEM ($n=3$). The difference is significant ($P < 0.03$).

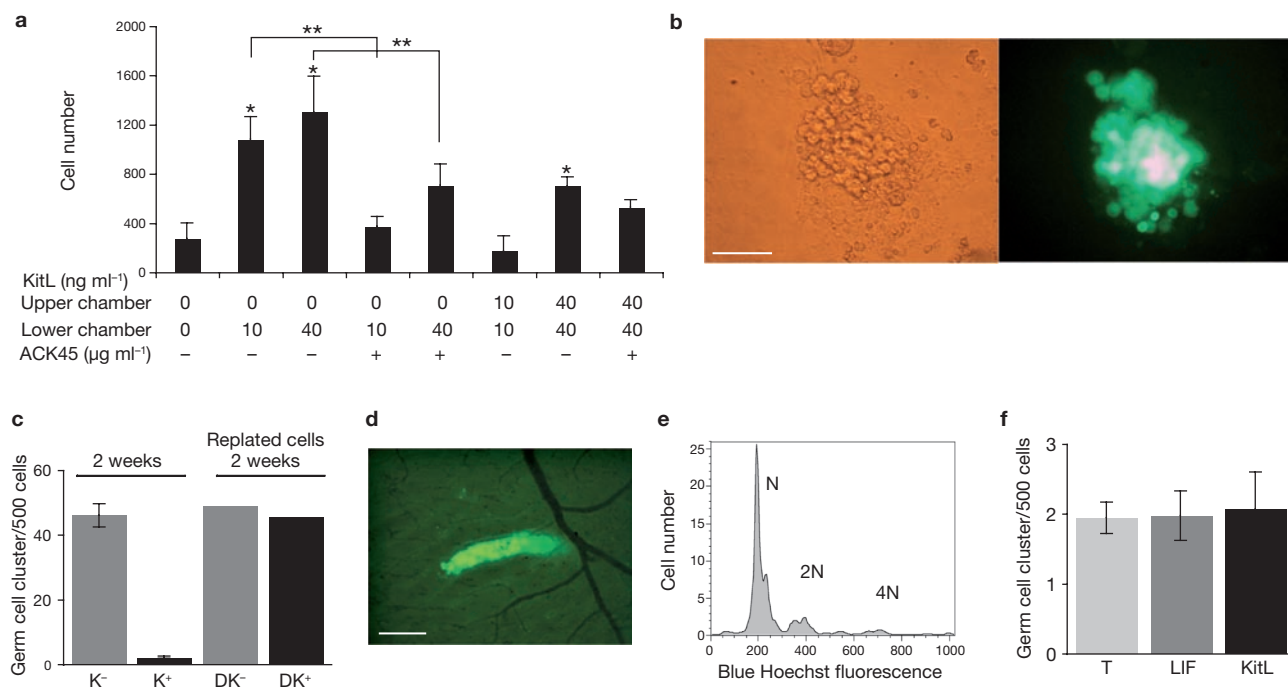


Figure 5 Chemoattraction of c-kit positive spermatogonia by KitL *in vitro*, and generation of germ-cell clusters with long-term clonogenic activity from c-kit positive spermatogonia in culture in presence of GDNF and FGF2. **(a)** *In vitro* migration assay. KitL concentrations in upper and lower chambers are indicated, as well as the addition of ACK45 neutralizing antibody to c-kit in the upper chamber (+). Mean $\pm$ s.e.m. of triplicate measurements are shown. Differences are significant (* $P \leq 0.01$) between 0/0 (control) and 0/10, 0/40, 40/40 conditions. Inhibition with the ACK45 neutralizing antibody was significant (** $P < 0.002$) in 0/10, 0/40 conditions (one-way ANOVA test with Fisher's LSD post-hoc). **(b)** *In vitro* cluster formation assay. Phase microscopic (left) and EGFP fluorescence (right) appearance of a germ-cell cluster after 2 weeks of culture of sorted EGFP-positive SP α -6⁺c-kit⁺ cells in presence of GDNF and FGF2 on feeder

cells. Scale bar, 50 μ m. **(c)** Number of germ-cell clusters generated after 2 weeks from sorted SP α -6⁺c-kit⁺ (K⁺) and SP α -6⁺c-kit^{-low} (K⁻) cells ($n = 10$), and from 2-week cultures derived SP α -6⁺c-kit⁺ cells (DK⁺) and SP α -6⁺c-kit^{-low} cells (DK⁻) after two weeks, that is, 4 weeks after the initial seeding (mean of $n = 2$). **(d)** Macroscopic observation of fluorescence in recipient testes 10 weeks after transplantation with 4-week-culture cells derived from EGFP-positive SP α -6⁺c-kit⁺ spermatogonia. Scale bar, 100 μ m. **(e)** Hoechst fluorescence analysis of EGFP-positive cells from the recipient testis after transplantation. Diploid (2N), meiotic (4N) and postmeiotic (N) cells are indicated. **(f)** Number of germ-cell clusters generated from sorted SP α -6⁺c-kit⁺ cultivated in presence of GDNF and FGF2 (T, $n = 8$), GDNF, FGF2 and LIF (LIF, $n = 8$), GDNF, FGF2 and KitL (KitL, $n = 4$). Mean $\pm$ s.e.m. are shown.

Government regulations (Services Vétérinaires de la Santé et de la Production Animale, Ministère de l'Agriculture).

Flow cytometry analysis, immunomagnetic and flow-cell sorting. Testicular single-cell suspensions from 2–3-month-old mice were obtained as described previously¹¹. MACS (Miltenyi Biotech) c-kit-positive fraction of cells was obtained using anti-c-kit microbeads according to the manufacturer's protocol. Hoechst staining of cell suspensions was performed as described previously¹¹. Cells were then labelled with monoclonal antibodies (1 μ g per 10⁶ cells) from BD Pharmingen: anti-c-Kit-biotin (2B8), anti-CD45-PC5 or FITC (30-F11), anti-Thy-1-APC (53-2.1) and anti- α -6 integrin-PE (GoH3). Analyses and cell-sorting were performed on ARIA, LSR and LSR II flow cytometers (Becton Dickinson).

Testicular transplantation and analysis of recipient mice. Flow- and MACS-sorted cellular fractions obtained from EGFP-transgenic males as donors were transplanted through the efferent ductules into testes of C57BL6 germ-cell-depleted recipient mice, except for conditioning of recipient mice, and analysed ten weeks after transplantation, as described previously^{10,11}. γ -irradiation (¹³⁷Cs source, IBL637; CIS Biointernational) with a total dose of 10 Gy was used for recipient conditioning of 10-week-old mice, as a substitute to busulphan treatment. Total bone marrow (10⁶ cells) transplantation was performed to support haematopoiesis 24 h after irradiation. The recipient testes were transplanted 4 weeks after irradiation. Efficiency of this conditioning was verified (Supplementary Information, Fig. S4). For serial transplantations, two recipient testes transplanted with EGFP-c-kit-positive cells were removed, and reconstitution was determined. Then, EGFP cells were flow-sorted and

25,000 EGFP cells were transplanted into the testis of a second irradiated recipient.

Reconstitution was monitored 10 weeks after transplantation and recipient testes were collected. Individual EGFP-positive stretches of spermatogenesis are spermatogenic colonies derived from one single EGFP donor GSC, as previously reported^{9,12}. Dissection of the testes and spread-out of the seminiferous tubules were performed under a fluorescent microscope and EGFP colonies were counted. Seminiferous tubules were then collected and cell suspensions were obtained for Hoechst 33342 flow cytometric analysis, as previously described using TruCount microbeads¹¹. Statistical analysis was performed using Student's *t* test (unpaired, one-tailed).

RT-PCR. mRNAs were prepared from flow-sorted SP α -6⁺c-kit⁺ and SP α -6⁺c-kit^{-low} cells using microMACS mRNA isolation kit (Miltenyi), and reverse-transcribed using Quantitect enzyme (Qiagen). The cDNA was then amplified by PCR using the following primers: Sox3 (U ACAACTCCGAGATCAGCAAGC, L CTTGAGCAGCGTCTTGGTCTT), NgN3 (U AACAGGCCCAAGAGCGAGTT, L GCCGAGTTGAGGTTGTGCAT), *E-Cad* (U TGAAGGGACGGTCAACAACCTG, L GCTCTTTGACCACCGTTCTCC), *GAPDH* (U GAGCGAGACCCCACTAACAT, L TTCACACCCATCACAAACAT). RT-PCR assays were performed twice on each subpopulation purified from three independent sorting experiments.

Migration experiments. Transwell chambers (Costar) were used to assess cell migration through filters (pore size 8 μ m). The c-kit-positive spermatogonial fraction was purified by MACS after a negative enrichment using the dead-cell removal kit (Miltenyi). For ligand-dependent cell migration, 10⁵ cells were plated with Stemspan medium (Stemcell Technologies) supplemented with B27 (Gibco)

onto polycarbonate filters pre-coated with laminin (4 µg/cm²; Sigma). KitL was added to the bottom chamber or to both bottom and top chambers at either 10 or 40 ng ml⁻¹. ACK45 neutralizing antibody to c-kit (5 µg ml⁻¹) was added to the top chamber when necessary. After a 12-h incubation, cells in the bottom of the chamber were stained with Hoechst 33342 (5 µg ml⁻¹) and spermatogonial cell number was quantified by flow cytometry using the TruCount (BD Biosciences) methodology. Elongated spermatids were eliminated by FSC-gating. Each experiment was repeated three times in triplicate.

Long-term *in vitro* culture of adult GSCs and c-kit-positive spermatogonial fractions. We developed a culture method for adult GSC based on previous work²², with slight modifications. For the *in vitro* cluster formation assay, sorted EGFP-positive SPα-6⁺c-kit⁺ and SPα-6⁺c-kit^{low} were cultured in 96-well tissue culture plates on a feeder layer of mouse embryonic fibroblasts, mitotically inactivated after mitomycin C (1 µg ml⁻¹) treatment. The GSC medium was composed of StemSpan (Stem cell) and B27 supplement (Invitrogen). Recombinant human GDNF (40 ng ml⁻¹, R&D Systems), recombinant rat GFRα1 (300 ng ml⁻¹, R&D Systems) and FGF2 (1 ng ml⁻¹, Invitrogen) were added, as described previously²². KitL (100 ng ml⁻¹, R&D Systems) and mouse LIF (1000 U ml⁻¹, Millipore) were added when indicated. SPα-6⁺c-kit^{low} and SPα-6⁺c-kit⁺ cells (500 and 2000, respectively) were flow-sorted and seeded per well. After 2 weeks of culture, EGFP cell clusters were counted. Cell clusters were then digested using 0.25% trypsin-EDTA and subcultured by direct flow-sorting of cells according to EGFP fluorescence in 96-well tissue culture plates (500 cells per well) and cultured for an additional 2 weeks.

Note: Supplementary Information is available on the Nature Cell Biology website.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank P.H. Romeo for critical review of the manuscript and helpful comments. We thank M. Okabe for the generous gift of the EGFP transgenic mice; S. Leblay and V. Neuville for their technical assistance in the animal facilities, and T. Andrieu for assistance with Aria, LSR and LSRII. This work was supported in part by a grant from Electricité De France.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.B. and B.L. contributed equally to the experimental work, with help from M.C., L.R. and P.F.; V.B., B.L., L.R. and P.F. conceived and designed the experiments; J.P.L. provided valuable material and initiated the breeding of the EGFP mice; F.L.P., J.T., I.A., B.L. and L.R. revised the manuscript. All authors participated in data analysis. P.F. coordinated the study; P.F. and V.B. wrote the paper.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturecellbiology/>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

- Kai, T. & Spradling, A. Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature* **428**, 564–569 (2004).
- Brawley, C. & Matunis, E. Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation *in vivo*. *Science* **304**, 1331–1334 (2004).
- de Rooij, D. G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* **121**, 347–354 (2001).
- Schrans-Stassen, B. H., van de Kant, H. J., de Rooij, D. G. & van Pelt, A. M. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology* **140**, 5894–5900 (1999).
- Ohta, H., Yomogida, K., Dohmae, K. & Nishimune, Y. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* **127**, 2125–2131 (2000).
- Yoshida, S. *et al.* Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev. Biol.* **269**, 447–458 (2004).
- Raverot, G., Weiss, J., Park, S. Y., Hurley, L. & Jameson, J. L. Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Dev. Biol.* **283**, 215–225 (2005).
- Tokuda, M., Kadokawa, Y., Kurahashi, H. & Marunouchi, T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol. Reprod.* **76**, 130–141 (2007).
- Shinohara, T., Orwig, K. E., Avarbock, M. R. & Brinster, R. L. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 8346–8351 (2000).
- Bastos, H. *et al.* Flow cytometric characterization of viable meiotic and post-meiotic cells by Hoechst 33342 in mouse spermatogenesis. *Cytometry A* **65**, 40–49 (2005).
- Lassalle, B. *et al.* 'Side population' cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Development* **131**, 479–487 (2004).
- Zhang, X., Ebata, K. T. & Nagano, M. C. Genetic analysis of the clonal origin of regenerating mouse spermatogenesis following transplantation. *Biol. Reprod.* **69**, 1872–1878 (2003).
- Shinohara, T., Avarbock, M. R. & Brinster, R. L. beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 5504–5509 (1999).
- Kubota, H., Avarbock, M. R. & Brinster, R. L. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* **71**, 722–731 (2004).
- Shinohara, T., Orwig, K. E., Avarbock, M. R. & Brinster, R. L. Remodeling of the post-natal mouse testis is accompanied by dramatic changes in stem cell number and niche accessibility. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 6186–6191 (2001).
- Falcioni, I. *et al.* Identification and enrichment of spermatogonial stem cells displaying side-population phenotype in immature mouse testis. *FASEB J.* **18**, 376–378 (2004).
- Kubota, H., Avarbock, M. R. & Brinster, R. L. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 6487–6492 (2003).
- Chen, C. *et al.* ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* **436**, 1030–1034 (2005).
- Meng, X. *et al.* Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* **287**, 1489–1493 (2000).
- Bedell, M. A. & Mahakali Zama, A. Genetic analysis of Kit ligand functions during mouse spermatogenesis. *J. Androl.* **25**, 188–199 (2004).
- Heissig, B. *et al.* Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* **109**, 625–637 (2002).
- Kubota, H., Avarbock, M. R. & Brinster, R. L. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 16489–16494 (2004).
- Yeh, J. R., Zhang, X. & Nagano, M. C. Establishment of a short-term *in vitro* assay for mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* **77**, 897–904 (2007).
- de Rooij, D. G. & Grootegoed, J. A. Spermatogonial stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 694–701 (1998).
- Nakagawa, T., Nabeshima, Y. & Yoshida, S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev. Cell* **12**, 195–206 (2007).
- Hanna, J. *et al.* Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* **133**, 250–264 (2008).
- Aoi, T. *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* **26**, 101–106 (2008).
- Ryu, B. Y., Orwig, K. E., Oatley, J. M., Avarbock, M. R. & Brinster, R. L. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* **24**, 1505–1511 (2006).
- Akala, O. O. *et al.* Long-term haematopoietic reconstitution by *Trp53^{-/-} p16^{ink4a}^{-/-} p19^{arf}^{-/-}* multipotent progenitors. *Nature* **453**, 228–232 (2008).
- Guan, K. *et al.* Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* **440**, 1199–1203 (2006).
- Seandel, M. *et al.* Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* **449**, 346–350 (2007).
- Boulanger, C. A., Mack, D. L., Booth, B. W. & Smith, G. H. Interaction with the mammary microenvironment redirects spermatogenic cell fate *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 3781–3786 (2007).
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. & Nishimune, Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* **407**, 313–319 (1997).

C-I.3 Conclusion

Le but de ce travail était d'étudier la capacité des progéniteurs à se différencier en CSG et à participer à la régénération de la spermatogenèse. Nous avons montré que les spermatogonies « différenciées » peuvent changer leur programme de différenciation et agir comme une CSG fonctionnelle, contribuant à l'activité clonogénique et à la régénération d'une spermatogenèse après transplantation dans des testicules receveurs déplétés de cellules germinales.

La fraction de spermatogonies c-Kit⁺ de souris EGFP a été triée par sélection magnétique, ce qui permet d'exclure les CSG qui sont c-Kit⁻, et transplantées dans des testicules de souris irradiées. Nous avons déterminé le nombre de colonies EGFP formées dans le testicule dix semaines après transplantation. Une régénération 1,57 fois supérieure à la capacité de régénération de la fraction totale a été observée. Une spermatogenèse normale a été analysée dans la fraction EGFP. En accord avec ces résultats, des travaux ont montré que les cellules germinales c-Kit⁺ possèdent une activité de régénération 1,7 fois supérieure à la fraction totale (Shinohara *et al.*, 1999). Donc la fraction c-Kit⁺ conserve une capacité de régénération. Ces résultats montrent que la fraction spermatogoniale progénitrice, qui s'engage en différenciation, garde un potentiel de régénération après transplantation, mais avec une faible efficacité.

Afin de caractériser plus précisément les spermatogonies progénitrices qui possèdent cette capacité de régénération, nous avons analysé la fraction c-Kit⁺ en fonction d'autres marqueurs de spermatogonies. Nous avons observé que 55% des cellules sont $\alpha 6^{+}/c\text{-Kit}^{+}$ et 10% sont $\alpha 6^{+}/c\text{-Kit}^{\text{low}}$ dans la SP. Ces dernières expriment bien les marqueurs moléculaires des CSG : Sox3, Ngn3 et E-Cadh. En revanche, la fraction SP/ $\alpha 6^{+}/c\text{-Kit}^{+}$ dite « différenciée » n'exprime pas ces marqueurs moléculaires. La transplantation de la fraction SP/ $\alpha 6^{+}/c\text{-Kit}^{\text{low}}$ a une capacité de régénération 50 fois supérieure à celle de la fraction totale, montrant que les CSG sont dans cette fraction. Ceci confirme les travaux précédents concernant la présence CSG dans la fraction SP dans les testicules normaux adultes et dans les souris immatures (Falcioni *et al.*, 2004) (Lassalle *et al.*, 2004), bien qu'il ait été aussi décrit que les CSG ne sont pas dans la fraction SP chez les souris cryptochides (Kubota *et al.*, 2003).

La transplantation de la fraction SP/ $\alpha 6^{+}/c\text{-Kit}^{+}$ régénère une spermatogenèse normale, et la capacité de régénération est 5 fois supérieure à celle de la fraction totale, ce qui signifie que cette fraction a un potentiel de régénération mais, avec une efficacité plus faible que la fraction contenant les CSG. Cette régénération n'est pas due à une différenciation transitoire des progéniteurs injectés car l'analyse est réalisée après deux cycles de spermatogenèse, et la transplantation secondaire des CSG obtenues recolonise le receveur secondaire. De plus, une spermatogenèse normale est observée un an après transplantation. Les cellules dérivées des cellules c-Kit⁺ transplantées réacquièrent les marqueurs des CSG : c'est à dire $\alpha 6$ -intégrine et Thy-1 (Shinohara *et al.*, 2000) (Kubota *et al.*, 2004a). Nos données démontrent que la fraction SP/ $\alpha 6^{+}/c\text{-Kit}^{+}$ qui contient les

spermatogonies « différenciées » possède une sous-population capable de se différencier en CSG après transplantation.

Dans ce type d'étude, le problème majeur est une contamination potentielle de la fraction progénitrice par les CSG. Pour répondre à cette question, nous avons ré-analysé par cytométrie en flux les fractions SP/ $\alpha 6^+$ /c-Kit⁺ purifiées afin de déterminer le pourcentage de cellules contaminantes SP/ $\alpha 6^+$ /c-Kit^{low}. Les résultats ont montré que cette contamination ne contribuait que de façon marginale au phénomène de régénération que nous avons observé (voir supplemental data).

Les cellules souches se situent dans un micro-environnement, appelé la niche, qui régule leur destin cellulaire. Nous avons étudié si cette niche jouait un rôle dans la reprogrammation du progéniteur. Le composant majeur de la niche germinale est la cellule somatique de Sertoli, qui produit des facteurs comme le GDNF, le FGF2 et le facteur de transcription ERM qui semble important pour le maintien des CSG (Chen *et al.*, 2005 ; Gonzalez-Herrera *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2000). Le ligand du récepteur c-Kit, le SCF, est également exprimé par les cellules de Sertoli sous forme soluble ou membranaire, et a été précédemment impliqué dans la prolifération, la survie et la migration des gonocytes et des spermatogonies. De plus, le SCF soluble libéré, après le clivage par MMP-9, joue un rôle direct dans le recrutement des CSH et progéniteurs pendant la reconstitution de la moelle osseuse (Heissig *et al.*, 2002).

Afin d'étudier les effets des composants spécifiques sur la niche, les CSG peuvent être maintenus en culture à long terme dans un milieu sans sérum, en présence de facteurs de croissance spécifiques (Kubota *et al.*, 2004b) (Kubota *et al.*, 2004a). Les essais de formation de colonies germinales *in vitro* fournissent une technique fiable pour détecter les CSG (Yeh *et al.*, 2007). Nous avons développé une méthode de culture sur des cellules nourricières (MEFs) qui permettent d'apporter un soutien aux CSG et en présence de GDNF, FGF2 et GFR- $\alpha 1$. Les deux fractions SP/ $\alpha 6^+$ /c-Kit⁺ et SP/ $\alpha 6^+$ /c-Kit^{low} ont été mises en culture dans ces conditions et sont capables de former des colonies *in vitro*. La fraction SP/ $\alpha 6^+$ /c-Kit^{low} a une plus forte capacité à former des colonies que la fraction SP/ $\alpha 6^+$ /c-Kit⁺. En revanche les colonies formées par ces deux fractions ont la même capacité à reformer des colonies *in vitro* lorsqu'elles sont remises en culture. Donc les spermatogonies « différenciées » peuvent aussi être reprogrammées *in vitro*, en présence de GDNF et FGF2, et acquérir les mêmes capacités de croissance que les CSG de la fraction SP/ $\alpha 6^+$ /c-Kit^{low}. De plus, la transplantation de ces cultures montre que les colonies ainsi formées sont capables de régénérer une spermatogenèse à long terme. Le SCF n'augmente pas *in vitro* la formation des colonies germinales et ne semble pas être impliqué dans la reprogrammation des cellules SP/ $\alpha 6^+$ /c-Kit⁺ mais il peut agir comme chimiokine pour la migration des progéniteurs.

Nous avons montré que les progéniteurs spermatogoniaux engagés en différenciation peuvent générer des CSG fonctionnelles capables de coloniser un testicule déplété en cellules germinales. Le GDNF et le FGF2, régulateurs clés de la niche, sont capables de reprogrammer *in vitro* les

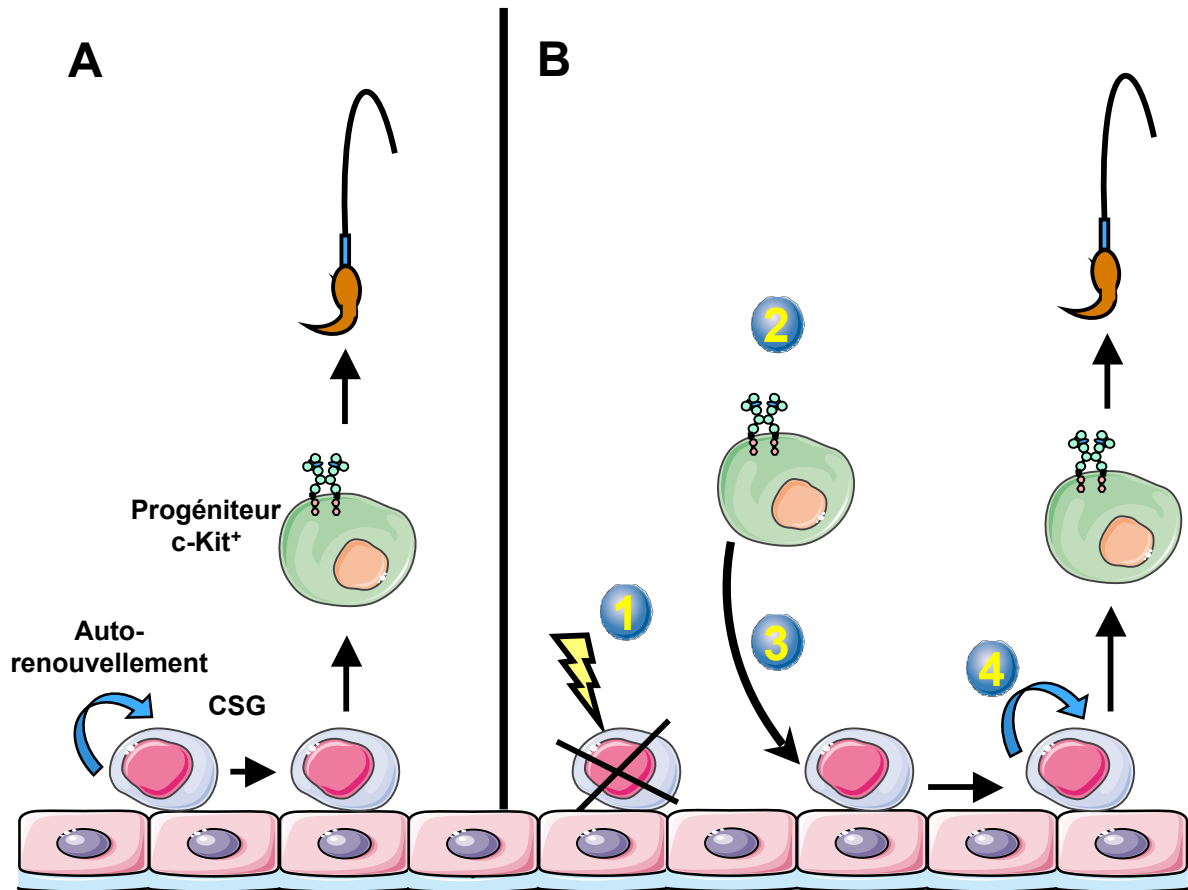


Figure 23 : Schéma récapitulatif de la dédifférenciation des progéniteurs germinaux en CSG

- **A-** Spermatogenèse normale
- **B-** Dédifférenciation
 - ✓ 1-Déplétion du stock de CSG
 - ✓ 2-Injection de progéniteurs dans le testicule déplété
 - ✓ 3-dédifférenciation
 - ✓ 4-recolonisation du testicule par auto-renouvellement et différenciation des CSG

progéniteurs spermatogoniaux afin de reverser la différenciation. Cette étude soutient le concept selon lequel l'identité des cellules souches n'est pas restreinte chez l'adulte à un pool de cellules qui s'auto-renouvellent, mais que la propriété « souche » peut être acquise par dé-différenciation des progéniteurs après lésion du tissu ou au cours de la vie pour maintenir l'homéostasie tissulaire.

Les spermatogonies A_{pr} et A_{al} sont les premières étapes de la différenciation. On suppose qu'elles conservent une propriété souche qui ne s'exprime que lorsque les ponts intercytoplasmiques sont rompus suite, par exemple à une irradiation (de Rooij, 2001 ; de Rooij and Grootegoed, 1998). Nakagawa *et al.*, en étudiant les cellules $Ngn3^+$ c'est-à-dire les spermatogonies A_s à A_{al} , propose qu'il existe deux populations de CSG : une population de « CSG réelles » c'est-à-dire qu'elles ont la capacité d'auto-renouvellement et une population « dite à potentiel souche » qui est composée des cellules qui sont dans la phase d'amplification (A_{pr} à A_{al}) et qui lorsqu'elles sont placées dans un micro-environnement déplété de CSG, se reprogramment et recolonisent le testicule. Durant le développement normal du testicule, cette population n'a pas la capacité de CSG. Cette voie de secours serait essentielle pour le maintien de l'intégrité de la spermatogenèse après agression du tissu par exemple (Nakagawa *et al.*, 2007). D'après nos résultats, ce processus de dédifférenciation des progéniteurs précoces en CSG peut être étendu aux spermatogonies « différenciées » (spermatogonie A_1 à B) (Figure 23).

Enfin, nos résultats sont également à rapprocher de l'ancien modèle de Clermont décrivant les premières étapes de la spermatogenèse (c.f. Introduction-Clermont and Bustos-Obregon, 1968). Dans ce modèle, les spermatogonies différenciées A_1 - A_4 contribuent à l'entretien du stock de CSG et les spermatogonies A_4 sont capables soit de générer à nouveau une spermatogonie A_1 contribuant à l'entretien du stock de cellules souches en renouvellement, spermatogonie A_1 soit de poursuivre le processus de différenciation. Le processus de dédifférenciation en CSG des spermatogonies différenciées que nous observons pourrait s'inscrire dans ce modèle, suggérant ainsi que le modèle de Clermont n'est peut être pas aussi obsolète qu'on l'a pensé lors de la description du modèle de Huckins et Oakberg (Huckins and Oakberg, 1978). De nouvelles études contribueront certainement à déterminer si la combinaison de ces deux modèles ne permet pas de mieux caractériser les premières étapes de la spermatogenèse.

C-II Article 2 : Rôle du gène *Fancg* Dans la fonctionnalité des cellules souches hématopoïétiques

Impaired quiescence, migration and engraftment of hematopietic stem cells and progenitors in Fanconi anemia-type G-deficient mice

V. Barroca, M.A. Mouthon, D. Lewandowski, P.B. de la Grange, L. Gauthier, F. Boussin, L. Riou, I. Allemand, P.H. Romeo, P. Fouchet

Manuscript en préparation.

C-II.1 Introduction

L'Anémie de Fanconi (AF) est une maladie génétique récessive, caractérisée par un défaut congénital, une hypersensibilité aux agents pontants, une défaillance progressive de la moelle osseuse et une prédisposition aux cancers. Il existe treize gènes Fanconi connus : *Fanca*, *Fancc*, *Fancc2*, *Fance*, *Fanccf*, *Fanccg*, *Fanci*, *Fancj*, *Fancl*, *Fancm* et *Fancn*. L'inactivation d'un seul de ces gènes conduit au phénotype AF. Suite à des dommages de l'ADN ou à un stress de réplication, huit de ces protéines vont former un complexe nucléaire que l'on appelle le « complexe core », responsable de la mono-ubiquitination des protéines FancD2 et FancI (formant le complexe ID). Une fois mono-ubiquitiné, le complexe ID est recruté au niveau des foci de l'ADN où il colocalise avec d'autres protéines des voies de réparations comme BRCA1 ou RAD51. La perte d'une seule des protéines du complexe core entraîne un défaut d'ubiquitination du complexe ID.

La protéine FancG ou XRCC9 est une protéine de 65kDa avec au moins sept motifs de répétition tétratricopeptides (TPR) qui permettent des interactions protéine/protéine. Cette protéine appartient au complexe core nucléaire de l'AF. Comme d'autres protéines Fanconi, FancG semble être impliqué dans d'autres voies biologiques que la réparation, et interagit avec des protéines modulatrices du stress oxydatif (Mukhopadhyay *et al.*, 2006). Le phénotype du modèle murin *Fancg*^{-/-} est identique aux autres modèles murins *Fanca*^{-/-}, *Fancc*^{-/-}, *Fancd2*^{-/-}, c'est-à-dire une hypersensibilité à la Mitomycine C (MMC), des cassures chromosomiques spontanées, et une diminution de la fertilité.

L'homéostasie du tissu hématopoïétique est maintenue tout au long de la vie de l'individu par une faible population de CSH quiescente. Les CSH sont capable de s'auto-renouveler et de se différencier pour donner les différents lignages du sang. Le défaut de moelle osseuse observé chez les patients AF semble être lié à un défaut de prolifération et de différenciation des CSH. Bien que l'anémie n'est pas observée spontanément dans les modèles murins d'AF, elle peut être induite par traitement des souris avec des agents pontants comme la MMC (Carreau *et al.*, 1998). Les modèles murin *Fancc*^{-/-} et *Fancd1*^{-/-} possèdent un défaut d'auto-renouvellement des CSH mis en évidence par un défaut de reconstitution de l'hématopoïèse à long terme après transplantation (Haneline *et al.*, 1999 ; Navarro *et al.*, 2006). De plus, les CSH *Fancc*^{-/-} perdent la capacité de reconstitution après expansion dans des conditions de culture *ex vivo* (Habi *et al.*, 2005).

Le maintien de l'intégrité génomique est primordial afin que les cellules souches restent fonctionnelles. Ce maintien de l'intégrité se fait grâce au bon fonctionnement des mécanismes de surveillance du génome. Différents travaux montrent l'implication des gènes des voies de réponses aux dommages à l'ADN dans les syndromes de sénescence prématurée, d'anomalies du développement et de cancérisation, et on été décrit également dans la régulation des fonctions d'auto-renouvellement des CSH (Ito *et al.*, 2004 ; Nijnik *et al.*, 2007 ; Ruzankina *et al.*, 2007). De plus, un défaut dans le maintien de l'intégrité génomique peut mener à un avantage prolifératif et à un

dysfonctionnement de l'homéostasie des cellules souches qui induit une augmentation des transformations malignes.

Dans cet article, nous avons examiné l'incidence de la mutation *Fancg* sur la fonctionnalité des CSH et des progéniteurs immatures (LSK : Lin⁻/Sca1⁺/c-Kit⁺). Nous avons montré que l'inactivation de *Fancg* entraîne une diminution du nombre de CSH et que ces CSH possèdent un défaut de reconstitution de l'hématopoïèse à court et long terme après transplantation (Annexe 1). Cette inactivation entraîne une altération de la quiescence, et des capacités de migration/homing des CSH dans la moelle osseuse. Enfin, l'inactivation de *Fancg* dérégule l'expression de plusieurs gènes clés impliqués dans l'auto-renouvellement, la quiescence et la migration des CSH.

C-II.2 Article 2: Impaired quiescence, migration and engraftment of hematopoietic stem cells and progenitors in Fanconi anemia-type G deficient mice

Introduction

Fanconi Anemia (FA) is a recessive disease characterized by congenital defects, crosslinker hypersensitivity, progressive bone marrow failure and predisposition to cancer. There are thirteen known Fanconi Anemia genes (A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N) and disruption of these genes appears to account for Fanconi phenotype (Niedernhofer *et al.*, 2005). In response to DNA damage or replication, eight fanconi proteins form a nuclear core complex responsible for the mono-ubiquitination of FANCD2 and FANCI (ID complex). Once mono-ubiquitinated, the complex ID is recruited to DNA repair foci, where it colocalizes with DNA repair proteins like BRCA1 and Rad51. The loss of any core-complex components results in defective ubiquitination of the ID complex (Grompe and van de Vrugt, 2007).

FANCG/XRCC9 is a 65-kDa protein with at least 7 protein-protein interaction tetratricopeptide repeat (TPR) motifs (Blom *et al.*, 2004). This protein is a component of the nuclear fanconi core complex. The phenotype of *Fancg*^{-/-} mice is similar to this of other *fanca*, *fancc*, *fancd2*-deficient models and includes cellular hypersensitivity to mitomycin C (MMC), spontaneous chromosome breakage, and reduced fertility (Koomen *et al.*, 2002) (Carreau, 2004). However, the phenotype appears to be less severe than in human with normal life span and no occurrence of anemia.

Homeostasis of the hematopoietic tissue is maintained throughout life by a rare population of quiescent Hematopoietic Stem Cells (HSCs). HSCs are able to self-renew and to differentiate to give rise to all blood cell lineages. The bone marrow failure in patients seems to be linked to a defect in the proliferation and differentiation of primitive hematopoietic cells. Although anemia is not observed spontaneously in FA knock-out models, similar bone marrow failure was induced in *fancc*^{-/-} mice after treatment with the mitomycin C DNA damaging agent (Carreau *et al.*, 1998). In addition, *fancc*^{-/-} and *fancd1*^{-/-} hematopoietic stem cells displayed altered self-renewal potential and reconstitution ability using competitive repopulation assay into myeloablated recipients (Carreau *et al.*, 1999) (Haneline *et al.*, 1999) (Navarro *et al.*, 2006). Likewise, *Fancc*^{-/-} hematopoietic stem cells are not able to maintain reconstitution potential in conditions of *ex vivo* culture expansion (Habi *et al.*, 2005), and hypoxia/reoxygenation exposure was shown to induce premature senescence (Zhang *et al.*, 2005).

The genomic integrity of stem cells is fundamental to maintain the stem cell pool and tissue function in several tissue (Rossi *et al.*, 2007). A number of DNA repair abnormalities are linked to stem cell dysfunction (Park and Gerson, 2005). DNA repair defects appear to be involved both in stem cell self-renewal failure and in increased malignant transformation, which could result from genomic instability leading to proliferative advantage and dysfunction of stem cell homeostasis. As a

DNA repair syndrome, the fanconi pathway could be involved in hematopoietic stem cell failure as it was suggested for neural progenitors and stem cells (Sii-Felice *et al.*, 2008). However, several fanconi proteins, one of which is FANCG, appear to be potent interactors of other biological pathways (Pagano *et al.*, 2005). FA cells are sensitive to proinflammatory cytokines TNF- α , reactive oxygen species (ROS), and stress response pathways (SAPK) overactivation (Zhang *et al.*, 2007) (Briot *et al.*, 2008) (Bijangi-Vishehsaraei *et al.*, 2005). ROS and MAPK p38 appeared recently to be critical determinants of hematopoietic stem cell (HSC) life span and self-renewal, suggesting that the level of intracellular ROS determines the balance between quiescence and proliferation in the stem cell pool (Ito *et al.*, 2004) (Ito *et al.*, 2006).

In this paper, we have examined the incidence of the *fancg* mutation on the functionality of HSCs and primitive hematopoietic progenitors (HPC). We found that loss of *fancg* resulted in a reduction in HSCs and HPCs subset. HSCs failed to reconstitute at short and long term the hematopoiesis after transplantation. The effect of *fancg* *-/-* deficiency involves a loss of quiescence owing to an enhanced level of activation of HSCs. *fancg* *-/-* HSC/HPC subset shows an impairment in their capacity to migrate *in vitro* in response to chemokine CXCL12 and to home to bone marrow, linked to the engraftment defect after transplantation. In addition, *fancg* deficiency deregulates the expression of several key genes involved in self-renewal, quiescence and migration of HSCs. Collectively, our data reveal that *fancg*, like *fance* and *fancd1*, plays a role in the regulation of several physiological pathways of HSC.

Materials and methods

Mice

Fancg^{-/-} mice were generated in a 129Ola/FVB background ⁴. *Fancg*^{+/-} heterozygotes were backcrossed 6 times with C57BL/6 and EGFP transgenic mice ²¹ (C57BL/6-TgN(beta-act-EGFP)01Osb—generous gift of Dr Okabe) partners in order to generate heterozygous *Fancg*^{+/-} EGFP mice. Then they were intercrossed to generate homozygous *fancg*^{-/-} EGFP mice. All data presented in this study were obtained with offspring from heterozygous parents of the sixth C57BL/6 backcross. All animal procedures reported in this paper were carried out in accordance with French Government regulations (Services Vétérinaires de la Santé et de la Production Animale, Ministère de l'Agriculture).

Isolation of BM LSK Cells

Femurs and tibias from mice were flushed. After red blood cells lysis, BM mononuclear cells were stained using biotin lineage antibody cocktail (Miltenyi Biotec), streptavidin PC7, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-Sca-1 (Sca-1-PE) and allophycocyanin (APC)-conjugated anti-c-Kit (c-Kit-APC) antibodies (BD Pharmingen). Alternatively, BM mononuclear cells were depleted of lineage-committed cells using the magnetic-activated cell separation (MACS) and cell separation columns (Miltenyi Biotec). Then the Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ were purified by staining Lin⁻ cells with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-Sca-1 (Sca-1-PE) and allophycocyanin (APC)-conjugated anti-c-Kit (c-Kit-APC) antibodies (BD Pharmingen) followed by analysis and cell sorting using ARIA cytometer (BD Pharmingen).

Determination of ROS production

The Lin⁻ cells were incubated with 10 μM CM-H2DCFDA (Molecular Probes) in the dark for 10 minutes at 37°C. After washing, cells were labelled by anti-Sca-1, and anti-c-Kit. Propidium iodide was added to exclude dead cells. Then cell were analysed by flow cytometry using a LSR II.

Apoptosis assay

Cells were collected for BM and stained with annexin V and 7-AAD using BD Annexin V-PE apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) in accordance with the manufacturer's instructions. BM mononuclear cells were stained using biotin lineage antibody cocktail (Miltenyi Biotec), streptavidin PC7, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-Sca-1 (Sca-1-FITC) and allophycocyanin (APC)-conjugated anti-c-Kit (c-Kit-APC) antibodies (BD Pharmingen). Apoptosis was analysed by quantification of annexin-V-positive cell population by flow cytometry.

Quiescence and cell-cycle analysis

Lin⁻ cells were collected for BM, fixed and stained with DAPI, anti-Ki-67 PE, anti-Sca-1 FITC and anti-c-Kit APC antibodies (BD Pharmingen) and analysed by flow cytometry LSR II. To determine KLS cell-cycle status by BrdU incorporation in vivo, BrdU (100mg/kg; sigma) was injected i.p. into *Fancg*^{-/-} or *Fancg*^{+/-} mice and BrdU was incorporated in the drinking water (1mg/mL) for 48hr. Lin⁻ cells were collected for BM, fixed and stained with 7-AAD, anti-BrdU, anti-Sca-1 and anti-c-Kit antibodies (BD Pharmingen)

RT-PCR

mRNA were prepared from 10^3 flow sorted LSK cells using microMACS mRNA isolation kit (Miltenyi Biotech), and reverse transcribed using Quantitec enzyme (Qiagen). The cDNA was subjected to real-time PCR using Power SYBR Green Master Mix and Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) in 7000 Sequence Detection System. Amplification of GAPDH was used for sample normalization. Primer sequences are as follow : CXCR4 (U ATGGAACCGATCAGTGTGAG, L AAGTAGATGGTGGGCAGGAA), p18 (U GGGACCTAGAGCAACTTACT, L TGACAGCAAAACCAGTTCCA), p27 (U GGACCAAATGCCTGACTCGT, L GGGGAACCGTCTGAAACATT), c-myc (U CTGGATTCCTTTGGGCGTT, L AATAGGGCTGTACGGAGTCG), p21 (U TCCAGACATTTCAGAGCCACA, L CGAAGAGACAACGGCACACT), Hif-1 α (U CCCATTCTCATCCGTCAAA, L CGGCTCATAACCCATCAACT), Mef (U GATGTCTCTGGATGAGAAGCA, L TGCCCTTCCCCATCTTCTTAA), p19 ATGGGTCGCAGGTTCTTGGT, L GTAGTGGGGTCTCGCAGTT), Bmi-1 (U AGCAGCAATGACTGTGATGCACTTGAG, L GCTCTCCAGCATTTCGTAGTCCATCCC), N-Cadh (U GATAAAGAGCGCCAAGCCAA, L TATCTGGTTGCTGGAGCTGG), EGR1 (U AGCCGAGCGAACAACCCTAT, L GAAGCGGCCAGTATAGGTGA), p57 (U AGGAGCAGGACGAGAATCAA, L TTCTCCTGCGCAGTTCTCTT), Cdc42 (U AGGCTGTCAAGTATGTGGAG, L AGTATGACGACAACACCAGC), Rac1 (U AGTACATCCCCACCGTCTTT, L CCACTTTGCACGGACATTTT), Notch-1 (U CAGCCACAGAACTTACCACTCCAG, L TAAATGCCTCTGGAATGTGGGTGAT), GAPDH (U GAGCGAGACCCCACTAACAT, L TTCACACCCATCACAAACAT), Luciférase (U TCGAAGTATTCCGCGTACGTG, L GCCCTGGTTCCTGGAACAA), Hes1 sonde Taqman RT-PCR assays were performed twice on each genotype purified from five mice independent.

Migration experiments

Transwell chambers (Costar) were used to assess cell migration through filters (pore size 6 μ m). The KLS population was purified by sorting and 10^4 cells were plated with RPMI media (GIBCO) onto polycarbonate filter. CXCL12 was added to the bottom chamber at 100ng/mL. After 4h, cells in the bottom side chamber were stained with anti-CD45 antibody (BD Pharmingen) and KLS cell number was quantified by flow cytometry using the TruCount™ (BD Biosciences) methodology. Each experiment was repeated three times in triplicates. For JNK inhibition experiments, 2.10^4 lin⁺kit⁺ progenitors were sorted and incubated for 1 h with 10 μ M JNK inhibitor SP 600125 in RPMI media. Then, cells were plated onto polycarbonate filter of Transwell chambers for migration assay with CXCL12 (100ng/mL) added to the bottom chamber. Cells were collected for analysis after 4 h.

In vivo Competitive Reconstitution Assay and in vitro progenitor assay

Femurs and tibias from mice were flushed. For competitive reconstitution assay, either 250.10^3 bone marrow cells from *Fancg*^{-/-} EGFP or wt EGFP was mixed with 250.10^3 cells wt of total BM. The suspensions were transplanted by retro-orbital or in intra-femoral route into lethally irradiated (10Gy) wt recipients. The analysis by flow cytometry of peripheral blood was performed 4, 8, 12 and 16 weeks after transplantation according to CD45 and EGFP fluorescence donor-derived markers in order to examine hematopoietic regeneration. Competitive stem cell reconstitution assay was also performed with 2,000 LSK cells from either *fancg*^{-/-} EGFP and EGFP wt mice mixed with 250,000 bone marrow cells of wt mice. For *in vitro* progenitor assay, methylcellulose cultures were performed from 50,000-25,000 bone marrow cells or 150-300 sorted LSK cells according to manufacturer's protocol (Stem cell).

Western Blot

Femurs and tibias from mice were flushed. 5×10^6 bone marrow cells were solubilized with a Laemmli solution, and samples of 10 μ L protein were subjected to electrophoresis on a 12% SDS-PAGE. SAPK/JNK, Phospho-SAPK/JNK, p38 α MAP Kinase and Phospho-p38 MAPK antibodies (Cell Signaling Technology®) (each Ab was diluted 1:1000). The blots were incubated with secondary antibodies and Ab-reactive proteins were detected using chemiluminescence reagents (Amersham). Signal intensity was quantified by densitometry. Levels of phospho-JNK, -p38 to their respective totals are presented. Signals were normalized according to actin. For chemokine stimulus, bone marrow cells were incubated 1 min in RPMI with or without CXCL12 (100ng/mL).

Statistical analysis

Data are Mean $\pm$ SEM. Unpaired Student's t test (one tail) was used to determine statistical significance.

Results

Mice lacking *Fancg* exhibit an altered hematopoietic progenitors/stem cell subset

In the peripheral blood of adult *fancg*^{-/-} mice, all hematopoietic cells were present in the same proportion as in wt mice (Fig.1a). *fancg*^{-/-} mice displayed normal white blood cell counts and normal hemoglobin levels in the peripheral blood, showing that *fancg* deficiency do not induce gross abnormal hematopoiesis, as previously described⁴. Likewise, bone marrow cellularity was normal in *fancg*^{-/-} adult mice (respectively $43 \pm 5 \cdot 10^6$ and $44 \pm 4 \cdot 10^6$ cells for wt and *fancg*^{-/-} mice- cells flushed from 2 femurs and 2 tibias per mice). To study the role of *Fancg* in the biology of hematopoietic progenitors/stem cells, we first investigated the frequency of the KLS subpopulation, containing HSC and early progenitors (Fig.1b). We observed a decrease of roughly 30% of KLS in *fancg*^{-/-} bone marrow. According to CD34 and Flk2 expression, a decrease of the long-term HSC (LSK CD34⁻ Flk-2⁻) was determined (Fig.1c). In progenitors compartment, LSK CD34⁺ Flk-2⁻ short-term HSC were not affected, but lymphoid-primed multipotent progenitors number (LSK CD34⁺ Flk-2⁺) diminished. *In vitro* clonogenic potential of myeloid committed progenitors (colony-forming cells, CFCs) was also examined. Unfractionned bone marrow cells from *Fancg*^{-/-} mice displayed a reduced number and a smaller size of colonies compared to controls (Fig. 2a and b). The decrease in size of the colonies reveals a significant proliferative defect of those progenitors. Multipotent (i.e., CFU-GEMM) or bipotent and unipotent (i.e., CFU-GM, CFU-G, or CFU-M) colonies were reduced showing a global decrease of the capacity of progenitors towards myeloid differentiation (Fig. 2c). Methylcellulose cultures were also performed from sorted LSK cells. In the same way, *Fanc*^{-/-} LSK cells produced a lower number of colonies compared to controls, and confirmed that the defects concerned early hematopoietic progenitors and affected all myeloid lineages (Fig. 2d). Collectively, those data demonstrate that the hematopoietic stem/progenitors cell compartment is altered in the bone marrow of *fancg*^{-/-} mice.

Functional defects of HSC in *fancg*^{-/-} mice

To assess the functional properties of HSC from *fancg*^{-/-} mice, we performed competitive stem cell reconstitution experiments using EGFP *fancg*^{-/-} and EGFP wt mice in order to discriminate donor cells from competitor and recipient cells. First, bone marrow cells from either *fancg*^{-/-} EGFP or EGFP wt were mixed at a 1:1 ratio with the equivalent cell population of wt mice and injected retroorbitally into lethally irradiated wt recipients. The analysis by flow cytometry of peripheral blood 4, 8, 12 and 16 weeks after transplantation revealed severe impairment in recipient transplanted with EGFP *fancg*^{-/-} bone marrow cells (Fig. 3a and b). EGFP *fancg*^{-/-} HSC exhibited a strong defect in their ability to reconstitute at short term and long term the hematopoiesis in irradiated recipients. A five-fold decay was observed. In another set of experiments, competitive stem cell reconstitution assay was performed with 2,000 LSK cells from either *fancg*^{-/-} EGFP and EGFP wt mice mixed with 250,000 bone marrow cells from wt mice. By analysis of peripheral blood, a similar deficit in the ability of LSK *fancg*^{-/-} cells to reconstitute hematopoiesis was observed (Fig. 3c). Moreover, this defect was not associated to a block in the

differentiation process of a specific lineage, as lymphoid and myeloid lineages were affected in the same manner (Fig. 3d). Furthermore, the frequency of *fancg*^{-/-} donor-derived LSK population was decreased in the bone marrow of the recipients 16 weeks after transplantation (Fig. 3e). Thus, the lack of *fancg*^{-/-} derived hematopoiesis observed after transplantation result from *fancg*^{-/-} HSC impairment in the recipient bone marrow. Collectively, those data show a functional defect in the HSC biology of *fancg*^{-/-} mice.

Quiescence status and apoptosis

Homeostasis between quiescent and activated states of HSC appears to be crucial for their maintenance and their cycling state is inversely correlated with their ability to engraft recipient after transplantation²². Impaired function of hematopoietic stem/progenitors cells is frequently associated with loss of quiescence and excessive proliferation^{19,23}. To address a potential alteration of the cell cycle regulation in the stem/progenitor cell compartment, we performed in wt and *fancg*^{-/-} cells LSK populations the analysis of intracellular ki-67 expression combined with DNA content, allowing to discriminate quiescent (ki-67 negative cells) from proliferating cells (ki-67 positive cells). In LSK stem/progenitor subset, the ratio between cells in G0 and cells that have entered cell cycle in G1 was lower for *fancg*^{-/-} than for the wt/wt controls, showing a loss of quiescence (Fig. 4a). In a second set of experiments, we performed a BrdU-uptake assay in wt and *fancg*^{-/-} mice. A 2-d exposure of mice to BrdU shows a decrease of BrdU⁺ LSK cells in *fancg*^{-/-} bone marrow compared to wt, indicating a higher proportion of cycling cells in the *fancg* deficient LSK cells (Fig. 4b). Thus, *fancg* seems to be involved in the balance between metabolically active and inactive cells of the HSC/progenitor pool at the steady state. However, enhanced proliferative activity does not lead to accumulation of LSK cells in the BM as shown in Fig.1. This failure of proliferating KLS to accumulate does not appear to reflect decreased survival as enhanced apoptosis was not detected in *fancg*^{-/-} KLS cells by using fluorescent annexin-V (Fig. 4c). Taken together, those data demonstrate that HSC/progenitors are actively cycling in *fancg*^{-/-} bone marrow, probably due to an impairment in the regulation of the quiescent state.

Anti-oxdyant NAC treatment do not restore *fancg*^{-/-} HSC potential

Several lines of evidence suggest a role of oxydative stress in the establishment of the FA pathology¹⁵. Moreover, reactive oxygen species were reported to inhibit the repopulating capacity and to reduce the lifespan of HSC in mice²⁰. Therefore, a potential role of ROS in the *fancg*^{-/-} HSC defect was investigated. First, we did not detect any differences in levels of intracellular ROS between LSK cells from *fancg*^{-/-} and wt mice (data not shown). Nevertheless, we examined the effect of dietary supplementation with the anti-oydant N-acetyl-L-cysteine (NAC) in order to test whether HSC defects under physiological conditions could result from chronic exposure of HSC to subtle increase of endogeneous ROS that we could not detect in our assay. NAC was added to drinking water of *fancg*-deficient mice from fertilization continuously throughout life in order to protect also HSC during mouse development. Even if a partial recovery of the quiescent status of LSK was detected in NAC-treated mice (Fig. 5a, p<0.02), NAC-treated and control *fancg*^{-/-} HSC continued to show a strong defect in their

ability to engraft and repopulate at short and long term irradiated recipients (Fig. 5b). Similar defects of engraftment were obtained when adult mice were treated during one month before transplantation as previously described¹⁹. Altogether, our data show that intrinsic HSC deficiency in *fancg*^{-/-} mice should not be linked to an increase in intracellular ROS.

Mice lacking *Fancg* show a defect in chemotactic migration to CXCL12 and homing in the BM

A deficit of reconstitution at short term and long term of the hematopoiesis could result from impaired migration/homing to the niche of the bone marrow of HSC after transplantation. The chemokine CXCL12 is one of the main chemoattractant factors involved in this process²⁴. Hence, we assayed the migration of *fancg*^{-/-} LSK cells to the chemokine CXCL12. LSK cells were placed in the top well of a transwell chamber, and chemokine-containing medium was placed in the bottom well. Responding cells were collected from the bottom well and enumerated (Fig. 6a). Strikingly, there was a significant decrease of migration to CXCL12 of *fancg*^{-/-} LSK cells compared to wt. As CXCL12 is a key protein for the first steps of the engraftment after transplantation, *fancg*^{-/-} LSK cells were evaluated for in vivo capacity to home to the bone marrow. Using a new fibered confocal fluorescence imaging system, we tracked the early steps of in vivo recruitment of EGFP-*fancg*^{-/-} and EGFP-wt LSK transplanted retroorbitally into lethally irradiated mice. This imaging system can navigate inside the femoral cavity from the knee to the femoral head and we show that this technique can visualize the hematopoietic reconstitution within the femoral cavity after lethal irradiation (manuscript submitted). Recruitment of the transplanted LSK first occurs in the femoral head and is continuous during 24 hours after the transplantation. By visualization of the homing to bone marrow 18 hours after transplantation, we detected fewer EGFP-*fancg*^{-/-} LSK compared to EGFP-wt LSK (Fig. 6b). Hence, deletion of *fancg* in LSK cells resulted in a marked impairment in their ability to home to bone marrow microenvironment.

HSC engraftment assays are based on intravenous injection, and require circulation through blood, adhesion and transmigration through bone marrow vasculature²⁵. *fancg*^{-/-} HSC show a significant decrease in their ability to engraft lethal irradiated recipient bone marrow, and as we show, could be linked to an impairment in the complex process of homing. The injection of HSC directly in the femur cavity allows to bypass this crucial step of the engraftment. Hence, we investigated whether intrafemoral injection of HSC rescued the deficit of long term hematopoietic regeneration. We performed competitive stem cell reconstitution experiments using intrafemoral transplantation. Bone marrow cells from either *fancg*^{-/-} EGFP and EGFP wt littermates were mixed at a 1:1 ratio with the equivalent cell population of wt mice and injected directly in femurs from lethally irradiated wt recipients. The analysis by flow cytometry of peripheral blood at 4, 8, 12 and 16 weeks after transplantation strikingly showed a significant improvement of the multilineage short-term and long-term repopulating ability of *fancg*^{-/-} HSC. Recipient mice displayed a chimerism around 30% (Fig. 6c). Four months after transplantation, the deficit of engraftment of *fancg*^{-/-} HSC compared to wt was 25% (chimerism was respectively 40% and 30% for wt and *fancg*^{-/-} donor cells) after intrafemoral route, though it was severely impaired (76%) after retroorbital transplantation (chimerism was respectively 42% and 10% for wt and *fancg*^{-/-} donor cells-Fig.

3). Hence, intrafemoral transplantation rescued significantly the ability to regenerate of *fancg*^{-/-} HSC that do not engraft efficiently if injected by the traditional intravenous route. This is probably linked to a lack of homing or migration potential that is normally responsible for seeding of HSC in the bone marrow after intravenous injection.

Impaired homing/retention to the niche of HSC in several genetic mouse models was sometimes associated to increased occurrence of HSC in peripheral blood. However, lack of *fancg* did not result in an aberrant mobilization of HSC to the peripheral system (data not shown). Likewise, impaired retention could lead to the increase of empty niche in bone marrow of *fancg*^{-/-} mice in physiological conditions, which would be available for transplanted HSC as previously described for DNA Lig4 and FancD1 deficient-mice^{9,26}. In order to test this hypothesis, wt bone marrow cells were transplanted retroorbitally in unconditioned 4-months old *fancg*^{-/-} and wt recipient mice. No difference of engraftment was observed between *fancg*^{-/-} and wt recipient mice 1, 2, and 4 months after transplantation (data not shown), which surmises that niches were occupied by endogenous HSC in the bone marrow of *fancg*^{-/-} mice in homeostasis condition.

Collectively, our data show that *fancg*-deficient mice show an impairment in the homing/migration of HSC in the blood flow towards the niche in the bone marrow, but *fancg* seems not to be required for HSC retention in the bone marrow under physiological conditions.

Overactivation of JNK could play a role in the deficiency of the chemotactic migration to CXCL12

Aberrant activation of the stress-activated protein kinases (SAPKs), such as the mitogen activated kinase p38 and c-jun N terminal kinase, were assumed to play a role in the pathogenesis of hematopoietic defects in the genesis of FA pathology^{17,18}. We investigated whether dysregulation of p38 MAPK and/or JNK could be linked to defect of migration to the CXCL12 response. First, we tested the consequence of CXCL12 stimulus upon p38 MAPK and JNK activation status in bone marrow cells (Fig. 7a). We observed that the exposure of wt bone marrow cells to the chemokine CXCL12 caused a two-fold increase in JNK phosphorylation and activation, but the difference was not statistically significant (Fig. 7b, $p=0.09$; $n=5$). P38 MAPK phosphorylation did not change after CXCL12 stimulus (Fig. 7c). This suggested that JNK kinase could act downstream in the CXCR4/CXCL12 signalling pathway and could play a role in the migration in response to CXCL12 stimuli. In order to test this hypothesis, wt $\text{lin}^- \text{kit}^+$ progenitors cells were placed in the top well of a transwell chamber in presence of specific JNK inhibitor SP600125, and CXCL12-containing medium were placed in the bottom well. Compared to DMSO vehicle control, a significant decrease of migration to CXCL12 was observed in presence of JNK inhibitors (Fig. 7d). Hence, JNK activation seems to play a role in the migration response of hematopoietic progenitors to CXCL12.

In cells flushed from *fancg*^{-/-} bone marrow, we observed a diminished expression of the protein JNK, but JNK was hyperactivated (Fig. 7a and e), as previously described in *fancd1*^{-/-} mice²⁷. Bone

marrow cells from *fancg*^{-/-} were incubated in presence of CXCL12 and activation of JNK was monitored. Due certainly to JNK hyperactivation in non-treated *fancg*^{-/-} cells, we observed a strong impairment of JNK activation compared to wt in response to CXCL12 (Fig. 7f). Moreover, treatment with specific JNK inhibitor SP600125 of *fancg*^{-/-} hematopoietic lin⁻ kit⁺ progenitors increased the deficit of migration in response to CXCL12 chemokine (number of responding cells divided by a factor 2-data not shown), showing that JNK pathway was only partially impaired in *fancg*^{-/-} progenitors. Collectively, our data suggest that overactivation of JNK observed in *fancg*^{-/-} mice could play a role in the impairment of migration.

Fancg deficiency deregulates several genes involved in selfrenewal, quiescence and migration

fancg^{-/-} HSC deficiency could result from changes of expression of key regulators of their physiology. In this regard, recent reports suggest a role of the FA core complex in the regulation of gene transcription^{28,29}. LSK cells from *fancg*^{-/-} and wt mice were sorted and analysed by real-time quantitative RT-PCR for several genes involved in the physiology of HSC (Fig. 8). No changes of expression were observed for cell cycle regulators and transcription factors like *c-myc*, *MEF*, *Hif1-α*, *p27*, *p18*, and *p19*. However, the transcription factor *Bmi1* was downregulated in LSK *fancg*^{-/-} mice. Real-time quantitative RT-PCR analysis revealed also changes in the Notch signalling pathway. *Notch1* was slightly upregulated, though the Notch target gene *Hes1* was markedly downregulated. We observed also in *fancg*^{-/-} KLS subset an increase of a target gene repressed by HES-1, the cyclin-dependent kinase inhibitor *p21*^{*waf1/cip1*}. Real-time quantitative RT-PCR analysis also revealed a significantly decreased expression of *N-cadh*, but not *CXCR4*, *cdc42*, *Rac1*, molecules that have been shown to be critical for homing of HSCs^{30 31 32}. EGR1 (early growth-response factor-1) is involved in the regulation of the proliferation and mobilization of HSC³³. In *Fancg*^{-/-} mice, the zinc-finger transcription factor *Egr1* and the cell cycle regulator *p57*^{*Kip2*} were down-regulated in LSK cells and suggest that it could be involved in the decreased pool of quiescent LSK. Taking together, it appears that *fancg* controls the expression of several key cell cycle, self renewal and adhesion regulators to coordinate the quiescence maintenance and the homing of HSCs.

Discussion

We aimed to determine whether the gene *fancg* plays a role in the regulation of HSC in the bone marrow. The present study shows that the hematopoietic potential of stem cells and early progenitors is severely altered in *fancg*^{-/-} mice. The deletion of *fancg* reduces the number of quiescent HSC/HPC and increases the population that is actively cycling. *fancg* deficiency also causes defective migration to chemokine CXCL12 and defective homing in the BM niche, which likely results in the impaired engraftment and long-term hematopoiesis that was observed after transplantation.

In the bone marrow, we observed decreased frequencies of LSK (Lin-Sca-1+Kit+) and LSK CD34⁻ Flk-2⁻ HSC population in *fancg*^{-/-} mice in comparison to WT controls. Furthermore, lethally irradiated recipients transplanted with bone marrow or LSK from *fancg*^{-/-} mice showed reduced donor-type blood cell chimerism at 16 weeks post-transplant, compared to the recipients transplanted with WT bone marrow. Short-term repopulating potential was also impaired. In addition, colony forming unit (CFU) assays determined that *fancg*^{-/-} deficient mice have lowered numbers of committed progenitors and sizes of colonies were reduced. This was quite surprising because the *in vitro* defect of proliferation of progenitors and their inability to produce colonies in physiological conditions was only reported for *fancD1*^{-/-} mice, but not for the mice deficient for the fanconi core proteins A and C^{7 8 9}. In addition to compromising myeloid progenitors, we found that *fancg*^{-/-} contained fewer lymphoid-primed multipotent progenitors KLS CD34⁺Flk-2⁺, indicating a potential impairment in differentiation. Likewise, it was previously reported that Lin⁻Thy1.2^{low}c-kit⁺Sca-1⁺CD34⁺ multipotent progenitors were fewer in *fancg* mice⁷. Moreover, upregulation of *fancg* mRNA was previously detected in Lin⁻Thy1.2^{low}Sca-1⁺CD34⁺ progenitor fraction which surmises a role in differentiation³⁴. Collectively, our data indicate that mice deficient in *fancg* have hematopoietic progenitors and stem cell defects, likewise *Fancc*^{-/-} and *FancD1/Brca2*^{-/-} mice.

Enhanced apoptosis was not observed in LSK cells from *fancg*^{-/-} mice compared to wild type mice. Therefore we could not explain this repopulation defect to stem cell exhaustion due to cell death. Only a slight decrease of the number of KLS CD34⁻ Flk-2⁻ HSC was observed in the bone marrow of *fancg*^{-/-} mice, and could reflect the mild effect of fanconi deficiency upon regulation of HSC. This is supported by the fact that hematopoiesis is normal in *fancg*^{-/-} mice. In several model of mice showing HSC deficiency, a relationship was obtained between the impairment of the repopulation capacity and abnormal cell cycle relative to a loss of quiescence. Indeed, the primitive quiescent HSC anchored in the niches have the most efficient reconstitution³⁵. HSC compartment should be divided in a highly dormant subpopulation and an activated compartment as recently suggested²². Activated HSC should be responsible for the daily maintenance of the hematopoiesis, i.e. tissue homeostasis. Quiescent compartment should constitute a silent reservoir of highly potent stem cells which could be activated after tissue injury in order to recover stem cell pool and hematopoiesis. After return to tissue hemostasis, a fraction of HSC would return to dormance. In this regard, *Mef*^{-/-} HSC constitute an another interesting example of the link between quiescence and regeneration after injury³⁶. *Mef* regulates the entry of HSC in the cell cycle. Due to their increased HSC quiescence, mice invalidated for *Mef* show a faster recovery

of hematopoiesis than wt after the myelosuppressive effects of fluorouracil (5-FU) or busulfan chemotherapy, and radiation. Those mice are indeed relatively resistant to the myelosuppressive treatments.

The phenotype of *fancg*^{-/-} mice could reflect this dual compartmentation of the HSC pool in function of the cell cycle status. We found that *fancg* deficiency result in attrition of quiescent LSK cells and an increase in proliferating LSK cells, showing that *fancg* is involved in the regulation of the proliferative rate and the balance between metabolically active and inactive cells of the HSC/progenitor pool, as previously described in *fanc*^{-/-} HSC/progenitor cells³⁷. Therefore, homeostasis of hematopoietic tissue could be maintained by activated HSC and no gross abnormalities are observed in *fancg*^{-/-} mice. However, *fancg*^{-/-} mice could be susceptible to tissue injury and aging, because of the decrease of the silent reservoir of dormant HSC observed in the *fancg*^{-/-}. In agreement with this, *fanc*^{-/-} mice, but not wt mice, treated with the DNA cross-linking agent mitomycin C (MMC) displayed progressive reductions in clonogenic and LTC-IC progenitors, leading to bone marrow failure⁶. Additional experiments should be performed in order to address the question whether the potential of regeneration of HSC after tissue injury is affected in *fancg*^{-/-} mice. Chronic exposure should be performed with other myelosuppressive treatments, such as irradiation (sublethal dose) inducing DNA double-strand breaks, and the chemotherapy S-phase sensitive agent fluorouracil (5-FU) or busulfan that target cycling hematopoietic cells.

Oxydative stress was reported to play potentially a role in the establishment of the FA pathology¹⁵. The fanconi proteins can interact with cytoplasmic components and propose a role for FANCG in protection against oxidative DNA damage. In line with this, the protein FANCG interact with the mitochondrial peroxylase peroxiredoxin 3, which is an important cellular antioxidant that regulates physiological levels of H₂O₂³⁸. The deficiency of FANCG alters redox metabolism and increase DNA oxidation. FA pathway could be thus directly involved in stem cell functions through regulation of ROS. ROS appeared recently to be a critical determinant of hematopoietic stem cell (HSC) life span and self-renewal, suggesting that the level of intracellular ROS determines the balance between quiescence and proliferation in the stem cell pool^{20,23}. Therefore, the role of ROS was investigated in stem cells and the maintenance of the stem cell pool in bone marrow of *fancg*^{-/-} mice. We did not detect any differences in levels of intracellular ROS between LSK cells from *fancg*^{-/-} and wt. In addition, We examined the effect of dietary supplementation with the thiol-containing antioxidant, N-acetyl-L-cysteine (NAC) on HSC. In spite of a partial reacquisition of a quiescent status by the *fancg*^{-/-} NAC-treated LSK cells, the frequency of LSK cells was similar in the NAC-treated and control *fancg*^{-/-} mice, and was lower than in the wt group. Furthermore, NAC-treated and control *fancg*^{-/-} HSC continued to show a strong defect in their ability to regenerate hematopoiesis in irradiated recipients. Altogether, our data show that intrinsic HSC deficiency in *fancg*^{-/-} mice should not be linked to an increase in intracellular ROS.

Transplanted HSC disseminate in the blood flow and have to interact with endothelial cells from specific microvasculature structures in order to enter in the bone marrow. Then, this homing process

requires the transendothelial migration of HSC through sinusoids walls ²⁵. Inside the niche in the bone marrow, they can selfrenew and give rise to differentiated cells. In adult mice, HSC reside mainly in the bone marrow, but circulating HSC has been also found in the blood flow. The experiments using parabiotic mice nicely show that the HSC trafficking in the circulation contributes to some important features of HSC physiology, such as engraftment ²⁵. Hence, HSC/HPC exit from BM to blood and return to other functional niches in BM via blood flow. This illustrates the role of HSC homing and migration in the transplantation process, but also in the regulation of the hematopoiesis in homeostatic condition. Homing and migration involves numerous molecules regulating cell adhesion and chemoattraction. The chemokine CXCL12 is one these important chemoattractant factors ²⁴. AMD3100, a CXCR4 antagonist, mobilizes HSC. In addition, adult HSC express the chemokine receptor CXCR4, and conditional invalidation of CXCR4 results in the decrease of the pool of HSC, the exit of quiescence and decrease of repopulating potential ³²⁻³⁹. Hence, we investigated whether the response to CXCL12 was altered in the HSC/HPC from *fancg*^{-/-} mice. We observed that the induction of chemotaxis *in vitro* by CXCL12 was lower in LSK cells from *fancg*^{-/-} mice compared to WT. We did not observe any differences in the expression of the receptor CXCR4 in *fancg*^{-/-}. Similar results for CXCR4 were recently reported for *fanca*, *fancc*, and *fancd2* mice ⁴⁰. Hence, this defect of response to CXCL12 was not linked to a decrease of expression of its receptor in LSK cells. A defect in the homing to the bone marrow of *fancg*^{-/-} LSK was also observed *in vivo* after transplantation. Interestingly, direct injections of *fancg*^{-/-} cells by intrafemoral transplantations in the bone marrow rescued significantly the engraftment defect of *fancg*^{-/-} HSC because long term reconstitution was effective by this injection route. Those data suggest that bypassing the transmigration/homing process rescued the HSC defects observed in *fancg*^{-/-}. Collectively, those data suggest that *fancg*^{-/-} LSK display a defect in HSC/HPC trafficking and could be responsible in part for the engraftment defects observed in *fancg*^{-/-} mice. A recent paper has also reported a defective homing of human hematopoietic progenitors in cells from patients with Fanconi anemia group A ⁴¹.

SDF1/CXCR4 involves several downstream signalling pathways in order to tract cells in the niche. Among them, the Rho family GTPase Rac1, Rac2 and cdc42 play a role in the migration and homing of HSC ³⁰⁻³¹. *Rac1* and *cdc42* expression do not vary in *fancg*^{-/-} LSK cells compared to wt. As *CDC42GAP*^{-/-} mice show phenotype reminiscent of FA, we went further in the study of *CDC42* ⁴². Using quantitative Elisa assay, we did not observe any differences in the activity of *CDC42* between lin c-kit⁺ progenitors from *fancg*^{-/-} and wt (data not shown), although defective homing was recently associated with altered *Cdc42* activity in cells from Fanconi anemia group A patients ⁴¹. We determined by real-time quantitative RT-PCR a decreased expression of N-cadherin in *fancg*^{-/-} LSK. N-cadherin appears to play a role in the anchorage of HSC to the osteoblastic niche at the endosteal surface of the bone marrow, and could also influence the cell cycle of HSCs ⁴³. However, its role remains controversial and N-cadherin expression by HSCs appears not to be necessary for niche function ⁴⁴.

Recently, HSC deficiency was associated to an increase of proliferation of the HSC pool linked to a reduced expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors p57(Kip2) in mice deficient for *Thpo* and *stat5* ^{45,46}. This suggests that the maintenance of quiescence may be carefully controlled by p57Kip2

^{47,48}. CXCR4 signaling participates to the quiescent status of HSC as shown in *Cxcr4*^{-/-} mice ³⁹. Hence, CXCL12 produced by bone marrow (BM) stromal cells is not only a chemoattractant for HSCs but also a regulatory factor that controls the quiescence. In addition, *p57^{kip2}* was identified as one of the direct targets downstream of CXCR4 signalling pathway ³⁹. Interestingly, we observed a lack of response to CXCL12-CXCR4 signaling in *fancg*^{-/-} LSK, and also a decrease of the expression of *p57^{kip2}* and an alteration of the quiescence. Collectively, those data seem to involve CXCL12-CXCR4 pathway in FA deficiency. Indeed, the hyperproliferative *Cxcr4*^{-/-} HSCs sustained hematopoiesis during mouse adult life and mice were not aplastic, but showed impaired engraftment after transplantation due to an incapacity of CXCR4-deficient HSC to home to the bone marrow niche ³⁹. Those traits of *Cxcr4*^{-/-} mice are reminiscent of the phenotype of the fanconi-deficient mice. These evidence suggest that CXCR4 signaling pathway impairment could play a major role in the deficiency of *fancg*^{-/-} HSC and that FA proteins could interact with downstream effectors of this pathway.

Several lines of evidence support the involvement of the stress-activated protein kinases (SAPKs) in the genesis of FA pathology. In *Fancc*^{-/-} hematopoietic cells challenged with lipopolysaccharides, tumor necrosis factor α or interferon γ , aberrant p38 MAPK and/or JNK activation has been shown to be responsible for HSC/HPC apoptosis and hematopoietic defects ^{16,49-51}. We sought to determine whether dysregulation of p38 MAPK and/or JNK could be linked to defect of migration to the CXCL12 response. We observed that the exposure of wt bone marrow cells to the chemokine CXCL12 caused JNK phosphorylation and activation. Hence, SAPK could play a role in the migration in response to SDF-1 stimuli. Indeed, the migration of wt lin⁺ kit⁺ progenitors was strongly decreased *in vitro* when the progenitors were incubated in presence of specific JNK inhibitor SP600125. In cells flushed from *fancg*^{-/-} bone marrow, we observed that JNK was hyperactivated as previously described in *fancc*^{-/-} mice ²⁷, and a strong impairment of JNK activation after CXCL12 stimuli. Collectively, our data suggest that SAPK dysregulation observed in *fancg*^{-/-} mice could play a role in the impairment of migration, in addition to its role in apoptosis and in the emergence of preleukemic cells previously described ²⁷.

Recent evidence suggests that the FA proteins, and even the FA core complex, could be involved in the regulation of gene transcription. The FA core complex could indeed act as a transcriptional regulator of several genes, notably of the BLBH transcription factor HES-1 through direct binding to its promoter or through interaction with corepressor of this transcription factor ^{28,29}. To determine the potential mechanism underlying the accelerated cell cycle status and the defective adhesion properties of the *fancg*^{-/-} HSCs, we further examined in LSK cells the expression profile of a number of transcription factors, cell cycle factors regulators and adhesion molecules, involved in HSC physiology.

Fang deficiency deregulates several genes involved in self-renewal, quiescence and migration. *Bmi1*, a key transcription factor required for the maintenance of stem cell self-renewal ability ⁵², was downregulated in LSK *fancg*^{-/-} mice. In line with this, the physical interaction between FancD2 and Bmi-1 connects Polycomb genes to the FA repair pathway (Chargraoui, 2009, Congress communication). The Drosophila hairy and enhancer of split (HES) 1 basic helix-loop-helix protein is a major downstream

effector in the canonical Notch pathway, which is surmised to play a role in the stem cell function⁵³. We observed a discrepancy between an upregulation of *Notch1* and a downregulation of Notch target gene *Hes1* in *fancg*^{-/-} KLS cells. However, a Notch independent regulation of the expression of *Hes1* was recently reported, and showed that inactivation of the Notch pathway in HSCs does not impair their self-renewal⁵⁴. *Hes-1* plays a role in the self-renewal and maintenance of HSCs, and in the control of the quiescence^{53,55}. Interestingly, FA core complex was recently shown to regulate *Hes1* transcription and HES1 target genes^{28,29}. In agreement with this, we observed also in *fancg*^{-/-} KLS subset an increase of a target gene repressed by HES-1, the cyclin-dependent kinase inhibitor *p21*^{waf1/cip1}. This upregulation of *p21*^{waf1/cip1} is a hallmark of FA mutant cells⁵⁶. Its role in HSCs is controversial and recent work show that *p21*^{waf1/cip1} seems not to be essential during steady state hematopoiesis⁵⁷. Nevertheless, the increase of *p21*^{waf1/cip1} in the context of telomere dysfunction in *Terc*^{-/-} HSC, which induces DNA damage signalling, was in part responsible for the impairment of the repopulation capacity and self-renewal of hematopoietic stem cells, but did not affect the cycling of HSC⁵⁸. The zinc-finger transcription factor *Egr1* (early growth-response factor-1) is involved in the regulation of the proliferation and mobilization of HSC³³. *Egr1*^{-/-} mice exhibit increased proliferation and increased pool of circulating HSC, but maintained long-term multilineage engraftment upon transplantation. Loss of function of *Egr1*^{-/-} HSC was only seen during serial transplantation. In *Fancg*^{-/-} mice, *Egr1* was down-regulated in LSK cells and suggest that it could be involved in the decreased pool of quiescent LSK. In addition, *p57*^{kip2}, is a potential regulator of HSC quiescence, and it can be regulated by EGR1⁵⁹. However, we did not observe an increase in the number of *fancg*^{-/-} circulating HSC in blood, another trait of *Egr1*^{-/-} mice. Interestingly, defective activation of JNK and expression of its downstream target *Egr1* was previously reported to potentially play a role in the pathogenesis of fanconi A patients⁶⁰.

In summary, our data show a stem cell defect in the *fancg*^{-/-} mouse models and involves an impairment of CXCR4/CXCL12 signaling, suggesting that FA proteins could interact with downstream effectors of this pathway and alter migration and homing of stem cells. Furthermore, the expression of several genes involved in the quiescence and the selfrenewal of HSC were dysregulated in *fancg*^{-/-} mice, which underlines that FA pathway could regulate the transcription as recently described²⁸. In addition to the role of the FA pathway in DNA repair, our data highlight that FA pathology and HSC defects certainly result from impairment of others fundamental functions of the HSC physiology.

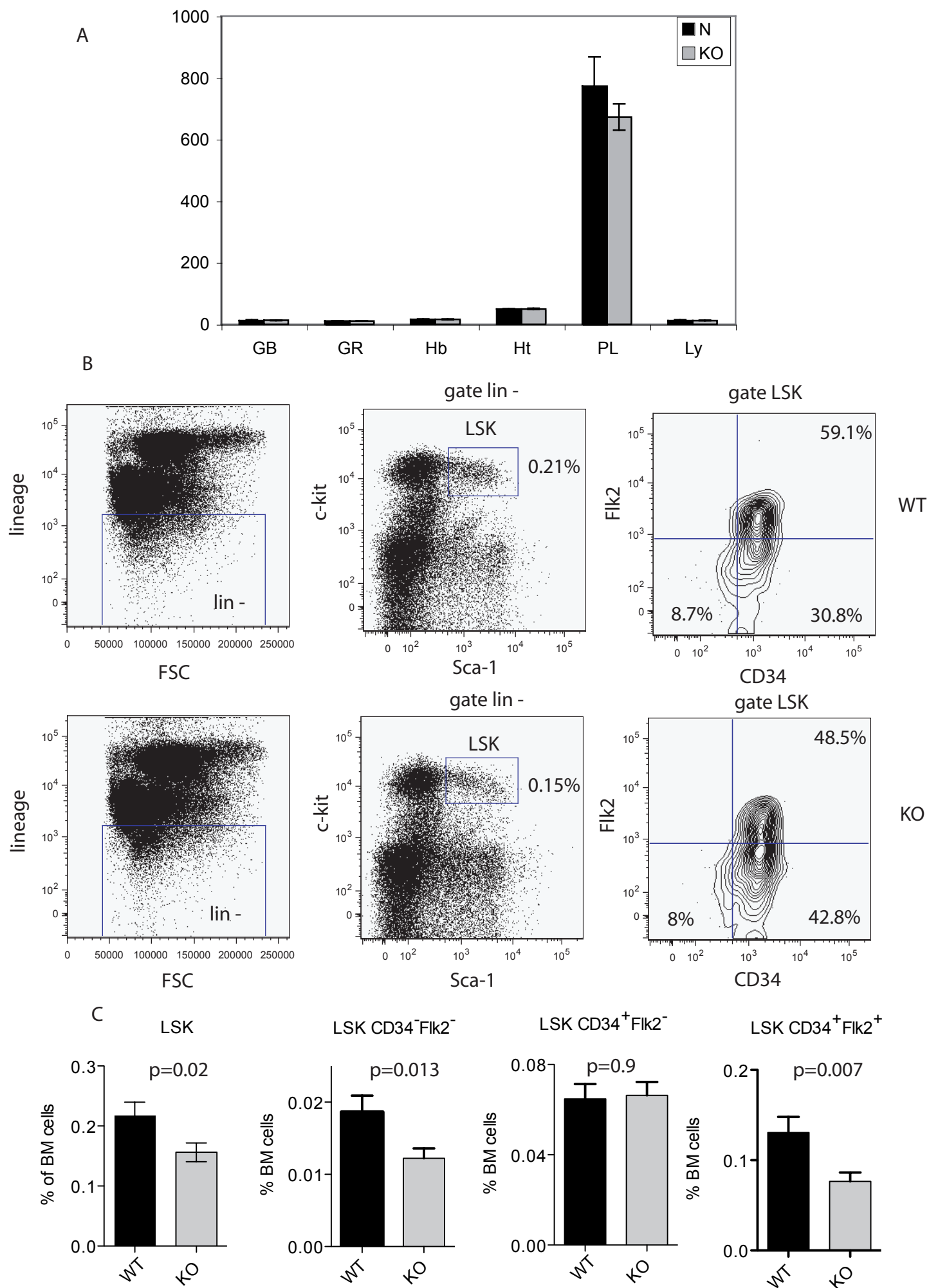


Figure 1

Figure 1. Hematopoietic stem/progenitors cells defects in *fancg*^{-/-} mice. (A) Automated analysis of blood cells in *fancg*^{-/-} and wt mice. Differences are statistically not significant (n=4). GB (leukocytes), GR (erythrocytes), Hb (Hemoglobin), Ht (hematocrit), PL (Platelets), Ly (lymphocytes). (B) Phenotypic defects in the HSC compartment. Plots from one representative animal from each genotype are shown. HSC/progenitors subset, LSK; Long-term HSC, LSK CD34⁻Flk-2⁻; Short-term HSC LSK CD34⁺Flk-2⁻; LMPP; LSK CD34⁺Flk-2⁺. (C) Frequency (%) of Long-term HSC (LSK CD34⁻Flk-2⁻), Short-term HSC (LSK CD34⁺Flk-2⁻) and LMPP (LSK CD34⁺Flk-2⁺) in function of total bone marrow cells. n=7-8 per group.

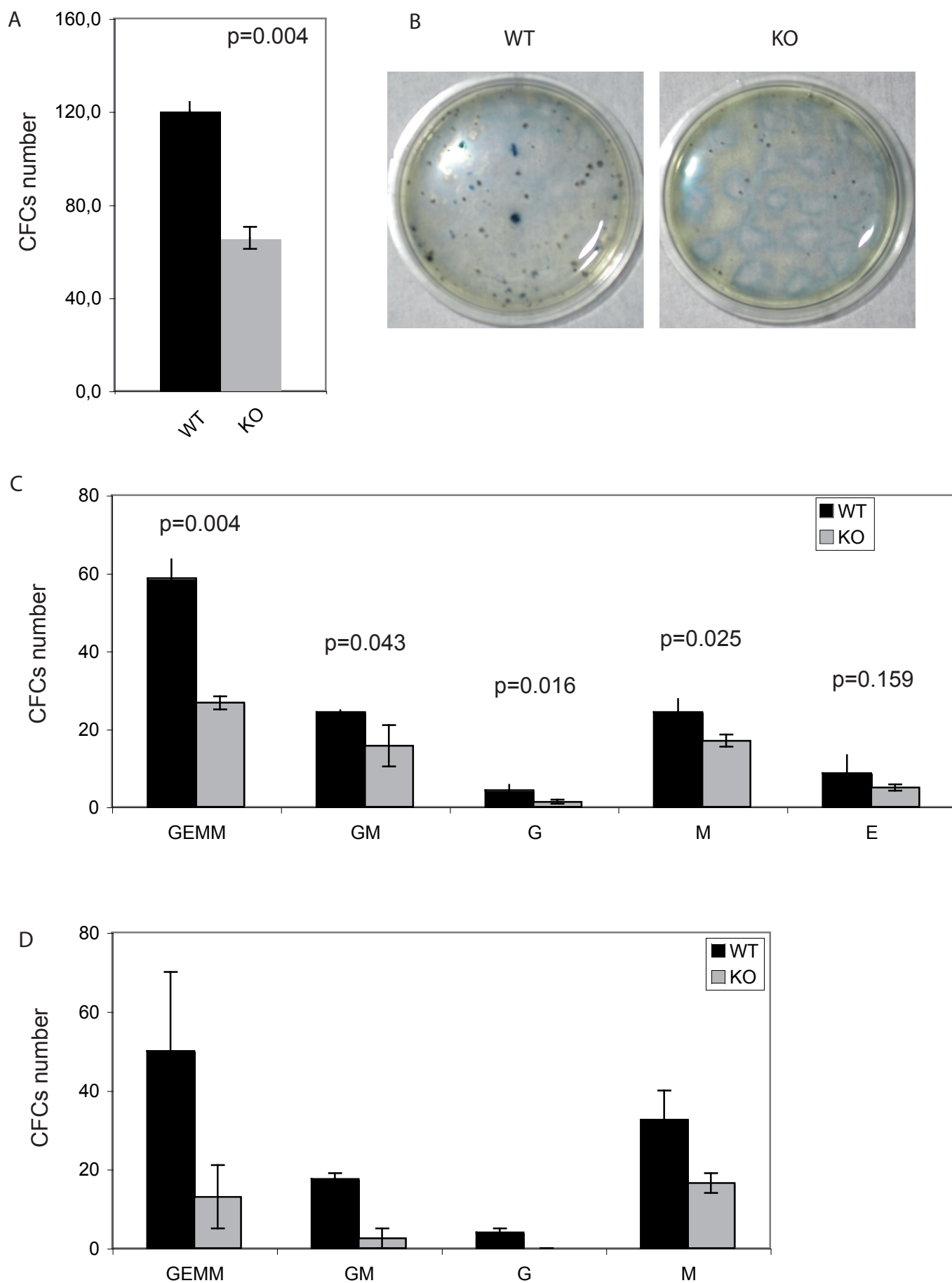


Figure 2

Figure 2. Loss of *fancg* in bone marrow cells impairs *in vitro* clonogenic potential of myeloid committed progenitors (colony-forming cells, CFCs). (A) In vitro clonogenic potential of unfractionned bone marrow cells from *Fancg*^{-/-} and WT mice. N= 3 (B) Proliferative defects in progenitors from *Fancg*^{-/-} mice. Colonies are smaller compared to WT controls. Representative pictures of plate of one animal from each genotype are shown. (C) CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, CFU-E and CFU-M colonies from unfractionned bone marrow cells from *Fancg*^{-/-} and WT mice (N= 3). (C) CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, and CFU-M colonies from sorted LSK cells from *Fancg*^{-/-} and WT mice (N= 2 independent experiments. Each LSK subset was sorted from 2 mice of each genotype). Colony-forming unit Granulocyte Erythrocyte Monocyte Macrophage (CFU-GEMM), Colony-forming unit Granulocyte-Macrophage (CFU-GM), Colony-forming unit Granulocyte (CFU-G), Colony-forming unit Macrophage (CFU-M), Colony-forming unit Erythrocytes (CFU-E).

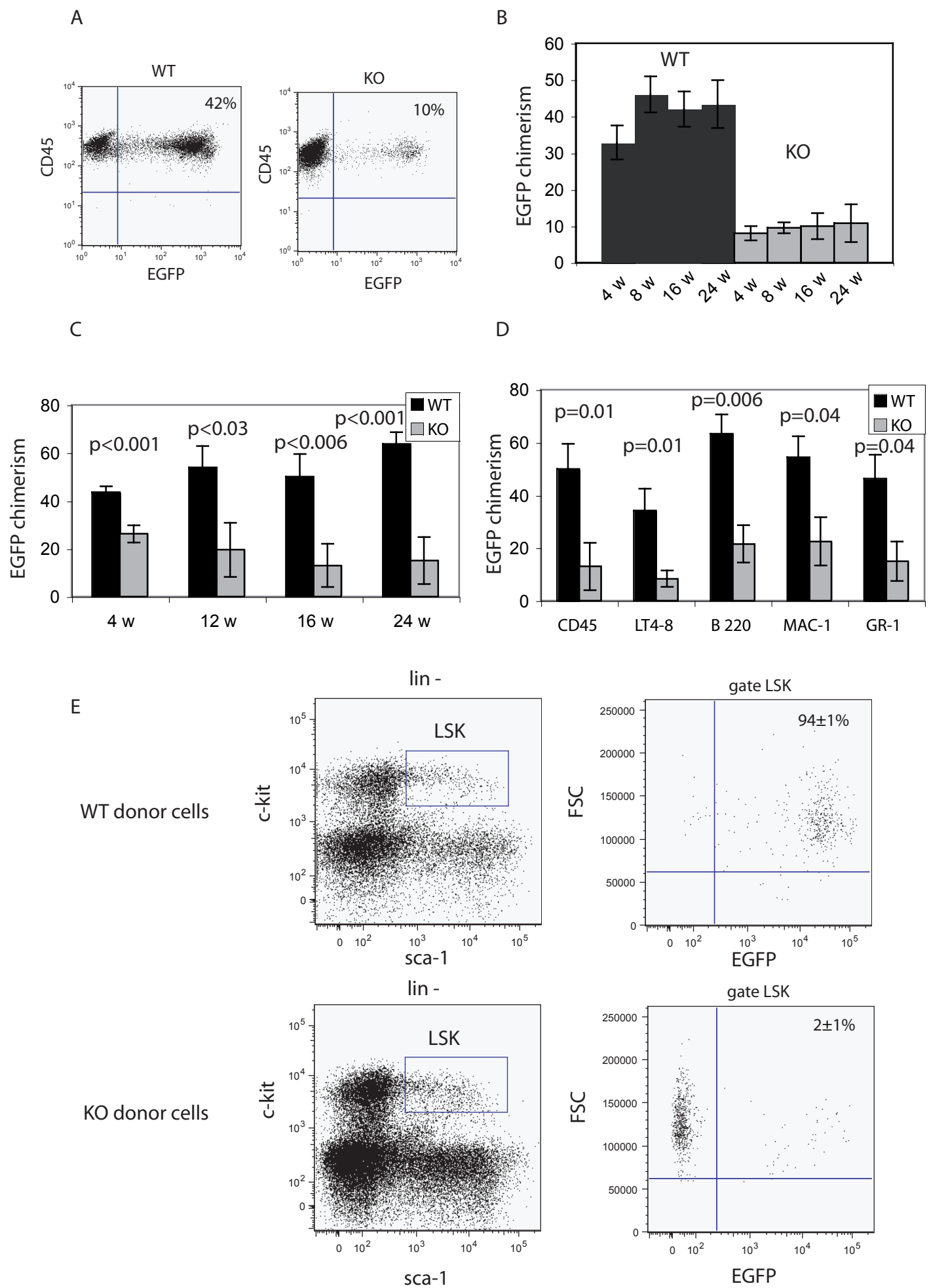
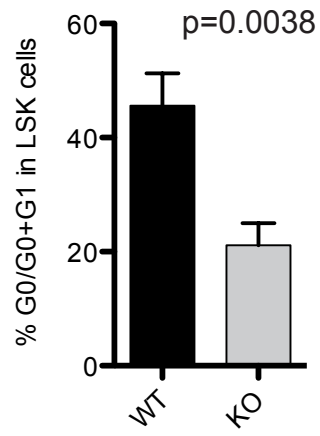


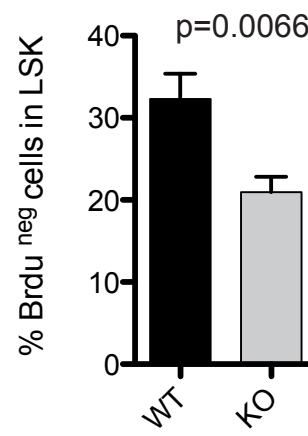
Figure 3

Figure 3. Loss of *fancg* impairs short term and long term repopulation potential of HSC. (A) Flow analysis of EGFP chimerism of CD45⁺ cells in blood of irradiated recipient mice 16 weeks after competitive transplantation with either *fancg*^{-/-} EGFP or EGFP wt mixed at a 1:1 ratio with the equivalent cell population of wt mice. Representative plots of one recipient animal transplanted with cells from each genotype are shown. (B) Comparison of short term and long term engraftment of transplanted *fancg*^{-/-} EGFP and EGFP wt bone marrow cells in competitive repopulation experiments. Proportion of CD45⁺ EGFP donor-derived cells in blood of recipient mice (N=9). $p < 0.001$ for each time. (C) CD45⁺ EGFP donor-derived cells chimerism in peripheral blood of recipient mice transplanted with 2,000 LSK cells from EGFP *fancg*^{-/-} or EGFP wt mice in competitive repopulation assay. $P < 0.03$ for each time (D) Proportion of donor-derived lymphocytes T (LT4-8), lymphocytes B (B220), and myeloid (MAC-1, GR-1) of either mutant or WT origin in peripheral blood of recipient mice 6 months after transplantation (N=4). (E) Frequency of donor-derived LSK cells in bone marrow from recipient mice 6 months after transplantation of either *fancg*^{-/-} EGFP or EGFP wt cells (N=2-3 per group)

A



B



C

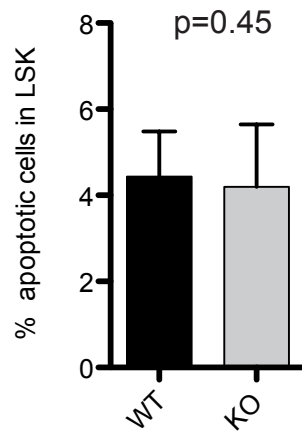


Figure 4

Figure 4. *fancg* deficiency impairs quiescence in HSC/HPC compartment (A) Proportion of quiescent cells in wt and *fancg* ^{-/-} cells LSK populations according to the flow analysis of intracellular ki-67 expression combined with DNA content (N=5-6 per group). (B) Proportion of BrdU-negative in LSK cells from wt and *fancg* ^{-/-} mice using a 48h BrdU-uptake assay (N=5). (C) Frequency of apoptotic cells in *fancg* ^{-/-} and wt LSK cells by fluorescent annexin-V assay (N=3).

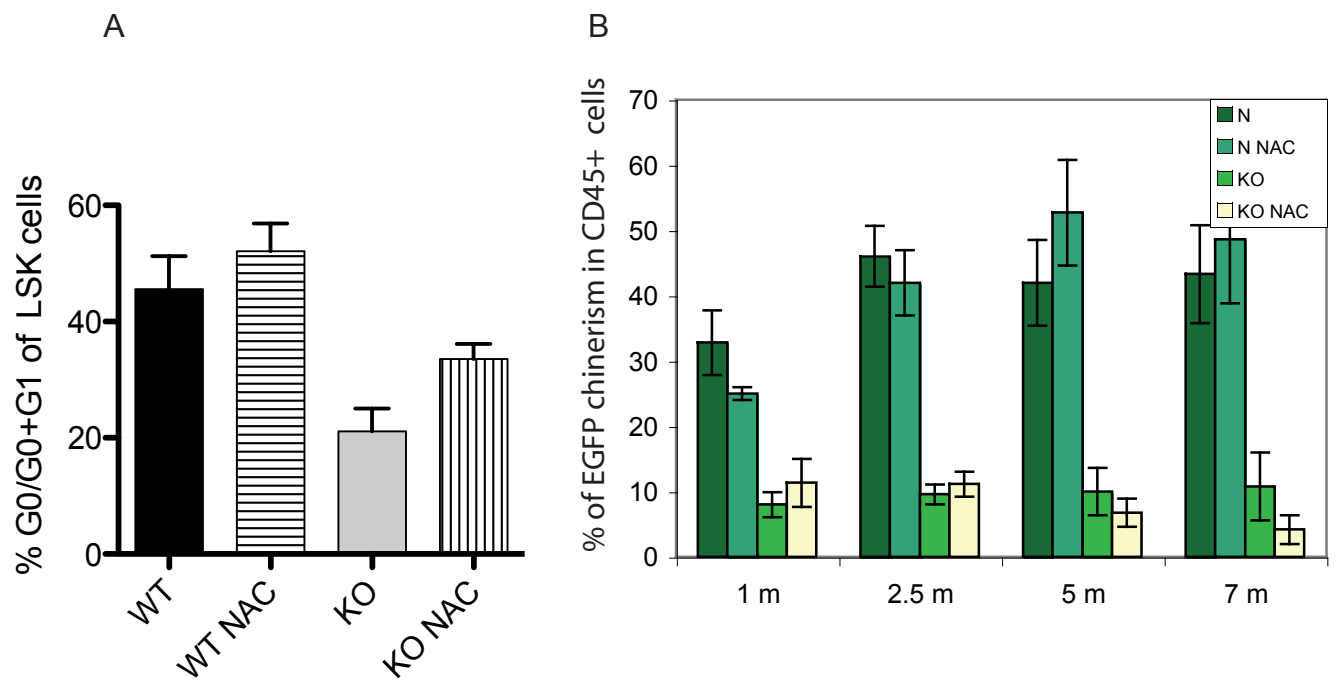


Figure 5

Figure 5. NAC treatment of *fancg*-/- mice do not restore HSC engraftment. (A) Proportion of quiescent cells in wt and *fancg* ^{-/-} cells LSK populations according to NAC treatment. Data obtained from the flow analysis of intracellular ki-67 expression combined with DNA content (N=5-6 per group). (B) Comparison of short term and long term engraftment of transplanted *fancg* ^{-/-} EGFP and EGFP wt bone marrow cells from control mice and mice treated with NAC in competitive repopulation experiments. Proportion of CD45⁺ EGFP donor-derived cells in blood of recipient mice (N=6-8 per group).

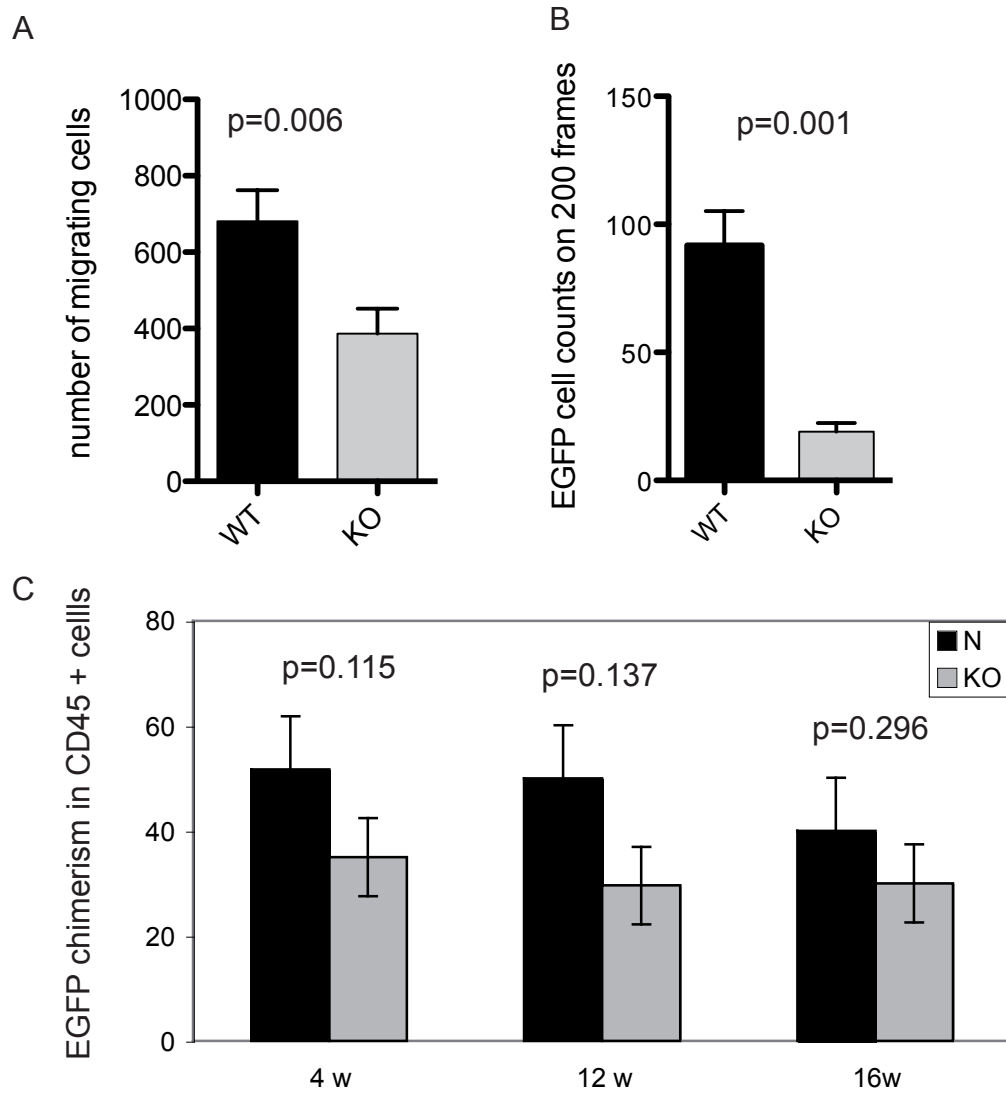


Figure 6

Figure 6. Loss of *fancg* impairs *in vitro* migration to CXCL12 and *in vivo* homing to the bone marrow in LSK subset (A) *In vitro* migration of *fancg*^{-/-} and wt LSK cells in response to the chemokine CXCL12 (N=9). (B) Analysis by confocal fluorescence imaging system of *in vivo* homing to the femurs 18 hours after retro-orbital transplantation of *fancg*^{-/-} EGFP and EGFP wt LSK cells (N=4 femurs). (C) Intrafemoral transplantation. Comparison of short term and long term engraftment of transplanted *fancg*^{-/-} EGFP and EGFP wt bone marrow cells in competitive assay. Proportion of CD45⁺ EGFP donor-derived cells in blood of recipient mice (N=3-4 per group).

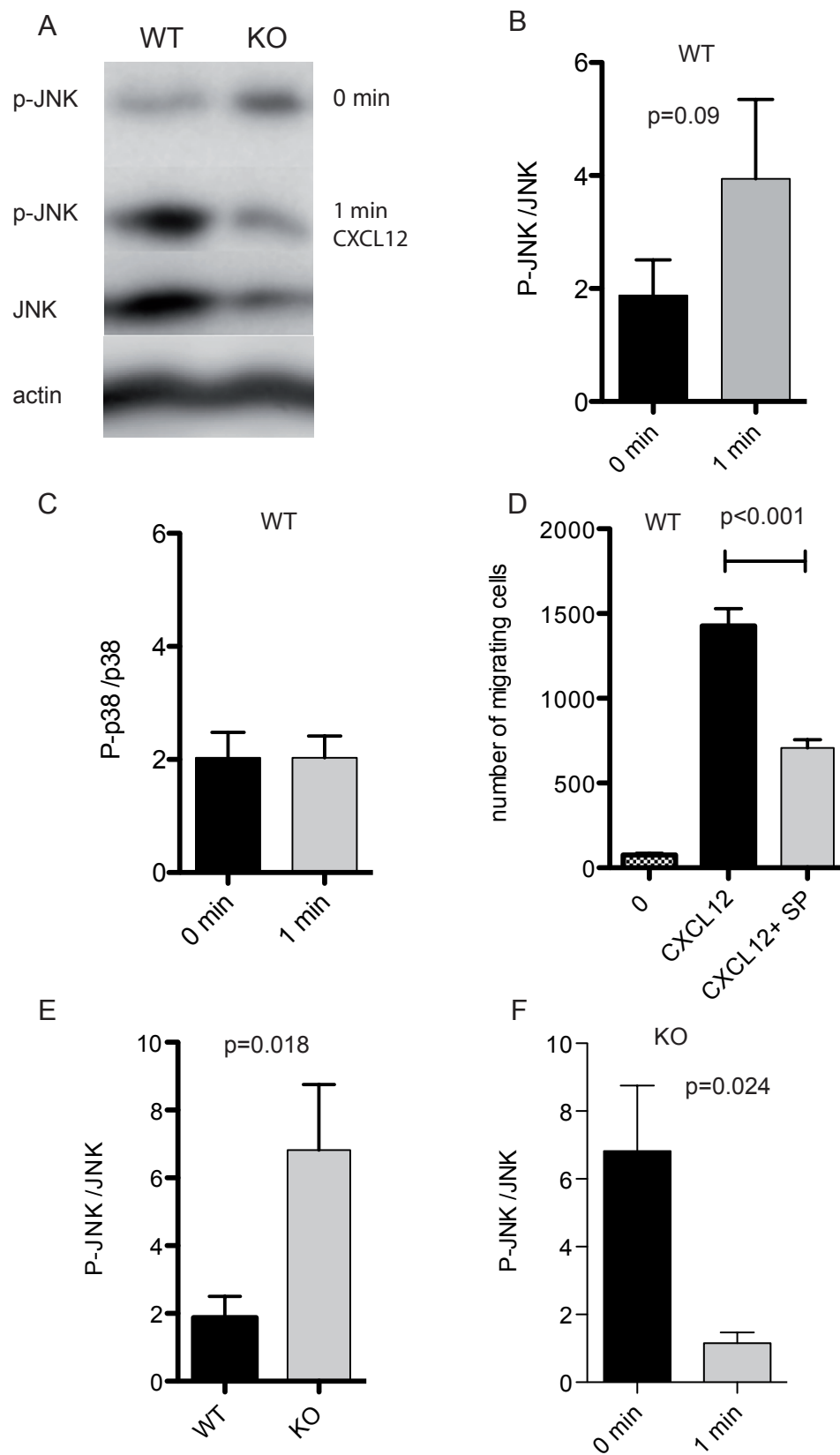


Figure 7

Figure 7. A potential link between overactivation of JNK and impaired chemotactic migration to CXCL12 in *fancg*^{-/-} LSK cells. (A) JNK phosphorylation status after 1 min activation by CXCL12 of wt and *fancg*^{-/-} bone marrow cells. Representative JNK, P-JNK and β -actin western blots are shown. (B) Mean densitometry data for P-JNK activation in wt bone marrow cells following CXCL12 stimulus (N=5-6 per group). (C) Mean densitometry data for P-p38 activation in wt bone marrow cells following CXCL12 stimulus (N=5-6 per group). (D) *In vitro* migration of bone marrow kit⁺ progenitors in presence of JNK inhibitor SP 600125 in response to the chemokine CXCL12; (N=6). (E) Comparison of P-JNK activation in wt and *fancg*^{-/-} bone marrow cells. Mean densitometry data (N=5-6 per group). (F) Comparison of P-JNK activation in wt and *fancg*^{-/-} bone marrow cells following CXCL12 exposure. Mean densitometry data (N=6).

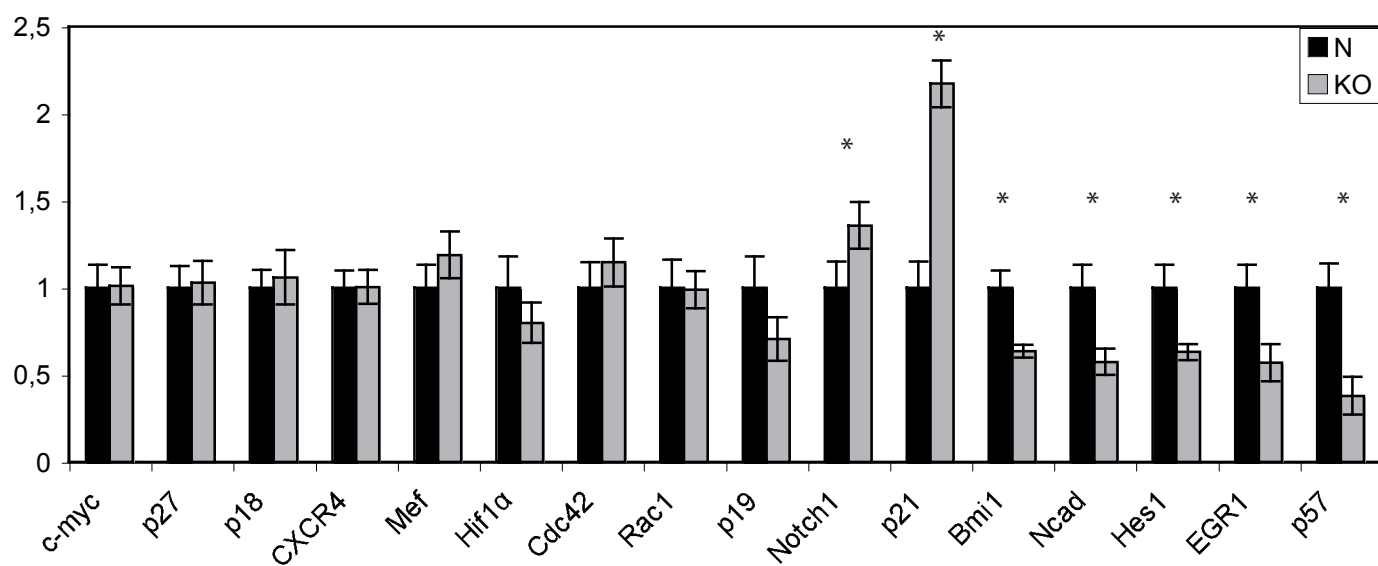


Figure 8

Figure 8. Altered expression profile of transcription factors, migration and cell-cycle regulatory genes in *fancg* ^{-/-} LSK cells. Analysis of gene expression by qRT-PCR of RNA isolated from sorted LSK cells. The relative expression is shown normalized to gene expression in control wt LSK. *, P < 0.05.

References

1. Niedernhofer LJ, Lalai AS, Hoeijmakers JH. Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell*. 2005;123:1191-1198.
2. Grompe M, van de Vrugt H. The Fanconi family adds a fraternal twin. *Dev Cell*. 2007;12:661-662.
3. Blom E, van de Vrugt HJ, de Vries Y, de Winter JP, Arwert F, Joenje H. Multiple TPR motifs characterize the Fanconi anemia FANCG protein. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3:77-84.
4. Koomen M, Cheng NC, van de Vrugt HJ, et al. Reduced fertility and hypersensitivity to mitomycin C characterize Fancg/Xrcc9 null mice. *Hum Mol Genet*. 2002;11:273-281.
5. Carreau M. Not-so-novel phenotypes in the Fanconi anemia group D2 mouse model. *Blood*. 2004;103:2430.
6. Carreau M, Gan OI, Liu L, et al. Bone marrow failure in the Fanconi anemia group C mouse model after DNA damage. *Blood*. 1998;91:2737-2744.
7. Carreau M, Gan OI, Liu L, Doedens M, Dick JE, Buchwald M. Hematopoietic compartment of Fanconi anemia group C null mice contains fewer lineage-negative CD34+ primitive hematopoietic cells and shows reduced reconstruction ability. *Exp Hematol*. 1999;27:1667-1674.
8. Haneline LS, Gobbett TA, Ramani R, et al. Loss of FancC function results in decreased hematopoietic stem cell repopulating ability. *Blood*. 1999;94:1-8.
9. Navarro S, Meza NW, Quintana-Bustamante O, et al. Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. *Mol Ther*. 2006;14:525-535.
10. Habi O, Delisle MC, Messier N, Carreau M. Lack of self-renewal capacity in FancC-/- stem cells after ex vivo expansion. *Stem Cells*. 2005;23:1135-1141.
11. Zhang X, Li J, Sejas DP, Pang Q. Hypoxia-reoxygenation induces premature senescence in FA bone marrow hematopoietic cells. *Blood*. 2005;106:75-85.
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;447:725-729.
13. Park Y, Gerson SL. DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annu Rev Med*. 2005;56:495-508.
14. Sii-Felice K, Etienne O, Hoffschir F, et al. Fanconi DNA repair pathway is required for survival and long-term maintenance of neural progenitors. *Embo J*. 2008;27:770-781.
15. Pagano G, Degan P, d'Ischia M, et al. Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. *Eur J Haematol*. 2005;75:93-100.
16. Zhang X, Sejas DP, Qiu Y, Williams DA, Pang Q. Inflammatory ROS promote and cooperate with the Fanconi anemia mutation for hematopoietic senescence. *J Cell Sci*. 2007;120:1572-1583.
17. Briot D, Mace-Aime G, Subra F, Rosselli F. Aberrant activation of stress-response pathways leads to TNF-alpha oversecretion in Fanconi anemia. *Blood*. 2008;111:1913-1923.
18. Bijangi-Vishehsaraei K, Saadatzaheh MR, Werne A, et al. Enhanced TNF-alpha-induced apoptosis in Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on apoptosis signal-regulating kinase 1. *Blood*. 2005;106:4124-4130.
19. 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;431:997-1002.
20. 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;12:446-451.
21. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*. 1997;407:313-319.
22. 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.
23. Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*. 2007;128:325-339.
24. Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, Butcher EC, Weissman IL. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med*. 2002;195:1145-1154.
25. Laird DJ, von Andrian UH, Wagers AJ. Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell*. 2008;132:612-630.
26. Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, et al. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature*. 2007;447:686-690.
27. Li J, Sejas DP, Zhang X, et al. TNF-alpha induces leukemic clonal evolution ex vivo in Fanconi anemia group C murine stem cells. *J Clin Invest*. 2007;117:3283-3295.
28. Tremblay CS, Huard CC, Huang FF, et al. The fanconi anemia core complex acts as a transcriptional co-regulator in hairy enhancer of split 1 signaling. *J Biol Chem*. 2009.

29. Tremblay CS, Huang FF, Habi O, et al. HES1 is a novel interactor of the Fanconi anemia core complex. *Blood*. 2008;112:2062-2070.
30. Yang L, Wang L, Geiger H, Cancelas JA, Mo J, Zheng Y. Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:5091-5096.
31. Cancelas JA, Lee AW, Prabhakar R, Stringer KF, Zheng Y, Williams DA. Rac GTPases differentially integrate signals regulating hematopoietic stem cell localization. *Nat Med*. 2005;11:886-891.
32. 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.
33. Min IM, Pietramaggiori G, Kim FS, Passegue E, Stevenson KE, Wagers AJ. The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;2:380-391.
34. Aube M, Lafrance M, Brodeur I, Delisle MC, Carreau M. Fanconi anemia genes are highly expressed in primitive CD34+ hematopoietic cells. *BMC Blood Disord*. 2003;3:1.
35. 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.
36. Lacorazza HD, Yamada T, Liu Y, et al. The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells. *Cancer Cell*. 2006;9:175-187.
37. Li X, Plett PA, Yang Y, et al. Fanconi anemia type C-deficient hematopoietic stem/progenitor cells exhibit aberrant cell cycle control. *Blood*. 2003;102:2081-2084.
38. Mukhopadhyay SS, Leung KS, Hicks MJ, Hastings PJ, Youssoufian H, Plon SE. Defective mitochondrial peroxiredoxin-3 results in sensitivity to oxidative stress in Fanconi anemia. *J Cell Biol*. 2006;175:225-235.
39. Nie Y, Han YC, Zou YR. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med*. 2008;205:777-783.
40. Skinner AM, O'Neill SL, Grompe M, Kurre P. CXCR4 induction in hematopoietic progenitor cells from Fanca(-/-), -c(-/-), and -d2(-/-) mice. *Exp Hematol*. 2008;36:273-282.
41. Zhang X, Shang X, Guo F, et al. Defective homing is associated with altered Cdc42 activity in cells from patients with Fanconi anemia group A. *Blood*. 2008;112:1683-1686.
42. Wang L, Yang L, Debidda M, Witte D, Zheng Y. Cdc42 GTPase-activating protein deficiency promotes genomic instability and premature aging-like phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:1248-1253.
43. Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, et al. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*. 2004;18:2747-2763.
44. Kiel MJ, Acar M, Radice GL, Morrison SJ. Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. *Cell Stem Cell*. 2009;4:170-179.
45. Wang Z, Li G, Tse W, Bunting KD. Conditional deletion of STAT5 in adult mouse hematopoietic stem cells causes loss of quiescence and permits efficient non-ablative stem cell replacement. *Blood*. 2009.
46. Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007;1:671-684.
47. Umemoto T, Yamato M, Nishida K, Yang J, Tano Y, Okano T. p57Kip2 is expressed in quiescent mouse bone marrow side population cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;337:14-21.
48. Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, et al. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *Embo J*. 2006;25:3515-3523.
49. Si Y, Ciccone S, Yang FC, et al. Continuous in vivo infusion of interferon-gamma (IFN-gamma) enhances engraftment of syngeneic wild-type cells in Fanca-/- and Fancg-/- mice. *Blood*. 2006;108:4283-4287.
50. Saadatzaheh MR, Bijangi-Vishehsaraei K, Kapur R, Haneline LS. Distinct roles of stress-activated protein kinases in Fanconi anemia-type C-deficient hematopoiesis. *Blood*. 2009;113:2655-2660.
51. Sejas DP, Rani R, Qiu Y, et al. Inflammatory reactive oxygen species-mediated hemopoietic suppression in Fancd-deficient mice. *J Immunol*. 2007;178:5277-5287.
52. Iwama A, Oguro H, Negishi M, et al. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity*. 2004;21:843-851.
53. Yu X, Alder JK, Chun JH, et al. HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding. *Stem Cells*. 2006;24:876-888.

54. Maillard I, Koch U, Dumortier A, et al. Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;2:356-366.
55. Sang L, Collier HA, Roberts JM. Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1. *Science*. 2008;321:1095-1100.
56. Fagerlie SR, Diaz J, Christianson TA, et al. Functional correction of FA-C cells with FANCC suppresses the expression of interferon gamma-inducible genes. *Blood*. 2001;97:3017-3024.
57. van Os R, Kamminga LM, Ausema A, et al. A Limited role for p21Cip1/Waf1 in maintaining normal hematopoietic stem cell functioning. *Stem Cells*. 2007;25:836-843.
58. Choudhury AR, Ju Z, Djojosebroto MW, et al. Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat Genet*. 2007;39:99-105.
59. Roeb W, Boyer A, Cavenee WK, Arden KC. PAX3-FOXO1 controls expression of the p57Kip2 cell-cycle regulator through degradation of EGR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:18085-18090.
60. Pipaon C, Casado JA, Bueren JA, Fernandez-Luna JL. Jun N-terminal kinase activity and early growth-response factor-1 gene expression are down-regulated in Fanconi anemia group A lymphoblasts. *Blood*. 2004;103:128-132.

C-II.3 Conclusion

Nous avons étudié l'implication du gène *Fancg* dans la fonction des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques. Cette étude montre une altération du potentiel des CSH et des progéniteurs *Fancg*^{-/-}. *Fancg* joue un rôle dans la régulation de la quiescence des CSH et des progéniteurs. Ce gène intervient également dans la migration/homing des CSH dans la moelle osseuse. D'autre part, la perte de *Fancg* dérégule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'autorenouvellement, la quiescence et la migration.

L'invalidation du gène *Fancg* chez la souris entraîne une diminution du nombre de CSH (Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺/CD34⁺/FLK2⁻). Une étude fonctionnelle des CSH a été réalisée en évaluant le potentiel de régénération de l'hématopoïèse par transplantation *in vivo* en compétition des cellules de la moelle osseuse *Fancg*^{-/-} EGFP dans la circulation sanguine (Annexe 1). Cette étude fonctionnelle montre un déficit important de régénération de l'hématopoïèse à court et long terme des CSH issues des souris *Fancg*^{-/-}. Ces résultats ont été confirmés par transplantation de la population LSK enrichie en CSH. Les tests de différenciation *in vitro* (CFC : colony-forming cells) montrent la déficience des progéniteurs. Le nombre de progéniteurs et leur capacité à proliférer sont altérés dans les LSK *Fancg*^{-/-}. Dans le modèle murin *Fancd1*^{-/-}, des observations similaires ont été faites (Navarro *et al.*, 2006). De plus, l'analyse par cytométrie en flux révèle une diminution des cellules Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺/CD34⁺/FLK2⁺ correspondant aux progéniteurs lymphoïdes communs. Dans les souris *Fancc*^{-/-}, une baisse du nombre de progéniteurs multipotents Lin⁻/Thy1.2^{low}/c-kit⁺/Sca-1⁺/CD34⁺ a également été rapportée (Carreau *et al.*, 1999). De plus, l'expression du gène *Fancg* augmente dans les progéniteurs, suggérant son implication dans la différenciation (Aube *et al.*, 2003). L'ensemble de ces données montre un rôle de *Fancg* dans le maintien de la fonctionnalité des CSH et la différenciation des progéniteurs.

Le défaut de maintien du stock de CSH chez les souris *Fancg*^{-/-} pourrait résulter d'une augmentation de la mort cellulaire liée à la défaillance de leur système de réparation. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation d'apoptose dans la fraction LSK. De nombreux modèles murins invalidés pour des gènes des voies de réponse aux dommages de l'ADN, comme les souris *Atm*^{-/-} et *Atr*^{-/-}, présente le même phénotype de CSH que les souris *Fancg*^{-/-} (Andreassen *et al.*, 2004 ; Haneline *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2004). Or le défaut des CSH des souris *Atm*^{-/-} est associé à un niveau élevé de ROS. De plus, le traitement des souris *Atm*^{-/-} avec un anti-oxydant permet de restaurer la capacité de repopulation à long-terme des CSH (Ito *et al.*, 2004). Le taux de ROS dans les LSK *fancg*^{-/-} a été mesuré et il n'est pas augmenté par rapport au taux des CSH sauvages. De plus, le traitement des souris *Fancg*^{-/-} avec du NAC (N-acetyl-L-cysteine) ne permet pas de restaurer le défaut de régénération des CSH. Donc la déficience des CSH ne semble pas lié à une augmentation du stress oxydatif dans les souris *Fancg*^{-/-}.

Des travaux récents suggèrent l'existence de deux compartiments avec des cinétiques bien distinctes d'entrée en cycle dans la population de CSH (Wilson *et al.*, 2008) : une population très quiescente et une population se divisant activement. Cette population quiescente possède les caractéristiques fonctionnelles des CSH (transplantation secondaire, reconstitution de tous les lignages) et la majorité du potentiel de reconstitution à long terme. D'autre part, elles sont activées en cas d'atteinte du tissu puis une fraction retourne en quiescence après le retour de l'homéostasie tissulaire. En homéostasie, la fraction quiescente serait ainsi le réservoir sanctuaire de CSH et le maintien de l'hématopoïèse serait assuré par la fraction se divisant de manière active. Le défaut de maintien du stock des CSH est généralement associé à une perte de la quiescence de ces cellules. Dans les LSK *Fancg*^{-/-}, nous avons observé une diminution de la fraction quiescente (négative pour le marqueur Ki-67) et une augmentation des cellules proliférantes (positives pour le BrdU) par rapport aux souris sauvages. *Fancg* jouerait donc un rôle dans la régulation de l'équilibre entre le pool de cellules souches quiescentes et le pool des CSH métaboliquement actives, comme précédemment décrit pour les souris *Fancc*^{-/-} (Haneline *et al.*, 1999). Ainsi, le complexe « core » de la voie Fanconi pourrait réguler cette quiescence des CSH. L'homéostasie du tissu hématopoïétique des souris *Fancg*^{-/-}, pourrait être maintenue par le pool de CSH activées, ce qui expliquerait l'absence d'anémie dans ces souris. Les souris *Fancg*^{-/-} pourraient montrer une susceptibilité accrue aux lésions tissulaires et au vieillissement, à cause de la déplétion du réservoir de CSH quiescentes.

Une nouvelle fonction du complexe « core » de l'AF a été mise en évidence. Il posséderait une fonction de régulation de la transcription. Le complexe « core » de l'AF interagit avec le promoteur de *Hes1*, régulant sa transcription et celle de ces gènes cibles. Ce complexe peut affecter la transcription directement, en agissant sur le promoteur du gène et indirectement, en interagissant avec le facteur de transcription afin d'inhiber ou d'activer la transcription de ces gènes cibles (Tremblay *et al.*, 2009). Dans les LSK *Fancg*^{-/-}, nous avons observé la modification de l'expression d'un certain nombre de gènes potentiellement impliqués dans la régulation de la quiescence des CSH. Parmi ces gènes, nous avons retrouvé le gène *Hes1*. L'expression de *Hes1* est requise pour la réversibilité de la quiescence et *Hes1* prévient la sénescence prématurée dans les fibroblastes (Sang *et al.*, 2008). D'autre part, *Hes1* joue un rôle dans l'auto-renouvellement et la maintenance des CSH (Yu *et al.*, 2006b). Un autre facteur de transcription qui favorise la quiescence et la rétention des CSH dans la niche, est le facteur de transcription EGR1. Les souris *Egr1*^{-/-} ont un nombre plus important de CSH en prolifération dans la moelle osseuse (Min *et al.*, 2008). Dans les LSK *Fancg*^{-/-}, on observe une diminution de l'expression de *Egr1* par rapport aux souris sauvages. De plus, EGR1 active la transcription de *p57^{Kip2}* qui est exprimé dans les CSH quiescentes (Roeb *et al.*, 2007; Umemoto *et al.*, 2005). Dans les LSK *Fancg*^{-/-}, on observe aussi une diminution de l'expression *p57^{Kip2}*. *Fancg* semble également impliqué dans la régulation de facteurs de transcription comme *Bmi-1* qui sont impliqués dans l'auto-renouvellement des CSH (Park *et al.*, 2003).

La capacité à régénérer une hématopoïèse des CSH invalidées pour le gène *Fancg* est diminuée après transplantation. En effet, lorsque l'on transplante en compétition des LSK *Fancg*^{-/-} EGFP, on

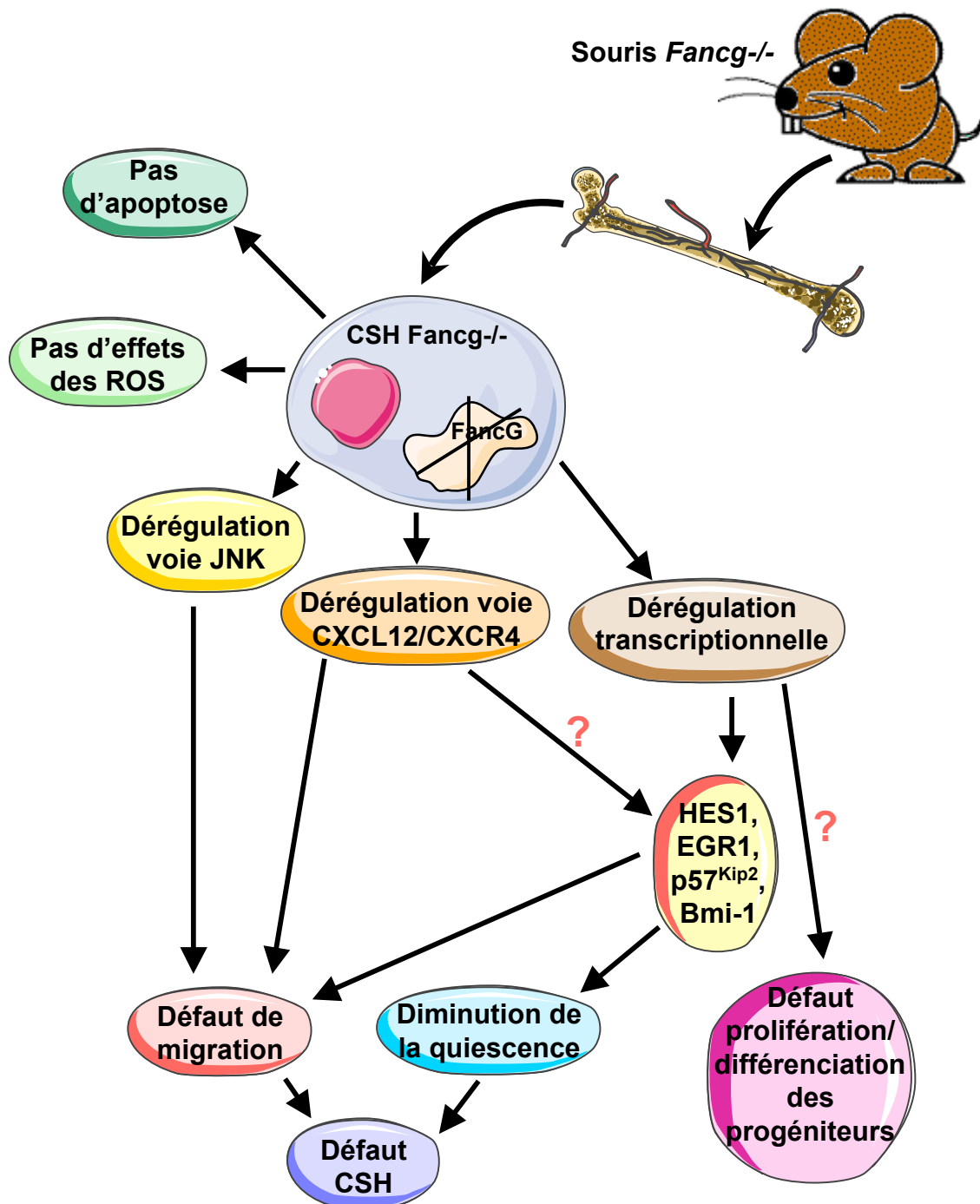


Figure 24 : Une origine multifactorielle du phénotype Fanconi des CSH et progéniteurs de souris *Fancg*^{-/-}

observe seulement 15% de cellules hématopoïétiques EGFP dans le sang 16 semaines après transplantation. Ce déficit pourrait résulter soit d'un problème de migration/nichage dans la moelle osseuse, soit d'un problème de différenciation et ou de prolifération, ou alors de la combinaison de ces différents phénomènes. L'analyse de la capacité de migration *in vitro* des LSK en réponse au CXCL12, chimiottractant principal des CSH, nous révèle une plus faible capacité de migration des LSK *Fancg*^{-/-}. De plus, un défaut de nichage dans la moelle osseuse des CSH et des progéniteurs *Fancg*^{-/-} a été observé *in vivo* après transplantation. D'autre part, ce défaut de migration est en partie restauré lorsque l'on injecte directement les CSH *Fancg*^{-/-} dans la moelle osseuse par transplantation intra-fémorale. Ce défaut de homing n'est pas lié à une diminution de l'expression du récepteur de CXCL12, CXCR4, car le taux d'expression de CXCR4 dans les LSK *Fancg*^{-/-} est similaire à celui des LSK sauvages. Chez des patients AF, il a été récemment montré un défaut de homing des progéniteurs hématopoïétiques qui pourrait être dû à une altération de l'activité de la Rho GTPase Cdc42 (Zhang *et al.*, 2008b). Dans les LSK, le taux d'expression et l'activité de Cdc42 ne varient pas entre les souris sauvages et les souris *Fancg*^{-/-}, ainsi que l'expression d'autres Rho GTPases comme Rac1. En revanche, le taux d'expression de la N-cadhérine diminue dans les LSK *Fancg*^{-/-}, ce facteur d'adhésion est nécessaire pour l'adhésion des CSH dans leur niche (Arai *et al.*, 2004).

L'invalidation des gènes *Fanca* ou *Fancc* dans des lymphoblastes entraîne une hyperphosphorylation de p38, JNK et ERK (Briot *et al.*, 2008). Ces voies semblent être impliquées dans la déficience des CSH et progéniteurs des souris *Fancc*^{-/-} (Bijangi-Vishehsaraei *et al.*, 2005; Saadatzaheh *et al.*, 2009). Nous avons donc étudié si p38 et JNK étaient dérégulées dans les cellules de la moelle osseuse des souris *Fancg*^{-/-} et si cette dérégulation pouvait être responsable du défaut de migration. Dans les cellules de la moelle osseuse, on observe une diminution de l'expression de la protéine JNK (en niveau de base), mais une hyper-phosphorylation de JNK par rapport aux cellules de souris sauvage. Cette dernière observation a déjà été décrite dans les souris *Fancc*^{-/-} (Li *et al.*, 2007). Par contre, on n'observe pas de variation de p38 entre les cellules *Fancg*^{-/-} et sauvages. Dans les cellules de la moelle de souris sauvages en présence de CXCL12, une augmentation d'un facteur deux de la phosphorylation de JNK est observée, même si cette augmentation n'est pas statistiquement significative. De plus, la migration des progéniteurs hématopoïétiques Lin⁻/c-Kit⁺ en réponse au CXCL12 est diminuée en présence d'un inhibiteur de JNK. Ces résultats soulignent un rôle de JNK dans la migration en réponse au CXCL12. D'autre part, l'activation de la phosphorylation de JNK en réponse au CXCL12 est altérée dans les cellules *Fancg*^{-/-} par rapport aux cellules sauvages, liée sans doute à l'hyperactivation basale de JNK dans les cellules *Fancg*^{-/-}. Ces données suggèrent que la dérégulation de la voie JNK dans les cellules de la moelle osseuse *Fancg*^{-/-} pourrait jouer un rôle dans leur défaut de migration.

En conclusion, ce travail montre que la voie Fanconi est également impliquée dans les mécanismes fondamentaux de la physiologie des CSH, outre son rôle dans les voies de réparation de l'ADN. L'origine du phénotype de l'AF pourrait donc être multifactorielle (Figure 24).

D- Discussion

La préservation d'un stock de cellules souches fonctionnelles est indispensable pour le maintien de nombreux tissus chez l'adulte. Les cellules souches sont en effet responsables du renouvellement continu du tissu, mais également de sa régénération après lésion. Elles se multiplient soit pour s'auto-renouveler soit pour entrer en différenciation, donnant naissance à des progéniteurs qui produisent les cellules matures du tissu. Il est couramment admis que ces progéniteurs ont perdu la capacité de s'auto-renouveler et de régénérer le tissu à long terme. Cependant des études récentes soulignent la possibilité des progéniteurs de réacquérir le potentiel d'auto-renouvellement et de régénération à long terme des cellules souches, notamment dans le tissu germinale (Brawley and Matunis, 2004 ; Kai and Spradling, 2004). Deux mécanismes pourraient donc coexister au sein du tissu afin de maintenir le pool de cellules souches : l'auto-renouvellement et la reprogrammation des progéniteurs. Mon travail de thèse portait sur l'étude de ces deux mécanismes de régénération des cellules souches. Les résultats suggèrent, d'une part, que les progéniteurs germinaux pourraient constituer une réserve de « cellules souches potentielles », qui après reprogrammation génèrent de nouvelles CSG. D'autre part, ce travail montre le rôle du gène *Fancg* de la voie de l'Anémie de Fanconi dans l'auto-renouvellement et la fonctionnalité des CSH. L'ensemble de ces résultats souligne l'importance des processus de migration/rétention dans la niche, et de la régulation de l'expression des facteurs de transcription et des régulateurs du cycle cellulaire, dans le maintien des fonctions des cellules souches et dans la reprogrammation des progéniteurs.

☞ La plasticité du tissu germinale et la reprogrammation cellulaire

Nous avons montré que les progéniteurs germinaux, c'est-à-dire les spermatogonies « différenciées », peuvent modifier leur programme de différenciation et agir comme des CSG fonctionnelles, contribuant à l'activité clonogénique et à la régénération d'une spermatogenèse à long terme après transplantation dans des testicules receveurs. Ces travaux soulignent que les progéniteurs spermatogoniaux conservent la capacité de se reprogrammer spontanément en CSG, même si l'efficacité de cette conversion reste faible. Des questions restent néanmoins ouvertes quant à connaître l'origine de ce faible taux de conversion. Ce phénomène de conversion touche-t-il uniquement une sous-population spécifique des progéniteurs spermatogoniaux qu'il resterait à déterminer? Est-il le reflet d'un taux d'échec important de reprogrammation des progéniteurs, la destinée de ces cellules restant principalement de poursuivre la différenciation ou de mourir si elle est bloquée?

Toutefois, ce phénomène de reprogrammation des progéniteurs n'est pas spécifique des cellules germinales. Elle peut également être induite dans d'autres types cellulaires après modification génétique des cellules. Des études récentes rapportent ainsi la possibilité de reprogrammer *in vitro* des cellules différenciées en cellules pluripotentes chez la souris et l'homme. En effet, des cellules progénitrices ont été reprogrammées en cellules souches pluripotentes « ES-like » après insertion

dans leur génome d'une combinaison de facteurs de transcription par transduction rétrovirale. Ces cellules souches sont appelées iPS (induced Pluripotent Stem cells) (Aoi *et al.*, 2008 ; Hanna *et al.*, 2008). L'efficacité de la reprogrammation reste également faible dans le cas des iPS (moins de 0,05%) (Huangfu *et al.*, 2008). Les premiers travaux ont utilisé la combinaison de facteurs de transcription Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-myc, proto-oncogènes impliqués dans le développement. Depuis ces travaux, d'autres combinaisons de facteurs de transcription et de molécules chimiques ont également été décrites (Huangfu *et al.*, 2008). Les mécanismes moléculaires de cette reprogrammation restent encore méconnus.

Des iPS ont été obtenues à partir d'hépatocytes de souris adulte et d'épithélium gastrique. Les clones sont équivalents à des cellules souches embryonnaires dans l'expression de leurs gènes et leur capacité à générer des chimères germinales après injection dans des blastocytes (Aoi *et al.*, 2008). D'autre part, des iPS ont également été obtenues à partir de lymphocytes B matures ou en cours de maturation. Cette étude montre la reprogrammation directe en cellules pluripotentes de cellules adultes en différenciation terminale (Hanna *et al.*, 2008).

Néanmoins, il semblerait que les cellules germinales présentent une grande plasticité. Outre la dédifférenciation des progéniteurs germinaux en CSG, les CSG sont en effet capables *in vitro* de générer des cellules souches pluripotentes. La mise en culture de CSG conduirait à l'émergence de clones qui ont acquis des propriétés de cellules souches embryonnaires. L'émergence de ces clones multipotents et de cette reprogrammation reste cependant rare au cours de la culture. Ces cellules sont appelées des maGSC (multipotent adult Germline Stem Cell), sont capables de générer *in vitro* les trois feuillets embryonnaires, un chimérisme et une transmission germinale après injection dans un blastocyste, et de produire des tératomes après injection dans des souris immunodéficientes (Guan *et al.*, 2006 ; Seandel *et al.*, 2007). La réacquisition de pluripotence par les CSG issues de souriceaux a également été décrite (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004a). Enfin, cette reprogrammation en pluripotence a aussi été observée dans des cultures de spermatogonies humaines réalisées à partir de biopsies testiculaires (Conrad *et al.*, 2008).

Cette plasticité « spontanée » des CSG et de leurs progéniteurs semble donc les distinguer clairement des cellules souches et progéniteurs somatiques des autres tissus adultes, et constitue un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant cette reprogrammation. De plus, elle souligne l'importance de leur environnement, et plus spécialement de la niche dans le maintien de l'unipotence des CSG. Dans des conditions physiologiques normales, la niche des CSG doit prévenir cette reprogrammation car la réacquisition de multipotence n'est observée que si elles sont cultivées *in vitro*. D'autre part, il est possible que les tératomes, une forme de cancer testiculaire, résulte d'un dysfonctionnement de la niche testiculaire induisant la multipotence des CSG. En effet, il est à noter, qu'une fois reprogrammées, les CSG multipotentes ne sont plus capables de redonner une spermatogenèse puisque elles donnent des tératomes même si elles sont injectées dans le testicule (Guan *et al.*, 2006) (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004a).

Concernant la plasticité, des questions restent en suspens. Quelle est la finalité physiologique pour le tissu de ce phénomène de reprogrammation des progéniteurs en CSG ? Ce processus participe-t-il au maintien des CSG dans des conditions physiologiques ? Joue-t-il un rôle primordial dans la régénération tissulaire après une lésion du tissu ?

Il est intéressant de noter qu'une étude récente a montré chez la drosophile la participation de cette dédifférenciation des progéniteurs à la régénération des CSG suite à une irradiation ou au cours du vieillissement (Cheng *et al.*, 2008). La réparation des tissus lésés s'effectue à partir des cellules souches, le maintien de leur stock fonctionnel, assuré par leur autorenouvellement, est donc indispensable. Cependant, les progéniteurs pourraient également constituer une réserve de « cellules souches potentielles » afin d'assurer la régénération du tissu lésé. En cas d'atteinte trop importante du stock de CSG, la reprogrammation des progéniteurs, qui sont en plus grand nombre que les cellules souches dans le tissu, pourrait être impliquée dans la régénération de ce stock. Comprendre comment le tissu répond au stress afin d'assurer sa régénération est important, et plus particulièrement dans des perspectives thérapeutiques.

La niche/micro-environnement joue un rôle crucial dans le destin des CSG et des progéniteurs, et pourrait être également impliqué dans la régulation de la plasticité cellulaire. Des CSG et des progéniteurs adultes ont été injectés dans l'épithélium mammaire (Boulanger *et al.*, 2007). Ces cellules injectées interagissent avec leur nouveau micro-environnement durant la régénération des glandes et elles adoptent les propriétés des cellules progénitrices mammaires aboutissant à la production de cellules progénitrices qui se différencient en cellules épithéliales fonctionnelles. Ces résultats prouvent l'implication du micro-environnement sur le destin cellulaire des CSG et progéniteurs germinaux. D'autre part, les CSG des animaux âgés transplantées dans des testicules de mâles jeunes sont capables de régénérer une spermatogenèse pendant au moins trois ans par transplantation en série dans des receveurs stériles. L'infertilité due à l'âge résulterait certainement d'une détérioration de la niche (Ryu *et al.*, 2006).

Or, rappelons nous qu'une étude récente a montré, chez *Drosophila*, la participation de cette dédifférenciation des progéniteurs à la régénération des CSG au cours du vieillissement (Cheng *et al.*, 2008). La plasticité des progéniteurs pourrait donc être également régulée en grande partie par le micro-environnement tissulaire. En effet, le GDNF est un facteur essentiel pour les cultures des CSG. Après un traitement au busulfan, les testicules sont dépourvues de cellules germinales et on observe une augmentation de l'expression du GDNF, de même qu'au cours du vieillissement dans les testicules des animaux âgés (Ryu *et al.*, 2006). Or, nous avons montré *in vitro* en culture le rôle clé du facteur de croissance GDNF dans le processus de dédifférenciation des progéniteurs en cellules souches. L'ensemble de ces observations tend à suggérer une régulation par la niche du processus de dédifférenciation des progéniteurs au cours du vieillissement. Cette hypothèse reste néanmoins à vérifier.

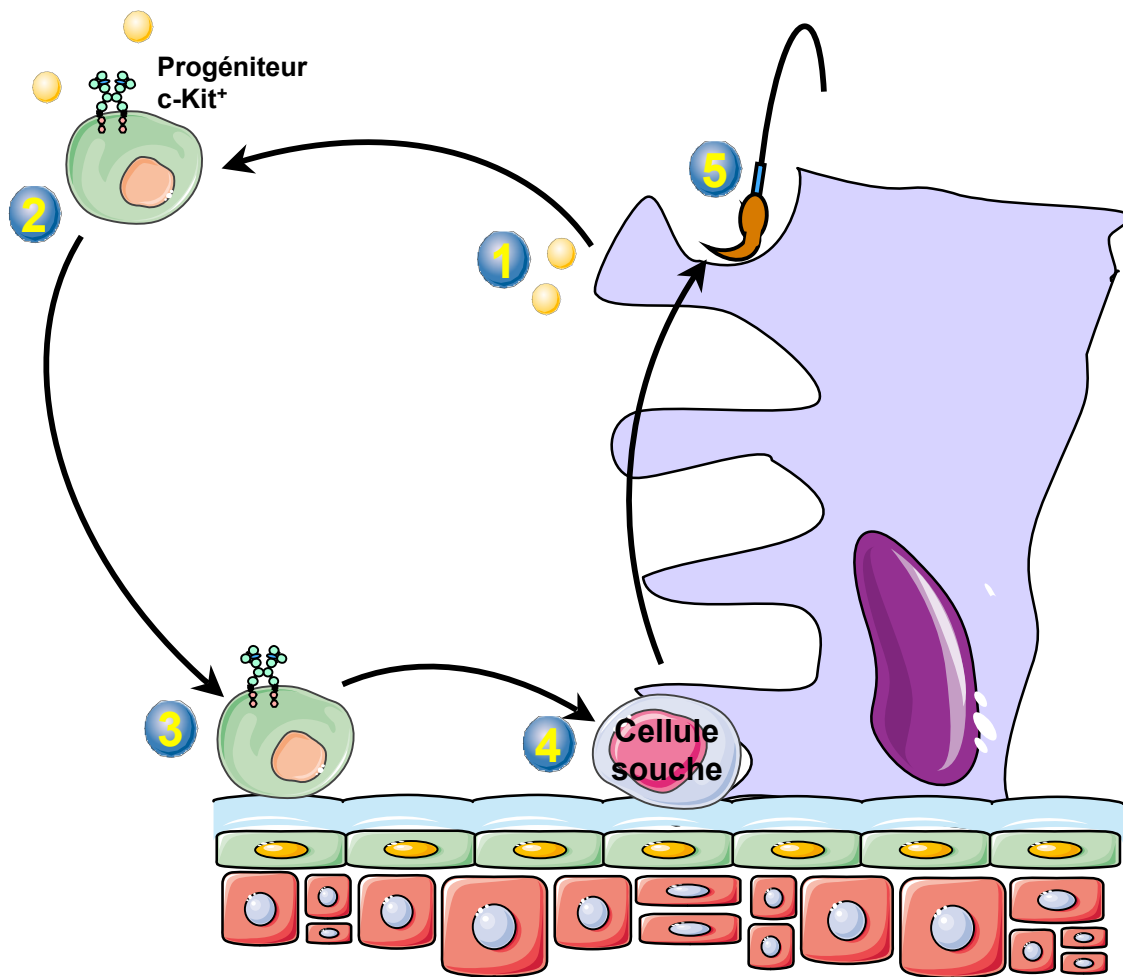


Figure 25 : les différentes étapes de la dé-différenciation des progéniteurs germinaux en CSG

- **1**-Sécrétion de chimiotractants par la cellules de Sertoli
- **2**-Transduction du signal des chimiotractants dans le progéniteur
- **3**-Migration du progéniteur dans la niche
- **4**-Dédifférenciation du progéniteur en CSG
- **5**-Différenciation de la CSG en cellule mature, recolonisation du testicule par une spermatogénèse normale

La migration des cellules souches et de progéniteurs

La migration est un processus important pour une grande partie des cellules dont les cellules souches afin qu'elles migrent jusqu'à leur niche. Généralement cette capacité est utilisée par certain type cellulaire pour leur maturation comme des cellules de l'immunité : les lymphocytes T qui migrent de la moelle osseuse dans le thymus où elles vont finir leur maturation. Les macrophages aussi possèdent une forte capacité de migration afin de rejoindre les lieux d'infection et de détruire les pathogènes. Les cellules neurales aussi migrent pendant leur maturation. Les cellules cancéreuses utilisent aussi ce processus afin de coloniser l'organisme entier.

Concernant la dédifférenciation des progéniteurs, nous avons observé la reprogrammation des spermatogonies « différenciées », après transplantation. Lors de la transplantation, ces progéniteurs doivent recevoir un appel par des chemokines afin qu'ils migrent jusqu'à la niche, lieu où ils seront reprogrammés en CSG. Cet appel pourrait être assuré par le SCF sécrété par les cellules de Sertoli. D'après nos résultats, les progéniteurs germinaux c-Kit⁺ répondent au SCF, cette migration peut être partiellement inhibée par ajout d'un anticorps bloquant le récepteur c-Kit. D'autres facteurs pourraient également participer à cette migration, comme le GDNF. Le microenvironnement pourrait donc jouer un rôle important dans ce processus de dédifférenciation des progéniteurs germinaux, notamment en chimiotractant ces progéniteurs vers la niche et en activant le processus de reprogrammation (Figure 25).

D'après nos résultats, le gène *Fancg* jouerait un rôle important dans la migration des cellules. Les CSH *Fancg*^{-/-} possèdent un défaut de migration, de homing et de régénération de l'hématopoïèse après transplantation en compétition. De plus, nous avons observé que les CSH *Fancg*^{-/-} possèdent un défaut de réponse au CXCL12, or cette chimiokine est primordiale dans les processus migration et de nichage des CSH dans la moelle osseuse (Nie *et al.*, 2008 ; Wright *et al.*, 2002). Les CSH murines et humaines sont majoritairement trouvées dans la moelle osseuse, mais elles sont aussi constitutivement présentes à un faible taux dans la circulation sanguine. Ces CSH circulantes sont détectées dans le sang périphérique, phénotypiquement et fonctionnellement par transplantation de sang périphérique et par analyses de souris parabiotiques (animaux reliés chirurgicalement afin qu'ils aient une circulation commune). Des expériences de parabioses démontrent que les CSH d'une souris A passent dans la circulation et sont capables de se loger dans le fémur de la souris B et de contribuer à son hématopoïèse (Laird *et al.*, 2008). La migration des CSH est donc un processus continu et nécessaire dans l'hématopoïèse normale. Comme les CSH *Fancg*^{-/-} ont un défaut de migration, sont-elles capable de faire cette migration constitutive, et sinon comment arrivent-elles à compenser ce déficit? Les mécanismes de migration et de nichage après transplantation et les mécanismes de circulation des CSH dans le sang dans des conditions normales d'hématopoïèse sont-ils identiques ?

Dans de nombreux travaux, une forte corrélation est établie entre les capacités migratoires et régénératives des CSH et leur statut quiescent après transplantation (Passegue *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2008). En effet, CXCL12 est un facteur qui régule la quiescence des CSH. Lorsqu'il est ajouté

dans des cultures de CSH, il inhibe leur entrée en cycle et permet un maintien de leur quiescence. De plus, l'inactivation de son récepteur entraîne une prolifération excessive des CSH mais elles sont capables de soutenir l'hématopoïèse. D'autre part, $p57^{Kip2}$ a été identifié comme une cible potentielle de la voie de signalisation CXCL12/CXCR4 (Nie *et al.*, 2008). Cette protéine inhibe spécifiquement la prolifération des CSH et permet donc leur entrée en quiescence. Ce dernier est régulé par le facteur de transcription EGR1 (Roeb *et al.*, 2007). Nous observons effectivement dans les souris *Fancg*^{-/-} une diminution de la quiescence et une augmentation de la prolifération des CSH. Nos résultats montrent que les LSK *Fancg*^{-/-} ne répondent pas au CXCL12, or le taux d'expression de *Cxcr4* n'est pas changé, mais les taux d'expression de $p57^{Kip2}$ et de *EGR1* sont diminués par rapport aux LSK sauvages. Donc la voie de signalisation CXCL12/CXCR4 serait défaillante dans les LSK *Fancg*^{-/-}, probablement liée à une mauvaise transduction du signal. Existe-t-il une interaction entre la protéine FANCG et une cible de la voie de signalisation CXCL12/CXCR4 en amont d'EGR1 ou de $p57^{Kip2}$?

La migration des cellules embryonnaires est un mécanisme primordial afin que l'organisme se développe correctement. Dans les souris adultes *Fancg*^{-/-}, nous avons observé une diminution du nombre de CSH. Ce déficit partiel chez l'adulte pourrait résulter d'un défaut de migration des CSH embryonnaires de l'AGM (région de l'Aorte, des Gonades et du Mésonéphros) au foie et/ou du foie à la moelle osseuse au cours du développement. D'autre part, les souris invalidées pour les gènes de la famille fanconi présentent toutes des problèmes de stérilité chez l'adulte. Les Cellules Germinales Primordiales (CGP) sont les précurseurs embryonnaires du lignage germlinal et des CSG chez l'adulte. Chez la souris, la migration des CGP de l'épiblaste jusqu'aux crêtes génitales a lieu autour des 10-11^{ème} jour de gestation et se fait entre autre grâce au SCF et au CXCL12 (Ara *et al.*, 2003 ; Gu *et al.*, 2009). Si cette migration est défectueuse, on observe un hypogonadisme qui mène à une stérilité. Les CGP des modèles murins *Fanca*^{-/-} et *Fancc*^{-/-} ont été comptés au 13,5^{ème} jour de gestation, et une diminution du nombre de CPG est notée dans les gonades (Whitney *et al.*, 1996 ; Wong *et al.*, 2003). Donc, les CGP *Fanca*^{-/-} et *Fancc*^{-/-} présentent soit un problème de migration, soit une diminution de la prolifération, ce qui explique en partie le phénotype d'hypogonadisme et de stérilité de ces animaux. Au laboratoire, nous avons déterminé que les souris *Fancg*^{-/-} présentent également une diminution importante des CGP au 13,5^{ème} jour de gestation. L'étude de la migration des CGP dans les souris *Fancg*^{-/-} serait intéressante afin de déterminer si les cellules Fanconi présentent un défaut commun de migration. D'autre part, ces études permettront de déterminer si la pathologie Fanconi est également liée à des problèmes de développement au cours de l'embryogenèse.

Le rôle des facteurs de transcription et des régulateurs du cycle cellulaire

Précédemment, nous avons émis l'hypothèse du rôle du microenvironnement tissulaire dans la reprogrammation des progéniteurs germinaux en CSG. Cette plasticité des progéniteurs pourrait être également liée à des mécanismes intrinsèques. Les travaux récents sur les iPS ont montré le rôle clé des facteurs de transcription c-myc, Oct3/4, Sox2 et Klf4 dans l'acquisition de la pluripotence par des cellules somatiques différenciées (Aoi *et al.*, 2008 ; Hanna *et al.*, 2008). Plus particulièrement, ces facteurs de transcription sont exprimés dans les CSG et progéniteurs de jeunes souriceaux en

culture, même si le niveau d'expression reste faible (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2008b). Par contre, ce niveau d'expression augmente dans les cellules germinales multipotentes « ES-like », soulignant un rôle potentiel de ces gènes dans cette reprogrammation. D'autre part, nous avons déjà observé dans les souris transgéniques OCT4-EGFP qu'une fraction des spermatogonies différenciées SP/ α -6⁺/c-Kit⁺ expriment le facteur de transcription Oct3/4, constituant donc une piste intéressante dans le cadre de cette étude des mécanismes de reprogrammation des progéniteurs.

De plus, après invalidation des gènes *p16^{Ink4a}*, *p19^{Arf}* et *p53*, les progéniteurs multipotents hématopoïétiques réacquièrent une capacité de reconstitution à long terme, caractéristique des CSH (Akala *et al.*, 2008). Ces gènes joueraient donc un rôle central dans la limitation de l'expansion des progéniteurs multipotents en maintenant l'engagement en différenciation de ces progéniteurs. D'autre part, il a été décrit que la fréquence de clones multipotents dérivés de cellules germinales adultes augmentait dans un fond génétique *p53*^{-/-}, suggérant un rôle potentiel du facteur *Nanog* dans la reprogrammation (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2004a). En effet, *Nanog* est un facteur clé de la maintenance et de la pluripotence dans les cellules ES, et réprimé par *p53*. Les gènes *p16^{Ink4a}*, *p19^{Arf}*, *p53* et *Nanog* pourraient être également impliqués dans la plasticité des progéniteurs spermatogoniaux « différenciés ».

Les facteurs de transcription jouent un rôle primordial dans la régulation des CSH et de l'hématopoïèse (c.f. Introduction). Il a été récemment montré que le complexe core de la voie Fanconi pouvait être impliqué dans la régulation de la transcription, et notamment dans la régulation de l'expression de facteur de transcription. Par exemple, le complexe core se fixe sur le promoteur du facteur de transcription *Hes1*, facteur de la famille BHLH, mais aussi interfère dans la liaison de *Hes1* avec son co-répresseur. Le complexe core Fanconi affecte donc la transcription de gènes de manière directe et indirecte (Tremblay *et al.*, 2009). De la même manière, il semble y avoir une régulation réciproque des gènes Fanconi au niveau transcriptionnel. En effet, l'invalidation de *Fancc* affecte l'expression d'autres gènes Fanconi comme *Fancg* et *Fancd1* dans les progéniteurs CD34⁺ (Aube *et al.*, 2003). Dans les LSK *Fancg*^{-/-}, nous avons observé une modification de l'expression d'un certain nombre de facteurs de transcription et de gènes clés impliqués dans la régulation de la quiescence, de la migration et de l'auto-renouvellement des CSH. Nous retrouvons une diminution du taux d'ARNm dans les LSK *Fancg*^{-/-} des facteurs de transcription *Hes1*, *Egr1*, *Bmi-1* ainsi que du régulateur de quiescence *p57^{kip2}*. Il serait intéressant de déterminer si le complexe core Fanconi peut réguler directement l'expression de ces gènes. De plus, la défaillance de la voie de signalisation CXCL12/CXCR4 serait-elle liée à une absence d'interaction entre le complexe core et une protéine de la voie, ou bien à un déficit de la fonction de régulateur de la transcription du complexe core? Les progéniteurs hématopoïétiques des souris *Fancg*^{-/-} présentent également des problèmes de prolifération et de différenciation *in vitro*, et une diminution du nombre des progéniteurs lymphoïdes communs. La propriété du complexe core de régulation de l'expression de facteurs de transcription pourrait également être impliqués dans ces problèmes de prolifération et différenciation.

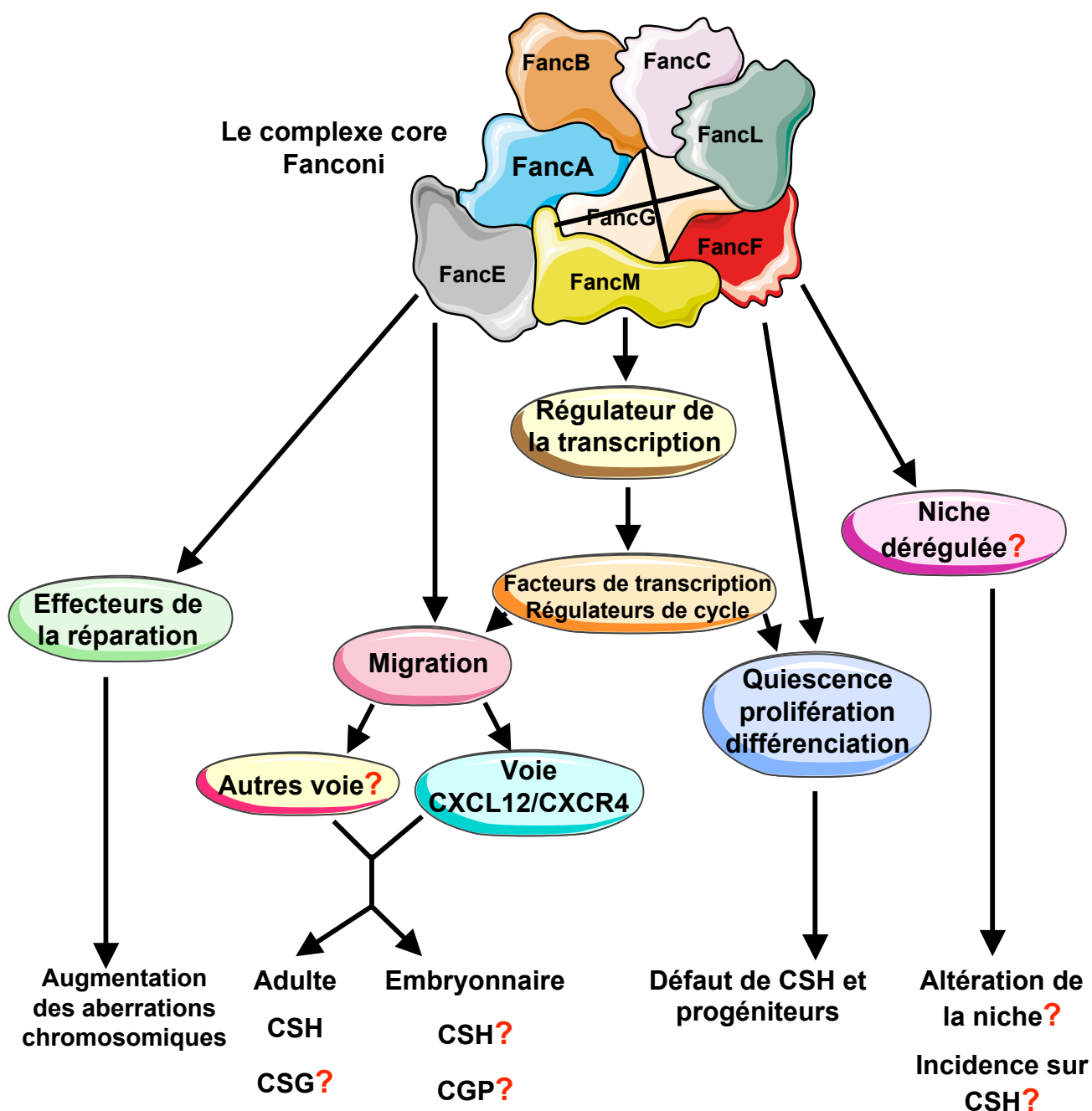


Figure 26 : Schéma récapitulatif de l'implication du complexe core Fanconi dans les CSH et progéniteurs

En conclusion, nous avons vu l'importance des processus de migration/rétention dans la niche, de la régulation de l'expression des facteurs de transcription et des régulateurs du cycle cellulaire, dans les processus d'auto-renouvellement des cellules souches et de reprogrammation des progéniteurs.

Ce travail suggère une origine multifactorielle du défaut fonctionnel des CSH et d'autres phénotypes dans la pathologie fanconi (Figure 26). Dans ce cadre, j'ai décrit précédemment le rôle primordial du micro-environnement tissulaire pour les cellules souches. Il serait important d'étudier l'influence de l'inactivation de *Fancg* dans les cellules du micro-environnement (Niche) sur des CSH sauvages, comme l'a récemment souligné une étude sur les cellules mésenchymateuses *Fancg*^{-/-}, constituants de la niche de la moelle osseuse (Li *et al.*, 2009). Cependant, la contribution de la niche des souris *Fancg*^{-/-} dans le déficit de fonction des CSH reste encore à être précisée. D'autre part nous avons identifié dans les souris *Fancg*^{-/-} la perturbation de certaines voies de la biologie des CSH. Il sera très intéressant d'analyser ces voies dans d'autres modèles de cellules souches comme les CSG (que nous étudions). Nous pourrions ainsi déterminer si le phénotype Fanconi résulte en partie d'un défaut commun des cellules souches.

Concernant la plasticité des progéniteurs, de nombreuses questions restent en suspens. Quels sont les mécanismes qui induisent cette plasticité ? Cette plasticité est-elle vraiment une spécificité du tissu germinale adulte et serait-elle liée à sa fonction ? Car ne l'oublions pas, le tissu germinale assure la transmission du patrimoine génétique à la descendance, il doit donc assurer un maintien de l'intégrité génomique afin de permettre à l'espèce de perdurer. Le maintien d'un stock de cellules souches fonctionnelles et intègres est donc primordial notamment après une agression du tissu. La compréhension des mécanismes responsables de cette reprogrammation devrait offrir de nouvelles perspectives pour la thérapie cellulaire. Enfin, certains processus de cancérisation pourraient résulter d'une activation incontrôlée de ces mécanismes de reprogrammation cellulaire et de réacquisition d'un potentiel prolifératif à long terme.

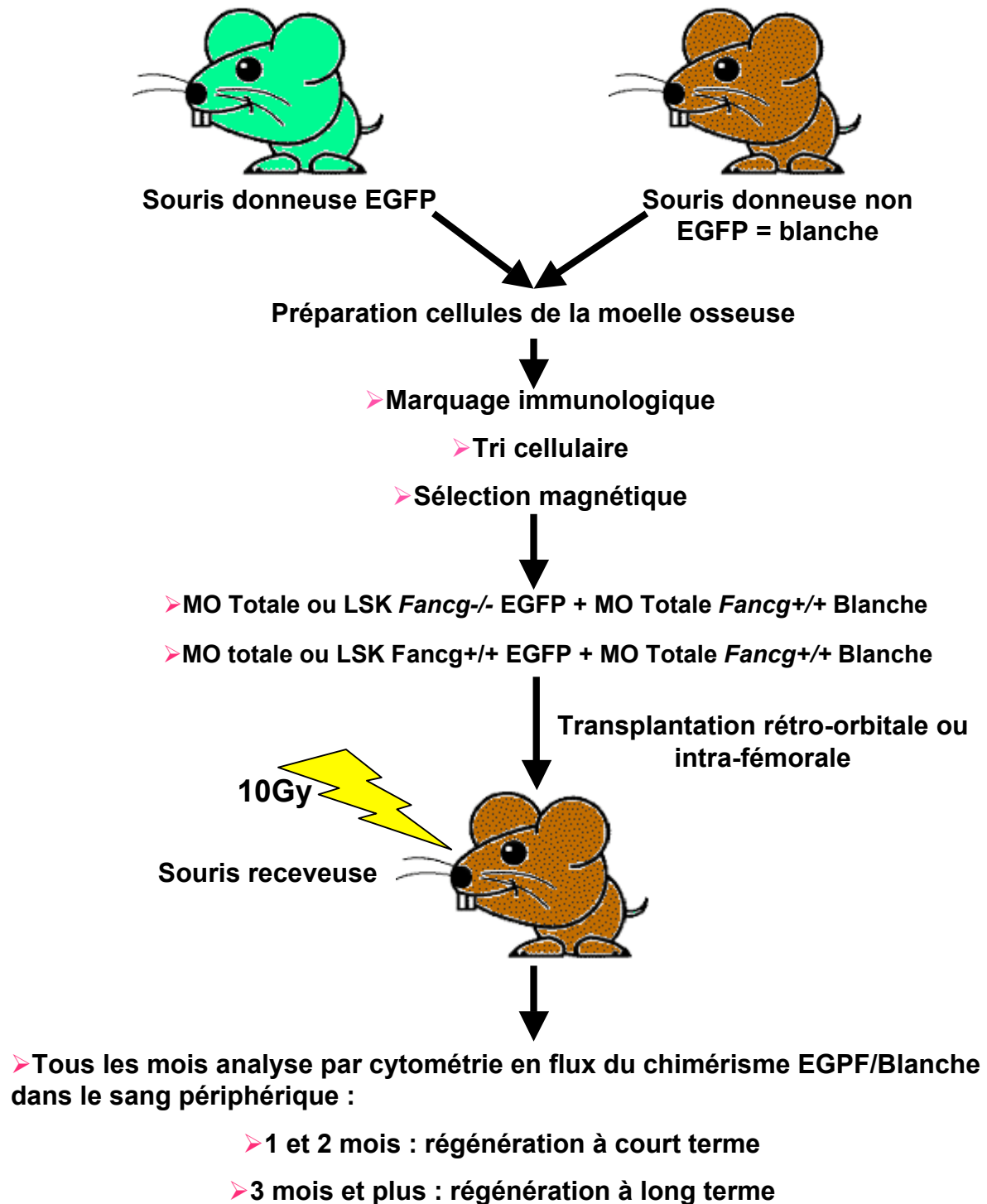


Figure 1 : La transplantation de moelle osseuse

E- Annexe I : La transplantation

Une des caractéristiques majeures des cellules souches, dont découle d'ailleurs leur intérêt thérapeutique, est leur capacité à régénérer des tissus lésés. Cette régénération peut être effectuée par la transplantation dans le tissu de cellules souches exogènes. Les cellules souches du donneur régénéreront à long terme après transplantation le tissu du receveur.

Différentes techniques (cytométrie en flux, tri magnétique -MACS) permettent de caractériser les cellules viables en fonction de différents marqueurs et de les purifier. L'utilisation conjointe de ces techniques et de la transplantation constitue le test fonctionnel des cellules souches. Il a permis de mettre en évidence certains marqueurs des cellules souches germinales et hématopoïétiques et ainsi d'obtenir des fractions hautement enrichies en cellules souches. Cette technique est le test fonctionnel des cellules souches.

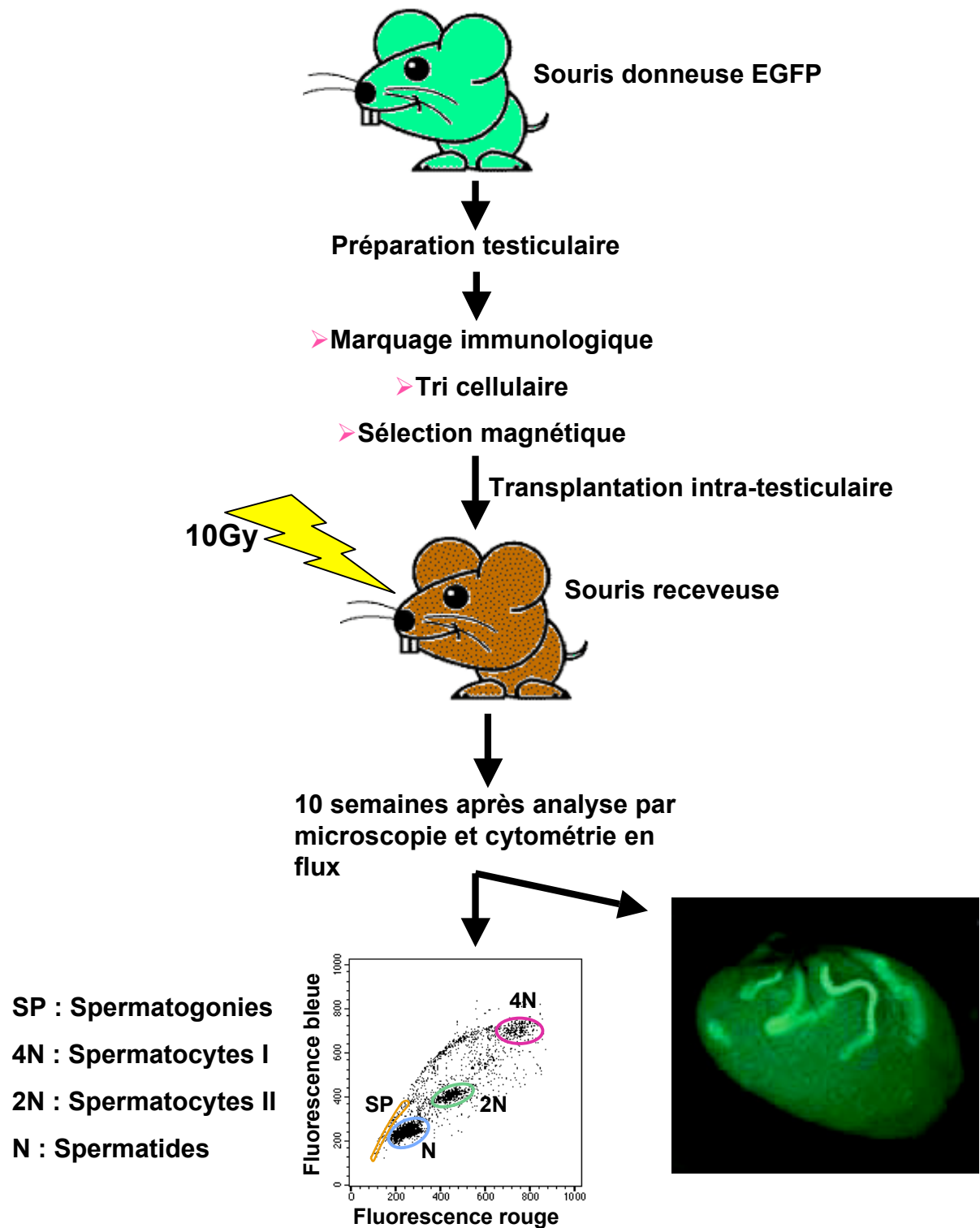
E-I La transplantation de CSH

La transplantation de cellules souches hématopoïétiques (figure 1) ou greffe consiste à injecter les cellules sélectionnées d'un donneur dans un receveur aplasique (dont la moelle osseuse a été déplétée par une irradiation à 10Gy). Si on observe une régénération de l'hématopoïèse cela signifie que la fraction sélectionnée contient des cellules souches (McCulloch and Till, 1962).

Dans cette étude les cellules souches sont injectées en compétition : des cellules EGFP et non EGFP (dite blanche), en ratio 1:1 par exemple. Cette régénération s'observe en regardant s'il y a des cellules du donneur dans le sang, due à la différenciation des cellules souches injectées à différents temps après transplantation. On parle de régénération à long terme 4 mois après transplantation. Pour cela, on regarde le chimérisme EGFP/sauvage dans le sang par cytométrie en flux. La transplantation peut se faire soit en rétro-orbital, directement dans la circulation sanguine, afin de voir si les cellules souches ont une capacité à migrer jusqu'à la niche, à proliférer et à se différencier. Elle peuvent être injectées également directement dans le fémur, voie intra-fémorale, afin de limiter le défaut de prise de greffe dû à une faible capacité de migration.

E-II La transplantation de CSG

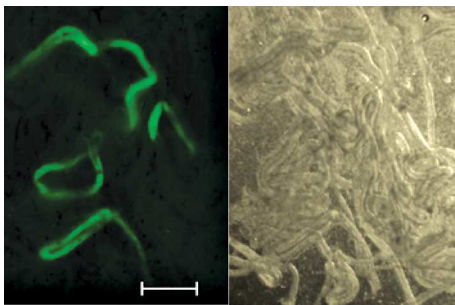
La transplantation de cellules souches germinales (Figure 2) consiste après anesthésie, à injecter les cellules sélectionnées issues d'un donneur (généralement les cellules donneuses expriment l'EGFP) dans les tubules d'un testicule receveur stérile *via* les canaux efférents (Ogawa *et al.*, 1997). Des souris génétiquement stériles (W/W^v), ou déplétées en cellules germinales après traitement par des génotoxiques (busulfan, irradiation à 10 Gy) peuvent être utilisées comme receveurs. On observe s'il y a une reprise de la spermatogenèse 2 mois après transplantation (les CSG sont les seules cellules capables de redonner les différents types cellulaires de la spermatogenèse) (Brinster and Zimmermann, 1994) (Ogawa *et al.*, 1997). Cette observation se fait par cytométrie en flux : la coloration au Hoechst de l'ADN nous permet de distinguer les différentes populations germinales. On peut également quantifier le potentiel de régénération par microscopie. Pour cela, on compte les



Analyse par cytométrie en flux d'une coloration au Ho
d'une spermatogenèse normale

Figure 2 : La transplantation testiculaire

portions de tubules EGFP, chaque portion de tubule correspondant à une colonie générée par une CSG transplantée (ci-dessous).



F- Bibliographie

- Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I, Sitnicka E *et al* (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* **15**: 659-69.
- Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, van Drunen E, Beverloo HB, Weisberg DB *et al* (2008). ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **28**: 5082-92.
- Akala OO, Park IK, Qian D, Pihajla M, Becker MW, Clarke MF (2008). Long-term haematopoietic reconstitution by Trp53-/-p16Ink4a-/-p19Arf-/- multipotent progenitors. *Nature* **453**: 228-32.
- Alter BP, Frissora CL, Halperin DS, Freedman MH, Chitkara U, Alvarez E *et al* (1991). Fanconi's anaemia and pregnancy. *Br J Haematol* **77**: 410-8.
- Amsellem S, Pflumio F, Bardinet D, Izac B, Charneau P, Romeo PH *et al* (2003). Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat Med* **9**: 1423-7.
- Andreassen PR, D'Andrea AD, Taniguchi T (2004). ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev* **18**: 1958-63.
- Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K *et al* (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* **321**: 699-702.
- Ara T, Nakamura Y, Egawa T, Sugiyama T, Abe K, Kishimoto T *et al* (2003). Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5319-23.
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K *et al* (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**: 149-61.
- Aube M, Lafrance M, Brodeur I, Delisle MC, Carreau M (2003). Fanconi anemia genes are highly expressed in primitive CD34+ hematopoietic cells. *BMC Blood Disord* **3**: 1.
- Baba S, Heike T, Umeda K, Iwasa T, Kaichi S, Hiraumi Y *et al* (2007). Generation of cardiac and endothelial cells from neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells. *Stem Cells* **25**: 1375-83.
- Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol* **74**: 68-85.
- Bijangi-Vishehsaraei K, Saadatzadeh MR, Werne A, McKenzie KA, Kapur R, Ichijo H *et al* (2005). Enhanced TNF-alpha-induced apoptosis in Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on apoptosis signal-regulating kinase 1. *Blood* **106**: 4124-30.
- Blank U, Karlsson G, Karlsson S (2008). Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* **111**: 492-503.
- Blom E, van de Vrugt HJ, de Vries Y, de Winter JP, Arwert F, Joenje H (2004). Multiple TPR motifs characterize the Fanconi anemia FANCG protein. *DNA Repair (Amst)* **3**: 77-84.

- Boulanger CA, Mack DL, Booth BW, Smith GH (2007). Interaction with the mammary microenvironment redirects spermatogenic cell fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 3871-6.
- Boyle M, Wong C, Rocha M, Jones DL (2007). Decline in self-renewal factors contributes to aging of the stem cell niche in the *Drosophila* testis. *Cell Stem Cell* **1**: 470-8.
- Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertoncello I (1997). Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol* **25**: 445-53.
- Brawley C, Matunis E (2004). Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation in vivo. *Science* **304**: 1331-4.
- Brinster RL, Avarbock MR (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11303-7.
- Brinster RL, Zimmermann JW (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11298-302.
- Briot D, Mace-Aime G, Subra F, Rosselli F (2008). Aberrant activation of stress-response pathways leads to TNF-alpha oversecretion in Fanconi anemia. *Blood* **111**: 1913-23.
- Brown EJ, Baltimore D (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* **14**: 397-402.
- Bryder D, Ramsfjell V, Dybedal I, Theilgaard-Monch K, Hogerkorp CM, Adolfsson J *et al* (2001). Self-renewal of multipotent long-term repopulating hematopoietic stem cells is negatively regulated by Fas and tumor necrosis factor receptor activation. *J Exp Med* **194**: 941-52.
- Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD *et al* (2004). Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet* **36**: 647-52.
- Cancelas JA, Lee AW, Prabhakar R, Stringer KF, Zheng Y, Williams DA (2005). Rac GTPases differentially integrate signals regulating hematopoietic stem cell localization. *Nat Med* **11**: 886-91.
- Cao YA, Wagers AJ, Beilhack A, Dusich J, Bachmann MH, Negrin RS *et al* (2004). Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 221-6.
- Carreau M (2004). Not-so-novel phenotypes in the Fanconi anemia group D2 mouse model. *Blood* **103**: 2430.
- Carreau M, Gan OI, Liu L, Doedens M, Dick JE, Buchwald M (1999). Hematopoietic compartment of Fanconi anemia group C null mice contains fewer lineage-negative CD34+ primitive hematopoietic cells and shows reduced reconstruction ability. *Exp Hematol* **27**: 1667-74.
- Carreau M, Gan OI, Liu L, Doedens M, McKerlie C, Dick JE *et al* (1998). Bone marrow failure in the Fanconi anemia group C mouse model after DNA damage. *Blood* **91**: 2737-44.
- Chang TS, Cho CS, Park S, Yu S, Kang SW, Rhee SG (2004). Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J Biol Chem* **279**: 41975-84.
- Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H *et al* (2005). ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* **436**: 1030-4.
- Cheng J, Baumhueter S, Cacalano G, Carver-Moore K, Thibodeaux H, Thomas R *et al* (1996). Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood* **87**: 479-90.
- Cheng J, Turkel N, Hemati N, Fuller MT, Hunt AJ, Yamashita YM (2008). Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing. *Nature* **456**: 599-604.

- Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3120-5.
- Choudhury AR, Ju Z, Djojotubroto MW, Schienke A, Lechel A, Schaetzlein S *et al* (2007). Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat Genet* **39**: 99-105.
- Clermont Y, Bustos-Obregon E (1968). Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *Am J Anat* **122**: 237-47.
- Cock TA, Back J, Eleftheriou F, Karsenty G, Kastner P, Chan S *et al* (2004). Enhanced bone formation in lipodystrophic PPARgamma(hyp/hyp) mice relocates haematopoiesis to the spleen. *EMBO Rep* **5**: 1007-12.
- Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M *et al* (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* **456**: 344-9.
- Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M *et al* (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet* **36**: 653-9.
- Cumano A, Dieterlen-Lievre F, Godin I (1996). Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* **86**: 907-16.
- Cumming RC, Lightfoot J, Beard K, Youssoufian H, O'Brien PJ, Buchwald M (2001). Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nat Med* **7**: 814-20.
- Dahl R, Iyer SR, Owens KS, Cuylear DD, Simon MC (2007). The transcriptional repressor GFI-1 antagonizes PU.1 activity through protein-protein interaction. *J Biol Chem* **282**: 6473-83.
- Dann CT, Alvarado AL, Molyneux LA, Denard BS, Garbers DL, Porteus MH (2008). Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor downregulated during retinoic acid-induced differentiation. *Stem Cells* **26**: 2928-37.
- de Rooij DG (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* **121**: 347-54.
- de Rooij DG, Grootegoed JA (1998). Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 694-701.
- Driessen RL, Johnston HM, Nilsson SK (2003). Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region. *Exp Hematol* **31**: 1284-91.
- Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C *et al* (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* **6**: 314-22.
- Fagerlie SR, Diaz J, Christianson TA, McCartan K, Keeble W, Faulkner GR *et al* (2001). Functional correction of FA-C cells with FANCC suppresses the expression of interferon gamma-inducible genes. *Blood* **97**: 3017-24.
- Falciatori I, Borsellino G, Haliassos N, Boitani C, Corallini S, Battistini L *et al* (2004). Identification and enrichment of spermatogonial stem cells displaying side-population phenotype in immature mouse testis. *FASEB J* **18**: 376-8.
- Falender AE, Shimada M, Lo YK, Richards JS (2005). TAF4b, a TBP associated factor, is required for oocyte development and function. *Dev Biol* **288**: 405-19.
- Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Spangrude GJ, Weissman IL (1993). Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* **122**: 897-902.

- Giulini G, Tomljenovic A, Labrecque N, Oulad-Abdelghani M, Rassoulzadegan M, Cuzin F (2002). Murine spermatogonial stem cells: targeted transgene expression and purification in an active state. *EMBO Rep* **3**: 753-9.
- Gonzalez-Herrera IG, Prado-Lourenco L, Pileur F, Conte C, Morin A, Cabon F *et al* (2006). Testosterone regulates FGF-2 expression during testis maturation by an IRES-dependent translational mechanism. *FASEB J* **20**: 476-8.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* **183**: 1797-806.
- Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, Mi T, Wang H, Pocius J *et al* (2001). Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* **938**: 208-18; discussion 218-20.
- Grompe M, van de Vrugt H (2007). The Fanconi family adds a fraternal twin. *Dev Cell* **12**: 661-2.
- Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA, Siefring JE, Williams EP, Jasti AC *et al* (2003). Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* **302**: 445-9.
- Gu Y, Runyan C, Shoemaker A, Surani A, Wylie C (2009). Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development* **136**: 1295-303.
- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH *et al* (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* **440**: 1199-203.
- Guan K, Wagner S, Unsold B, Maier LS, Kaiser D, Hemmerlein B *et al* (2007). Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res* **100**: 1615-25.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF *et al* (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**: 390-4.
- Habi O, Delisle MC, Messier N, Carreau M (2005). Lack of self-renewal capacity in Fancc^{-/-} stem cells after ex vivo expansion. *Stem Cells* **23**: 1135-41.
- Hadjur S, Ung K, Wadsworth L, Dimmick J, Rajcan-Separovic E, Scott RW *et al* (2001). Defective hematopoiesis and hepatic steatosis in mice with combined deficiencies of the genes encoding Fancc and Cu/Zn superoxide dismutase. *Blood* **98**: 1003-11.
- Haneline LS, Gobbett TA, Ramani R, Carreau M, Buchwald M, Yoder MC *et al* (1999). Loss of FancC function results in decreased hematopoietic stem cell repopulating ability. *Blood* **94**: 1-8.
- Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M *et al* (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* **133**: 250-64.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR *et al* (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* **109**: 625-37.
- Herzog EL, Chai L, Krause DS (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* **102**: 3483-93.
- Hock H, Meade E, Medeiros S, Schindler JW, Valk PJ, Fujiwara Y *et al* (2004). Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* **18**: 2336-41.
- Houghtaling S, Timmers C, Noll M, Finegold MJ, Jones SN, Meyn MS *et al* (2003). Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes Dev* **17**: 2021-35.

- Hsu HJ, Drummond-Barbosa D (2009). Insulin levels control female germline stem cell maintenance via the niche in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1117-21.
- Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S *et al* (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* **26**: 1269-75.
- Huckins C, Oakberg EF (1978). Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. II. The irradiated testes. *Anat Rec* **192**: 529-42.
- Ishiko E, Matsumura I, Ezoe S, Gale K, Ishiko J, Satoh Y *et al* (2005). Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J Biol Chem* **280**: 4929-39.
- Ito CY, Li CY, Bernstein A, Dick JE, Stanford WL (2003). Hematopoietic stem cell and progenitor defects in Sca-1/Ly-6A-null mice. *Blood* **101**: 517-23.
- Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I *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 *et al* (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* **12**: 446-51.
- Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR (2002). A stem cell molecular signature. *Science* **298**: 601-4.
- Iwama A, Hamaguchi I, Hashiyama M, Murayama Y, Yasunaga K, Suda T (1993). Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **195**: 301-9.
- Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H *et al* (2004). Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* **21**: 843-51.
- Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez EA, Iwasaki-Arai J, Mizuno S *et al* (2005). Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* **106**: 1590-600.
- Joenje H, Arwert F, Eriksson AW, de Koning H, Oostra AB (1981). Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature* **290**: 142-3.
- Joenje H, Patel KJ (2001). The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet* **2**: 446-57.
- Kai T, Spradling A (2004). Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature* **428**: 564-9.
- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H *et al* (2004a). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* **119**: 1001-12.
- Kanatsu-Shinohara M, Lee J, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S *et al* (2008a). Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol Reprod* **78**: 681-7.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S *et al* (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* **69**: 612-6.
- Kanatsu-Shinohara M, Takehashi M, Takashima S, Lee J, Morimoto H, Chuma S *et al* (2008b). Homing of mouse spermatogonial stem cells to germline niche depends on beta1-integrin. *Cell Stem Cell* **3**: 533-42.

- Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T (2004b). CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol Reprod* **70**: 70-5.
- Keller GM, Phillips RA (1984). Maintenance of hemopoiesis in long-term bone marrow cultures from S1/S1d and W/Wv mice. *Exp Hematol* **12**: 822-4.
- Kiel MJ, Acar M, Radice GL, Morrison SJ (2009). Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. *Cell Stem Cell* **4**: 170-9.
- Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**: 1109-21.
- Kiger AA, Jones DL, Schulz C, Rogers MB, Fuller MT (2001). Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* **294**: 2542-5.
- Kontou M, Adelfalk C, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M (2003). Suboptimal action of NF-kappaB in Fanconi anemia cells results from low levels of thioredoxin. *Biol Chem* **384**: 1501-7.
- Kontou M, Adelfalk C, Ramirez MH, Ruppitsch W, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M (2002). Overexpressed thioredoxin compensates Fanconi anemia related chromosomal instability. *Oncogene* **21**: 2406-12.
- Koomen M, Cheng NC, van de Vrugt HJ, Godthelp BC, van der Valk MA, Oostra AB *et al* (2002). Reduced fertility and hypersensitivity to mitomycin C characterize Fancg/Xrcc9 null mice. *Hum Mol Genet* **11**: 273-81.
- Kruyt FA, Hoshino T, Liu JM, Joseph P, Jaiswal AK, Youssoufian H (1998). Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P450 reductase. *Blood* **92**: 3050-6.
- Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2003). Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6487-92.
- Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004a). Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* **71**: 722-31.
- Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004b). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16489-94.
- Lacorazza HD, Yamada T, Liu Y, Miyata Y, Sivina M, Nunes J *et al* (2006). The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells. *Cancer Cell* **9**: 175-87.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L *et al* (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* **6**: 1229-34.
- Laird DJ, von Andrian UH, Wagers AJ (2008). Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell* **132**: 612-30.
- Lassalle B, Bastos H, Louis JP, Riou L, Testart J, Dutrillaux B *et al* (2004). 'Side Population' cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Development* **131**: 479-87.
- Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S *et al* (2007). Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development* **134**: 1853-9.

- Li J, Sejas DP, Zhang X, Qiu Y, Nattamai KJ, Rani R *et al* (2007). TNF-alpha induces leukemic clonal evolution ex vivo in Fanconi anemia group C murine stem cells. *J Clin Invest* **117**: 3283-95.
- Li X, Plett PA, Yang Y, Hong P, Freie B, Srour EF *et al* (2003). Fanconi anemia type C-deficient hematopoietic stem/progenitor cells exhibit aberrant cell cycle control. *Blood* **102**: 2081-4.
- Li Y, Chen S, Yuan J, Yang Y, Li J, Ma J *et al* (2009). Mesenchymal stem/progenitor cells promote the reconstitution of exogenous hematopoietic stem cells in Fancg^{-/-} mice in vivo. *Blood* **113**: 2342-51.
- Lu B, Bishop CE (2003). Late onset of spermatogenesis and gain of fertility in POG-deficient mice indicate that POG is not necessary for the proliferation of spermatogonia. *Biol Reprod* **69**: 161-8.
- Mace G, Briot D, Guervilly JH, Rosselli F (2007). [Fanconi anemia: cellular and molecular features]. *Pathol Biol (Paris)* **55**: 19-28.
- Machida YJ, Machida Y, Chen Y, Gurtan AM, Kupfer GM, D'Andrea AD *et al* (2006). UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Mol Cell* **23**: 589-96.
- Maillard I, Koch U, Dumortier A, Shestova O, Xu L, Sai H *et al* (2008). Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **2**: 356-66.
- Mauduit C, Hamamah S, Benahmed M (1999). Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Hum Reprod Update* **5**: 535-45.
- McCulloch EA, Till JE (1962). The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow to gamma radiation in vitro and in vivo. *Radiat Res* **16**: 822-32.
- Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ *et al* (2003). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* **35**: 165-70.
- Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW *et al* (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* **287**: 1489-93.
- Metcalf D (2007). Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. *Stem Cells* **25**: 2390-5.
- Min IM, Pietramaggiori G, Kim FS, Passegue E, Stevenson KE, Wagers AJ (2008). The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **2**: 380-91.
- Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S *et al* (2007). Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell* **1**: 101-12.
- Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H *et al* (1996). Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* **382**: 76-9.
- Morrison SJ, Kimble J (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**: 1068-74.
- Mukhopadhyay SS, Leung KS, Hicks MJ, Hastings PJ, Youssoufian H, Plon SE (2006). Defective mitochondrial peroxiredoxin-3 results in sensitivity to oxidative stress in Fanconi anemia. *J Cell Biol* **175**: 225-35.
- Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S (2007). Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell* **12**: 195-206.
- Naughton CK, Jain S, Strickland AM, Gupta A, Milbrandt J (2006). Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol Reprod* **74**: 314-21.

- Navarro S, Meza NW, Quintana-Bustamante O, Casado JA, Jacome A, McAllister K *et al* (2006). Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. *Mol Ther* **14**: 525-35.
- Nie Y, Han YC, Zou YR (2008). CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med* **205**: 777-83.
- Niedernhofer LJ, Lalai AS, Hoeijmakers JH (2005). Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell* **123**: 1191-8.
- Nijman SM, Huang TT, Dirac AM, Brummelkamp TR, Kerkhoven RM, D'Andrea AD *et al* (2005). The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell* **17**: 331-9.
- Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, Dawson S, Lambe T, Liu C *et al* (2007). DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* **447**: 686-90.
- Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL (2007). Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J Biol Chem* **282**: 25842-51.
- Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, Fearon DT, Brinster RL (2006). Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9524-9.
- Oatley JM, Oatley MJ, Avarbock MR, Tobias JW, Brinster RL (2009). Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development* **136**: 1191-9.
- Ogawa T, Arechaga JM, Avarbock MR, Brinster RL (1997). Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* **41**: 111-22.
- Ohmura M, Yoshida S, Ide Y, Nagamatsu G, Suda T, Ohbo K (2004). Spatial analysis of germ stem cell development in Oct-4/EGFP transgenic mice. *Arch Histol Cytol* **67**: 285-96.
- Ohta H, Sawada A, Kim JY, Tokimasa S, Nishiguchi S, Humphries RK *et al* (2002). Polycomb group gene rae28 is required for sustaining activity of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **195**: 759-70.
- Ohta H, Yomogida K, Dohmae K, Nishimune Y (2000). Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* **127**: 2125-31.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* **407**: 313-9.
- Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T (1992). In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* **80**: 3044-50.
- Orkin SH (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* **1**: 57-64.
- Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273**: 242-5.
- Otsuki T, Nagakura S, Wang J, Bloom M, Grompe M, Liu JM (1999). Tumor necrosis factor-alpha and CD95 ligation suppress erythropoiesis in Fanconi anemia C gene knockout mice. *J Cell Physiol* **179**: 79-86.
- Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Decimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dolle P *et al* (1996). Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol* **135**: 469-77.

- Pagano G, Degan P, d'Ischia M, Kelly FJ, Nobili B, Pallardo FV *et al* (2005). Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. *Eur J Haematol* **75**: 93-100.
- Pan L, Chen S, Weng C, Call G, Zhu D, Tang H *et al* (2007). Stem cell aging is controlled both intrinsically and extrinsically in the Drosophila ovary. *Cell Stem Cell* **1**: 458-69.
- Papadopoulo D, Moustacchi E (2005). [Fanconi anemia: genes and function(s) revisited]. *Med Sci (Paris)* **21**: 730-6.
- Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihajla M, Weissman IL *et al* (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* **423**: 302-5.
- Park Y, Gerson SL (2005). DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annu Rev Med* **56**: 495-508.
- Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5431-6.
- Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med* **202**: 1599-611.
- Persons DA, Allay JA, Allay ER, Ashmun RA, Orlic D, Jane SM *et al* (1999). Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood* **93**: 488-99.
- Pichierri P, Rosselli F (2004). The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J* **23**: 1178-87.
- Pipaon C, Casado JA, Bueren JA, Fernandez-Luna JL (2004). Jun N-terminal kinase activity and early growth-response factor-1 gene expression are down-regulated in Fanconi anemia group A lymphoblasts. *Blood* **103**: 128-32.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD *et al* (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**: 143-7.
- Prasher JM, Lalai AS, Heijmans-Antonissen C, Ploemacher RE, Hoeijmakers JH, Touw IP *et al* (2005). Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient Ercc1-/- mice. *EMBO J* **24**: 861-71.
- Pulliam AC, Hobson MJ, Ciccone SL, Li Y, Chen S, Srour EF *et al* (2008). AMD3100 synergizes with G-CSF to mobilize repopulating stem cells in Fanconi anemia knockout mice. *Exp Hematol* **36**: 1084-90.
- Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Mansson R *et al* (2007). Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **1**: 671-84.
- Raverot G, Weiss J, Park SY, Hurley L, Jameson JL (2005). Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Dev Biol* **283**: 215-25.
- Reese JS, Liu L, Gerson SL (2003). Repopulating defect of mismatch repair-deficient hematopoietic stem cells. *Blood* **102**: 1626-33.
- Reichard P (1993). From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* **260**: 1773-7.
- Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K *et al* (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**: 409-14.

- Rodrigues NP, Janzen V, Forkert R, Dombkowski DM, Boyd AS, Orkin SH *et al* (2005). Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* **106**: 477-84.
- Roeb W, Boyer A, Cavenee WK, Arden KC (2007). PAX3-FOXO1 controls expression of the p57Kip2 cell-cycle regulator through degradation of EGR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18085-90.
- Rosselli F, Sanceau J, Gluckman E, Wietzerbin J, Moustacchi E (1994). Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. II. In vitro and in vivo spontaneous overproduction of tumor necrosis factor alpha. *Blood* **83**: 1216-25.
- Rosselli F, Sanceau J, Wietzerbin J, Moustacchi E (1992). Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. I. Involvement of interleukin-6. *Hum Genet* **89**: 42-8.
- Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* **447**: 725-9.
- Ruzankina Y, Pinzon-Guzman C, Asare A, Ong T, Pontano L, Cotsarelis G *et al* (2007). Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell* **1**: 113-26.
- Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL (2006). Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* **24**: 1505-11.
- Saadatzadeh MR, Bijangi-Vishehsaraei K, Kapur R, Haneline LS (2009). Distinct roles of stress-activated protein kinases in Fanconi anemia-type C-deficient hematopoiesis. *Blood* **113**: 2655-60.
- Sanchez MJ, Holmes A, Miles C, Dzierzak E (1996). Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* **5**: 513-25.
- Sang L, Collier HA, Roberts JM (2008). Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1. *Science* **321**: 1095-100.
- Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM *et al* (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* **9**: 1753-65.
- Schindler D, Hoehn H (1988). Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am J Hum Genet* **43**: 429-35.
- Schlesser HN, Simon L, Hofmann MC, Murphy KM, Murphy T, Hess RA *et al* (2008). Effects of ETV5 (ets variant gene 5) on testis and body growth, time course of spermatogonial stem cell loss, and fertility in mice. *Biol Reprod* **78**: 483-9.
- Schofield R (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**: 7-25.
- Schrans-Stassen BH, van de Kant HJ, de Rooij DG, van Pelt AM (1999). Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology* **140**: 5894-900.
- Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciatori I, Kim J, Chavala S *et al* (2007). Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature* **449**: 346-50.
- Sejas DP, Rani R, Qiu Y, Zhang X, Fagerlie SR, Nakano H *et al* (2007). Inflammatory reactive oxygen species-mediated hemopoietic suppression in Fancc-deficient mice. *J Immunol* **178**: 5277-87.
- Shawlot W, Behringer RR (1995). Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* **374**: 425-30.

- Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL (1999). beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5504-9.
- Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL (2000). Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8346-51.
- Si Y, Ciccone S, Yang FC, Yuan J, Zeng D, Chen S *et al* (2006). Continuous in vivo infusion of interferon-gamma (IFN-gamma) enhances engraftment of syngeneic wild-type cells in Fanca^{-/-} and Fancg^{-/-} mice. *Blood* **108**: 4283-7.
- Sii-Felice K, Etienne O, Hoffschir F, Mathieu C, Riou L, Barroca V *et al* (2008). Fanconi DNA repair pathway is required for survival and long-term maintenance of neural progenitors. *Embo J* **27**: 770-81.
- Skinner AM, O'Neill SL, Grompe M, Kurre P (2008). CXCR4 induction in hematopoietic progenitor cells from Fanca^(-/-), -c^(-/-), and -d2^(-/-) mice. *Exp Hematol* **36**: 273-82.
- Smith LG, Weissman IL, Heimfeld S (1991). Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2788-92.
- Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J *et al* (2007). Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* **129**: 289-301.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**: 58-62.
- Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**: 977-88.
- Sun J, Yomogida K, Sakao S, Yamamoto H, Yoshida K, Watanabe K *et al* (2009). Rad18 is required for long-term maintenance of spermatogenesis in mouse testes. *Mech Dev* **126**: 173-83.
- Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y (2002). Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev* **113**: 29-39.
- Takahara Y, Tomotsune D, Shirai M, Katoh-Fukui Y, Nishii K, Motaleb MA *et al* (1997). Targeted disruption of the mouse homologue of the Drosophila polyhomeotic gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects. *Development* **124**: 3673-82.
- Takubo K, Ohmura M, Azuma M, Nagamatsu G, Yamada W, Arai F *et al* (2008). Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell-cycle arrest. *Cell Stem Cell* **2**: 170-82.
- Tang H, Brennan J, Karl J, Hamada Y, Raetzman L, Capel B (2008). Notch signaling maintains Leydig progenitor cells in the mouse testis. *Development* **135**: 3745-53.
- Tegelenbosch RA, de Rooij DG (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res* **290**: 193-200.
- Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K *et al* (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* **2**: 222-8.
- Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H, Marunouchi T (2007). CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol Reprod* **76**: 130-41.
- Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE *et al* (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* **128**: 325-39.

- Tremblay CS, Huang FF, Habi O, Huard CC, Godin C, Levesque G *et al* (2008). HES1 is a novel interactor of the Fanconi anemia core complex. *Blood* **112**: 2062-70.
- Tremblay CS, Huard CC, Huang FF, Habi O, Bourdages V, Levesque G *et al* (2009). The fanconi anemia core complex acts as a transcriptional co-regulator in hairy enhancer of split 1 signaling. *J Biol Chem*.
- Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M *et al* (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* **371**: 221-6.
- Umemoto T, Yamato M, Nishida K, Yang J, Tano Y, Okano T (2005). p57Kip2 is expressed in quiescent mouse bone marrow side population cells. *Biochem Biophys Res Commun* **337**: 14-21.
- van der Lugt NM, Domen J, Linders K, van Roon M, Robanus-Maandag E, te Riele H *et al* (1994). Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev* **8**: 757-69.
- van Os R, Kamminga LM, Ausema A, Bystrykh LV, Draijer DP, van Pelt K *et al* (2007). A Limited role for p21Cip1/Waf1 in maintaining normal hematopoietic stem cell functioning. *Stem Cells* **25**: 836-43.
- Wang L, Yang L, Debidda M, Witte D, Zheng Y (2007). Cdc42 GTPase-activating protein deficiency promotes genomic instability and premature aging-like phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1248-53.
- Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F *et al* (1998). The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* **12**: 2392-402.
- Wang T, Zhang X, Li JJ (2002). The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol* **2**: 1509-20.
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M *et al* (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422**: 897-901.
- Wang Z, Li G, Tse W, Bunting KD (2009). Conditional deletion of STAT5 in adult mouse hematopoietic stem cells causes loss of quiescence and permits efficient non-ablative stem cell replacement. *Blood*.
- Weiss J, Meeks JJ, Hurley L, Raverot G, Frassetto A, Jameson JL (2003). Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol Cell Biol* **23**: 8084-91.
- Whitney MA, Royle G, Low MJ, Kelly MA, Axthelm MK, Reifsteck C *et al* (1996). Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia C gene. *Blood* **88**: 49-58.
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M *et al* (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **135**: 1118-29.
- Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM *et al* (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* **18**: 2747-63.
- Wilson A, Trumpp A (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* **6**: 93-106.
- Wong JC, Alon N, McKerlie C, Huang JR, Meyn MS, Buchwald M (2003). Targeted disruption of exons 1 to 6 of the Fanconi Anemia group A gene leads to growth retardation, strain-specific microphthalmia, meiotic defects and primordial germ cell hypoplasia. *Hum Mol Genet* **12**: 2063-76.

- Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, Butcher EC, Weissman IL (2002). Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med* **195**: 1145-54.
- Xie T, Spradling AC (2000). A niche maintaining germ line stem cells in the Drosophila ovary. *Science* **290**: 328-30.
- Xie Y, Yin T, Wiegand W, He XC, Miller D, Stark D *et al* (2009). Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* **457**: 97-101.
- Yamashita YM, Jones DL, Fuller MT (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* **301**: 1547-50.
- Yamashita YM, Mahowald AP, Perlin JR, Fuller MT (2007). Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science* **315**: 518-21.
- Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, Morita Y, Eto K, Ema H *et al* (2006). Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *Embo J* **25**: 3515-23.
- Yang L, Dybedal I, Bryder D, Nilsson L, Sitnicka E, Sasaki Y *et al* (2005). IFN-gamma negatively modulates self-renewal of repopulating human hemopoietic stem cells. *J Immunol* **174**: 752-7.
- Yang L, Wang L, Geiger H, Cancelas JA, Mo J, Zheng Y (2007). Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5091-6.
- Yeh JR, Zhang X, Nagano MC (2007). Establishment of a short-term in vitro assay for mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* **77**: 897-904.
- Yoshida S, Nabeshima Y, Nakagawa T (2007a). Stem cell heterogeneity: actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1120**: 47-58.
- Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y (2007b). A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* **317**: 1722-6.
- Yoshida S, Takakura A, Ohbo K, Abe K, Wakabayashi J, Yamamoto M *et al* (2004). Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev Biol* **269**: 447-58.
- Yu F, Kuo CT, Jan YN (2006a). Drosophila neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology. *Neuron* **51**: 13-20.
- Yu X, Alder JK, Chun JH, Friedman AD, Heimfeld S, Cheng L *et al* (2006b). HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding. *Stem Cells* **24**: 876-88.
- Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG *et al* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**: 836-41.
- Zhang P, Behre G, Pan J, Iwama A, Wara-Aswapati N, Radomska HS *et al* (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8705-10.
- Zhang S, Li D, Li E, Li L, Wang J, Wang C *et al* (2008a). Expression localization of Bmi1 in mice testis. *Mol Cell Endocrinol* **287**: 47-56.
- Zhang X, Li J, Sejas DP, Pang Q (2005). Hypoxia-reoxygenation induces premature senescence in FA bone marrow hematopoietic cells. *Blood* **106**: 75-85.
- Zhang X, Sejas DP, Qiu Y, Williams DA, Pang Q (2007). Inflammatory ROS promote and cooperate with the Fanconi anemia mutation for hematopoietic senescence. *J Cell Sci* **120**: 1572-83.

Zhang X, Shang X, Guo F, Murphy K, Kirby M, Kelly P *et al* (2008b). Defective homing is associated with altered Cdc42 activity in cells from patients with Fanconi anemia group A. *Blood* **112**: 1683-6.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ *et al* (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* **7**: 1028-34.

Vilma BARROCA

Renouvellement des cellules souches : plasticité des progéniteurs germinaux et rôle du gène *Fancg* dans la fonction des cellules souches hématopoïétiques

La préservation d'un stock de cellules souches fonctionnelles est indispensable pour le maintien de nombreux tissus chez l'adulte. Les cellules souches se multiplient pour s'auto-renouveler et entrent en différenciation donnant naissance à des progéniteurs puis à des cellules matures. Récemment, la possibilité pour les progéniteurs de se reprogrammer en cellules souches et de réacquérir un potentiel de régénération à long terme a été suggérée notamment dans le tissu germinal. Ainsi, l'auto-renouvellement et la reprogrammation des progéniteurs pourraient jouer un rôle dans le maintien du pool de cellules souches. Mon travail de thèse portait sur l'étude de ces deux mécanismes de régénération des cellules souches chez la souris.

J'ai tout d'abord étudié la reprogrammation des progéniteurs germinaux au cours de la spermatogenèse. Ce travail montre la capacité des progéniteurs germinaux mâles, les spermatogonies différenciées, à modifier leur programme de différenciation et à générer de nouvelles cellules souches germinales après transplantation testiculaire. Les progéniteurs germinaux pourraient ainsi constituer une réserve de « cellules souches potentielles ». Le tissu germinal possède donc une certaine plasticité.

La seconde partie de mon travail porte sur l'implication du gène *Fancg* de l'anémie de Fanconi, voie de réponse aux dommages à l'ADN, dans l'auto-renouvellement et la fonctionnalité des cellules souches hématopoïétiques au cours de l'hématopoïèse. L'intégrité génétique des cellules souches doit en effet être préservée tout au long de la vie de l'individu. Cette étude montre que l'inactivation du gène *Fancg* perturbe le processus de migration, la quiescence, et la régulation de l'expression de certains gènes clés des fonctions des cellules souches. Ces altérations participent au déficit fonctionnel des cellules souches hématopoïétiques observées dans le modèle murin *Fancg*^{-/-}.

Mots clés : cellules souches, dédifférenciation, spermatogenèse, hématopoïèse, anémie de Fanconi

Stem cell renewal : germinal progenitor plasticity and role of the *Fancg* gene in the hematopoietic stem cell functions

The long-term maintenance of the stem cell pool is necessary to preserve the functionality of an organ throughout life. Stems cells proliferate in order to selfrenew or to be committed to differentiate to produce progenitors and finally highly specialized cells. Recent reports have suggested that germinal progenitors could reprogram into stem cells and reacquire a potential to regenerate tissue at long-term. Thus, the stem cell selfrenewal process and the reprogramming of progenitors could play a role in the maintenance of the stem cell pool. The project of my thesis focused on those two mechanisms of stem cell regeneration in the mouse model.

First, I investigated the reprogramming process of the germinal progenitors during spermatogenesis. Our results show that male germinal progenitors, the differentiating spermatogonia, can change their differentiation program and generate new functional germinal stem cells after testicular transplantation. The germinal progenitors could constitute a pool of potential stem cell, and underscores the plasticity of the germinal lineage.

A second part of my project dealt with the involvement of *fancg*, a gene of the Fanconi anemia DNA damage response pathway, in the selfrenewal and in the functions of the hematopoietic stem cells. The maintenance of the genetic integrity throughout life is particularly important for stem cells in order to safeguard the stem cell pool. Our study show that *fancg* deficiency induces the impairment of the migration potential and of the quiescence of stem cells, and modifies the expression of several key genes regulating stem cell functions. Those alterations contribute to the functional impairment of the hematopoietic stem cells observed in *Fancg*^{-/-} mice.

Key words : stem cells, dedifferentiation, spermatogenesis, hematopoiesis, Fanconi anemia