

**UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD**

2005

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI
Spécialité : **RADIOBIOLOGIE**

présentée et soutenue publiquement
par

Marie PRAT-LEPESANT

Le 13 Juin 2005

**MÉCANISMES DE RÉGULATION DU FLT3-LIGAND
APRÈS IRRADIATION**

Directeur de thèse : Pr. Norbert-Claude GORIN

JURY

M. Jean-Marc COSSET	Professeur, Université Paris XI	Président
M. Pierre CHARBORD	Directeur de recherche INSERM	Rapporteur
M. François HÉRODIN	Docteur en pharmacie, Docteur en sciences, HDR	Rapporteur
M. Norbert-Claude GORIN	Professeur, Université Paris VI	Examineur
M. Jean-Jacques LATAILLADE	Docteur en médecine, Docteur en science	Examineur
M. Jean-Marc BERTHO	Docteur en sciences, HDR	Examineur

INTRODUCTION	6
1 Rappels concernant l'hématopoïèse	8
1.1 La cellule souche hématopoïétique	9
1.2 Les progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques et les cellules matures ..	12
2 Régulation de l'hématopoïèse par le micro-environnement médullaire ...	15
2.1 Les cellules stromales médullaires	16
2.1.1 Les fibroblastes médullaires.....	17
2.1.2 Les adipocytes médullaires	17
2.1.3 Les cellules endothéliales	18
2.1.4 Les ostéoblastes	19
2.2 Molécules qui interviennent dans la régulation de l'hématopoïèse	20
2.2.1 Les principaux facteurs de croissance	20
2.2.2 Molécules d'adhésion et micro environnement médullaire	22
3 Effet d'une irradiation sur l'hématopoïèse	22
4 Différentes situations d'irradiations	25
4.1 Irradiations thérapeutiques.....	25
4.2 Irradiations accidentelles.....	26
4.3 Un bio-indicateur possible d'atteinte radio-induite à la moelle osseuse : Le Flt3-Ligand	27
4.3.1 FLT3/FLT3-Ligand: structures et fonctions	27
4.3.1.1 FLT3-Ligand: structure et cellules productrices	27
4.3.1.2 Le récepteur Flk2/Flt3	30
4.3.1.3 Activités du Flt3-Ligand	32
4.3.2 Flt3-Ligand / Flt3 et pathologies humaines.....	36
4.3.2.1 Mutation du récepteur Flt3 et pathologies hématopoïétiques malignes ..	36
4.3.2.2 Variation du FL chez le patient aplasique.....	37
4.3.2.3 Variation du FL au cours de la mobilisation par G-CSF.....	38
BUT DE L'ETUDE	40
MATERIELS ET METHODES	41
1 Etude in vitro	41
1.1 Lignées Cellulaires	41
1.1.1 Lignée ostéoblastique humaine : MG-63.....	41
1.1.2 Lignée préadipocytaire murine : MS-5	41
1.1.3 Lignée stromale de moelle osseuse humaine : HS-5.....	42
1.2 Irradiations et stimulation.....	42
1.3 Etude de la production de Flt3-Ligand	42
1.3.1 Mise en culture des cellules	42
1.3.2 Recherche de la forme soluble de FL	43
1.3.3 Recherche du FL présent dans le cytoplasme	44
2 Etude in vivo	44
2.1 Modèles murins	44

2.1.1	Les Animaux.....	44
2.1.1.1	Souris BALB/c	44
2.1.1.2	Souris NOD/SCID	45
2.1.2	Les irradiations	45
2.1.2.1	Irradiations corporelles totales (ICT)	45
2.1.2.2	Irradiations localisées	46
2.1.3	Obtention et traitement des échantillons sanguins	48
2.1.4	Détermination du nombre de progéniteurs survivants dans la moelle osseuse et dans la rate	48
2.1.5	Analyse phénotypique des cellules circulantes et médullaires	49
2.1.6	Etude de l'expression de l'ARNm codant le FL.....	50
2.1.6.1	Extraction des ARN totaux et synthèse des ADN complémentaires	50
2.1.6.2	PCR quantitative en temps réel.....	50
2.1.7	Quantification et localisation de la protéine FL	51
2.1.7.1	Quantification dans différents organes et types cellulaires.....	51
2.1.7.2	Localisation par Immunohistochimie	51
2.2	Modèle de primate non humain	52
2.2.1	Les animaux	52
2.2.2	Mobilisation	52
2.2.3	Obtention et traitement des échantillons sanguins	52
2.2.4	Prélèvement de moelle osseuse et isolement des cellules mononucléées... ..	53
2.2.5	Analyse phénotypique des cellules circulantes et médullaires	53
2.2.6	Détermination des nombres de progéniteurs dans le sang et la moelle osseuse	54
2.2.7	Recherche de l'ARNm codant le FL dans les cellules circulantes et médullaires	54
2.2.8	Quantification du FL.....	55
3	Etude Clinique	55
3.1	Les patients	55
3.1.1	Traitement par radiothérapie localisée	55
3.1.2	Patients greffés par cellules souches hématopoïétiques	56
3.2	Etude de l'expression de FL	57
3.2.1	Numération formule sanguine et mesure de la concentration plasmatique de FL	57
3.2.2	Recherche du FL membranaire	57
3.2.3	Etude de l'expression de l'ARNm codant le FL.....	58
4	Analyses statistiques	58
	RESULTATS.....	59
1	Etude de la relation existant entre la concentration plasmatique de FL et l'atteinte médullaire radio-induite.....	59
1.1	Modèle murin	59
1.1.1	Evolution du nombre de leucocytes après une irradiation hétérogène.....	60
1.1.2	Evolution du nombre de plaquettes après une irradiation hétérogène.....	62
1.1.3	Evolution de la concentration plasmatique de FL après une irradiation hétérogène	63
1.1.4	Effet d'une irradiation hétérogène sur le nombre de progéniteurs médullaires survivants dans la moelle osseuse présente en territoire exposé et en territoire protégé.	65
1.1.5	Effet d'une irradiation hétérogène sur le nombre de progéniteurs survivant dans l'ensemble de l'animal.....	68

1.1.6	Corrélation entre la concentration plasmatique de FL et la sévérité de l'atteinte médullaire	71
1.1.7	Construction d'équations mathématiques en vue de prédire la sévérité de l'atteinte médullaire	75
1.2	Etude clinique	77
1.2.1	Concentration plasmatique physiologique de FL chez l'homme.....	77
1.2.2	Concentration plasmatique en FL chez les patients avant le début de la radiothérapie.....	78
1.2.3	Estimation du volume médullaire irradié	79
1.2.4	Corrélation entre la concentration plasmatique de FL et les nombres de leucocytes et de plaquettes	80
1.2.5	Corrélation entre la concentration plasmatique de FL, la dose cumulée d'irradiation et la fraction de moelle osseuse irradiée	82
2	Mécanismes de régulations du FL	85
2.1	Test de l'hypothèse de consommation : FL et mobilisation.....	85
2.1.1	Etude de la relation entre la concentration plasmatique de FL avant la mobilisation et le nombre de cellules CD34 ⁺ mobilisées	86
2.1.2	Variation du taux plasmatique de FL au cours de la mobilisation.....	87
2.2	Etude de l'implication des cellules lymphoïdes chez la souris	88
2.2.1	Evolution des leucocytes et des plaquettes après une irradiation corporelle totale.....	89
2.2.2	Variation de la concentration plasmatique de FL après des ICT chez les souris BALB/c et NOD/SCID	91
2.2.3	Effet d'irradiation corporelle totale sur le nombre de progéniteurs survivants dans la moelle osseuse de souris BALB/c et NOD/SCID.....	94
2.2.4	Etude des organes produisant du FL après irradiation	98
2.2.4.1	Expression de l'ARNm	98
2.2.4.2	Concentration de la protéine	102
2.2.4.3	Analyse phénotypique des cellules circulantes et des cellules de moelle osseuse.....	104
2.2.4.4	Localisation par immunohistochimie du FL dans la moelle osseuse, la rate, et le thymus de souris BALB/c	106
2.3	Implication des cellules lymphoïdes chez l'homme.....	108
2.3.1	Evolution de la concentration plasmatique de FL au cours du traitement .	108
2.3.2	Effet du traitement aplasiant sur l'expression du FL membranaire à la surface des cellules circulantes.....	109
2.3.3	Effet du traitement aplasiant sur l'expression de l'ARNm codant le FL dans les cellules circulantes	110
2.3.4	Effet du traitement par sérum anti-lymphocytaire sur le taux plasmatique de FL	111
2.4	Implication d'autres types cellulaires	113
2.4.1	Culture de cellules préadipocytaires murines (MS-5)	113
2.4.1.1	Effet de l'irradiation et du TNF α sur la survie cellulaire	113
2.4.1.2	Production de FL par MS-5 dans le surnageant de culture.....	114
2.4.1.3	Etude de la quantité intracellulaire de FL	115
2.4.2	Culture de cellules ostéoblastiques humaines (MG-63)	116
2.4.2.1	Effet de l'irradiation sur la survie cellulaire	117
2.4.2.2	Production de FL par MG-63 dans le surnageant de culture.....	118
2.4.2.3	Etude de la quantité intracellulaire de FL	119
2.4.3	Culture de cellules stromales humaines (HS-5)	120
2.4.3.1	Effet de l'irradiation sur la survie cellulaire	120

2.4.3.2	Production de FL par HS5 dans les surnageants de cultures	121
2.4.3.3	Suivi de la quantité intracellulaire de FL	122
DISCUSSION		124
1	<i>Le Flt3-Ligand comme bio-indicateur de la sévérité de l'atteinte médullaire radio-induite</i>	124
2	<i>Mécanismes de régulation du FL : régulation par un équilibre entre production et consommation ?</i>	135
REFERENCES		149
LISTE DE PUBLICATIONS.....		149

INTRODUCTION

Le compartiment hématopoïétique est l'un des plus sévèrement endommagé lors de traitements anticancéreux (chimiothérapie ou radiothérapie) ou lors d'irradiations accidentelles. L'atteinte de ce compartiment conduit à une aplasie médullaire qui a pour conséquence une pancytopénie périphérique. Cette pancytopénie, dont la sévérité croît avec la dose et le volume médullaire irradié, induit des risques infectieux et hémorragiques importants pour les patients. Chez certains patients, une atteinte médullaire sévère peut nécessiter la suspension du traitement afin de ne pas créer de dommages irréversibles à la moelle osseuse. Néanmoins, le délai existant entre l'atteinte médullaire et sa manifestation périphérique rend l'évaluation des dommages à la moelle osseuse difficile, et l'interruption du traitement peut intervenir de façon trop tardive. Dans les cas d'irradiations accidentelles, la problématique est plus complexe. En effet, une exposition à forte dose présente deux types de difficultés :

- Tout d'abord, l'irradiation accidentelle provoque un ensemble pathologies regroupées sous le terme de syndrome d'irradiation aiguë (SIA) dans lequel on distingue trois phases: une phase initiale caractérisée par des nausées, des vomissements, des diarrhées, une anorexie et une fatigue généralisée, une phase de latence clinique et une phase d'état. Dans cette dernière phase, les syndromes hématopoïétique, gastro-intestinal et cérébro-vasculaire se développent sous forme d'atteinte morphologique. Le délai d'apparition et l'intensité de ces différents syndromes dépend de la dose d'irradiation (Figure 1).
- Ensuite, une irradiation accidentelle n'est jamais homogène, et la nature du rayonnement, son débit de dose, la dose et sa répartition sont à priori inconnus au moment de la prise en charge du patient.

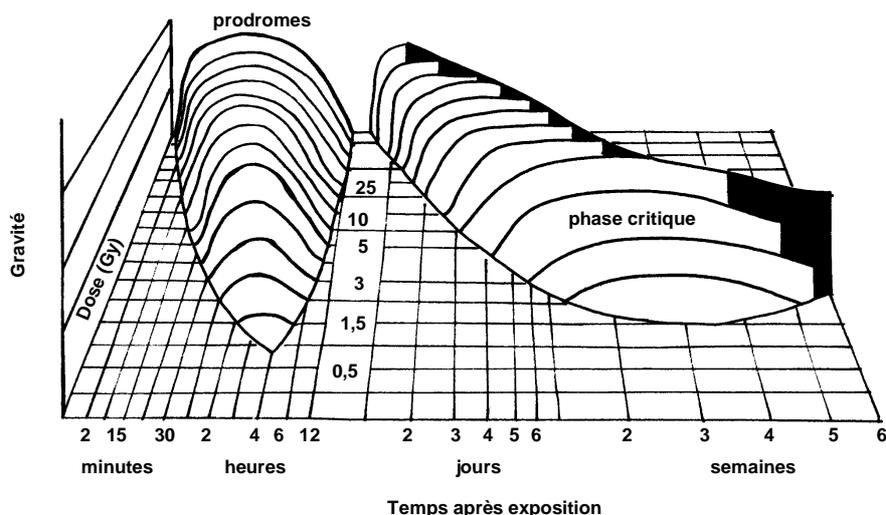


Figure 1 : Schématisation de la cinétique d'apparition et de la gravité du SIA.

Le choix des traitements à mettre en oeuvre va donc dépendre de l'estimation des dommages radio-induits aux différents organes, et notamment de l'évaluation de l'hématopoïèse résiduelle. C'est pourquoi il serait particulièrement intéressant de disposer d'un bio-indicateur fiable permettant d'évaluer l'activité hématopoïétique résiduelle. De plus, un tel bio-indicateur pourrait permettre d'anticiper les pancytopenies au cours de traitements aplasians. Il permettrait donc d'adapter le traitement à chaque situation clinique.

Dans cette thèse nous avons suivi, dans un modèle murin, les variations de la concentration plasmatique de Flt3-Ligand (FL) et l'évolution des nombres de progéniteurs hématopoïétiques survivants après des irradiations homogènes ou hétérogènes. Cette étude a permis de caractériser le FL comme bio-indicateur d'atteinte hématopoïétique capable de nous renseigner sur le nombre de progéniteurs survivants au 3^{ème} jour après une irradiation et les durées de leucopénie et de thrombopénie. De plus, l'étude des mécanismes de régulation du FL a montré que la concentration plasmatique de FL n'était pas seulement la résultante de la production spontanée de la cytokine par les cellules lymphoïdes et sa consommation par les cellules médullaires. Ainsi, nous avons pu

démontrer que plusieurs types cellulaires étaient impliqués dans cette régulation et particulièrement les cellules stromales.

1 Rappels concernant l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes de prolifération et de différenciation qui conduisent à la production continue et régulée de cellules sanguines fonctionnelles et matures. Le tissu hématopoïétique est situé principalement dans la moelle osseuse chez l'homme adulte et, chez la souris, dans la moelle osseuse et la rate (Metcalf et Moore, 1971). La moelle osseuse est répartie sur l'ensemble du squelette dans les cavités des os. Néanmoins, sa distribution est hétérogène et évolue avec l'âge. Chez l'homme adulte, la majorité de la moelle osseuse est répartie dans les os courts et plats particulièrement dans l'os coxal, les vertèbres, les côtes et le crâne (Cristy, 1981).

Le tissu hématopoïétique est un tissu compartimentalisé et hiérarchisé comprenant quatre compartiments cellulaires : les cellules souches hématopoïétiques (CSH), les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures. Les CSH prolifèrent, et sont capables de s'engager dans différentes voies de différenciation conduisant à des progéniteurs, puis des précurseurs et enfin des cellules matures (Figure 2).

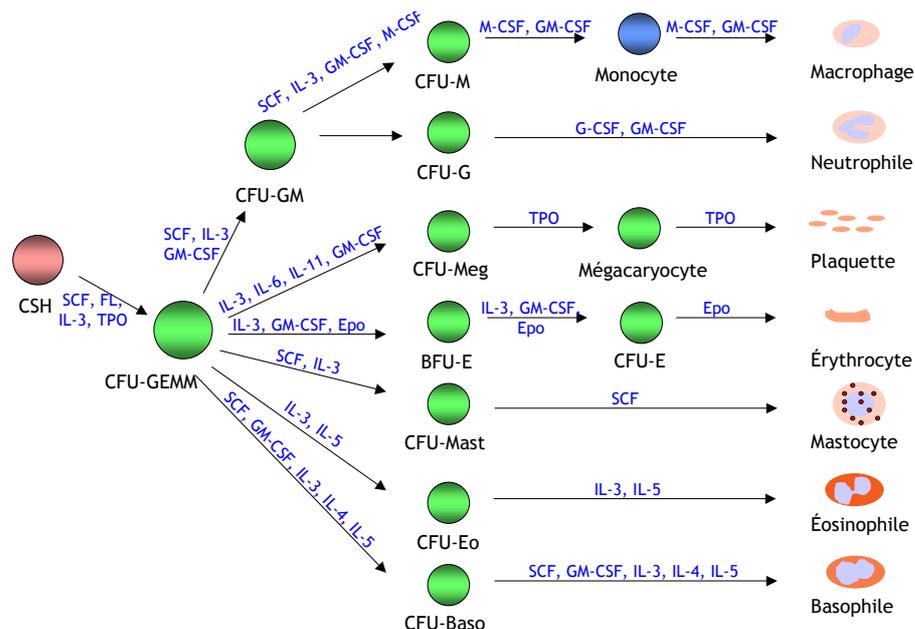


Figure 2 : Organisation hiérarchique de l'hématopoïèse

Ces processus sont étroitement contrôlés par les cellules stromales de la moelle osseuse et le micro-environnement médullaire via des facteurs de croissance et des molécules d'adhésion.

1.1 La cellule souche hématopoïétique

Les CSH présentent deux propriétés essentielles : d'une part, elles ont une capacité d'auto-renouvellement, c'est à dire de multiplication à l'identique sans différenciation qui permet de maintenir une réserve constante de CSH primitives et donc d'assurer le potentiel hématopoïétique. D'autre part, elles sont capables de se différencier vers l'ensemble des lignages médullaires, sanguins et thymiques. Les CSH sont ainsi dites multipotentes. L'existence des CSH a été mise en évidence dès le début des années 60 dans un modèle murin (Till et McCulloch, 1961) dans lequel l'aplasie médullaire létale consécutive à une irradiation de 10 Gy pouvait être traitée par une greffe de moelle osseuse. De plus, ce travail a mis en évidence l'existence de clones dans la rate (appelés colony forming unit-spleen, CFU-S) contenant des progéniteurs capables de générer des colonies érythroïdes, granuleuses, monocytaires et mégacaryocytaires. L'injection d'une fraction de ces cellules chez un hôte irradié létalement était capable de conduire à une reconstitution hématopoïétique. Bien que l'existence des CSH soit connue depuis longtemps, leur caractérisation reste difficile. En effet, ces cellules sont peu fréquentes (1/100000 cellules de moelle osseuse) et ne présentent pas de caractéristiques morphologiques spécifiques reconnaissables par coloration cytologique. Cependant, ces cellules peuvent être caractérisées par des tests fonctionnels. Ainsi, après avoir cultivé les cellules susceptibles d'être des CSH en contact avec un stroma, on évalue la capacité de ces cellules à former des colonies en milieu semi-solide (Dexter *et al.*, 1977; Spangrude *et al.*, 1988). Cette technique permet de mettre en évidence une population hématopoïétique très immature, mais l'absence de marqueurs de différenciation (lignage

négative) des CSH les rend difficilement repérables. Cependant, certains marqueurs, qui peuvent être différents selon l'espèce, sont exprimés durant l'hématopoïèse précoce.

Chez l'homme, le plus important de ces marqueurs est le cluster de différenciation 34 (CD34⁺) qui est exprimé dans 0,5 à 5% des cellules de la moelle osseuse humaine. Au cours de la différenciation, les cellules répriment l'expression de cette molécule (Civin *et al.*, 1984). Toutefois, le CD34 n'est pas spécifique des CSH. Il a également été observé à la surface de certains précurseurs des cellules stromales médullaires (Simmons et Torok-Storb, 1991) et de cellules endothéliales (Fina *et al.*, 1990). Afin d'affiner la caractérisation des CSH, d'autres marqueurs de sélection négative ou positive ont été utilisés en association avec le CD34. Ainsi, la population de CSH peut être mieux caractérisée par l'absence d'expression de l'antigène CD38 (Terstappen *et al.*, 1991; Terstappen *et al.*, 1993). La population CD34⁺ CD38⁻ est donc plus indifférenciée que la population CD34⁺ CD38^{low} et comporte un nombre plus important de cellules aptes à la reconstitution à long terme (Bhatia *et al.*, 1997; Glimm *et al.*, 2001). De même, l'absence d'expression des antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA-DR) (Srour *et al.*, 1991) et des marqueurs de différenciation tels que le CD33 (marqueur myéloïde) et le CD19 (marqueur lymphoïde B) permet de mieux caractériser la population de CSH (Andrews *et al.*, 1989; Lansdorp *et al.*, 1990; Mayani *et al.*, 1993). A l'inverse, l'expression du CD90 (Thy-1) peut être utilisée pour enrichir une population cellulaire en CSH (Baum *et al.*, 1992; Mayani et Lansdorp, 1994; Murray *et al.*, 1995). Plus récemment, l'antigène AC133 (Yin *et al.*, 1997) et le KDR (*i.e.* l'un des récepteurs du VEGF, autrement appelé VEGFR2) (Ziegler *et al.*, 1999) ont été décrits comme permettant d'identifier les CSH seuls ou en association avec le CD34. Les CSH expriment également un certain nombre de récepteurs pour des cytokines et chimiokines comme le CD117 (c-Kit) (Wognum *et al.*, 2003) ou le CD184 (CXCR4), récepteur du SDF-1 (Lataillade *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2002).

Chez la souris, bien que les marqueurs soient un peu différents, la démarche de caractérisation des CSH est similaire, avec une sélection négative puis positive à partir

d'une population cellulaire. Ainsi, les HSC sont définies comme étant c-Kit⁺ Thy-1⁺ Sca-1⁺ Lin^{-/low} (Spangrude *et al.*, 1988). Cependant, la population ainsi caractérisée reste hétérogène. En particulier, deux types de population de CSH pourraient exister, l'une étant capable de mener à une reconstitution hématopoïétique à long terme et douée d'un fort potentiel d'auto-renouvellement (LT-CSH) et l'autre ne permettant une reconstitution que pour une période limitée et avec un potentiel d'auto-renouvellement plus faible (ST-CSH) (Weissman, 2000). La distinction entre ces deux populations pourrait être réalisée par l'intensité d'expression de l'antigène Mac1. Ainsi, les LT-CSH sont Mac1⁻ et les ST-CSH sont Mac1^{low} (Weissman, 2000; Bellantuono, 2004). Cependant, la sélection négative reste délicate et différents groupes ont ainsi cherché à identifier de nouveaux marqueurs des CSH. Récemment, il a été montré que l'expression de l'endogline (CD105) est un marqueur de la population LT-CSH (Chen *et al.*, 2002). De plus, un travail récent a mis en évidence que la population cellulaire exprimant la Podocalyxine dans la moelle osseuse contenait des LT-CSH (Doyonnas *et al.*, 2005). A l'heure actuelle, la population de CSH la plus précoce semble être la « side population » caractérisée par son unique capacité à exclure les marqueurs fluorescents comme le Hoechst 33342 (Goodell *et al.*, 1996; Goodell *et al.*, 1997). Ces cellules portent les antigènes de surface Lin⁻, Sca1⁺, cKit⁺ et CD45⁺ (Hirschi et Goodell, 2001; Ramos *et al.*, 2003) et sont capable de s'auto-renouveler. De plus, il a été montré récemment qu'elles possèdent une capacité « plastique » à se différencier en myocytes squelettiques (Gussoni *et al.*, 1999), en cellules endothéliales (Jackson *et al.*, 2001) et en ostéoblastes (Olmsted-Davis *et al.*, 2003), bien que les mécanismes sous-jacents, c'est à dire trans/dé-différenciation ou bien fusion cellulaire, ne soient pas clairement définis (Loeffler et Roeder, 2004).

Comme cela a été évoqué, la population de CSH est hétérogène et répond, en cela, à son rôle de maintien des potentiels d'hématopoïèse et de différenciation. Cependant, les régulations qui conduisent au maintien du pool de CSH restent mal définies. Deux hypothèses ont été émises. La première décrit l'existence d'un nombre fini de CSH

déterminé pendant l'embryogenèse. Dans ce modèle, les CSH seraient recrutées au hasard pour proliférer et se différencier en cellules matures (Hellman *et al.*, 1978; Brecher *et al.*, 1986). La seconde hypothèse, privilégiée aujourd'hui, consiste en l'existence d'une petite population cellulaire ayant une importante capacité d'auto-renouvellement. Ces CSH seraient capables de se diviser conduisant ainsi à une cellule fille identique et à une cellule capable de s'engager vers une différenciation (Ho, 2005). Ainsi, il a été montré que les cellules CD34⁺ pouvaient avoir des divisions asymétriques aboutissant à une cellule quiescente (ou à division lente) et à une cellule proliférant de façon exponentielle (Huang *et al.*, 1999). De plus, cette étude a montré que la fréquence des divisions asymétriques est plus élevée dans la population de cellules CD34⁺ CD38⁻ que dans les cellules CD34⁺ CD38⁺. Les mécanismes de régulation de ces divisions restent cependant mal connus. De nombreux travaux récents, réalisés *in vitro* et *in vivo*, ont identifié des gènes capables d'influencer l'auto-renouvellement des CSH. Parmi ceux-ci, on trouve des facteurs de transcription, des régulateurs du cycle cellulaire ainsi que des gènes modifiant la structure du chromosome (Stein *et al.*, 2004). Quoiqu'il en soit, la population de CSH est étroitement régulée et s'engage, pour une partie, vers la différenciation en cellules matures.

1.2 Les progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques et les cellules matures

L'engagement des CSH dans une voie de différenciation aboutit en premier lieu à la formation de cellules présentant un fort pouvoir clonogénique appelés progéniteurs hématopoïétiques. Ces cellules sont engagées de façon irréversible dans la différenciation qui conduira à une ou plusieurs lignées cellulaires (Humphries *et al.*, 1981). Les progéniteurs hématopoïétiques sont capables d'assurer une hématopoïèse à court et moyen terme, mais en aucun cas ne peuvent assurer une reconstitution hématopoïétique à long terme. Initialement, ces progéniteurs ont été caractérisés grâce à des techniques de

cultures en milieu semi-solide. Ainsi, dès le milieu des années 60, Bradley et Metcalf ont généré des colonies de cellules macrophagiques et de polynucléaires à partir de moelle osseuse humaine (Bradley et Metcalf, 1966). Les progéniteurs hématopoïétiques ainsi caractérisés ont été appelés colony forming cells (CFC), colony forming unit (CFU) ou burst forming unit (BFU). Ainsi, plusieurs types de progéniteurs ont pu être caractérisés (Figure 2), parmi lesquels on trouve les CFU-GEMM capables de générer des colonies comprenant des cellules granulocytaires, macrophagiques, mégacaryocytaires et érythroïdes, les CFU-GM capables de former des colonies granuleuses et macrophagiques et les BFU-E capables de former des foyers de colonies érythroïdes. Bien que la quantification des différents types de progéniteurs soit réalisée usuellement par des tests fonctionnels, leur caractérisation reste difficile en raison du peu de marqueurs disponibles et de l'hétérogénéité de cette population cellulaire. Cependant, l'étude de l'expression des molécules de surface a permis de caractériser certains progéniteurs. Ainsi, on peut distinguer les progéniteurs multipotents (MPP) (Morrison *et al.*, 1997), très précoces, capables de conduire à la fois aux progéniteurs communs aux lymphocytes (CLP) (Kondo *et al.*, 1997) et aux progéniteurs communs aux cellules myélo-érythroïdes (CMP) (Akashi *et al.*, 1999).

La caractérisation de ces progéniteurs est essentiellement basée sur l'expression de différentes molécules de surface. Des modèles de schéma de l'hématopoïèse murine et humaine sont proposés figure 3 et 4.

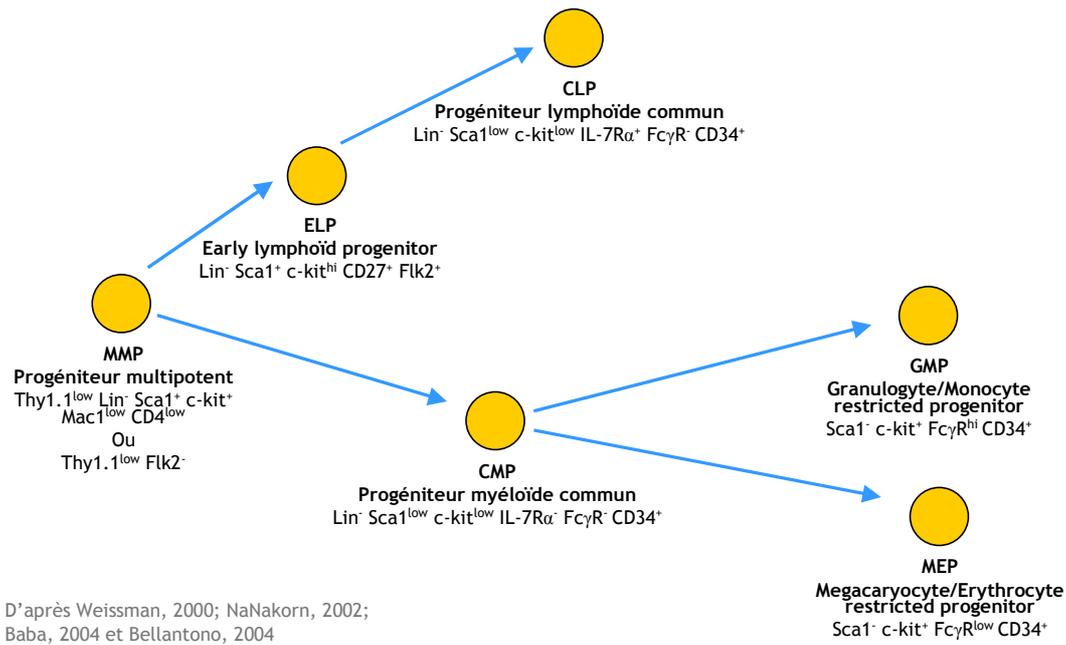


Figure 3 : Représentation schématique d'un modèle de l'hématopoïèse précoce chez la souris

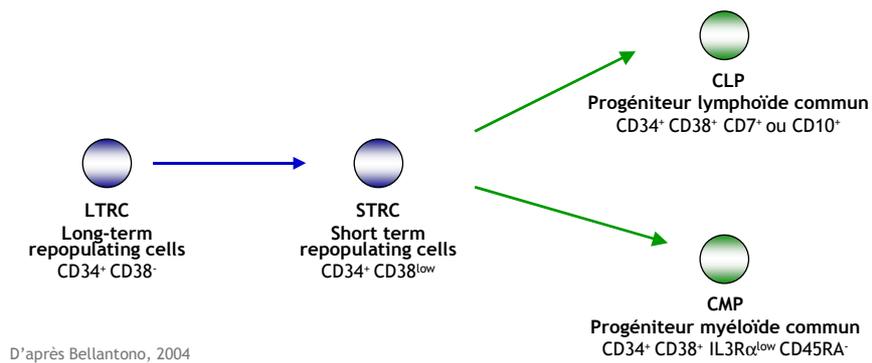


Figure 4 : Représentation schématique d'un modèle de l'hématopoïèse précoce humaine

La différenciation des progéniteurs aboutit à la formation de cellules appelées précurseurs qui représentent le dernier stade de la maturation des cellules hématopoïétiques. Ces précurseurs sont des myéloblastes, des promyélocytes éosinophiles, des promyélocytes basophiles, des monoblastes, des proérythroblastes, des mégacaryoblastes et des lymphoblastes. La maturation de ces précurseurs s'effectue par l'intermédiaire de deux phénomènes simultanés : la multiplication et l'évolution morphologique. En effet, les précurseurs ont une activité mitotique moins importante que les progéniteurs, néanmoins,

ils conservent une capacité de multiplication relative leur permettant de générer une dizaine de cellules matures à partir d'un seul précurseur. Classiquement, la maturation se caractérise par l'évolution de caractères cytologiques comme la réduction de la taille de la cellule et du rapport nucléo-plasmique, la condensation de la chromatine *etc.* Des modifications morphologiques spécifiques à chaque lignée ont également lieu au cours de la maturation des cellules circulantes telle que l'énucléation des érythroblastes. Ainsi, la maturation des précurseurs conduit à la formation de cellules circulantes matures telles que des granulocytes essentiellement neutrophiles, dont la durée de vie varie de 6 à 24 heures, mais aussi des granulocytes éosinophiles et basophiles. On trouve également des monocytes (durée de vie de 24 heures) capables de se différencier en macrophages tissulaires (durée de vie de quelques années) et des lymphocytes dont la durée de vie est variable de 24 heures à plusieurs années. Enfin, sont aussi présents dans le sang, des érythrocytes et des thrombocytes ayant respectivement des durées de vie de 120 et 7 jours.

2 Régulation de l'hématopoïèse par le micro-environnement médullaire

La prolifération et la différenciation des CSH, des progéniteurs et des précurseurs hématopoïétiques sont des mécanismes étroitement contrôlés. Particulièrement, le micro-environnement médullaire joue un rôle crucial dans la régulation de l'hématopoïèse (Wolf, 1979) en favorisant la réalisation de différents processus hématopoïétiques. Ainsi, il existe un contact très étroit entre les cellules hématopoïétiques et les cellules stromales. C'est ce micro-environnement qui fournit en grande partie aux cellules hématopoïétiques les molécules nécessaires à leur différenciation ou à leur prolifération. Ces molécules peuvent être des facteurs solubles, des molécules d'adhésion ou des molécules de la matrice extra-cellulaire dont on pensait initialement le rôle limité à une fonction architecturale mais qui ont été démontrées capables de transmettre des signaux. L'étude de l'implication majeure

du stroma médullaire dans la régulation de l'hématopoïèse a donné lieu à l'hypothèse de l'existence de niches (Schofield, 1978; Moore, 2004) pour les cellules souches hématopoïétiques capables d'influencer et de contrôler leur auto-renouvellement, et leur engagement vers une différenciation (Figure 5).

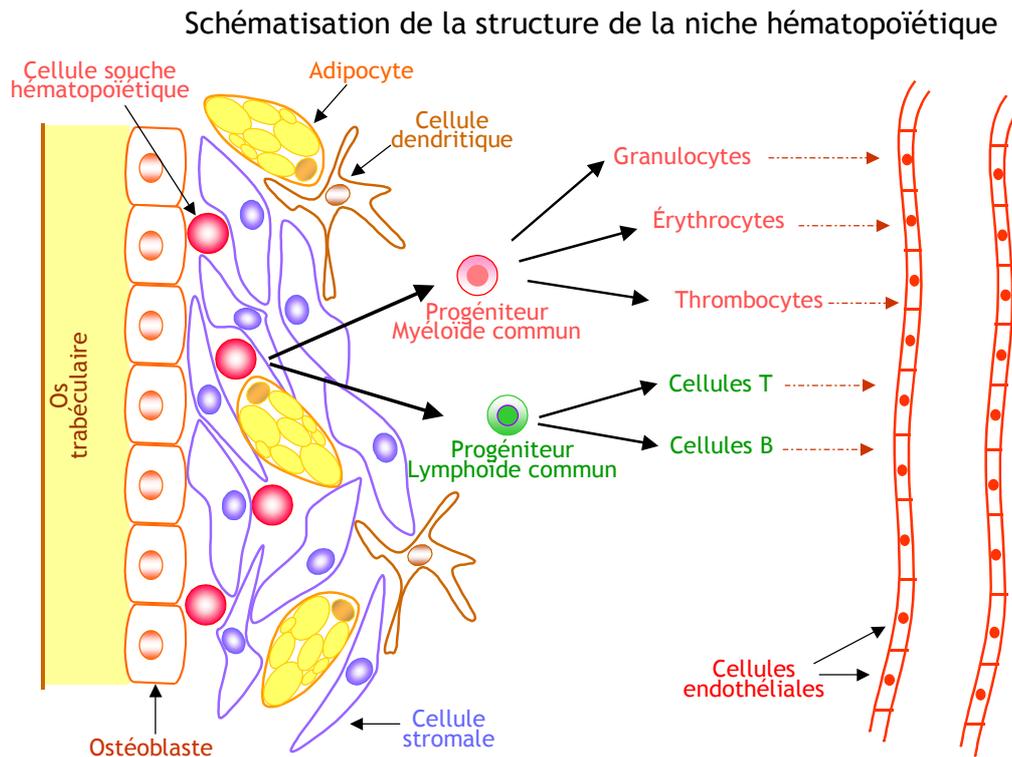


Figure 5 : Représentation schématique de la structure de la niche hématopoïétique.

2.1 Les cellules stromales médullaires

Le stroma médullaire est composé principalement de cinq types cellulaires comprenant des cellules fibroblastiques et myofibroblastiques, des adipocytes, des cellules endothéliales, des ostéoblastes et des macrophages (Andreoni *et al.*, 1990; Wilkins et Jones, 1995). Les fibroblastes, les adipocytes et les ostéoblastes peuvent se différencier à partir d'une même population cellulaire : les cellules souches mésenchymateuse (CSM) (Pittenger *et al.*, 1999). Ces CSM sont identifiables par un test fonctionnel (recherche de CFU-F) (Castro-Malaspina *et al.*, 1980) et par l'expression d'antigènes de surfaces tels que Stro-1, Thy-1,

VCAM-1, l'endogline, la sous-unité alpha1 de l'intégrine, et MUC18/CD146 et peuvent s'engager vers une voie de différenciation sous l'influence de différents facteurs (Dennis et Charbord, 2002). Il est important de noter qu'une particularité de ces cellules serait d'avoir la capacité de se transdifférencier d'un type cellulaire vers un autre (Dennis et Charbord, 2002).

2.1.1 Les fibroblastes médullaires

Les fibroblastes et les myofibroblastes médullaires ont été largement étudiés *in vitro* dans des cultures de moelle osseuse à long terme. Ces cellules représentent une fraction importante des cellules stromales dans les cultures de moelle osseuse (Charbord *et al.*, 1990; Galmiche *et al.*, 1993). De plus, elles ont été retrouvés *in vivo* au niveau de la moelle osseuse humaine (Charbord *et al.*, 1996) et murine (Weiss et Geduldig, 1991). Ces cellules sont capables de soutenir l'hématopoïèse *in vitro* (Moreau *et al.*, 1993; Tamayo *et al.*, 1994). En effet, il a été montré que les fibroblastes de moelle osseuse produisaient un grand nombre de molécules capables d'induire la prolifération et la maturation des progéniteurs hématopoïétiques (Charbord *et al.*, 1991; Verfaillie, 1993; Lisovsky *et al.*, 1996a). De plus, les fibroblastes médullaires produisent également un grand nombre de protéines entrant dans la constitution de la matrice extra-cellulaire tels que la laminine, la fibronectine ou le collagène (de type I, III et IV). Ces molécules ont pu être détectées dans de nombreuses études de cultures de moelle osseuse à long terme (Andreoni *et al.*, 1990; Wilkins et Jones, 1995; Rougier *et al.*, 1996).

2.1.2 Les adipocytes médullaires

Les cellules adipeuses sont caractérisées par la présence intra-cytoplasmique de vacuoles lipidiques. Les adipocytes médullaires sont relativement similaires aux adipocytes extra-médullaires, néanmoins, ils s'en distinguent par leur forte activité estérasique (Tavassoli, 1989). La fonction précise des adipocytes dans la moelle osseuse reste mal définie.

Initialement décrits comme éléments architecturaux au sein de la moelle osseuse, les adipocytes semblent être en mesure de jouer un rôle important dans l'hématopoïèse. En effet, ces cellules pourraient constituer une réserve en métabolites énergétiques nécessaire à l'hématopoïèse (Hussain *et al.*, 1989). De même, les adipocytes, capables de sécréter des molécules lipidiques telles que des acides gras ou des esters de cholestérols, pourraient fournir les molécules nécessaires à la constitution des membranes plasmiques des cellules en cours de différenciation (Tavassoli, 1989). D'autres études ont également suggéré un rôle dans la régulation de l'hématopoïèse. Ainsi, il a été montré que les adipocytes pouvaient produire des quantités importantes de leptine (Laharrague *et al.*, 1998). Cette molécule est capable d'induire une production de colonies érythroïdes et granulo-monocytaire à partir des précurseurs hématopoïétiques qui portent son récepteur (Mikhail *et al.*, 1997; Umemoto *et al.*, 1997). Plus récemment, il a été démontré que l'adiponectine, hormone produite par les adipocytes, est capable d'influencer la lymphopoïèse (Yokota *et al.*, 2003) et que les adipocytes pouvaient diriger les progéniteurs immatures vers une différenciation complète (Corre *et al.*, 2004). Ainsi, les adipocytes médullaires bien que peu étudiés semblent jouer un rôle non négligeable dans la régulation de l'hématopoïèse comme cela avait été suggéré (Laharrague *et al.*, 1999). Cette hypothèse est corroborée par le fait que plusieurs lignées cellulaires stromales présentant des vacuoles lipidiques, comme la lignée MS-5 (Issaad *et al.*, 1993), sont capables de supporter l'hématopoïèse (Suzuki *et al.*, 1992; Hangoc *et al.*, 1993).

2.1.3 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales constituent la paroi des vaisseaux sanguins. Elles jouent en outre un rôle de barrière entre les cellules médullaires et la circulation générale, en particulier au niveau des nombreux sinus vasculaires (zones d'échanges) situés à proximité des territoires médullaires. Les cellules endothéliales expriment un certain nombre de marqueurs tels que le Von Willebrand Factor (VWF), le CD31 ou le CD34. Néanmoins,

l'expression de certaines glycoprotéines de surface varie en fonction de l'organe considéré (Belloni et Nicolson, 1988). Ainsi, les cellules endothéliales de veine ombilicale (HUVEC) expriment peu la molécule VCAM-1 tandis que celles de la moelle osseuse l'expriment fortement (Masek et Sweetenham, 1994). De plus, il a été montré que les cellules CD34+ adhèrent en plus grand nombre aux cellules endothéliales de moelle osseuse qu'aux cellules HUVEC (Rafii *et al.*, 1994). Ainsi, les cellules endothéliales de moelle osseuse présentent des caractéristiques différentes de leurs homologues d'autres origines (Schweitzer *et al.*, 1997). Il a été largement documenté que les cellules endothéliales de moelle osseuse étaient capables de produire un grand nombre de cytokines et de facteurs de croissance hématopoïétiques en situation physiologique (Abboud, 1995), comme en réponse à un stress (Gaugler *et al.*, 1998; Girard *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que les cellules endothéliales de moelle osseuse étaient capables de soutenir l'hématopoïèse *in vitro* (Rafii *et al.*, 1995; Jazwiec *et al.*, 1998; Gaugler *et al.*, 2001). Ainsi, les cellules endothéliales interviennent largement dans la régulation de l'hématopoïèse.

2.1.4 Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules du tissu osseux provenant de la différenciation de cellules souches du stroma médullaire, autrement appelées cellules souches mésenchymateuses. La majorité de ces cellules se trouvent dans une zone située entre la bordure de l'os et le tissu hématopoïétique, appelée l'endosteum (Gong, 1978; Lord, 1990). Leur rôle principal est de synthétiser, de minéraliser et de renouveler la matrice osseuse durant la croissance et la vie d'un organisme (Marie, 2001). Ainsi, ces cellules synthétisent un grand nombre de protéines matricielles telles que le collagène de type 1, la fibronectine, l'ostéopontine, l'ostéocalcine *etc.* Bien que l'implication du stroma médullaire dans l'hématopoïèse ait été suggérée précocement (Wolf, 1979) et que les ostéoblastes entrent dans la constitution de ce stroma, peu d'études se sont intéressées, au départ, au rôle potentiel de ces cellules dans la régulation de l'hématopoïèse.

Cependant, depuis quelques années, il est connu que les ostéoblastes sont capables de supporter l'hématopoïèse *in vitro* (Taichman et Emerson, 1994; Taichman *et al.*, 1996). De plus, il a été démontré que ces cellules produisent un grand nombre de protéines pouvant stimuler ou inhiber la prolifération des cellules hématopoïétiques (Taichman, 2005). Ainsi, les ostéoblastes prennent part, au même titre que les autres types cellulaires stromaux, à la régulation de l'hématopoïèse.

2.2 Molécules qui interviennent dans la régulation de l'hématopoïèse

Les cellules stromales ont le potentiel de stimuler ou d'inhiber l'hématopoïèse via différentes cytokines solubles ou membranaires ou via la production de molécules d'adhésion. De plus, la matrice extra-cellulaire, produite par les cellules stromales intervient également dans la régulation de l'hématopoïèse. De très nombreux facteurs de croissance et cytokines, qui augmentent ou diminuent la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques ont été décrits (Watowich *et al.*, 1996; Veiby *et al.*, 1997). En raison du grand nombre de ces facteurs et de la multiplicité de leurs implications dans l'hématopoïèse, il est difficile d'en faire une liste exhaustive. C'est pourquoi seuls les facteurs principaux seront développés ici pour exemple.

2.2.1 Les principaux facteurs de croissance

De nombreux facteurs de croissance ont été identifiés dans les cultures de moelle osseuse à long terme. Comme cela a été évoqué, ces facteurs de croissance sont produits par le micro-environnement médullaire mais aussi par les cellules hématopoïétiques elles-mêmes. Globalement, ces facteurs de croissance peuvent être regroupés en quatre catégories : des facteurs maturants spécifiques d'une lignée cellulaire, des facteurs à spectre d'action plus large, des facteurs de croissance à action précoce et des facteurs inhibiteurs de l'hématopoïèse.

Parmi les facteurs maturants, on trouve, entre autres, l'érythropoïétine (Epo). Elle est synthétisée principalement par les cellules interstitielles du rein et agit spécifiquement en stimulant les précurseurs érythoïdes particulièrement en induisant la synthèse de globine (Fratantoni, 1998). Un exemple de facteur de croissance à spectre d'action plus large est le GM-CSF. Il est produit par plusieurs types cellulaires tels que les lymphocytes T, les monocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes ou les ostéoblastes. Cette production peut être spontanée ou induite par le $TNF\alpha$, l'IL-1, ou l'irradiation (Kittler *et al.*, 1992; Gaugler *et al.*, 1998). Le GM-CSF agit principalement sur la prolifération et la différenciation des lignées granulocytaires et macrophagiques (Nicola *et al.*, 1983), mais est aussi capable d'induire la différenciation des mégacaryocytes, des éosinophiles et, en présence d'érythropoïétine, des érythrocytes. Parmi les facteurs de croissance à action précoce, on trouve notamment le Stem Cell Factor, le Flt3-Ligand et la thrombopoïétine (TPO). Bien que la TPO fut initialement considérée comme un facteur agissant sur les cellules engagées vers une différenciation mégacaryocytaire (Lok et Foster, 1994; Farese *et al.*, 1995; Kaushansky *et al.*, 1995), il a été récemment démontré qu'elle pouvait induire une prolifération des CSH (Kimura *et al.*, 1998; Kirito *et al.*, 2005). Le Flt3-Ligand, ses co-facteurs, ses rôles et ses implications seront développés dans une partie ultérieure. Il existe également un certain nombre de facteurs capables d'inhiber l'hématopoïèse (Moore, 1991), par régulation de l'auto-renouvellement, de la prolifération et de la différenciation des CSH. Ils peuvent agir directement sur les CSH ou indirectement en modulant la sécrétion de facteurs de croissance par d'autres populations cellulaires. Parmi ces facteurs inhibiteurs on trouve, entre autres, les prostaglandines (PG de type E) et certaines cytokines telle que le $TNF\alpha$, les interférons et le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) (Fortunel *et al.*, 2000).

2.2.2 Molécules d'adhésion et micro environnement médullaire

Les cellules souches ont des interactions directes et relativement spécifiques avec la matrice extra-cellulaire (MEC) et les cellules stromales présentes dans la moelle osseuse (Simmons *et al.*, 1994; Papayannopoulou et Craddock, 1997). Ces interactions sont principalement responsables du maintien des CSH dans la moelle osseuse. Néanmoins, elles permettent également la transmission de signaux qui modulent la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les progéniteurs hématopoïétiques expriment plus de 20 récepteurs d'adhésions différents (Coulombel *et al.*, 1997; Simmons *et al.*, 1997). Parmi ces molécules, on trouve des intégrines responsables de l'adhésion cellulaire à la MEC telles que la fibronectine, la laminine ou le collagène (Verfaillie *et al.*, 1991), des sélectines ou CAM (cell adhesion molecules) telles que ICAM ou VCAM (Simmons *et al.*, 1992) (Teixido *et al.*, 1992), des molécules de la famille des « immunoglobulin-like » telle que PECAM-1 (Watt *et al.*, 1993) et des sialomucines telles que CD34, CD43, CD45RA, PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) ou CD164 (Verfaillie, 1998). De nombreuses études ont démontré que ces molécules avaient d'importants effets sur la survie et la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques mettant ainsi en évidence que l'hématopoïèse est régulée à la fois par des molécules solubles, des molécules membranaires et par des contacts intercellulaires.

3 Effet d'une irradiation sur l'hématopoïèse

L'irradiation induit une aplasie médullaire c'est à dire une réduction importante du nombre de CSH et de progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse. De façon générale ce type d'atteinte hématopoïétique peut être spontanée (anémie de Fanconi, hépatite virale) ou induite par des agents aplasants tels que les anti-mitotiques ou les rayonnement ionisants.

La moelle osseuse est un organe hiérarchisé qui comporte un grand nombre de cellules en cours de prolifération. C'est pourquoi elle fait partie des tissus les plus radiosensibles.

Cependant, les différentes cellules hématopoïétiques n'ayant pas la même capacité de prolifération, elles n'ont pas toutes la même radiosensibilité.

Les CSH sont généralement quiescentes, et par conséquent relativement radiorésistantes (Gothot *et al.*, 1997). Cependant, ces cellules présentent une radiosensibilité, au même titre que les cellules germinales, liée à la nécessité impérative de préserver l'intégrité génomique afin d'assurer la pérennité du tissu (Wright, 1998). Ainsi, la perte cellulaire radio-induite, principalement consécutive à une altération du génome, peut passer par un phénomène d'apoptose radio-induite dépendant des caspases et/ou du couple Fas/FasL (Domen, 2000; Dainiak, 2002). Par ailleurs, la courbe de survie des CFU-S de souris suit un modèle concave multiphasique autrement appelé modèle quadratique linéaire suggérant l'existence d'une catégorie de cellules résistantes même aux fortes doses (Inoue *et al.*, 1995). Ainsi, il a été montré que la D_0 (dose d'irradiation entraînant 37% de survie clonogénique) des CFU-S murines était de 0,95 Gy après exposition gamma, mais qu'une fraction de ces cellules (environ 1 pour $2 \cdot 10^6$ cellules) était radiorésistante jusqu'à 6 Gy (Inoue *et al.*, 1995; Dainiak, 2002). Les progéniteurs hématopoïétiques sont des cellules à fort index prolifératif ce qui en fait une population cellulaire très radiosensible dont la diminution radio-induite est essentiellement causée par de l'apoptose (Drouet *et al.*, 1999; Domen, 2000; Dainiak, 2002). A l'inverse, les précurseurs hématopoïétiques sont plus radiorésistants en raison de leur faible index mitotique. Enfin, hormis les lymphocytes, les cellules différenciées ne possèdent pas, normalement, de pouvoir prolifératif ce qui les rend relativement radiorésistantes (Fliedner *et al.*, 1988; Escribano *et al.*, 1998; Dainiak, 2002). Ceci explique que la diminution du nombre des cellules circulantes n'intervient qu'après un délai qui correspond à la durée de vie moyenne de ces populations. La pancytopénie radio-induite est donc la conséquence d'un arrêt de production de cellules matures et non pas d'une mort cellulaire radio-induite des éléments figurés du sang (Figure 6). La population lymphocytaire, en revanche, est l'une des plus radiosensible de l'organisme (Tubiana et Lalanne, 1963) et très sensible à l'apoptose. Récemment, il a été

montré que les lymphocytes précoces ($CD4^+ CD8^+$) étaient plus radiosensibles que les lymphocytes plus matures ($CD4^- CD8^+$) (Grayson *et al.*, 2002; Wilkins *et al.*, 2002).

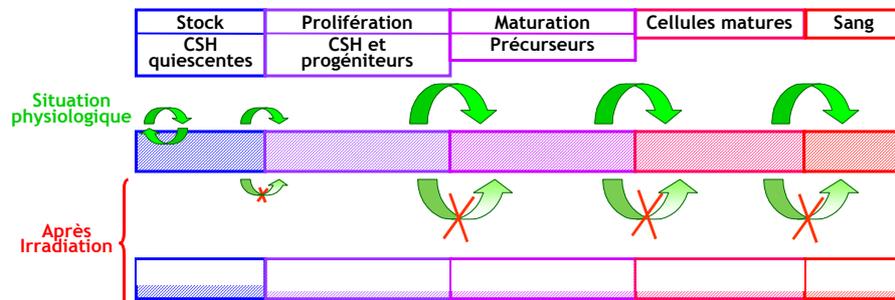


Figure 6 : Représentation schématique de l'effet d'une irradiation sur la production de cellules circulantes matures.

Globalement, les rayonnements ionisants affectent largement l'hématopoïèse directement en provoquant une diminution du nombre des cellules les plus immatures. Cependant, l'irradiation induit également une modification du micro-environnement médullaire. Bien que les cellules stromales matures soient relativement radiorésistantes (Laver *et al.*, 1986; Yamazaki et Allen, 1991). Il a été mis en évidence qu'une ICT induit une diminution du nombre de CFU-F dans la moelle osseuse des animaux exposés (Mahmud *et al.*, 2004). De plus, il a été démontré que des cellules stromales murines irradiées à 5 Gy, perdent partiellement leur capacité à soutenir l'hématopoïèse (Tavassoli, 1982). De plus, l'irradiation des progéniteurs du stroma médullaire induit une perte de la capacité de prolifération de ces cellules qui conduit à une modification du micro-environnement médullaire, par défaut de renouvellement des cellules matures (Grande et Bueren, 1994). Ainsi, l'irradiation du stroma médullaire affecte la régulation de l'hématopoïèse par la modification de l'expression des facteurs de croissance et des composants de la matrice extra-cellulaire (Laver, 1989; Fliedner *et al.*, 2002).

Ainsi, dans les heures qui suivent une irradiation corporelle, une baisse brutale des progéniteurs hématopoïétiques est observée (Drouet *et al.*, 2004). Il en résulte un

appauvrissement du compartiment médullaire en cellules en cours de prolifération et de différenciation, puis un arrêt de production d'éléments figurés du sang (Dainiak, 2002) menant à une pancytopénie radio-induite dont la sévérité est liée à la profondeur de l'aplasie médullaire. La capacité de récupération hématopoïétique d'un patient sera donc strictement liée au nombre de CSH survivantes à l'irradiation. Cependant, ceci doit être modulé dans le cas de patients présentant un SIA impliquant plusieurs organes pouvant influencer sur la récupération hématopoïétique.

4 Différentes situations d'irradiations

L'aplasie médullaire radio-induite peut être consécutive à une radiothérapie ou à un accident d'irradiation.

4.1 Irradiations thérapeutiques

L'utilisation thérapeutique des rayonnements ionisants est très ancienne. C'est en 1896, année de la découverte de la radioactivité naturelle par H.Becquerel (Becquerel, 1896), que les rayonnements ionisants ont été utilisés pour la première fois chez un patient présentant un cancer de l'estomac et chez un enfant présentant une tumeur cutanée. Néanmoins, ces essais restaient des épiphénomènes, jusqu'à la fondation de l'Institut du Radium en 1913 et la structuration de la radiothérapie en 1920, par Marie Curie. Depuis, l'irradiation thérapeutique est très largement utilisée avec de multiples indications dont 95% sont des affections cancéreuses. En effet, la radiothérapie est couramment utilisée dans le traitement des tumeurs solides et dans le contrôle des métastases, seule ou en association avec une chimiothérapie (Cosset, 1998) et/ou une chirurgie. Dans un autre cadre thérapeutique, l'irradiation corporelle totale fait partie du conditionnement du patient en vue de greffe de moelle osseuse (Thomas *et al.*, 1976; Cosset *et al.*, 1994). Au-delà de l'effet anti-tumoral, ce traitement a pour objectif de créer une immunodépression sévère afin de favoriser la prise de greffe et de limiter les risques de rejet. Compte tenu

des larges indications de l'utilisation thérapeutique des rayonnements ionisants, on estime qu'environ 100000 patients sont irradiés chaque année en France.

Comme cela a été évoqué au paragraphe précédent, la radiothérapie induit une aplasie médullaire associée à une leucopénie et une thrombopénie plus ou moins sévères selon la dose délivrée et le volume médullaire inclus dans le champ d'irradiation. Dans certains cas, l'atteinte médullaire qui se traduit par une pancytopenie profonde conduit à une suspension du traitement afin de ne pas créer de dommages irréversibles à la moelle osseuse. Il reste néanmoins difficile d'estimer la sévérité de cette atteinte médullaire radio-induite. De plus, une même irradiation n'a pas obligatoirement les mêmes conséquences en termes de profondeur et de durée d'aplasie chez deux patients distincts. En effet, il semble y avoir des différences de radiosensibilité d'un organisme à l'autre (Franko *et al.*, 1991; Weil *et al.*, 1996; Iwakawa *et al.*, 2003). C'est pourquoi il est particulièrement problématique d'évaluer individuellement et simplement l'hématopoïèse résiduelle pendant le traitement. Dans ce cadre, l'utilisation d'un bio-indicateur pourrait renseigner spécifiquement sur le statut médullaire.

4.2 Irradiations accidentelles

Malgré le nombre important de personnes exposées (patients, personnels médicaux, travailleurs du nucléaire), la fréquence des accidents d'irradiation reste très faible. Néanmoins, hormis l'accident de Chernobyl, on estime aujourd'hui qu'environ 400 accidents d'irradiation ont eu lieu depuis les années 60 conduisant à plusieurs milliers de victimes et environ 180 décès (Nenot, 1990; Chambrette *et al.*, 2001; Cosset et Gourmelon, 2002). Les situations d'irradiations accidentelles sont particulièrement délicates à appréhender dans la mesure où, le plus souvent, plusieurs organes sont mis en cause. Ainsi, il est particulièrement difficile de traiter un irradié accidentel comme l'a démontré l'accident de criticité de Tokai-Mura (Sasaki *et al.*, 2001). Ces réactions de fission incontrôlées ont causé l'irradiation de 49 personnes dont 3 ont été fortement

exposés. Le patient le plus gravement irradié présentait une défaillance multiple des organes difficilement traitable qui a conduit à son décès. Ainsi, après une irradiation accidentelle, le problème réside essentiellement dans la difficulté d'estimer les dommages radio-induits d'une part, et la capacité de récupération des tissus exposés d'autre part. Ce manque d'information est particulièrement gênant au niveau du système hématopoïétique. En effet, le choix d'un traitement de soutien (par antibiothérapie et par perfusion d'électrolytes, de fluides et/ou transfusion de cellules circulantes) ou d'aide au redémarrage de l'hématopoïèse (par injection de cytokines) ne peut être fait que s'il existe un nombre suffisant de CSH et de progéniteurs aptes à la reconstitution hématopoïétique. De même, une greffe de moelle osseuse ne doit être pratiquée que chez des patients présentant une éradication profonde de la moelle osseuse afin de limiter les risques de rejet de greffe ou de réaction du greffon contre l'hôte. Il est donc capital, dans le choix du traitement, d'être en mesure de quantifier l'hématopoïèse résiduelle chez le patient considéré. Cette évaluation pourrait être réalisée simplement si nous disposions d'un bio-indicateur du statut médullaire.

4.3 Un bio-indicateur possible d'atteinte radio-induite à la moelle osseuse :

Le Flt3-Ligand

4.3.1 FLT3/FLT3-Ligand: structures et fonctions

4.3.1.1 FLT3-Ligand: structure et cellules productrices

Le Flt3-ligand (fms-like tyrosine kinase 3 ligand ou FL) est une cytokine à action précoce. Elle a été découverte initialement chez la souris (Lyman *et al.*, 1993a), puis simultanément par deux équipes chez l'homme (Hannum *et al.*, 1994; Lyman *et al.*, 1994). Le gène est porté par les chromosomes 7 chez la souris et 19 chez l'homme (Lyman *et al.*, 1995c) avec une taille de 4 kb et 5,9 kb respectivement. Les séquences nucléotidiques présentent une identité de 76% entre ces deux espèces (Lyman *et al.*, 1994). Chez la souris, comme chez l'homme, le gène est constitué de 8 exons codants dont les tailles et les séquences se sont

bien conservées au cours de l'évolution et de deux exons non codants qui participent à la variabilité des ARNm codant le FL (Figure 7). Ainsi, les cinq premiers exons codent la séquence protéique active, l'exon 6 porte un codon stop qui conduit à la forme soluble de la protéine, l'exon 7 code la partie transmembranaire et une partie du domaine cytoplasmique, et enfin, l'exon 8 code la seconde partie du domaine cytoplasmique.

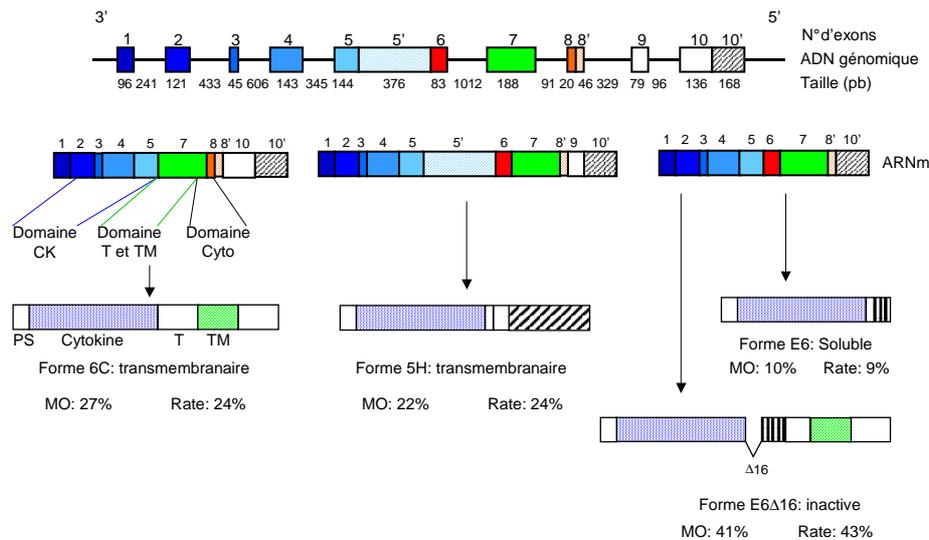


Figure 7 : schéma de l'organisation du gène murin codant le FL, des épissages alternatifs de l'ARNm et de structure des quatre formes possibles de la protéine. En haut : organisation de l'ADN génomique, avec les tailles d'introns et d'exons indiquées en dessous. Les exons hachurés sont non codants. Au milieu : les trois formes d'épissage alternatif de l'ARN messenger, qui donnent (de gauche à droite) la forme 6C transmembranaire, la forme 5H transmembranaire également et qui n'a pas été retrouvée chez l'homme, la forme E6 directement soluble, et la forme E6Δ16, qui comporte une délétion de 16 paires de bases incluant une cystéine formant un pont di-sulfure indispensable pour l'activité de la cytokine. Cette forme est donc inactive. En bas : pourcentages relatifs d'expression de chacune des formes de l'ARN messenger dans la moelle osseuse et la rate chez le souris. CK : cytokine, T : tether, TM : transmembranaire, Cyto : cytoplasmique, PS : peptide signal. D'après (Lyman et al., 1995c) et (McClanahan et al., 1996).

Un épissage alternatif de l'ARNm permet la production de différentes formes de la molécule (Lyman *et al.*, 1995a), avec quatre formes majoritaires chez la souris dont une forme soluble produite par un réarrangement de l'exon 6 et trois formes membranaires produites par excision de l'exon 6 et réarrangement différentiel des exons 7 et 10 (Lyman *et al.*, 1995a; Lyman *et al.*, 1995c). Chez l'homme, toutes les formes de la protéine existent à l'exception de l'une des formes membranaires, la forme 5H (Figure 7).

La protéine membranaire est constituée de 235 acides aminés (aa) avec deux sites de N-glycosylation et quatre résidus cystéines. Elle est constituée d'une partie COOH terminale intra-cytoplasmique (30 aa), d'une partie transmembranaire (23 aa), et d'une partie N-terminale extracellulaire (156 aa) comprenant la partie active de la molécule capable de se lier au récepteur. Les protéines humaine et murine présentent 72% d'identité de séquence (Lyman *et al.*, 1994). Le relargage de la cytokine depuis la surface membranaire se ferait par clivage protéolytique, bien que cela n'ait pas été formellement démontré, et permettrait de libérer dans le milieu une protéine monomérique de 34 kD (McClanahan *et al.*, 1996; Chklovskaja *et al.*, 1999). Cependant, un épissage alternatif de l'ARNm permet le relargage d'une forme homodimérique soluble de 64 kD dans différents types cellulaires (McClanahan *et al.*, 1996).

Il est remarquable que la structure protéique du FL présente de grandes similitudes avec celle de deux autres cytokines : le M-CSF (ou CSF-1) et le SCF (Hannum *et al.*, 1994; Lyman *et al.*, 1994). Cette homologie de structure est associée à une homologie de fonction et d'activité biologiques (Lyman et Jacobsen, 1998).

La recherche de l'ARN messenger codant le FL a permis de montrer que la production de cette cytokine est relativement ubiquitaire dans l'organisme. En effet, chez l'homme, le messenger codant le FL a été retrouvé dans la moelle osseuse, dans le thymus, dans les organes lymphoïdes secondaires (Lyman *et al.*, 1994), et chez la souris dans la moelle osseuse, la rate, le thymus, mais également à plus faible niveau dans le foie, le cerveau et

les poumons (Hannum *et al.*, 1994). L'expression relative des différentes formes de l'ARN messenger est présentée dans la figure 7. Les cellules capables de produire du FL ont été identifiées essentiellement par l'étude *in vitro* de lignées cellulaires. Ces études ont montré que les lignées lymphocytaires T et B (Brasel *et al.*, 1995; Meierhoff *et al.*, 1995), ainsi que différentes lignées de cellules stromales de souris (Lisovsky *et al.*, 1996a) expriment l'ARNm codant le FL. Plus récemment, il a été montré que le FL est produit également par les cellules endothéliales (Solanilla *et al.*, 2000b). Cette production de FL peut être constitutive ou induite par différents facteurs tels que le TGF- β , IFN- α , le MIP-1 α (Solanilla *et al.*, 2000b) ou le ligand du CD40, le CD154 (Solanilla *et al.*, 2000a). De même, la stimulation des lymphocytes T via la chaîne γ commune aux récepteurs de l'IL-2, de l'IL-4, de l'IL-7 et de l'IL-15 induit le relargage de FL soluble à partir d'un réservoir intracytoplasmique (Chklovskaja *et al.*, 2001). De plus, le FL est également produit par les cellules stromales médullaires après induction par le TNF- α (Dormady *et al.*, 2001), l'IL-1 (Lisovsky *et al.*, 1996a) ou le couple IL-6/IL-6 récepteur soluble (Peters *et al.*, 2001). Il apparaît donc clairement que le FL est une cytokine produite de façon induite ou constitutive par un grand nombre de cellules dans l'ensemble de l'organisme.

4.3.1.2 Le récepteur Flk2/Flt3

Au regard de cette production ubiquitaire de la cytokine, il est intéressant d'observer que l'expression du récepteur du FL, la molécule Flk2/Flt3, est quant à elle beaucoup plus restreinte (Rappold *et al.*, 1997). Le gène codant pour le récepteur Flk2/Flt3 a été cloné en 1991 chez la souris (Matthews *et al.*, 1991; Rosnet *et al.*, 1991a) et en 1993 chez l'homme (Rosnet *et al.*, 1993). Le gène est porté par le chromosome 13q12 chez l'homme (Rosnet *et al.*, 1991b), et comporte 24 exons sur une longueur de 96 kb. Il a été montré très rapidement que l'expression de l'ARNm codant pour ce récepteur est restreinte aux cellules hématopoïétiques et lymphoïdes immatures chez la souris (Matthews *et al.*, 1991) et chez l'homme (Rosnet *et al.*, 1993). Le Flt3 humain est une protéine de 993 acides

aminés, dont la forme mature fait 155Kd (Lyman *et al.*, 1993b). La structure de cette protéine en fait clairement un membre de la famille des récepteurs à tyrosine kinase de type III, comme le c-kit (récepteur du SCF), le c-fms (récepteur du M-CSF ou CSF-1 colony stimulating factor-1) et les chaînes α et β du récepteur du PDGF (platelet-derived growth factor). Le récepteur comporte cinq domaines « immunoglobulin-like » dans sa partie extra-cellulaire, avec les trois domaines distaux impliqués dans le site de liaison à la cytokine, et les deux domaines proximaux impliqués dans la dimérisation du récepteur (Figure 8). La molécule comporte ensuite une partie transmembranaire et deux domaines tyrosine kinase séparés par un domaine interkinase. La partie intracytoplasmique de la molécule comporte 23 résidus tyrosine (Rosnet *et al.*, 1991a; Dosil *et al.*, 1993).

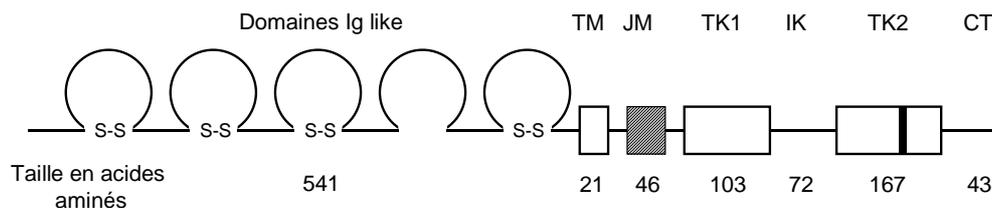


Figure 8 : Structure du récepteur du FL, la protéine Flt3. La partie extra cellulaire est composée de 5 domaines « immunoglobulin-like », suivie de la partie transmembranaire (TM) et de la partie juxtamembranaire (JM) dans laquelle se localisent les duplications en tandem conduisant à une autophosphorylation du récepteur (zone hachurée). Les deux zones à activité tyrosine kinase (TK1 et TK2) sont dans la partie COOH terminale (CT) du récepteur. L'acide aspartique de la TK2 dont la substitution conduit à une auto-activation du récepteur est indiqué par le trait vertical. D'après Fichelson, 1998.

Les études de l'activation cellulaire via le récepteur Flt3 ont montré une succession d'étapes classiquement décrites pour les tyrosines kinases de Type III. La fixation du ligand au récepteur induit une dimérisation du récepteur, et la juxtaposition des domaines intracytoplasmiques rend possible la transphosphorylation des résidus tyrosine du dimère.

Le signal est ensuite transmis soit par la voie des inositol phosphates 3' kinases (IP3K), soit par d'autres voies IP3K indépendantes, dans les lymphocytes B notamment (Rosnet *et al.*, 1996).

4.3.1.3 Activités du Flt3-Ligand

La cytokine étant produite de façon ubiquitaire dans l'organisme, c'est l'expression restreinte du récepteur Flk2/Flt3 qui gouverne son éventail d'activités. Peu de travaux ont considéré l'expression de la protéine Flt3, néanmoins, il a été montré que l'expression de son ARNm est limitée aux cellules hématopoïétiques et aux thymocytes immatures (Matthews *et al.*, 1991; Rossner *et al.*, 1994). Ainsi, 63 à 82% des cellules CD34⁺ de moelle osseuse, 88 à 95% des cellules CD34⁺ de sang de cordon et 90% des thymocytes portent le récepteur au FL (Rappold *et al.*, 1997; Bertho *et al.*, 2000). C'est pourquoi le FL agit essentiellement en induisant la prolifération des cellules hématopoïétiques immatures des lignées myéloïdes (Lyman *et al.*, 1993a; Hannum *et al.*, 1994; Lyman *et al.*, 1994) et lymphoïdes (Hunte *et al.*, 1996; Ray *et al.*, 1996; Bertho *et al.*, 2000), souvent en synergie avec d'autres cytokines comme le SCF sur les progéniteurs myéloïdes (Hannum *et al.*, 1994) ou lymphoïdes B (Hunte *et al.*, 1996) et l'IL-7 sur les progéniteurs intra-thymiques (Bertho *et al.*, 2000). Le FL agit également sur la différenciation des monocytes et des progéniteurs lymphoïdes en cellules dendritiques aussi bien *in vitro* (Siena *et al.*, 1995) que *in vivo* (Maraskovsky *et al.*, 1996), et sur la prolifération et la différenciation des progéniteurs lymphocytaires B en synergie avec l'IL-7 et l'IL-11 (Hunte *et al.*, 1996; Ray *et al.*, 1996). L'importance du FL dans la prolifération des cellules hématopoïétiques immatures et dans la différenciation de certaines lignées cellulaires a été confirmée chez les souris KO pour le gène codant le FL. En effet, ces animaux présentent un déficit profond affectant les progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes de la moelle osseuse, les cellules dendritiques et les cellules « natural killer » (NK) (McKenna *et al.*, 2000). De plus,

le nombre de cellules T présentes dans leurs tissus lymphoïdes est également réduit, bien que la cellularité thymique ne soit pas modifiée.

Cet éventail d'activités, décrites essentiellement *in vitro* a suscité un très grand intérêt pour cette cytokine, essentiellement dans deux buts : d'une part, l'expansion *ex vivo* des cellules hématopoïétiques et d'autre part des essais de stimulation de l'hématopoïèse par injection du FL. Dès les premières études sur les activités biologiques du FL, son activité hématopoïétique a été mise en évidence (McKenna *et al.*, 1995). En effet, il a été rapidement montré que le FL agit *in vitro* sur les cellules hématopoïétiques les plus immatures surtout en synergie avec d'autres facteurs comme l'IL-3, le GM-SCF, le SCF et l'IL-6 (Rusten *et al.*, 1996). Il a également été montré *in vitro* que le FL, en association avec d'autres cytokines, permet de diminuer l'apoptose radio-induite des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques (Drouet *et al.*, 1999) et est capable d'induire la prolifération des cellules souches CD34⁺CD38⁻ quiescentes, là encore essentiellement en synergie avec d'autres facteurs (Shah *et al.*, 1996). Cette dernière étude a également montré que le FL agit d'autant moins que les cellules hématopoïétiques sont matures. Ainsi, l'activité du FL diminue d'un facteur deux sur les cellules CD34⁺CD38⁺ par comparaison avec les cellules CD34⁺CD38⁻. Clairement, le FL est devenu un facteur incontournable de toutes les études sur la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques et sur l'expansion *ex vivo* de ces cellules (Bertho *et al.*, 2002; Heike et Nakahata, 2002; Norol *et al.*, 2002).

Cette action du FL sur les cellules immatures de la moelle osseuse a conduit à différents essais d'injection de la cytokine dans différentes situations. Chez la souris, des injections de FL durant 15 jours ont montré une augmentation très importante de tous les compartiments hématopoïétiques, dans la moelle osseuse, la rate et le sang périphérique (Brasel *et al.*, 1996), ce qui a suggéré une utilisation possible comme facteur de mobilisation des cellules souches. Ceci a été confirmé par une autre étude, en utilisant

une combinaison de FL et de G-CSF durant 5 à 7 jours chez le primate non humain (Papayannopoulou *et al.*, 1997). Cependant, dans tous les cas, une déplétion transitoire de la moelle osseuse a été observée. Par la suite, des essais d'injection de FL chez l'homme ont montré une bonne tolérance de la molécule jusqu'à des doses de 100µg/kg sur 14 jours (Maraskovsky *et al.*, 2000) avec une augmentation du nombre de cellules mononucléées circulantes, mais également des cellules CD34⁺ et des CFU-GM. Cependant, ceci s'accompagne d'une augmentation des monocytes circulants d'un facteur 5 à 10 et d'un facteur 30 des cellules dendritiques, ce qui confirme *in vivo* l'activité du FL sur la différenciation des cellules dendritiques (Siena *et al.*, 1995). Dans ces études, aucun effet secondaire notable, hormis une réaction locale au site d'injection et des ganglions lymphatiques volumineux, n'a été mise en évidence.

Peu d'études ont été conduites sur la capacité du FL à accélérer la reprise hématopoïétique. Pour l'essentiel, une étude a été conduite chez la souris, et a montré une forte augmentation de l'incidence des décès liés à la GVHD (Blazar *et al.*, 2001). Cette mortalité excessive est probablement liée à l'activité inductrice du FL pour la différenciation des cellules dendritiques. Cette activité de la cytokine est également à l'origine de la survie prolongée de souris dans un modèle murin de cancer métastatique des poumons (Chakravarty *et al.*, 1999). Une autre étude réalisée chez le primate non humain irradié a montré qu'un traitement par une combinaison de FL et de TPO, administré après irradiation, conduisait à une diminution de bénéfice thérapeutique en terme de profondeur et de durée de la thrombopénie par rapport à des animaux traités par TPO seule (Hartong *et al.*, 2003). D'après les auteurs, cet effet antagoniste pourrait être dû à l'induction préférentielle, par le FL, d'une différenciation des cellules souches vers les lignages myéloïdes au dépend des lignages mégakaryocytaires (Hartong *et al.*, 2003). La perte de bénéfice thérapeutique observée dans cette étude expliquerait qu'aucune étude clinique n'ait été réalisée chez les patients aplasiques. Cependant, il faut noter que l'utilisation du FL en combinaison avec d'autres cytokines (SCF, TPO, IL-3 ± SDF-1)

augmente très significativement la survie de souris irradiées létalement (Herodin *et al.*, 2003). De plus, une étude menée chez le primate a démontré l'efficacité d'un tel traitement pour réduire considérablement le syndrome hématopoïétique radio-induit (Drouet *et al.*, 2004).

Il est à noter également qu'un effet radioprotecteur de la cytokine a été mis en évidence chez la souris (Hudak *et al.*, 1998) et chez le lapin (Gratwohl *et al.*, 1998)). Dans les deux cas, l'administration de FL entre 24 et 20 heures avant irradiation permet d'augmenter la survie des animaux irradiés à une dose létale (12 et 14 Gy chez le lapin et 10 Gy chez la souris) dans une proportion de 60 à 100%. Cependant, chez la souris, bien que le traitement par FL améliore la reconstitution hématopoïétique, une anémie et une thrombocytopenie prolongée ont été observées. La raison est probablement liée au fait que le FL injecté seul agit essentiellement sur les progéniteurs des lignées granulomonocytaires et lymphocytaires (Hannum *et al.*, 1994; Lyman *et al.*, 1994; Hunte *et al.*, 1996; Ray *et al.*, 1996). Plus récemment, il a été montré qu'un vecteur plasmidique codant le FL pouvait être utilisé comme adjuvant pour l'induction de réponses immunitaires antigène-spécifique chez la souris (Fong et Hui, 2002; Sang *et al.*, 2003). Cette activité adjuvante semble en partie liée à la capacité du FL à augmenter le nombre de cellules dendritiques dans la circulation générale et dans les organes (Maraskovsky *et al.*, 1996). Cette capacité à stimuler la prolifération des cellules dendritiques a également été considérée avec intérêt dans le cadre du traitement de l'asthme. En effet, les cellules dendritiques produisent de l'IL-12 capable d'inhiber la différenciation des lymphocytes T naïf en lymphocytes T de type 2 impliqués dans l'asthme. Ainsi, il a été mis en évidence qu'un traitement par FL était capable de prévenir (Agrawal *et al.*, 2001) et de diminuer (Edwan *et al.*, 2004) l'inflammation allergique des voies aériennes chez la souris. En outre, l'administration du plasmide codant le FL est capable d'inhiber la production de l'IL-4 et de l'IL-5, deux médiateurs majoritaires de l'asthme (Edwan *et al.*, 2005).

4.3.2 Flt3-Ligand / Flt3 et pathologies humaines

4.3.2.1 Mutation du récepteur Flt3 et pathologies hématopoïétiques malignes

L'étude de l'expression du récepteur Flt3 par les lignées de cellules leucémiques établies a montré une expression de l'ARNm ou de la protéine dans 50% des lignées myélo-monocytaires et dans 90% des lignées pré-B, alors que très peu de lignées T, érythrocytaires ou mégacaryocytaires expriment le récepteur (Drexler, 1996). De plus, une co-expression du récepteur et de la cytokine a été mise en évidence dans les cellules leucémiques (Lisovsky *et al.*, 1996b), ce qui suggérait une implication possible du Flt3 dans la pathogénie de certaines leucémies par un mécanisme autocrine. De fait, 70% à 100% des cas de leucémie aiguë myéloïde (LAM) et des leucémies aiguës lymphoïdes pré B (LAL préB), mais aussi des leucémies myéloïdes chroniques en crise blastique lymphoïde (LMC) montrent une surexpression du récepteur (Carow *et al.*, 1996; Gilliland et Griffin, 2002; Stirewalt et Radich, 2003). Par la suite, deux types de mutations ont été mis en évidence dans les leucémies porteuses du Flt3 (Figure 4). Le premier type est une duplication interne du domaine juxtamembranaire (Nakao *et al.*, 1996), qui contient un site d'inhibition de l'activité tyrosine kinase. Cette duplication conduit à une levée de cette inhibition, conduisant à une autophosphorylation constitutive du récepteur. Ce type de mutation a une incidence moyenne de 24% dans les LAM (Gilliland et Griffin, 2002). Le deuxième type de mutation du récepteur est une substitution d'un résidu acide aspartique en position 835, dans la boucle d'activation du site tyrosine kinase 2 (Yamamoto *et al.*, 2001). La substitution de cet acide aspartique par un résidu tyrosine (cas le plus fréquent) ou par d'autres résidus (valine, histidine, glutamine ou asparagine) a été observée avec une incidence de 7% environ (Gilliland et Griffin, 2002), et conduit à une modification de conformation tridimensionnelle du site tyrosine kinase 2 rendant accessible le site de phosphorylation, ce qui induit une autophosphorylation du récepteur. Dans tous les cas, les mutations du récepteur semblent associées à un mauvais pronostic des leucémies porteuses de ces mutations (Gilliland et Griffin, 2002), bien que des résultats récents

semblent indiquer que ce pronostic défavorable puisse être modifié par l'intensification de la chimiothérapie par cytarabine (Kottaridis *et al.*, 2003). Ceci a conduit au développement de traitements basés sur l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase dans ces cas de leucémies à mutation du récepteur FLT3 (Levis *et al.*, 2002; Brown et Small, 2004; Brown *et al.*, 2005).

4.3.2.2 Variation du FL chez le patient aplasique

Rapidement après sa découverte, il a été montré que le FL est présent dans le sang circulant à une concentration comprise entre 10 et 100 pg/ml de sérum (Lyman *et al.*, 1995b). Cette concentration de FL circulant a été réévaluée à 53 ± 35 pg/ml de sérum (Todd *et al.*, 1997). Il a été observé chez des patients souffrant d'aplasie médullaire idiopathique ou d'anémie de Fanconi (Lyman *et al.*, 1995b) que la concentration sérique de FL était augmentée. De plus, le suivi de patients atteints d'aplasie médullaire idiopathique au cours de leur traitement a montré que le taux de FL sérique était normalisé pendant les rémissions mais de nouveau augmenté en cas de rechutes (Wodnar-Filipowicz *et al.*, 1996). Cette même étude a également mis en évidence que le taux de FL était augmenté lors des aplasies induites par chimiothérapie. Bien que le nombre de prélèvements médullaires faits chez des patients en aplasie ait été limité, il a pu être montré que la concentration sanguine de FL est inversement proportionnelle à la fréquence de cellules formatrices de colonies (CFC) dans la moelle osseuse (Wodnar-Filipowicz *et al.*, 1996). C'est cette corrélation négative entre FL sanguin et fréquence des CFC médullaires qui a suggéré une utilisation possible des variations de concentration du FL dans le sang périphérique comme bio-indicateur de fonctionnement de la moelle osseuse. Ceci a été confirmé dans une étude réalisée chez le primate non humain irradié (Bertho *et al.*, 2001).

4.3.2.3 Variation du FL au cours de la mobilisation par G-CSF

L'une des applications possibles de l'utilisation du FL comme bio-indicateur est d'essayer de prédire la capacité de mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique après injection de G-CSF. En effet, la quantité de cellules CD34⁺ mobilisées est variable en fonction des pathologies existantes et des traitements reçus par le patient (Bensinger *et al.*, 1995; Weaver *et al.*, 1998). De même, chez les donneurs sains, il existe une variabilité individuelle de la capacité de mobilisation qui pourrait être due à la présence de l'allèle SDF1-3'A comme cela a été démontré chez des patients présentant des pathologies malines (Benboubker *et al.*, 2001). Cependant, il est logique de penser que la capacité de mobilisation d'un individu dépend étroitement de l'état de fonctionnel de sa moelle osseuse, et qu'à ce titre le FL pourrait être utilisé. Plusieurs études ont été réalisées chez les donneurs sains pour essayer de corrélérer la concentration de FL avant mobilisation et le nombre de cellules CD34⁺ circulantes au 5^{ème} jour des injections de G-CSF (Gazitt et Liu, 2000; Dettke *et al.*, 2001; Haidar *et al.*, 2002). Bien que les trois études s'accordent pour indiquer une augmentation de la concentration de FL durant la mobilisation, les résultats des analyses effectuées sont en partie contradictoires. En effet, deux études ont montré une corrélation directe entre le taux circulant de FL et le nombre de cellules mobilisées (Gazitt et Liu, 2000; Haidar *et al.*, 2002) et la troisième étude a montré une absence de corrélation entre les deux paramètres (Dettke *et al.*, 2001). Ces analyses contradictoires ont certainement plusieurs origines, tout d'abord, elles sont en partie dues à la connaissance insuffisante des mécanismes de mobilisation (Lapidot et Petit, 2002). Ensuite, l'absence de connaissances sur les mécanismes de régulation du FL, aussi bien au niveau de la production par les différents types cellulaires impliquées, qu'au niveau de la consommation par les cellules porteuses du récepteur rend difficile l'analyse comparée de ces travaux. Enfin, la régulation de la concentration sanguine de cette cytokine reste mal connue (Fichelson, 1998). Ainsi, il y a clairement un manque de

connaissances sur la régulation de cette cytokine, aussi bien en situation physiologique normale qu'en conditions physiopathologiques.

BUT DE L'ETUDE

Le travail que nous avons réalisé a donc suivi deux axes principaux. Tout d'abord, nous avons caractérisé le FL comme bio-indicateur de l'atteinte hématopoïétique, dans un modèle de souris irradiée de façon homogène et hétérogène. Une validation de ce bio-indicateur a également été réalisée en clinique humaine. L'utilisation du FL comme bio-indicateur de l'atteinte hématopoïétique nécessitait une meilleure connaissance de ses mécanismes de régulation. C'est pourquoi nous avons développé un deuxième axe d'étude visant à définir les différentes populations cellulaires impliquées dans cette régulation, dans un modèle murin, en clinique humaine et *in vitro*.

MATERIELS ET METHODES

1 Etude *in vitro*

1.1 Lignées Cellulaires

1.1.1 Lignée ostéoblastique humaine : MG-63

La lignée cellulaire MG-63 a été dérivée d'un ostéosarcome humain (Billiau *et al.*, 1977). L'ostéosarcome est une différenciation néoplasique des ostéoblastes qui se développe au dépend du tissu ostéogénique. La lignée cellulaire MG-63 utilisée dans cette étude a été fournie gracieusement par le docteur Pierre MARIE (Inserm U349, hôpital Lariboisière, Paris). Sa culture a été effectuée en milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) à 4,5 g/l de glucose (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplémenté avec 1% de pénicilline-streptomycine (Invitrogen), 1% de L-Glutamine (Invitrogen) et 10% de Sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen). Les cellules ont été cultivées à 37°C, en atmosphère humide à 5% de CO₂. Un passage hebdomadaire a été réalisé. Les cellules ont été isolées par incubation avec de la trypsine (Invitrogen) pendant 5 minutes, numérotées en bleu trypan etensemencées à 5000 cellules par cm². Le milieu de culture a été renouvelé deux fois par semaine.

1.1.2 Lignée stromale murine : MS-5

La lignée MS-5 a été obtenue par dérivation à partir d'un stroma médullaire de souris irradié à 9 Gy (Itoh *et al.*, 1989). Il a été montré que ces cellules étaient capables de supporter l'hématopoïèse (Suzuki *et al.*, 1992; Issaad *et al.*, 1993).

La culture de cette lignée a été effectuée en milieu MEMα (Invitrogen) supplémenté avec 1% de pénicilline-streptomycine, 1% de L-Glutamine et 10% SVF. Les cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. Le renouvellement du milieu de culture était hebdomadaire jusqu'à la confluence, puis les cellules ont été passées à 0,02.10⁶ cellules /cm².

1.1.3 Lignée stromale de moelle osseuse humaine : HS-5

La lignée HS-5 (ATCC CRL-11882) a été obtenue par transformation de cellules stromales humaines par l'HPV-16 E6/E7 (Roecklein et Torok-Storb, 1995).

La culture de cette lignée a été effectuée en milieu DMEM à 4,5 g/l de glucose supplémenté avec 1% de pénicilline-streptomycine, 1% de L-Glutamine et 10% de SVF. Les cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. Le renouvellement du milieu de culture était bi-hebdomadaire jusqu'à la confluence, puis les cellules ont été passées à 0,02.10⁶ cellules /cm².

1.2 Irradiations et stimulation

Les différentes lignées cellulaires et les cultures primaires de cellules stromales ont été irradiées dans leurs milieux de culture par une source de ¹³⁷Cs située à Fontenay-aux-roses (IBL 637, Cisbio, Saclay, France). L'irradiation des cellules a été réalisée en plaque de culture, à température ambiante, pour des doses de 2, 5 ou 10 Gy. Le débit de dose moyen sur l'ensemble de ces irradiations est de 1,033 ± 0,002 Gy. Certaines cultures cellulaires ont été stimulées par incubation en présence de 10 ng/ml de TNFα (Invitrogen). Pour chaque échantillon irradié ou stimulé, un témoin a été traité dans les mêmes conditions expérimentales.

1.3 Etude de la production de Flt3-Ligand

1.3.1 Mise en culture des cellules

La mise en culture des cellules varie selon les caractéristiques de prolifération de la lignée considérée.

- Les cellules de la lignée MG-63 ont étéensemencées la veille de l'irradiation en plaques 6 puits à 40 000 cellules par cm² dans 4 ml de milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF.

- Les cellules MS-5 ont étéensemencées en plaques 12 puits à 10 000 cellules par cm² dans 2 ml de milieu MEM alpha supplémenté avec 10% de SVF et cultivées jusqu'à confluence.
- Les cellules HS-5 ont été cultivées jusqu'à la confluence en flasques 25 cm² avec un ensemencement initial à 20 000 cellules par cm² dans 5 ml de milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF.

Dans tous les cas, le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais le jour de l'irradiation. Le volume a été ajusté en fonction de la croissance cellulaire.

- Pour la lignée MG-63, les cellules récoltées à J3 et J7 ont été placées dans un volume initial de 2,5 ml et 3 ml de milieu de culture respectivement et les cellules récoltées à J10 et J14 ont été cultivées dans 4 ml de milieu.
- Pour la lignée MS-5, les cellules récoltées à J3, J7, J10 et J14 ont été placées respectivement dans 1, 1,5, 2 et 2 ml de milieu de culture.
- Dans le cas de la lignée HS-5, le volume du milieu de culture était constant à 5 ml. Néanmoins, une demi-déplétion bi-hebdomadaire du milieu a été réalisée. Les cellules ont été récoltées à J3, J7, J10 et J14.

Les plaques ont été irradiées (cf. paragraphe 1.2) puis incubées à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂ pendant 3, 7, 10 ou 14 jours.

1.3.2 Recherche de la forme soluble de FL

A différents temps après irradiation, les surnageants ont été récoltés et leurs volumes ont été mesurés. Après les avoir débarrassés des débris cellulaires par une centrifugation de 5 minutes à 2000g, ils ont été conservés à -80°C. Le FL soluble présent dans les surnageants de culture a été quantifié par test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (R & D system, London, UK) selon les recommandations du fournisseur.

1.3.3 Recherche du FL présent dans le cytoplasme

Après un rinçage en PBS, les cellules ont été incubées pendant 5 minutes à 37°C avec de la trypsine (1 ml de trypsine par puits pour les plaques 6 puits, 500 µl pour les plaques 12 puits ou 2 ml pour les flasques 25 cm²). L'action de la trypsine a été stoppée par ajout d'un volume équivalent de milieu de culture contenant 10 % de SVF puis les cellules ont été récoltées et centrifugées pendant 8 minutes à 800g. Le culot cellulaire a été repris dans 210 µl de milieu. Dix micro litres de cette suspension ont été prélevés pour une numération, une partie des cellules a été conservée pour faire une recherche de l'ARNm codant le FL, et l'autre partie a été lysée afin de rechercher le FL présent dans le cytoplasme. Le lysat cellulaire a été réalisé en plaçant les cellules dans du tampon de lyse (PBS contenant 0,1 % de Triton X-100) puis en effectuant trois cycles de congélation (-80°C)/décongélation (37°C). Selon le cas, le volume de tampon de lyse était ajusté pour l'obtention d'une concentration de 5.10⁶ cellules par ml ou était simplement de 50 µl (volume minimum nécessaire pour la recherche du FL). Le FL cytoplasmique a été quantifié par test ELISA.

2 Etude *in vivo*

2.1 Modèles murins

2.1.1 Les Animaux

Toutes les expérimentations réalisées au cours de ce travail ont été menées en accord avec la législation européenne sur l'expérimentation animale après avis du comité d'éthique de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (Loi n°87-848 du 19 octobre 1987, modifiée le 29 mai 2001).

2.1.1.1 Souris BALB/c

Les souris mâles BALB/c ont été obtenues auprès de l'élevage Janvier (Le Genest saint Isle, France). Une période minimale d'une semaine d'acclimatation a été respectée. La boisson

et la nourriture ont été distribuées *ad libitum* durant toute la durée de l'expérimentation. A leur arrivée, les souris ont été réparties au hasard par groupe de cinq dans des cages maintenues dans une armoire ventilée à la température de 22°C avec une alternance jour/nuit de 12 heures.

2.1.1.2 Souris NOD/SCID

Les souris NOD/SCID (non-obese diabetic-severe combined immunodeficient) sont des animaux de même fond génétique que les souris BALB/c, issues d'un croisement entre deux lignées de souris portant chacune une mutation (Prochazka *et al.*, 1992). Les souris SCID portent une mutation autosomique (C.B-17scid) qui conduit à un défaut en lymphocytes B et T fonctionnels (Bosma *et al.*, 1983) lié à un défaut de réarrangement des gènes codant pour les immunoglobulines des cellules B et pour le récepteur de l'antigène des cellules T (Schuler *et al.*, 1986). Les souris NOD portent une mutation qui conduit également à une forte réduction du nombre de lymphocytes T et de cellules NK (Kataoka *et al.*, 1983; Poulton *et al.*, 2001). Il en résulte que les souris NOD/SCID n'ont pas de lymphocytes B ou T fonctionnels et qu'elles présentent une immunodéficiences sévère.

Les souris NOD/SCID sont élevées au sein de l'animalerie du service de radiobiologie et d'épidémiologie. L'élevage est maintenu dans un isolateur stérile, et les animaux sont alimentés avec de la nourriture et de l'eau stériles. La température de l'isolateur est maintenue constante à 22°C avec un cycle lumineux de 12 heures. Les animaux en cours d'expérimentation sont hébergés dans des cages stériles à couvercle filtrant, maintenus dans des armoires ventilées et manipulés sous une hotte à flux laminaire.

2.1.2 Les irradiations

2.1.2.1 Irradiations corporelles totales (ICT)

Les souris âgées de 10 semaines ont été placées dans des cages de contentions stériles et irradiées par une source de ^{137}Cs (IBL 637). Sept doses ont été étudiées chez les souris

BALB/c soient 0, 2, 4, 6, 8, 10, et 15 Gy et trois doses ont été testées chez les souris NOD/SCID : 0, 2, et 4 Gy. Le débit de dose moyen sur l'ensemble de ces irradiations est de $1,033 \pm 0,002$ Gy.

2.1.2.2 Irradiations localisées

Les irradiations localisées ont été réalisées avec une source de ^{60}Co située à Fontenay-aux-roses (ICO 4000, Cisbio). Nous avons utilisé quatre configurations d'irradiations différentes par le volume médullaire se trouvant dans le champ d'exposition. Les animaux ont été irradiés avec 25%, 50%, 75%, ou 100% de leur volume médullaire inclus dans le champs d'irradiation (Figure 9).

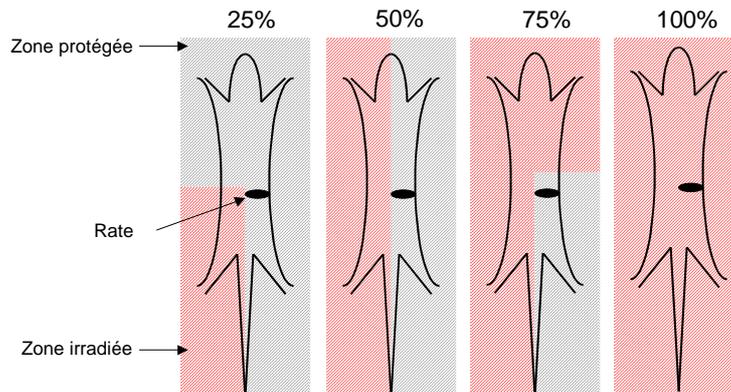


Figure 9 : Illustration des différentes configurations d'irradiation hétérogène étudiées. Pour chaque configuration étudiée, la rate (ovale noir) se trouvait dans la zone non irradiée (zone grise hachurée) et au minimum 25% de la moelle osseuse se trouvait dans la zone irradiée (zone rouge hachurée).

Une dosimétrie en chambre d'ionisation a été réalisée afin de vérifier que la dose délivrée dans le champ d'irradiation était la dose attendue et que la zone non exposée de chaque animal était effectivement protégée.

La figure 10 résume les résultats de la dosimétrie pour les configurations comprenant 25% et 75% des territoires médullaires inclus dans le champ d'irradiation.

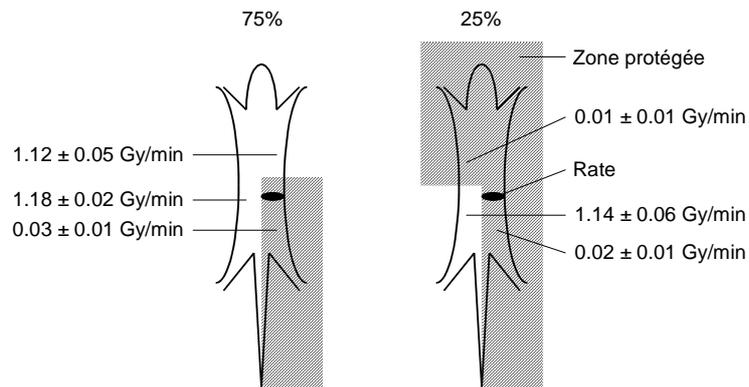


Figure 10 : Illustration des configurations d'irradiation incluant 25 et 75% des territoires médullaires et résumé de la dosimétrie effectuée en chambre d'ionisation. Pour chaque configuration étudiée, la rate (ovale noir) se trouvait dans la zone non irradiée (zone hachurée).

Après anesthésie *i.p.* par un mélange de Kétamine (Imalgène, Merial, Lyon, France)/Xylazine (Centravet, Maisons-Alfort, France) (100 mg/kg), les animaux ont été positionnés sur une plaque de plexiglas portant le schéma de positionnement des souris et irradiés (Figure 11). Trois doses d'irradiation ont été utilisées, une dose infra-létale : 4 Gy, une dose proche de la dose létale 50/30 : 7,5 Gy et une dose supra-létale : 11 Gy. Le débit de dose moyen sur l'ensemble de ces irradiations est de $1,18 \pm 0,02$ Gy.

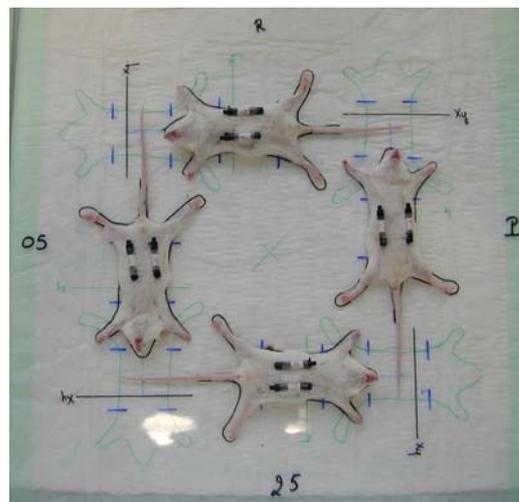


Figure 11 : Exemple du positionnement des animaux irradiés sur 50% de la moelle osseuse.

2.1.3 Obtention et traitement des échantillons sanguins

Après une anesthésie par Kétamine/Xylazine, le sang de chaque animal a été prélevé par ponction intra-cardiaque sur EDTA. Une numération formule sanguine a été réalisée à l'aide d'un ADVIA-120 (Bayer Diagnostics, Puteaux, France) et le plasma a été isolé par centrifugation (2200g pendant 15 min) puis conservé à -80°C jusqu'à l'analyse. La quantification du FL plasmatique a été réalisée par test ELISA.

2.1.4 Détermination du nombre de progéniteurs survivants dans la moelle osseuse et dans la rate

Après exsanguination (cf.paragraphe 2.1.3.) et euthanasie des souris par dislocation cervicale, les deux fémurs de chaque animal ont été prélevés. La moelle osseuse contenue dans chaque fémur a été récupérée par flush en milieu Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Invitrogen) supplémenté avec 1% de pénicilline-streptomycine et 1% de L-Glutamine. Selon le cas, la moelle osseuse provenant des deux fémurs a été regroupée ou traitée séparément. La rate de chaque animal a été prélevée et broyée en milieu IMDM à l'aide d'un potter.

Après numération du nombre de cellules en bleu acétique, $5 \cdot 10^4$ cellules de moelle osseuse ou $5 \cdot 10^5$ cellules de rate ont été ensemencées en duplicate dans un milieu semi-solide complet de méthyl cellulose (Stem Cell Technologie, Vancouver, Canada) supplémenté en rm-SCF à 50 ng/ml, rm-IL-3 à 10 ng/ml, rh-IL-6 à 50 ng/ml et en rh-EPO à 3 unités/ml. Les cultures ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂ pendant 12 jours et trois types de colonies ont été dénombrées : les progéniteurs granulomonocytaires (colony forming units-granulocyte macrophage, CFU-GM), érythroïdes (burst forming units-erythroid, BFU-E) et communs à ces deux lignées (Colony forming units-granulocyte erythrocyte monocyte megakaryocyte, CFU-GEMM).

2.1.5 Analyse phénotypique des cellules circulantes et médullaires

Les cellules circulantes ont été isolées en lysant les érythrocytes avec 1 ml de tampon de lyse (8,32 g/l de Chlorure d'ammonium, 1 g/l de Bicarbonate de sodium et 0,037 g/l d'EDTA) pour 100 µl de culot cellulaire pendant 7 minutes à 37°C. Après deux lavages en PBS, une centrifugation à 1600 g pendant 3 minutes permet d'isoler les cellules circulantes dans le culot. Les cellules médullaires ont été isolées comme décrit précédemment (cf. paragraphe 2.1.4). Les analyses phénotypiques ont été réalisées par double marquage à l'aide d'anticorps directement couplés à des fluorochromes.

Distribution antigénique	Anticorps	Fluorochrome	Clone	fournisseur
T	anti-CD3	FITC	KT3	Beckman Coulter
T	anti-CD4	FITC	YTS191.1	Beckman Coulter
T	anti-CD8	PE	KT15	Beckman Coulter
B	anti-CD19	PE	6D5	Beckman Coulter
GM	anti-CD11b	FITC	M1.70	Beckman Coulter
	Contrôle Isotypique	FITC ou PE	LODNP16	Beckman Coulter
Leucocytes	anti-CD45	FITC	30-F11	BD Pharmingen
NK	anti-Ly49A/D	PE	12A8	BD Pharmingen

Les cellules ont été incubées en présence de ces différents anticorps dans du PBS contenant 0,5 % d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA) (PBS-BSA), pendant 20 minutes à 4°C. Après un lavage, les cellules ont été suspendues dans 200 µl de PBS-BSA contenant 1 µg/ml de 7 amino actinomycin D (Sigma Chemical) afin d'exclure de l'analyse les cellules mortes (Schmid *et al.*, 1994). L'analyse a été effectuée grâce à un FACScalibur® (Becton-Dickinson, Grenoble, France) en enregistrant au minimum 10 000 évènements par point expérimental.

2.1.6 Etude de l'expression de l'ARNm codant le FL

2.1.6.1 Extraction des ARN totaux et synthèse des ADN complémentaires

L'expression de l'ARNm codant le FL a été mesurée dans différents organes (le cerveau, le thymus, le foie, la rate) ainsi que dans les cellules de la moelle osseuse et les cellules circulantes. Afin d'empêcher la dégradation des ARNm, les organes sont placés dans du RNA « later » (Qiagen, Courtaboeuf, France) immédiatement après le prélèvement. L'extraction des ARN totaux de la moelle osseuse a été réalisée au décours du prélèvement à l'aide du Rneasy Mini Kit (Qiagen). Une étape de digestion de l'ADN (Rnase-Free Dnase Set, Qiagen) a été incluse pour l'extraction des ARN totaux des cellules médullaires. L'extraction des ARN totaux issus des cellules circulantes a été réalisée à l'aide du Pax gene blood RNA Kit (Qiagen). Les ADN complémentaires ont été transcrits inversement à partir d'1 µg d'ARN total en utilisant 200U de Superscript II Reverse Transcriptase et 300 ng de Random Primers conformément aux recommandations du fournisseur (Invitrogen).

2.1.6.2 PCR quantitative en temps réel

L'ADN complémentaire est soumis à une amplification en utilisant des amorces spécifiques de l'ARNm codant le FL (Invitrogen) (amorce sens (exon 2) : 5'-CAGTCACTGTGGCCGTCAAT-3', amorce anti-sens (exon 4) : 5'-CTCCAGAAGCGTTTGCATCTT-3') et une sonde fluorescente (exon 3) 5'-6-FAM-TTCAGGACGAGAAGCACTGCAAGGC-TAMRA-3'. L'ARNm 18S a été choisi comme gène de référence et amplifié en utilisant des amorces et une sonde fluorescente (VIC) (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Les PCR en temps réel ont été réalisées en duplicate en utilisant un ABI Prism 7700 Sequence detection system (Applied Biosystems).

Les résultats de PCR en temps réel sont exprimés en nombre de cycles nécessaires à l'obtention d'un signal significatif (Ct). A chaque temps, la quantification de l'ARNm du FL a été réalisée par différence (Δ Ct) entre le nombre Ct du gène d'intérêt (FL) et celui du gène de référence (18S), par définition invariant. L'expression relative de l'ARNm codant

le FL au cours du temps après irradiation a été déterminée en rapportant la quantité d'ARNm codant le FL au temps t (ΔCt au temps t) à la quantité d'ARNm codant le FL chez les animaux témoins (ΔCt au temps 0) selon la formule suivante : $2^{-(\Delta Ct \text{ au temps t} - \Delta Ct \text{ au temps 0})}$, formule équivalente à : $2^{-(\Delta Ct \text{ au temps t})} / 2^{-(\Delta Ct \text{ au temps 0})}$.

2.1.7 Quantification et localisation de la protéine FL

2.1.7.1 Quantification dans différents organes et types cellulaires

Les cellules circulantes ont été isolées comme décrit au paragraphe II.1.5. Les cellules circulantes comme les cellules médullaires ont été lysées dans 100 μ l de PBS contenant 0,1 % de Triton X-100. Le foie, la rate, le thymus, et le cerveau ont été pesés et broyés dans 500 μ l de PBS à l'aide d'un Ribolyser™ (Hybaid, UK). Après centrifugation des broyats, les surnageants ont été collectés et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Une quantification des protéines totales a été réalisée par test de Coomassie® (Coomassie® protein assay, Interchim, Montluçon, France) et le FL a été quantifié par test ELISA, selon les recommandations du fabricant (R&D system). La gamme de linéarité du kit de dosage est de 31,2pg/ml à 2000pg/ml, avec un seuil de sensibilité de 5 pg/ml.

2.1.7.2 Localisation par Immunohistochimie

Les fémurs ont été prélevés, fixés en paraformaldehyde 4% pendant 24 heures puis inclus en résine de méthylmethacrylate (Hott et Marie, 1987). Les thymus et les rates ont été fixés 24 heures en formaldéhyde 10% et inclus en paraffine. Tous les organes ont été coupés en section de 5 μ m d'épaisseur. Les coupes ont été saturées par du Tris buffer saline (TBS) additionné de 4% de BSA et incubées 2 heures à 37°C en présence de 10 μ g/ml d'une Immunoglobuline G de chèvre (Santa Cruz, Le Perray en Yvelines, France) ou d'un anticorps dirigé contre le FL murin (10 μ g/ml pour la moelle osseuse et la rate et 20 μ g/ml pour le thymus) également préparé chez la chèvre (Sigma). Après trois lavages en Tris-Tween-Caséine (TTC), les coupes ont été incubées 30 minutes à température ambiante

avec un anticorps anti-chèvre biotinylé préparé chez le lapin (Dako, Trappes, France). Après trois lavages en TTC, les coupes ont été incubées 30 minutes à température ambiante en présence d'un complexe Phosphatase alcaline (PAL)/Streptavidine (PAL/Stept ABC complex Kit, Dako) puis lavées en TTC et TBS. L'activité PAL a été révélée par du BCIP/NBT (Dako) en inhibant les PAL endogènes sur les coupes de fémur par ajout de 1 mM de lévamisol (Dako). Une contre coloration a été réalisée avec du Nuclear Fast Red (Dako).

2.2 Modèle de primate non humain

2.2.1 Les animaux

Six primates non-humains (*Macaca fascicularis*) de sexe mâle ont été inclus dans cette étude. Ces animaux sont hébergés en cages individuelles et reçoivent quotidiennement de l'eau, des fruits frais et une portion de croquette. Comme précédemment, cette étude a obtenu préalablement à la réalisation un avis favorable du comité d'éthique de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire et a été menée selon les recommandations de la communauté européenne en accord avec la législation française (Loi n°87-848 du 19 octobre 1987, modifiée le 29 mai 2001).

2.2.2 Mobilisation

La mobilisation des cellules CD34⁺ a été réalisée par une injection sous-cutanée quotidienne de 10 µg/kg de poids vif de G-CSF (Granocyte 13, fourni gracieusement par Chugai Pharma France) pendant 5 jours (du jour 0 au jour 4).

2.2.3 Obtention et traitement des échantillons sanguins

Quotidiennement, un prélèvement sanguin sur EDTA a été réalisé pour chaque animal du jour -3 au jour 22. Après une numération formule sanguine effectuée à l'aide d'un ADVIA 120, le sang a été centrifugé à 800g pendant 10 minutes et le plasma a été isolé et

conservé à -80°C. Les érythrocytes présents dans le culot cellulaire ont été lysés selon le protocole décrit au paragraphe 2.1.5.

2.2.4 Prélèvement de moelle osseuse et isolement des cellules mononucléées

Des prélèvements de moelle osseuse ont été réalisés aux jours -3, 1, 3, 5, 8, 15 et 22 après anesthésie des animaux par une injection intra musculaire de 100 mg/kg de Kétamine. Ces ponctions ont été effectuées en conditions stériles alternativement dans les têtes humérales et les crêtes iliaques des animaux. Les cellules mononucléées (CMN) de la moelle osseuse ont été isolées sur un gradient de Ficoll (Lymphoprep, d=1,077 g/ml, Nycomed Pharma SA, Oslo, Norvège) puis les cellules vivantes ont été dénombrées par exclusion au bleu trypan.

2.2.5 Analyse phénotypique des cellules circulantes et médullaires

Les analyses phénotypiques des cellules circulantes et médullaires ont été réalisées par double ou triple marquage à l'aide d'anticorps directement couplés à des fluorochromes. Les anticorps ont été sélectionnés pour leur réactivité croisée entre les antigènes humains et simiens.

Distribution antigénique	Anticorps	Fluorochrome	Clone	Fournisseur
T	anti-CD2	PECy5	39C1.5	BD Pharmingen
GM	anti-CD11b	FITC	Bear1	BD Pharmingen
T	anti-CD8	FITC	B9.11	BD Pharmingen
M	anti-CD14	PECy5	RM052	BD Pharmingen
NK	anti-CD16	FITC ou PECy5	3G8	BD Pharmingen
T	anti-CD4	PE	SK3	BD Pharmingen
NK	anti-CD56	PE	B159	BD Pharmingen
CSH	anti-CD34	PE	563	BD Pharmingen
B	anti-CD20	PerCP	L27	BD Pharmingen
	IgG1	FITC ou PECy5 ou PE	679.1Mc7	BD Pharmingen

Les cellules ont été incubées en présence de ces différents anticorps et l'analyse a été réalisée comme décrit au paragraphe 2.1.5.

2.2.6 Détermination des nombres de progéniteurs dans le sang et la moelle osseuse

$2,5 \cdot 10^4$ à $1 \cdot 10^4$ CMN de moelle osseuse ou $2 \cdot 10^5$ CMN de sang ont étéensemencées en duplicate dans un milieu semi-solide de méthylcellulose (Stem Cell Technologies) supplémenté en rhu-G-CSF à 50 ng/ml, rhu-GM-CSF à 5 ng/ml, rhu-SCF à 50 ng/ml, rhu-Epo à 3 U/ml, rhu-FL à 50 ng/ml (R&D system) et en rhésus rIL-3 (gracieusement fournie de G.Wagemaker (Burger *et al.*, 1990)). Les cultures ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂ pendant 12 jours et les CFU-GM et les BFU-E ont été dénombrées.

2.2.7 Recherche de l'ARNm codant le FL dans les cellules circulantes et médullaires

L'expression de l'ARNm codant le FL a été recherchée dans les cellules circulantes et dans la moelle osseuse totale par PCR en temps réel. L'extraction des ARN totaux a été réalisée à l'aide d'un kit TriZol (TriZol reagent kit, Invitrogen) et les ADN complémentaires ont été transcrits inversement à partir d'1 µg d'ARN total en utilisant 200U de Superscript II Reverse Transcriptase, conformément aux recommandations du fournisseur.

L'ADN complémentaire a été amplifié grâce à des amorces spécifiques de l'ARNm codant le FL humain (Invitrogen) : amorce sens (exon 2) : 5'-TCGCTGTCAAATCCGTGAG-3', amorce anti-sens (exon 4) : 3'-ACAGTCTTGAGCCGCTCCA-5' et la spécificité a été contrôlée grâce à une sonde fluorescente (exon 3) 5'- 6-carboxy-fluorescein-CCAGTCACCGTGGCCTCCAACC-6-carboxy-tetramethyl-rhodamine -3'. L'ARNm 18s a été choisi comme gène de référence, bien que son niveau d'expression soit plus fort que celui du FL, car elle n'est pas modifiée par l'irradiation (Ropenga *et al.*, 2004). L'ARNm 18s a été amplifié en utilisant des

amorces et une sonde fluorescente (VIC) (Ribosomal RNA control, Applied Biosystems) suivant les recommandations du fournisseur. Les PCR en temps réel ont été réalisées en duplicate en utilisant un ABI Prism 7700 Sequence detection system (Applied Biosystems). L'analyse de l'expression relative de FL a été réalisée comme indiqué au paragraphe 2.1.6.2.

2.2.8 Quantification du FL

Le FL a été dosé dans le plasma des animaux. Cette quantification a été réalisée par test ELISA en utilisant la propriété de réactivité croisée du kit ELISA pour le FL humain, comme cela avait été précédemment démontré (Bertho *et al.*, 2001).

3 Etude Clinique

3.1 Les patients

Les études cliniques ont été réalisées en collaboration avec les équipes médicales après que chaque patient ait donné son consentement informé conformément à la Loi 88-1138 du 20 décembre 1988 modifié du Code de la Santé Publique dite Loi Huriet.

3.1.1 Traitement par radiothérapie localisée

27 patients ont été inclus dans cette étude parmi lesquels :

- 4 étaient traités pour des Lymphomes non Hodgkinien
- 3 étaient traités pour des Maladies de Hodgkin
- 1 présentait un myélome
- 5 étaient traités pour des tumeurs pulmonaires
- 8 étaient traités pour des tumeurs localisées dans la zone urogénitale
- 6 présentaient des localisations tumorales autres.

Ces patients ont été traités selon deux protocoles de radiothérapie, et ont reçu une dose cumulée totale de 10 à 56 Gy.

Le premier protocole consistait en une administration d'une fraction d'irradiation par jour, 5 jours par semaine avec une dose par fraction allant de 2 à 5 Gy, le traitement étant poursuivi jusqu'à ce que la dose totale requise soit administrée. Pour ces patients, un prélèvement de sang a été réalisé au premier jour de la radiothérapie puis un suivi hebdomadaire a été effectué.

Le second protocole était un protocole de radiothérapie séquentielle avec 2 fractions par semaine toutes les 2 semaines avec des doses par fraction allant de 4 à 5,75 Gy, jusqu'à administration de la dose requise. Le suivi hématologique de ces patients a été réalisé en effectuant des prélèvements de sang au jour 0 de la radiothérapie et avant chaque fraction.

3.1.2 Patients greffés par cellules souches hématopoïétiques

Dix patients devant subir une greffe de cellules souches hématopoïétiques ont été suivis. Parmi ces patients, on distingue 3 groupes de traitements résumés dans le tableau ci-dessous :

Patient #	Age	Sexe	Pathologie	Conditionnement	Greffe	Nombre de cellules CD34 ⁺ greffées
1	54	F	LNH*	BEAM	Auto CSSP	9.2x10 ⁶ /kg
2	49	M	LNH	BEAM	Auto CSSP	5.3x10 ⁶ /kg
3	38	F	LNH	BEAM	Auto CSSP	3.4x10 ⁶ /kg
4	42	M	LNH	BEAM	Auto CSSP	3.2x10 ⁶ /kg
5	21	M	LAM	Cy + ICT	Allo CSSP	2.1x10 ⁶ /kg
6	23	F	LAM	Cy + ICT	Allo CSSP	1.8x10 ⁶ /kg
7	15	M	LAM	Cy + ICT	Allo CSSP	2.5x10 ⁶ /kg
8	33	M	LAL	Cy + ICT	Allo CSSP	3.7x10 ⁶ /kg
9	24	F	AMI	Cy + SAL	Allo CSSP	2.8x10 ⁶ /kg
10	22	M	SR	Cy + SAL	Auto CSSP	3.3x10 ⁶ /kg

*: *Abbreviations utilisées: AMI: Aplasie médullaire idiopathique; LAL: Leucémie aiguë lymphoïde; LAM: Leucémie aiguë myéloïde; LNH: Lymphome non Hodgkinien; SR: spondylarthrite rhumatoïde; BEAM: BCNU 300 mg/m² jour -6 + Etoposide 300mg/m²/j: du jour -5 au jour -2 + Cytosine arabinoside 200mg/m²/j du jour -5 au jour -2 + Melphalan 140 mg/m² jour -1; Cy + ICT: cyclophosphamide 60mg/kg/j jour -4 et -3 et irradiation corporelle totale, 10 Gy jour -6; Cy + SAL: cyclophosphamide 50 mg/kg/j jour -2 et -1 et serum anti-lymphocytaire jours -7 à -4; Allo CSSP: transplantation de cellules souches de sang périphérique allogénique; Auto: CSSP Autologue.*

Pour chaque patient, des prélèvements de sang (1 à 2 ml sur tube EDTA) réguliers ont été réalisés tout au long du traitement.

3.2 Etude de l'expression de FL

3.2.1 Numération formule sanguine et mesure de la concentration plasmatique de FL

Une numération formule sanguine a été réalisée à partir de chaque prélèvement de sang, grâce à un hémocytomètre MS9 (Melet Schoesling, Cergy-Pontoise, France). Pour chaque prélèvement, le plasma a été isolé par centrifugation du sang à 800g pendant 10 minutes et la concentration plasmatique de FL a été quantifiée par test ELISA.

3.2.2 Recherche du FL membranaire

Le culot obtenu après centrifugation du sang été conservé pour la recherche du FL membranaire. Après lyse des hématies (*cf.* paragraphe 2.1.5), les cellules ont été incubées pendant 20 minutes à 4°C avec une Ig G de chèvre dirigée contre le FL humain (clone C20, Santa Cruz Biotechnologies, St. Louis, MO.) ou avec un contrôle isotypique (goat anti-human IgG isotypic control, Jackson Immunoresearch). Deux lavages en PBS-BSA ont de nouveau été effectués et les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire marqué au FITC (Jackson Immunoresearch). Puis, les cellules ont été lavées et reprises dans du PBS-BSA en présence de 7 amino actinomycin D (Sigma Chemical) afin d'exclure de

l'analyse les cellules mortes. La détection des cellules portant le FL membranaire a été effectuée grâce à un FACS calibur (Becton-Dickinson, Grenoble, France) en analysant au minimum 10 000 évènements par point expérimental.

3.2.3 Etude de l'expression de l'ARNm codant le FL

L'expression de l'ARNm codant le FL a été recherchée dans les cellules circulantes par PCR en temps réel en suivant le protocole décrit au paragraphe 2.1.6.2

4 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Sigmastats (SPSS, Paris, France). Les résultats sont reportés sous forme de moyenne \pm écartype (ET) ou écart standard à la moyenne (ES). Les comparaisons entre groupes ont été réalisées avec le test de Mann et Whitney. Les différences sont considérées comme significatives pour une valeur de $p < 0,05$. Les corrélations ont été analysées avec le test de Spearman (test de corrélation de rang). Les régressions linéaires ont été réalisées à l'aide du logiciel Sigmastats.

RESULTATS

Les atteintes médullaires rencontrées en clinique humaine sont de deux types. Elles peuvent être homogènes, comme au cours de chimiothérapies ou d'irradiations corporelles totales ou hétérogènes dans le cas de radiothérapies localisées ou d'accident d'irradiation. Nous avons donc étudié la possibilité d'utiliser le FL comme bio-indicateur de l'atteinte médullaire globale.

1 Etude de la relation existant entre la concentration plasmatique de FL et l'atteinte médullaire radio-induite

1.1 Modèle murin

Afin de déterminer si le FL pouvait être utilisé comme bio-indicateur de l'atteinte médullaire globale, nous avons réalisé des irradiations homogènes et hétérogènes de souris BALB/c. Nous avons exposé des animaux en incluant dans le champ d'irradiation 25%, 50 %, 75% ou 100% des territoires médullaires. Trois doses d'irradiation ont été étudiées, une dose infra-létale (4 Gy), une dose proche de la dose létale 50/30 (7,5 Gy) et une dose supra-létale (11 Gy). Pour chacune des configurations d'irradiations hétérogènes étudiées, au moins un fémur était protégé et un fémur se trouvait dans le champ d'irradiation, la rate étant dans tous les cas en territoire non irradié (figure 9).

Le tableau 1 résume les abréviations des 12 configurations étudiées.

Dose d'irradiation	Pourcentage de moelle osseuse irradiée			
	25%	50%	75%	100%
4 Gy	4 Gy-25%	4 Gy-50%	4 Gy-75%	4 Gy-100%
7,5 Gy	7,5 Gy-25%	7,5 Gy-50%	7,5 Gy-75%	7,5 Gy-100%
11 Gy	11 Gy-25%	11 Gy-50%	11 Gy-75%	11 Gy-100%

Tableau 1 : Abréviations des différentes configurations d'irradiation étudiées.

1.1.1 Evolution du nombre de leucocytes après une irradiation hétérogène

Le suivi des animaux durant les 28 jours suivant l'irradiation a montré que l'irradiation induit une diminution des nombres de leucocytes quelles que soient la dose et la configuration d'irradiation (Figure 12).

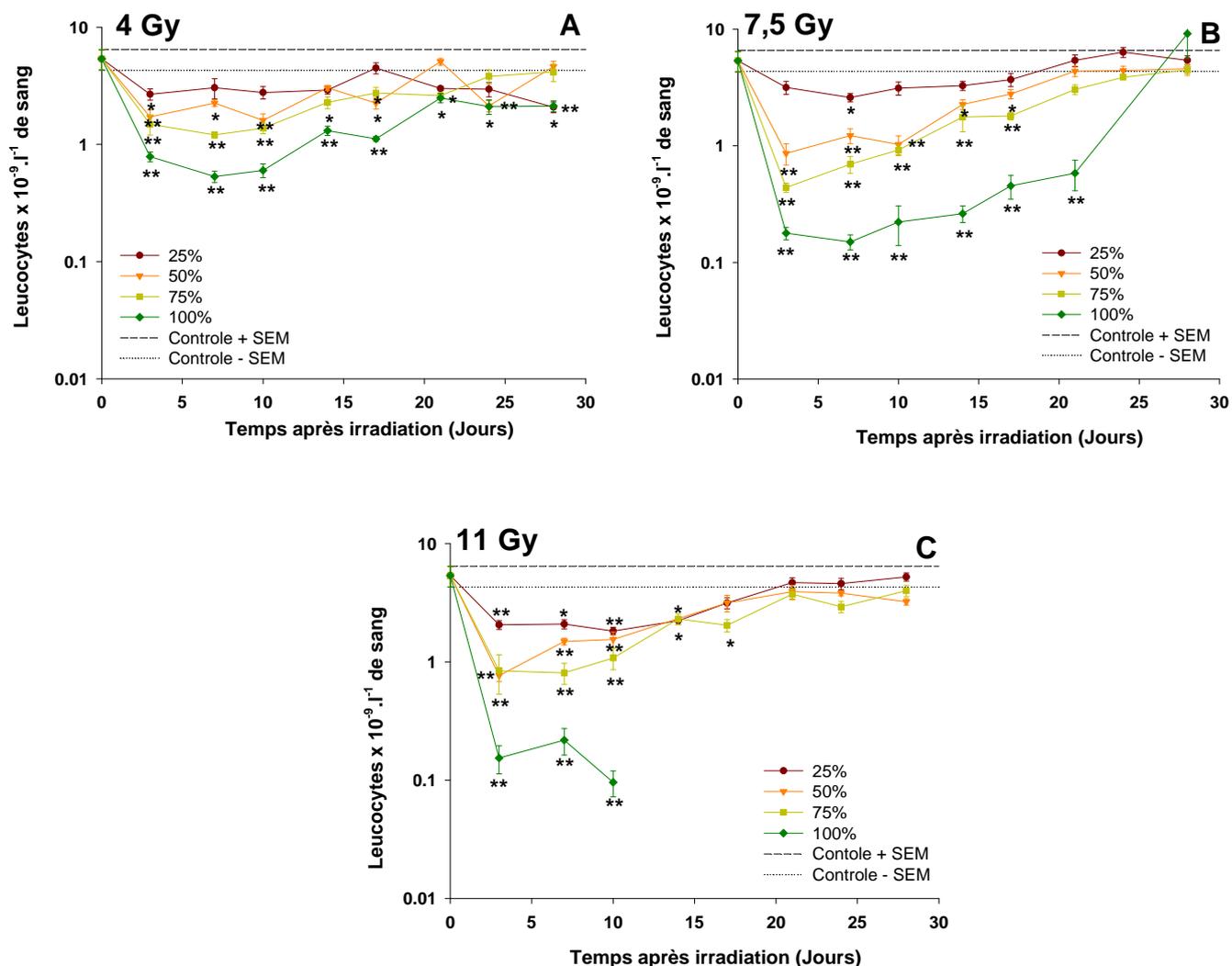


Figure 12 : Effet d'irradiations hétérogènes incluant 25%, 50%, 75% ou 100% des territoires médullaires sur le nombre de leucocytes circulants chez des souris BALB/c irradiées à 4 Gy (A) 7,5 Gy (B) ou 11 Gy (C) en fonction du temps après exposition. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 5 animaux. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

De plus, la réduction des nombres de leucocytes observée dès J3 est d'autant plus importante que le pourcentage de moelle osseuse exposé est grand. En effet, à titre d'exemple, les souris irradiées à 4 Gy sur 25% de la moelle osseuse présentent un nombre de leucocytes moyen de $2.67 \pm 0.296 \times 10^9 \cdot l^{-1}$ tandis que celles exposées à 50%, 75% ou 100% ont respectivement un nombre de globules blancs de $1.716 \pm 0.247 \times 10^9 \cdot l^{-1}$, $1.484 \pm 0.283 \times 10^9 \cdot l^{-1}$ et $0.787 \pm 0.075 \times 10^9 \cdot l^{-1}$ (Figure 12A).

De plus, la durée de la leucopénie radio-induite, définie comme la phase durant laquelle le nombre de leucocyte est significativement différent du contrôle, augmente avec la fraction de moelle osseuse irradiée (Figure 13).

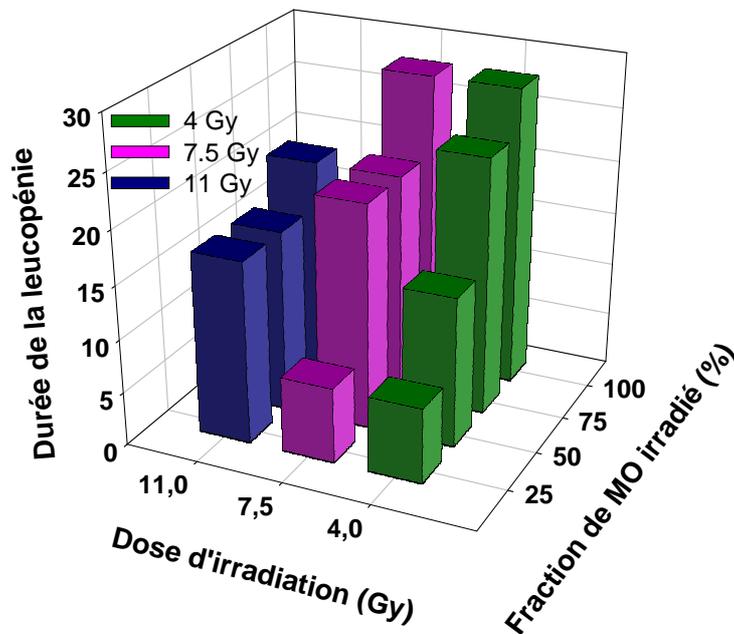


Figure 13 : Résumé des durées de leucopénie radio-induite exprimées en jours pour chaque configuration d'irradiation

Globalement, la durée et la profondeur de la leucopénie radio-induite sont proportionnelle à la dose d'irradiation et au volume médullaire exposé.

1.1.2 Evolution du nombre de plaquettes après une irradiation hétérogène

Le suivi des animaux a montré qu'une irradiation incluant 25% de la moelle osseuse affecte très peu le nombre de plaquettes circulantes quelle que soit la dose d'irradiation (Figure 14).

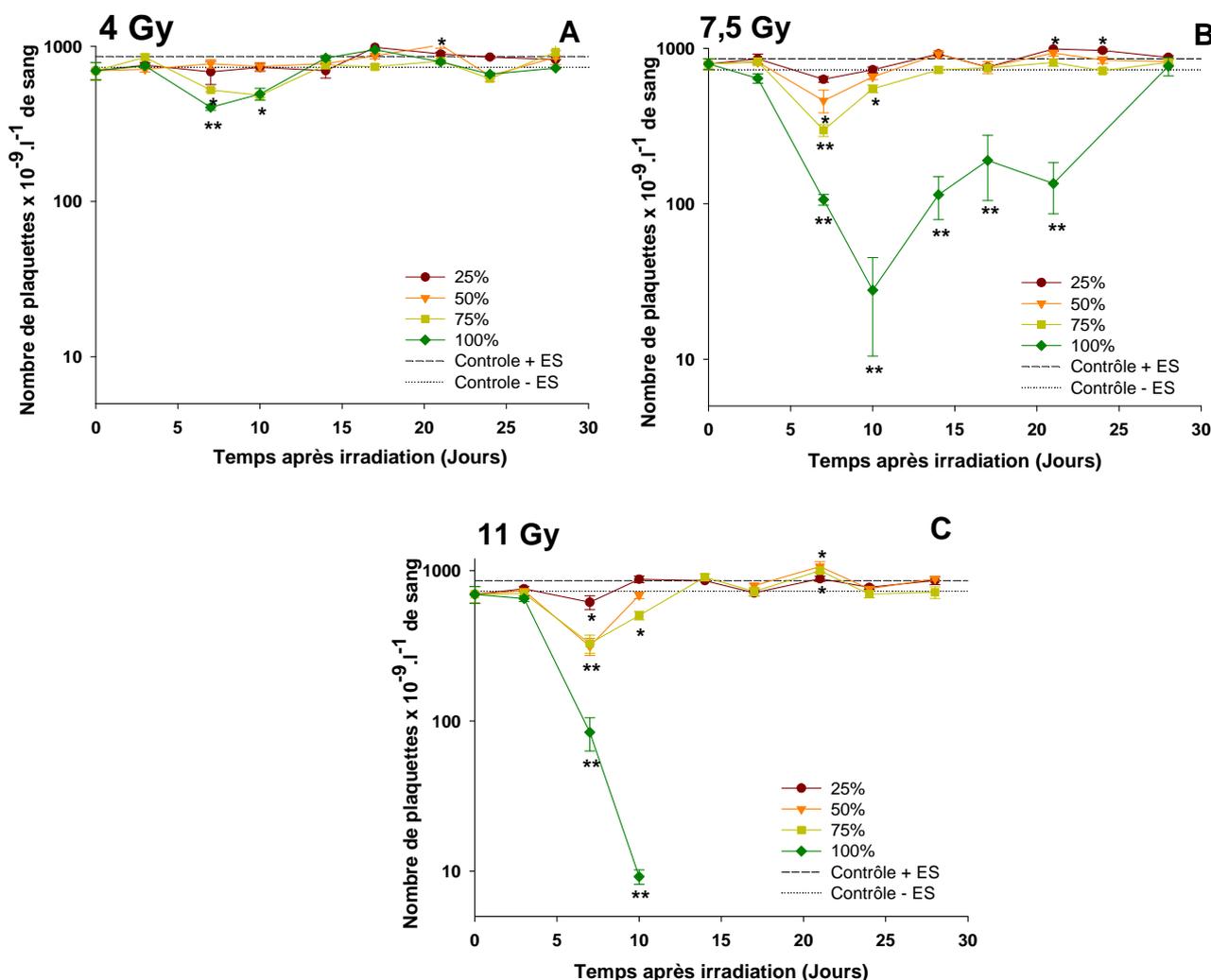


Figure 14 : Effet d'irradiations hétérogènes incluant 25%, 50%, 75% ou 100% des territoires médullaires sur le nombre de plaquettes circulantes chez des souris BALB/c irradiées à 4 Gy (A) 7,5 Gy (B) ou 11 Gy (C) en fonction du temps après exposition. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 5 animaux. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

En effet, nous n'avons pas observé de thrombopénie pour les configurations 4 Gy-25%, 4 Gy-50%, 7,5 Gy-25% et 11 Gy-25%. Pour les autres configurations d'irradiations étudiées,

nous avons constaté l'apparition d'une thrombopénie au jour 7 après irradiation dont la durée (*i.e.* le nombre de jour ou la numération plaquettaire est significativement inférieure au contrôle) a tendance à augmenter avec le pourcentage de moelle osseuse exposé (Figure 15).

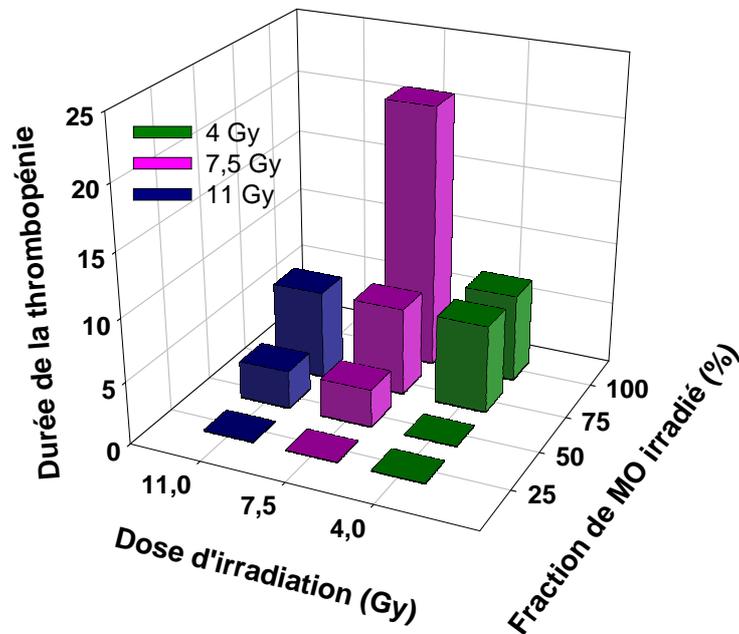


Figure 15 : Résumé des durées de thrombopénie radio-induite exprimées en jours pour chaque configuration d'irradiation

Globalement, la durée et la profondeur de la thrombopénie radio-induite sont proportionnelle à la dose d'irradiation et au volume médullaire exposé mais la numération plaquettaire est un paramètre moins discriminant que la leucocytose pour décrire l'irradiation.

1.1.3 Evolution de la concentration plasmatique de FL après une irradiation hétérogène

Nous avons quantifié le FL plasmatique de chaque animal afin d'étudier l'effet d'irradiations hétérogènes sur le taux de cette protéine. Les résultats ont montré qu'une

irradiation induit une augmentation précoce et significative du taux de FL plasmatique quelles que soient la configuration et la dose d'irradiation (Figure 16).

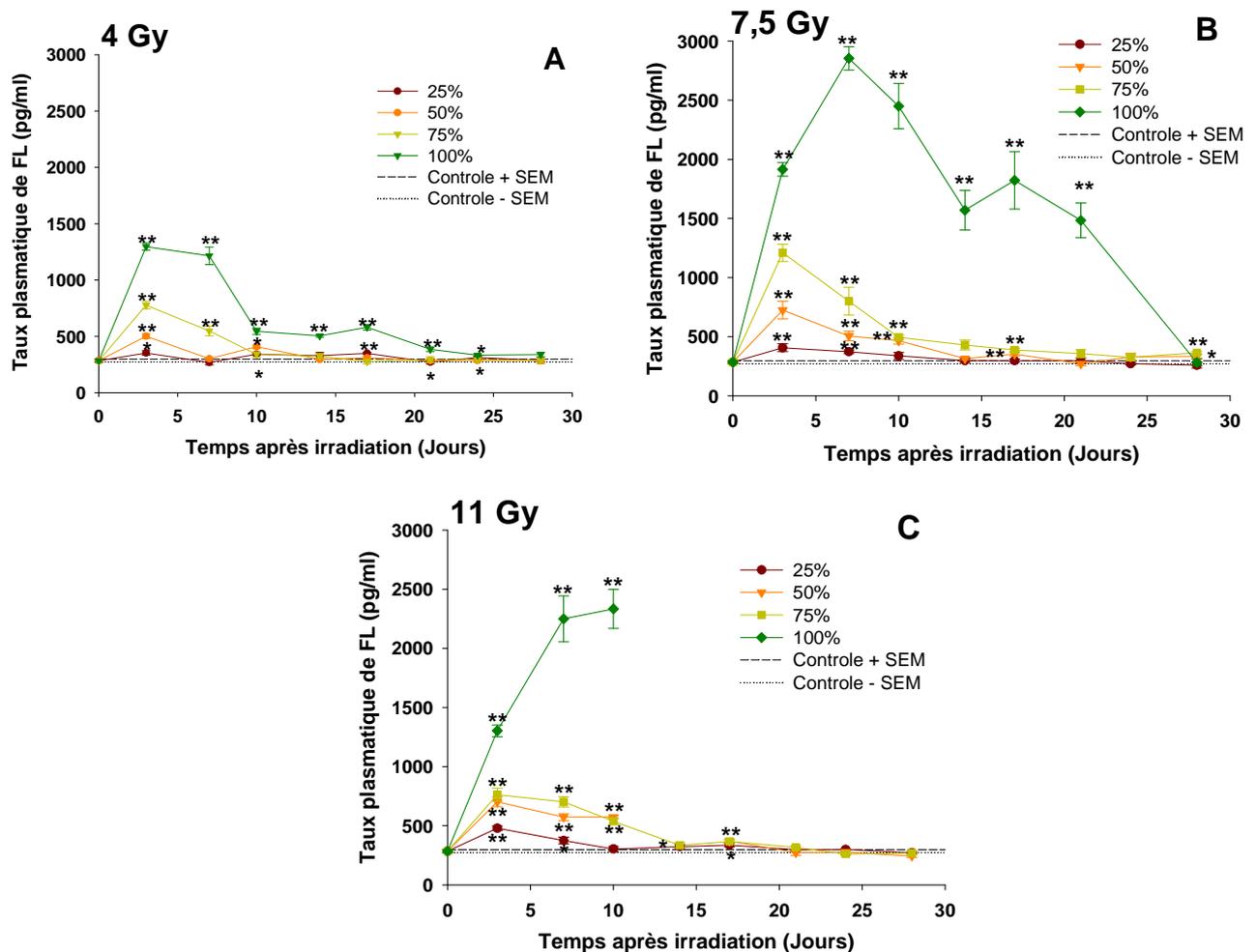


Figure 16 : Effet d'irradiations hétérogènes incluant 25%, 50%, 75% ou 100% des territoires médullaire sur la concentration plasmatique de FL chez des souris BALB/c irradiées à 4 Gy (A) 7,5 Gy (B) ou 11 Gy (C) en fonction du temps après exposition. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 5 animaux. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Il est apparu clairement que cette augmentation de la concentration plasmatique de FL est d'autant plus importante que la fraction de moelle osseuse exposée est grande. En effet, 3 jours après l'irradiation, le taux plasmatique moyen des animaux 4 Gy-25% est de 352 ± 20 pg/ml tandis qu'il atteint 501 ± 21 pg/ml pour 4 Gy-50% pg/ml, 776 ± 33 pg/ml pour 4 Gy-

75% pg/ml et 1296 ± 31 pg/ml pour 4 Gy-100% (Figure 16-A). Cette relation entre l'élévation de la concentration plasmatique de FL et la fraction de moelle osseuse exposée a également pu être mise en évidence chez les animaux irradiés à 7,5 et 11 Gy (Figure 16-B et C).

Pour toutes les configurations d'irradiations, hormis 7,5 Gy-100% et 11 Gy-100%, la valeur maximale de FL a été atteinte au jour 3. Le pic de FL a eu lieu respectivement aux jours 7 et 10 pour les configurations 7,5 Gy-100% (2854.07 ± 98.81 pg/ml) et 11 Gy-100% (2333.77 ± 164.56 pg/ml). D'autre part, l'augmentation initiale de la concentration plasmatique de FL est dose-dépendante pour les doses de 4 et 7,5 Gy, en revanche il a été observé une diminution de la quantité de FL présente dans le plasma des souris 11 Gy-50%, 11 Gy-75%, 11 Gy-100% comparativement aux souris 7,5 Gy-50%, 7,5 Gy-75%, 7,5 Gy-100%.

Ainsi, l'augmentation initiale de la concentration plasmatique de FL est étroitement liée à la fraction de moelle osseuse irradiée et dans une moindre mesure à la dose d'irradiation.

1.1.4 Effet d'une irradiation hétérogène sur le nombre de progéniteurs médullaires survivants dans la moelle osseuse présente en territoire exposé et en territoire protégé.

Afin d'analyser cette relation plus précisément, nous avons tenté de relier les variations de concentration plasmatique de FL à une notion d'atteinte médullaire. Pour ce faire, nous avons quantifié la réponse hématopoïétique aux irradiations hétérogènes des animaux en suivant les nombres de progéniteurs survivants dans les territoires irradiés et non irradiés, en considérant que la sensibilité de réponse des progéniteurs médullaires à la combinaison de cytokines n'est pas modifiée par l'irradiation. Ainsi nous avons étudié la moelle osseuse contenue dans le fémur droit situé dans le champ d'irradiation et le fémur gauche protégé de l'irradiation. De plus, la rate contenant une petite fraction des progéniteurs, nous avons également suivi l'évolution de leur nombre après irradiation.

L'irradiation induit une importante diminution du nombre absolu de CFC dans le fémur droit quelles que soient la dose et la configuration d'irradiation (pour exemple figure 17-A).

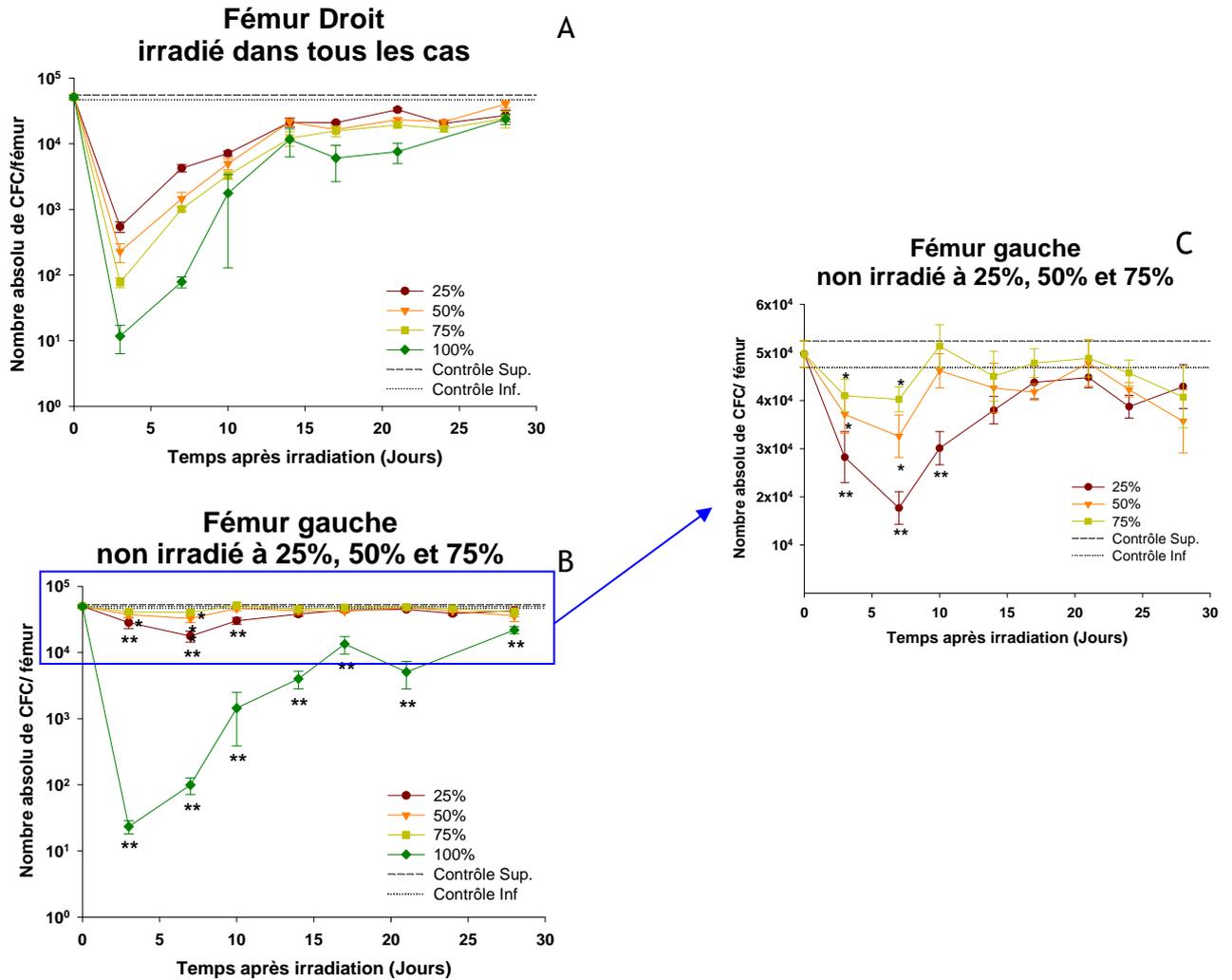


Figure 17 : Effet d'irradiations hétérogènes incluant 25%, 50%, 75% ou 100% de la moelle osseuse sur le nombre de progéniteurs hématopoïétiques survivants dans le fémur droit (A) et le fémur gauche (B et C) après une irradiation à 7,5 Gy chez des souris BALB/c en fonction du temps après exposition. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 5 animaux. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés. (A) : Tous les points sont significatifs avec $p < 0.01$ ou $p < 0.05$ hormis le groupe 7,5 Gy-50% à J28 non significatif. (B et C) : les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Bien que la dose reçue localement au fémur droit soit identique (7,5 Gy dans notre exemple), l'aplasie médullaire locale est d'autant plus profonde que le pourcentage de moelle osseuse exposé est grand. Ainsi, 3 jours après l'irradiation les nombres absolus de CFC dans le fémur droit étaient respectivement de 572 ± 99 pour 7,5 Gy-25%, 227 ± 73 pour 7,5 Gy-50%, 77 ± 13 pour 7,5 Gy-75% et de 11 ± 5 pour 7,5 Gy-100%. Ce résultat pourrait s'expliquer par un état inflammatoire général plus important chez les animaux irradiés sur une large fraction de la moelle osseuse qui aurait pour conséquence une augmentation locale de l'aplasie médullaire en fonction du pourcentage de moelle osseuse exposée.

Parallèlement, une diminution du nombre de CFC a été observée dans le fémur gauche bien qu'il n'ait pas été exposé chez les souris irradiées sur 25%, 50% et 75% des territoires médullaires (Figure 17-B et C). La diminution du nombre de CFC dans le fémur gauche est d'autant moins importante que le champ d'irradiation est grand (Figure 17-B et C). En effet, au jour 3 après l'irradiation seuls $28.10^3 \pm 5.10^3$ CFC ont été dénombrées à 25% contre $37.10^3 \pm 3.10^3$ à 50% et $41.10^3 \pm 3.10^3$ à 75%. Cette diminution du nombre de CFC dans le fémur gauche pourrait s'expliquer par une diffusion du rayonnement dans la zone protégée. Or, les résultats de la dosimétrie physique réalisée sur nos animaux montrent que le fémur gauche n'a pas été exposé. Deux autres hypothèses pourraient expliquer cette réduction du nombre de CFC dans le fémur gauche. La première est l'existence d'un effet à distance qui induirait une atteinte indirecte des territoires protégés, via des molécules solubles par exemple, comme cela a été décrit pour le poumon à la suite d'une irradiation abdominale (Van der Meeren *et al.*, 2005). Intuitivement, malgré l'absence de preuves expérimentales, l'effet à distance devrait augmenter avec le pourcentage de moelle osseuse irradié. Or, ce n'est pas le cas dans notre étude. La seconde hypothèse est celle d'une migration des progéniteurs provenant de la zone protégée vers la zone irradiée. Dans ce cas, il est possible que plus le territoire protégé est important, plus il est apte à délocaliser un grand nombre de progéniteurs. Cette hypothèse pourrait expliquer que la diminution du nombre de CFC dans le fémur gauche est d'autant plus importante

que le territoire protégé est grand et que l'aplasie dans le territoire irradié augmente avec le pourcentage de moelle osseuse exposé. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par le dosage du SDF-1, molécule chimio-attractante des cellules stromales ainsi que par la détection des CFC circulantes.

Néanmoins, ces hypothèses sont formulées à partir du suivi des nombres de CFC présents dans la moelle osseuse fémorale, soit 6,7% de la moelle osseuse totale. C'est pourquoi, l'extrapolation à l'organisme entier reste délicate.

Environ 1% des CFC totales présentes dans l'animal sont localisées dans la rate. Après irradiation, une diminution significative de ce nombre a été observée (résultats non présentés). Néanmoins, cet organe se situant à l'extrême limite du champ d'irradiation, nous ne pouvons pas exclure qu'il ait reçu une dose d'irradiation même faible. Les variations des nombres de CFC présents dans la rate ont néanmoins été considérées dans l'évolution globale des nombres de CFC à l'échelle de l'animal.

1.1.5 Effet d'une irradiation hétérogène sur le nombre de progéniteurs survivant dans l'ensemble de l'animal

La finalité de cette étude étant de comparer l'atteinte médullaire globale c'est à dire à l'échelle de l'organisme à un paramètre sanguin (le FL), nous avons déterminé le nombre total de progéniteurs hématopoïétiques survivants dans chaque animal. Pour ce faire, nous avons évalué le nombre absolu de progéniteurs survivant par extrapolation à partir du nombre de progéniteurs en territoires médullaires irradiés et protégés, avec la répartition de la moelle osseuse de la souris telle que décrite par Boggs (Boggs, 1984). Cette évaluation a donc été réalisée en considérant que chaque fémur représente 6,7% de la moelle osseuse totale de l'animal. Ainsi, en additionnant les nombres absolus de CFC présents dans la moelle osseuse exposée, la moelle osseuse non exposée et dans la rate, nous avons obtenu une estimation du nombre absolu de progéniteurs survivants dans chaque animal (Figure 18).

Le nombre total de progéniteurs était fortement diminué par l'irradiation dès J3, quelles que soient la dose et la configuration de l'irradiation (Figure 18).

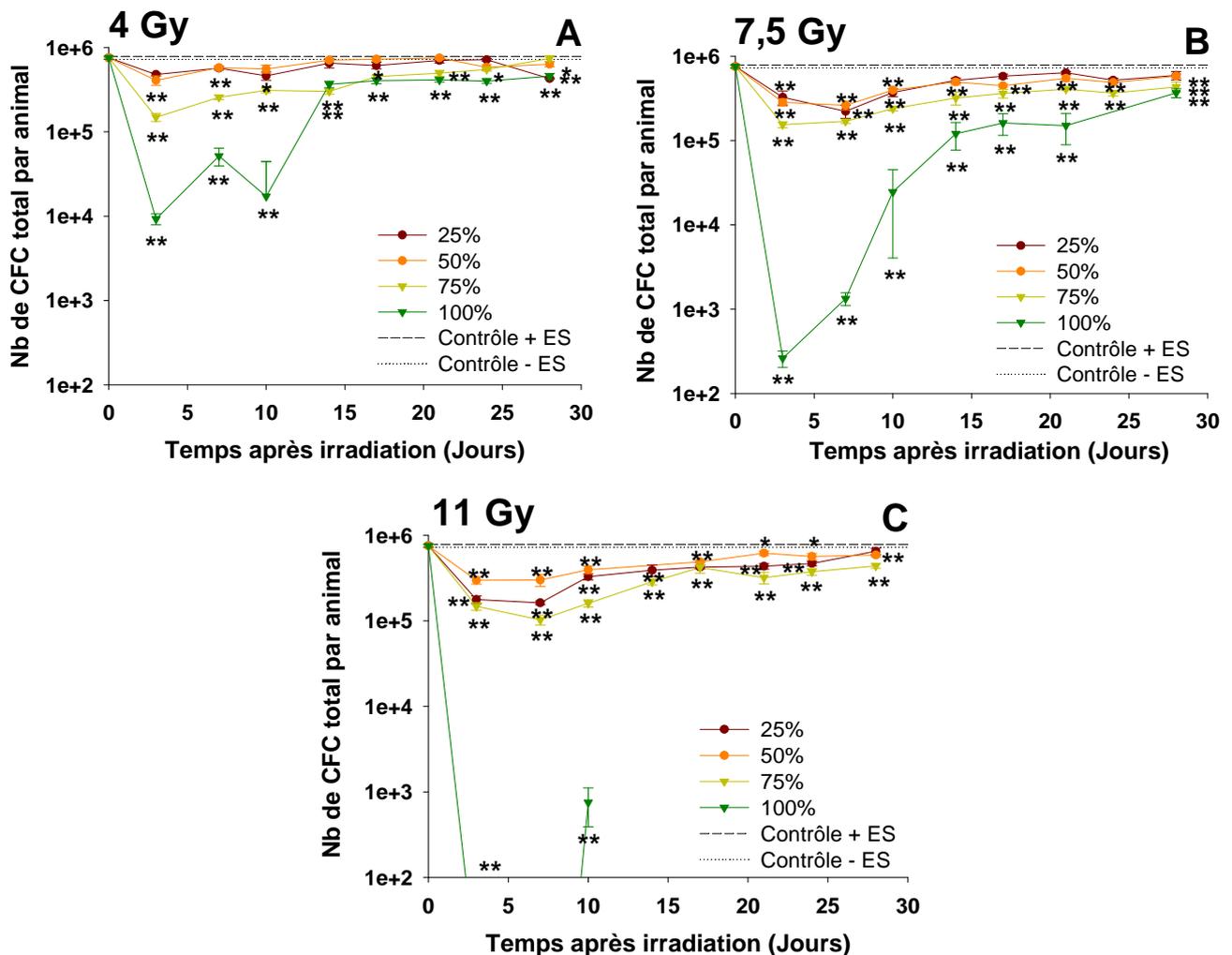


Figure 18 : Effet d'irradiations hétérogènes incluant 25%, 50%, 75% ou 100% de la moelle osseuse sur le nombre de progéniteurs hématopoïétiques survivants dans l'ensemble de l'animal après des irradiations de 4 Gy (A) 7,5 Gy (B) ou 11 Gy (C) chez des souris BALB/c en fonction du temps après exposition. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 5 animaux. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Les animaux exposés à 4 Gy-25% et 4 Gy-50% présentaient une évolution des nombres de CFC survivantes similaire durant les 28 jours suivant l'irradiation (Figure 18-A). En effet, dans ces deux groupes, nous avons pu observer une diminution des nombres de CFC au jour

3, 7 et 10 suivie par une phase de récupération hématopoïétique. Chez les animaux irradiés à 4 Gy-75% et 4 Gy-100%, les aplasies médullaires étaient d'autant plus profondes et persistantes que la fraction de moelle osseuse irradiée était importante. En effet, le nombre de CFC atteignait $1.48 \cdot 10^5 \pm 0.16 \cdot 10^5$ pour le groupe 4 Gy-75% et $0.09 \cdot 10^5 \pm 0.01 \cdot 10^5$ pour le groupe 4 Gy-100% pour des durées d'aplasie de 24 jours chez les animaux 4 Gy-75% et supérieure à 28 jours chez les animaux 4 Gy-100%.

Une exposition à 7,5 Gy induit une diminution rapide des nombres de progéniteurs survivants quelle que soit la configuration d'irradiation (Figure 18-B). La sévérité de cette atteinte médullaire croît avec le pourcentage de moelle osseuse exposé. Bien que la profondeur de l'aplasie médullaire semble similaire chez les animaux 7,5 Gy-25% et 7,5 Gy-50%, seuls les animaux exposés sur 25% des territoires médullaires présentent une récupération hématopoïétique complète au jour 28 témoignant ainsi d'une atteinte médullaire plus sévère chez les animaux 7,5 Gy-50%. Le suivi des nombres de progéniteurs chez les souris 7,5 Gy-75% montre que ce groupe d'animaux présente une aplasie plus profonde que les précédents, néanmoins très inférieure à celle observée chez les animaux 7,5 Gy-100%. En outre, l'importante différence observée entre les groupes 7,5 Gy-75% et 7,5 Gy-100% illustre la capacité d'un territoire médullaire protégé même de taille restreinte à compenser l'atteinte radio-induite globale (Cole *et al.*, 1967).

Une diminution radio-induite du nombre de CFC a également été observée après des irradiations à 11 Gy quelles que soient les configurations considérées (Figure 18-C). Bien que l'aplasie médullaire des animaux 11 Gy-50% soit moins profonde que celle des animaux 11 Gy-25% ($2.9 \cdot 10^5 \pm 0.2 \cdot 10^5$ vs $1.7 \cdot 10^5 \pm 0.1 \cdot 10^5$, $p = 0.016$ au jour 3), la récupération hématopoïétique n'était complète au jour 28 que chez les animaux 11 Gy-25%. Les animaux irradiés sur 75% des territoires médullaires présentaient également une importante diminution des nombres de progéniteurs qui persiste durant les 28 jours de l'étude. L'irradiation à 11 Gy-100% induisait une réduction dramatique des nombres de

CFC, néanmoins, le début de récupération hématopoïétique qui semblait se dessiner au jour 7 n'a pas pu être confirmé en raison du décès précoce des animaux.

Les estimations des nombres de CFC que nous avons réalisées ont permis de vérifier qu'un territoire médullaire de volume modeste est capable d'atténuer considérablement l'atteinte médullaire globale après une irradiation. De plus, le suivi des nombres de progéniteurs à l'échelle de l'organisme montre une évolution inverse à celle observée pour la concentration plasmatique de FL pour toutes les configurations d'irradiation, hormis 11Gy-50%. La discordance entre les animaux 11Gy-50% et les 11 autres configurations est sans doute liée à une légère différence de radiosensibilité de ce lot de souris. Cependant, l'ensemble des résultats suggère très fortement que le FL puisse être un reflet périphérique de l'atteinte médullaire.

1.1.6 Corrélation entre la concentration plasmatique de FL et la sévérité de l'atteinte médullaire

Afin d'étudier la relation pouvant exister entre les variations de FL plasmatique et l'atteinte médullaire radio-induite, nous avons corrélé le nombre de progéniteurs hématopoïétiques survivants avec la concentration de FL circulant, (Figure 19) quels que soient le temps, la dose ou la configuration d'irradiation.

Les résultats ont montré l'existence d'une corrélation négative entre la concentration plasmatique de FL et le nombre absolu de CFC par animal ($r^2 = -0.715$, $p < 0.001$, $n = 433$). Il est remarquable que cette relation entre concentration de FL et nombre résiduel de CFC n'est pas linéaire. Ainsi, le FL est bio-indicateur du statut fonctionnel global de la moelle osseuse après une irradiation hétérogène.

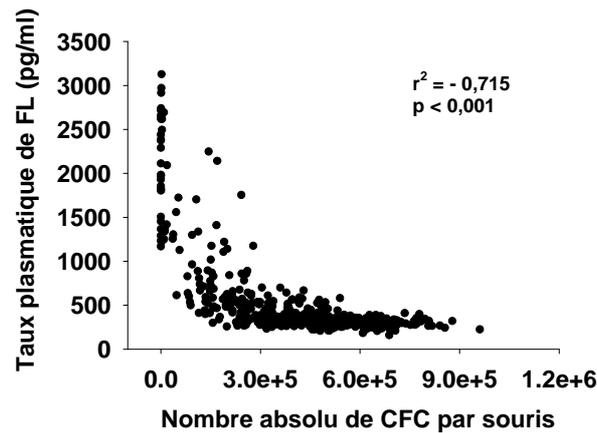


Figure 19 : Corrélation entre la concentration plasmatique de FL et le nombre absolu de CFC par souris après des irradiations hétérogènes à 4, 7,5, et 11 Gy. Chaque point représente un animal (n=438).

Afin de déterminer si le FL pouvait être utilisé comme bio-indicateur prédictif d'une atteinte médullaire globale en situation d'irradiation accidentelle hétérogène, nous avons corrélé le taux plasmatique de FL du jour 3 avec différents paramètres liés à la sévérité de l'aplasie médullaire.

Nous avons en premier lieu étudié la relation existant entre le nombre total de CFC par animal au jour 3 et le taux plasmatique de FL à ce même temps afin de déterminer s'il pouvait refléter simultanément l'atteinte médullaire (Figure 20).

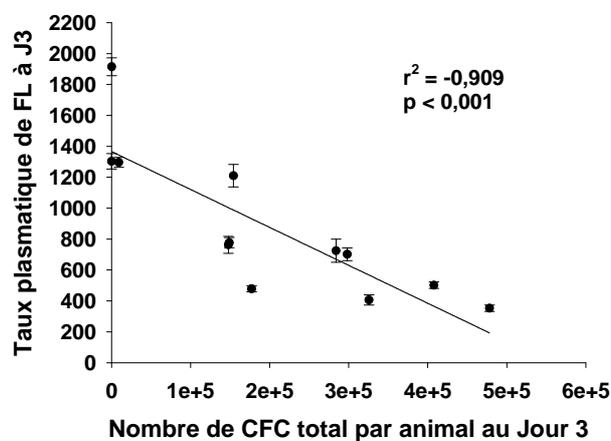


Figure 20 : Corrélation entre la concentration plasmatique de FL (pg/ml) au jour 3 et le nombre absolu de CFC par souris au jour 3 après des irradiations hétérogènes à 4, 7,5, et 11 Gy. Chaque

point représente une valeur moyenne de 5 animaux correspondant à une configuration d'irradiation (n=12) et la droite représente la régression linéaire.

Cette analyse démontre clairement l'existence d'une forte corrélation négative ($r^2=-0,909$, $p<0,001$, $n=12$) entre le nombre total de CFC par animal et le taux plasmatique de FL au jour 3 après l'irradiation. Ainsi, cette protéine est un excellent reflet périphérique en temps réel de l'atteinte médullaire dans la phase précoce qui suit l'irradiation quelle que soit la dose et le pourcentage de moelle osseuse irradiée.

Après une irradiation, plus l'atteinte médullaire est sévère plus la leucopénies et la thrombopénies sont persistantes. Afin de déterminer si le taux de FL plasmatique à J3 pouvait renseigner de façon prédictive sur ces paramètres, dans le cas d'irradiations hétérogènes, nous avons corrélé le taux moyen de FL mesuré au jour 3 avec la durée de la leucopénie d'une part (Figure 21-A) et de la thrombopénie d'autre part (Figure 21-B).

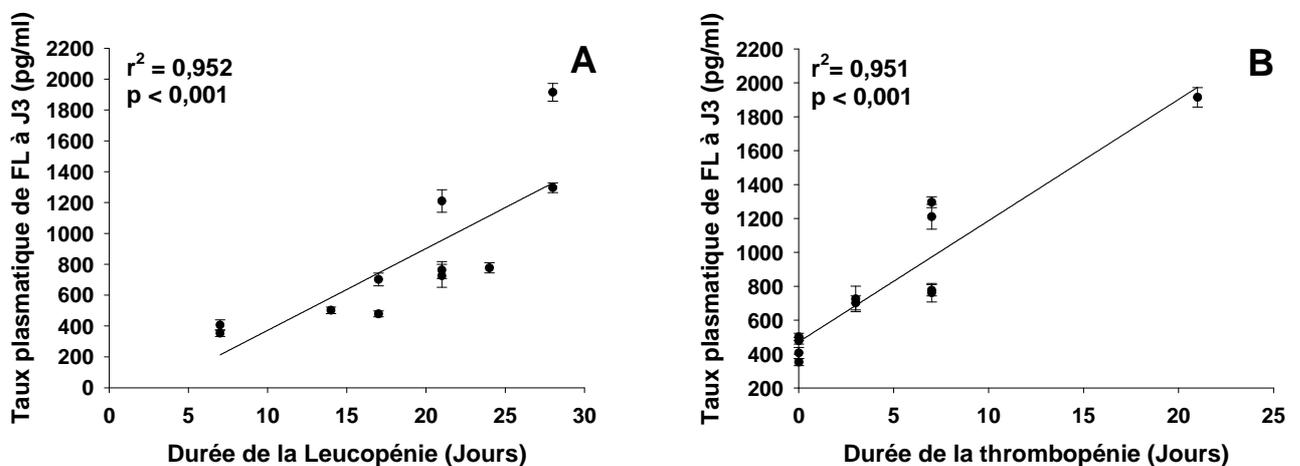


Figure 21 :Corrélation entre la concentration plasmatique de FL au jour 3 et la durée de la leucopénie (A) et de la thrombopénie (B) après des irradiations hétérogènes à 4, 7,5, et 11 Gy. Chaque point représente une valeur moyenne de 5 animaux correspondant à une configuration d'irradiation (n=11) et les droites représentent les régressions linéaires.

Ainsi nous avons démontré l'existence d'une forte corrélation entre la concentration plasmatique de FL à J3 et les durées de leucopénie ($r^2=0,952$, $p<0,001$, $n=11$) et de thrombopénie ($r^2=0,951$, $p<0,001$, $n=11$).

Le FL est donc un très bon facteur prédictif de la durée de la pancytopénie radio-induite quelle que soit la dose d'irradiation ou le pourcentage de moelle osseuse exposée.

Enfin, nous avons étudié le taux de FL plasmatique comme facteur prédictif de la durée de l'aplasie médullaire radio-induite (*i.e.* lorsque le nombre de CFC total est significativement différent du contrôle) (Figure 22).

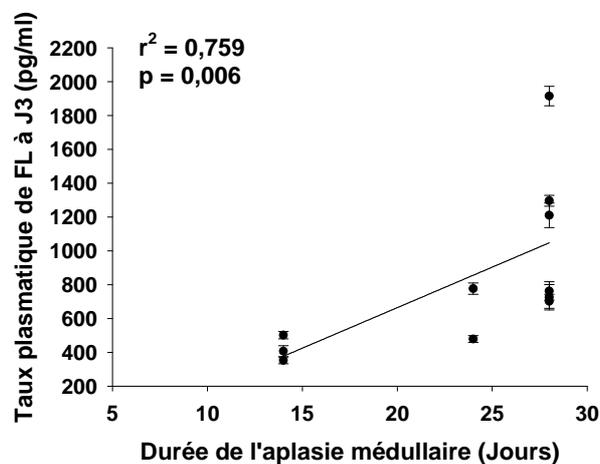


Figure 22 : Corrélation entre la concentration plasmatique de FL au jour 3 et la durée de l'aplasie médullaire radio-induite suite à des irradiations hétérogènes à 4, 7,5, et 11 Gy. Chaque point représente une valeur moyenne de 5 animaux correspondant à une configuration d'irradiation ($n=11$) et la droite représente la régression linéaire.

Une fois encore, nous avons mis en évidence l'existence d'une corrélation ($r^2=0,759$, $p=0,006$, $n=11$) entre le taux plasmatique de FL au jour 3 et la durée de l'aplasie médullaire radio-induite confirmant la validité du FL comme indicateur prédictif de la sévérité de l'atteinte médullaire.

Ces différentes analyses mettent en évidence que le dosage du FL au 3^{ème} jour après l'irradiation pourrait permettre d'évaluer le nombre total de CFC survivantes à J3, les durées de leucopénie, de thrombopénie et d'aplasie médullaire, fournissant ainsi de précieuses informations quant à la sévérité de l'atteinte hématopoïétique radio-induite.

1.1.7 Construction d'équations mathématiques en vue de prédire la sévérité de l'atteinte médullaire

Les résultats des corrélations ainsi réalisées étant encourageants, nous avons réalisé des régressions linéaires afin de définir des équations permettant de prédire mathématiquement le nombre total de CFC survivantes à J3 et les durées de leucopénie, de thrombopénie et d'aplasie médullaire à partir du taux plasmatique de FL au 3^{ème} jour après l'irradiation.

Ainsi, quatre équations ont été construites prédisant respectivement le nombre total de CFC survivantes à J3 (équation 1), la durée de la leucopénie (équation 2), la durée de la thrombopénie (équation 3), et la durée de l'aplasie médullaire (équation 4):

Equation 1 : $CFC \text{ à J3} = 447217.444 - (281.401 \times FL \text{ à J3})$

Où CFC à J3 est le nombre total de CFC par animal à J3 post irradiation
FL à J3 est le taux de FL plasmatique au 3^{ème} jour après l'irradiation

Equation 2 : $Durée \text{ Leucopénie} = 8.313 + (0.0124 \times FL \text{ à J3})$

Où Durée Leucopénie est la durée de la leucopénie radio-induite
FL à J3 est le taux de FL plasmatique au 3^{ème} jour après l'irradiation

Equation 3 : $Durée \text{ Thrombopénie} = -5.197 + (0.00123 \times FL \text{ à J3})$

Où Durée Thrombopénie est la durée de la thrombopénie radio-induite
FL à J3 est le taux de FL plasmatique au 3^{ème} jour après l'irradiation

Equation 4 : $Durée \text{ Aplasie} = 16.397 + (0.00851 \times FL \text{ à J3})$

Où Durée Aplasie est la durée de l'aplasie médullaire radio-induite
FL à J3 est le taux de FL plasmatique au 3^{ème} jour après l'irradiation

Les paramètres de chaque équation sont résumés dans le tableau 2

	Paramètre étudié	n	Coefficients		
			r	r ²	p
Equation 1	CFC à J3	12	0.831	0.690	< 0.001
Equation 2	Durée Leucopénie	11	0.812	0.660	0.002
Equation 3	Durée Thrombopénie	11	0.937	0.879	< 0.001
Equation 4	Durée Aplasie	11	0.638	0.407	< 0.001

Tableau 2 : Paramètres des régressions linéaires

A partir du taux plasmatique de FL mesuré à J3, nous pouvons donc déterminer le nombre total de CFC par animal dans 69% des cas (Pourcentage correspondant au coefficient de corrélation r^2) avec une fiabilité de 94% (Pourcentage correspondant à la performance du test), la durée de la leucopénie radio-induite dans 66% des cas avec une fiabilité de 89%, et la durée de la thrombopénie dans 87% des cas avec une fiabilité de 99%.

Bien qu'il ait été possible de définir une équation prédisant la durée d'aplasie à partir du taux plasmatique de FL au jour 3, le nombre de cas où cette équation s'applique est faible (40%) et la fiabilité n'est que de 57%. Cette équation semble donc ne pas être adaptée à la détermination de la durée de l'aplasie radio-induite. Néanmoins, l'imprécision de cette équation est sans doute explicable de par la nature même des valeurs qui ont été utilisées pour la construire. En effet, pour les configurations d'irradiation 4 Gy-100%, 7,5 Gy-50%, 7,5 Gy-75% 7,5 Gy-100%, 11 Gy-50%, 11 Gy-75% et 11 Gy-100% la récupération hématopoïétique n'était pas complète au jour 28, ainsi nous avons fait une approximation de la durée d'aplasie à 28 jours, durée extrême de notre étude. C'est pourquoi il est difficile d'affirmer que le FL n'est pas capable de prédire la durée d'aplasie radio-induite. Il conviendrait, pour valider ou infirmer cette hypothèse, de réaliser une étude

supplémentaire couvrant la totalité de la durée d'aplasie médullaire de chaque configuration d'irradiation.

Ces analyses statistiques ont cependant montré que le FL est bio-indicateur de la sévérité de l'atteinte médullaire après des irradiations homogènes et hétérogènes. D'autre part, elles ont permis de définir des équations mathématiques permettant de prédire le nombre total de CFC survivant chez les animaux à J3, la durée de la leucopénie radio-induite et la durée de la thrombopénie radio-induite à partir de la concentration plasmatique de FL mesurée très précocement après l'irradiation (3^{ème} jour).

Cette capacité prédictive du FL en fait un indicateur d'un intérêt majeur pour l'évaluation de la sévérité de l'atteinte médullaire radio-induite qui pourrait s'avérer capital dans les choix de stratégies thérapeutiques à mettre en place en cas d'irradiations accidentelles hétérogènes ou pour réévaluer les traitements mis en place précocement. Ces deux utilisations du FL ne sont pas exclusives.

1.2 Etude clinique

Suite à l'étude réalisée chez la souris, nous avons cherché à savoir si le FL pouvait également être un bio-indicateur de l'atteinte médullaire globale radio-induite après des irradiations localisées chez l'homme.

1.2.1 Concentration plasmatique physiologique de FL chez l'homme

Nous avons au préalable défini le taux plasmatique physiologique de FL chez l'homme. La concentration plasmatique de FL a été déterminée chez 82 donneurs sains comprenant 49 hommes et 33 femmes âgés de 20 à 68 ans. Dans cette population, la concentration plasmatique de FL moyenne est de 113 ± 24 pg/ml sans différence significative en fonction de l'âge ou du sexe (107 ± 25 pg/ml chez l'homme vs 120 ± 21 pg/ml chez la femme)

(Figure 23). Les valeurs mesurées se situent dans la zone de linéarité de réponse du test de dosage, zone qui va de 15,6 Pg/ml à 1000pg/ml.

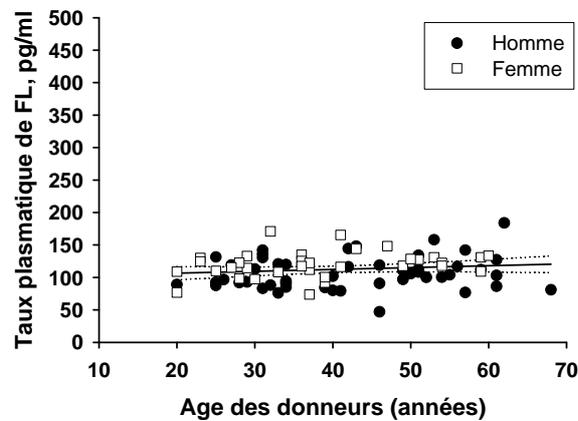


Figure 23 : Concentration plasmatique de FL en fonction de l'âge chez des donneurs sains. Chaque point représente un donneur masculin (cercles noirs) ou féminin (carré blanc). La ligne pleine représente la régression linéaire ($r^2 = 0.021$, $n = 82$), avec un intervalle de confiance de 95% (lignes en pointillés).

La concentration plasmatique basale de FL que nous avons déterminée est légèrement supérieure à celles précédemment décrites dans le sérum de donneurs sains (Lyman *et al.*, 1995b; Todd *et al.*, 1997). Néanmoins, cette valeur est proche de celle mesurée dans le plasma de primates non humains (Bertho *et al.*, 2001). La différence observée entre nos résultats et ceux décrits par d'autres équipes pourrait être liée à la nature de l'échantillon. En effet, nous avons travaillé sur du plasma tandis que le taux de FL a été mesuré dans le sérum pour les deux études citées.

1.2.2 Concentration plasmatique en FL chez les patients avant le début de la radiothérapie

Les 27 patients présentant des affections malignes inclus dans cette étude ont été traités selon 2 protocoles de radiothérapie. Le premier était un protocole standard avec une fraction de 2 à 5 Gy par jour, 5 jours par semaine jusqu'à administration de la dose totale.

Le second était un protocole séquentiel comprenant 2 fractions de 4 à 5,75 Gy par semaine toutes les deux semaines jusqu'à administration de la dose totale. Pour chaque patient, la concentration plasmatique en FL a été mesurée au jour 0 de la radiothérapie (Figure 24).

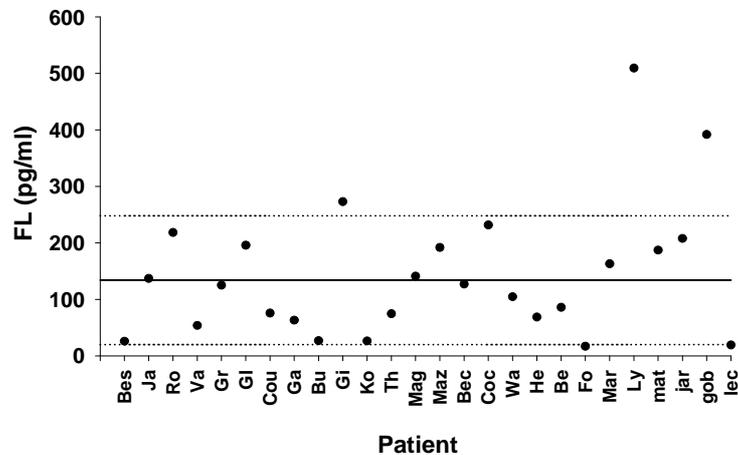


Figure 24 : Concentration plasmatique de FL de chaque patient. La moyenne (droite noire) et l'écartype (droite en pointillés) sont également représentés.

La valeur moyenne du taux plasmatique de FL (134 ± 114 pg/ml), est non significativement différente de la valeur moyenne observée chez les donneurs sains. Parmi les 27 patients, 7 suivaient un traitement par glucocorticoïdes et semblaient présenter une concentration plasmatique de FL moyenne plus faible que les autres patients (85 ± 17 pg/ml) néanmoins, cette différence n'était pas significative par comparaison avec les patients non traités par glucocorticoïdes. De plus, pour les 3 patients séropositifs pour le virus d'immunodéficience humaine (VIH), la concentration plasmatique de FL (144 ± 70 pg/ml) n'est pas apparue significativement différente de celle mesurée chez les patients traités par glucocorticoïdes ou chez les donneurs sains.

1.2.3 Estimation du volume médullaire irradié

Pour chaque patient, un diagramme de la zone irradiée a été réalisé, puis la fraction de moelle osseuse exposée a été estimée. Cette évaluation a été réalisée à partir de travaux antérieurs décrivant la distribution de la moelle osseuse active chez l'adulte (Cristy, 1981)

et considérant que la moelle osseuse active représente 4,5% de la masse corporelle totale. Le champ d'irradiation comprenait 40 à 680 ml de moelle osseuse. Afin de valider les estimations ainsi réalisées, le volume médullaire irradié de 9 patients a été déterminé par contournement des zones médullaires sur coupes sériées obtenues par tomodensitométrie et confronté au volume estimé grâce à la table de Cristy (Figure 25).

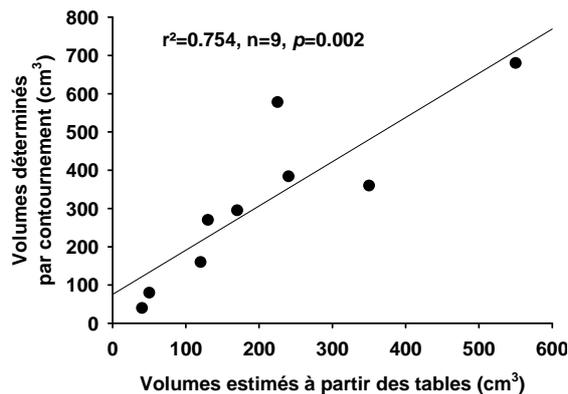


Figure 25 : Corrélation entre le volume médullaire estimé grâce aux tables de Cristy et le volume médullaire déterminé par contournement de la moelle osseuse sur coupes sériées obtenues par tomodensitométrie. Chaque point représente un patient. La ligne pleine représente la régression linéaire.

Il existe une bonne corrélation entre les résultats obtenus par ces deux méthodes d'évaluation du volume médullaire ($r^2 = 0,754$, $n = 9$, $p = 0,002$).

1.2.4 Corrélation entre la concentration plasmatique de FL et les nombres de leucocytes et de plaquettes

La concentration plasmatique de FL et les nombres de leucocytes et de plaquettes circulants ont été suivis durant la radiothérapie de 22 patients sur les 27 que comprenait l'étude. En effet, pour 5 patients, seule une mesure de FL et de NFS a pu être effectuée durant la radiothérapie, ne permettant pas la réalisation d'un suivi. Les résultats montrent une augmentation de la concentration plasmatique de FL associée à une diminution du

nombre de leucocytes d'une part et de plaquettes d'autre part. A titre d'exemple, la figure 26 représente les évolutions du FL, des leucocytes et des lymphocytes pour les patients #7 et #16 présentant des champs d'irradiation différents.

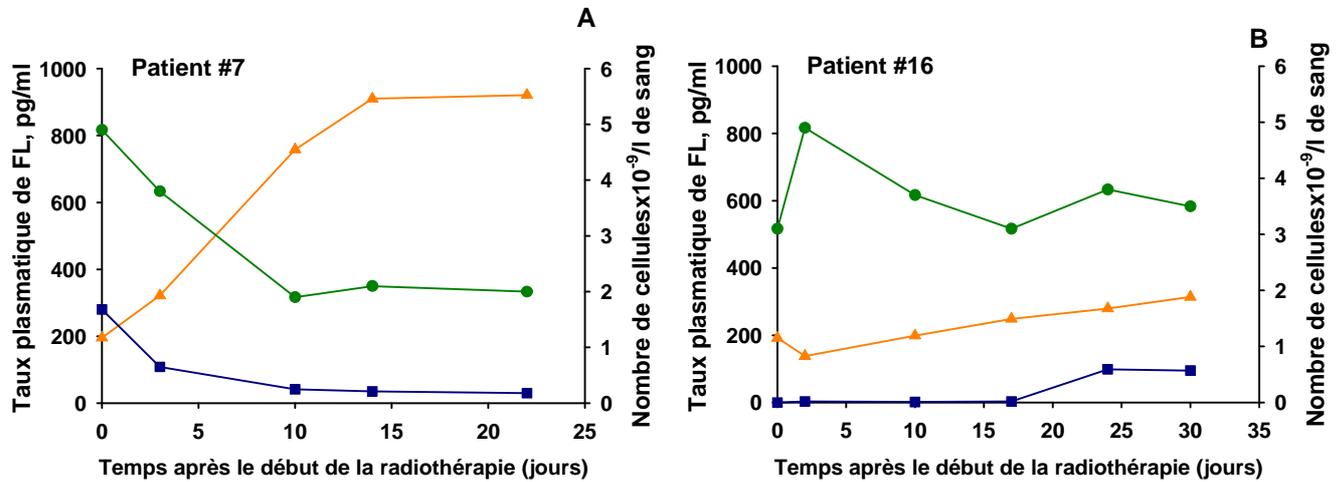


Figure 26 : A : Evolution de la concentration plasmatique de FL pendant le traitement par radiothérapie chez le patient #7 (courbes oranges) irradié au niveau des vertèbres C1-C6 et L1-L5 à 23.4 Gy et chez le patient #16 (courbes vertes) irradié localement au niveau de la scapula à 40 Gy. B : Effet de la radiothérapie sur les nombres de leucocytes (triangles) et de lymphocytes (cercles) chez les patients #7 (courbes oranges) et #16 (courbes vertes).

Le patient #7 a reçu une dose cumulée de 23.4 Gy sur 2 zones couvrant les vertèbres C1 à C6 et L1 à L5 ce qui correspond à environ 27% de la moelle osseuse exposée. Par contre, le patient #16 a été irradié en champ très restreint, où seule une scapula, équivalent à 3% de la moelle osseuse, a été exposée à une dose cumulée d'irradiation de 40 Gy.

L'étude de la relation existant entre la concentration plasmatique de FL et les nombres de cellules circulantes a mis en évidence l'existence de corrélations négatives entre la concentration plasmatique de FL et le nombre de leucocytes d'une part ($r^2 = 0.363$, $n = 95$, $p < 0.01$) (Figure 27-A) et le nombre de plaquettes d'autre part ($r^2 = 0.195$, $n = 95$, $p < 0.05$) (Figure 27-B).

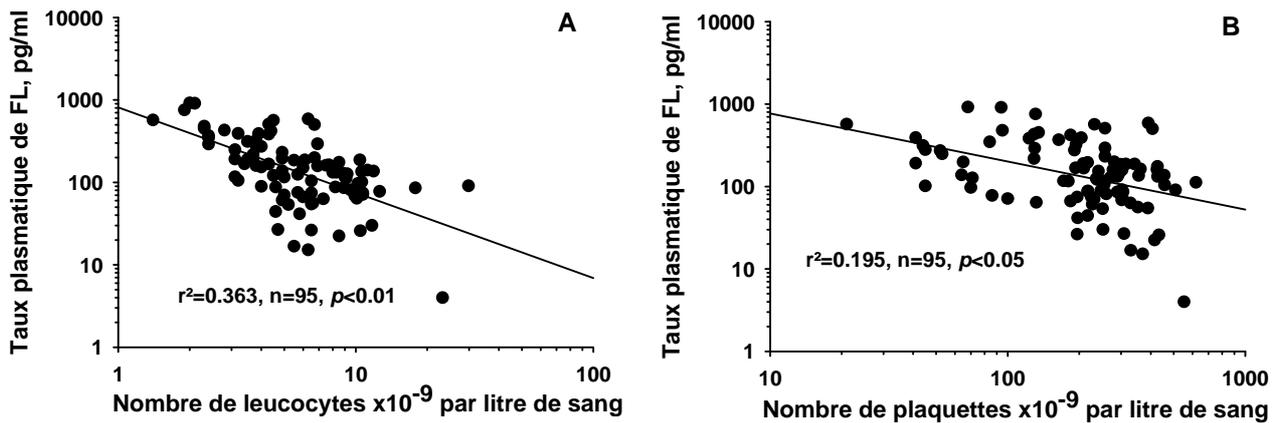


Figure 27 : Corrélation entre la concentration plasmatique de FL et le nombre de leucocyte (A) et de plaquettes (B) chez les 22 patients suivis durant leur traitement par radiothérapie fractionnée. Chaque point représente un prélèvement sanguin.

Les variations des nombres de cellules circulantes sont le reflet de l'activité du compartiment médullaire. Les corrélations que nous avons établies suggèrent donc très fortement que le taux de FL plasmatique soit lié à cette activité dans les situations d'irradiations hétérogènes chez l'homme.

1.2.5 Corrélation entre la concentration plasmatique de FL, la dose cumulée d'irradiation et la fraction de moelle osseuse irradiée

Afin d'étudier la relation existant entre la concentration plasmatique de FL, la dose cumulée d'irradiation et la fraction de moelle osseuse irradiée, nous avons calculé pour chaque patient, les aires sous la courbe (ASC) de FL permettant d'intégrer la notion de temps dans les variations de FL (Figure 28). Cela nous a permis de tenir compte de la durée de l'augmentation plasmatique de FL.

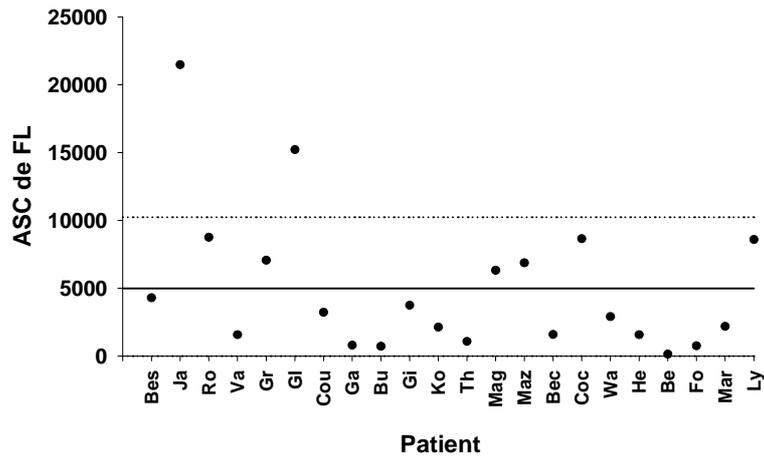


Figure 28 : Aires sous la courbe de FL (ASC) pour chaque patient.

Les résultats ont montré que l'ASC de FL moyenne était de 4982.6 ± 5253.7 (valeur médiane 3065.5, gamme : 139.8 - 21478.0) (Tableau 3). De plus, nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives liées au protocole d'irradiation (standard ou séquentiel) ou au traitement par glucocorticoïdes.

Groupe	<i>n</i>	Moyenne \pm sem	Médiane	Gamme
Tous patients	22	4982.6 ± 5253.7	3065.5	139.8-21478.0
Protocole standard	15	5655.2 ± 5863.4	3743.0	715.3-21478.0
Protocole séquentiel	7	3541.3 ± 3582.1	2186.0	139.8-8645.9
Trait. glucocorticoïde	18	5346.1 ± 5531.7	3065.5	715.3-21478.0
Non traité	4	3347.0 ± 3931.0	2248.9	139.8-8750.4

Tableau 3 : Moyennes des aires sous la courbe de FL (ASC) et influence des différents traitements sur les ASC.

Afin d'étudier la relation existant entre l'évolution de la concentration plasmatique de FL et l'atteinte médullaire radio-induite nous avons réalisé une régression linéaire multiple à partir des valeurs d'ASC de FL, de dose cumulée d'irradiation et de fraction de moelle osseuse exposée des 22 patients suivis tout au long de leur traitement. Les résultats

montrent l'existence d'une très forte corrélation entre ces trois paramètres (Tableau 4). Bien que la représentation graphique en trois dimensions de cette relation (Figure 29) suggère que la régression dépende essentiellement de deux patients, l'analyse statistique démontre une contribution à cette corrélation similaire à la fois de la dose cumulée d'irradiation et de la fraction de moelle osseuse irradiée (Tableau 4), avec une valeur de significativité inférieure à 0,005. Ceci montre bien la validité de cette analyse statistique.

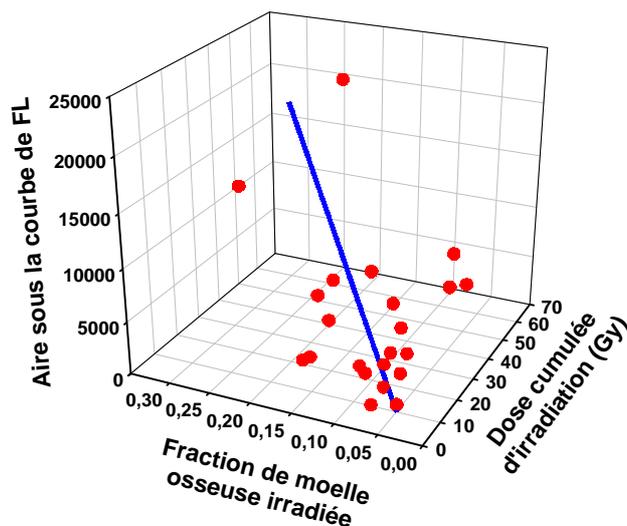


Figure 29 : Représentation graphique de la corrélation existant entre l'ASC de FL, la dose d'irradiation cumulée et le volume médullaire exposé où chaque point représente un patient.

Groupe	n	r	r^2	p	Contribution de la dose d'irradiation cumulée (p)	Contribution de la fraction de moelle osseuse irradiée (p)
Tous patients	22	0.691	0.477	0.002	0.012	0.017
Protocole standard	15	0.722	0.522	0.012	0.027	0.026
Protocole séquentiel	7	0.729	0.532	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

ns : non significatif

Tableau 4 : Résultats de l'analyse de la relation existant entre les ASC de FL, la dose d'irradiation cumulée et le volume médullaire exposé par régression linéaire multiple.

Une analyse comparable a été menée en tenant compte du type de fractionnement reçu par les patients. Ce travail a montré que la corrélation entre l'ASC de FL, la dose cumulée d'irradiation et la fraction de moelle osseuse exposée est retrouvée chez les patients traités en suivant un protocole de fractionnement standard (Tableau 4). De plus, la contribution relative de la dose cumulée d'irradiation et de la fraction de moelle osseuse exposée est similaire. En revanche, chez les patients traités par un protocole séquentiel, la corrélation n'a pas été observée en dépit du coefficient de corrélation élevé ($r^2 = 0.532$) probablement en raison du faible nombre de patients dans ce groupe (Tableau 4).

L'ensemble de cette étude a clairement mis en évidence que la concentration plasmatique de FL est directement corrélée à l'atteinte médullaire radio-induite après une irradiation hétérogène chez l'homme.

2 Mécanismes de régulations du FL

Bien que le FL soit décrit depuis plus de 10 ans (Lyman *et al.*, 1993a), ses mécanismes de régulations restent mal connus. L'hypothèse principale était que le taux plasmatique de FL était régulé par un équilibre entre la production de la protéine et sa consommation (Fichelson, 1998). Cette hypothèse était confortée par le fait qu'en situation d'aplasie médullaire, ou le nombre de cellules consommatrices est par définition fortement diminuée, la concentration plasmatique de FL était largement augmenté.

2.1 Test de l'hypothèse de consommation : FL et mobilisation

Afin de tester l'hypothèse de régulation proposée par Fichelson, nous avons réalisé, dans un modèle de primate non humain, des injections de G-CSF qui ont pour effet d'augmenter fortement le nombre de progéniteurs hématopoïétiques, c'est à dire le nombre de cellules consommatrices de FL. Ainsi, 6 animaux ont reçu, par injection sous cutanée, 10 µg/kg de G-CSF (Granocyte 13, Chugai Pharma France) pendant 5 jours (J0 à J4 inclus), selon un

protocole identique à celui utilisé pour la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques dans le sang périphérique chez l'homme.

2.1.1 Etude de la relation entre la concentration plasmatique de FL avant la mobilisation et le nombre de cellules CD34⁺ mobilisées

D'autres équipes avaient suggéré que la concentration plasmatique de FL avant mobilisation pourrait être prédictive du nombre de cellules CD34⁺ mobilisables (Gazitt et Liu, 2000; Haidar *et al.*, 2002). Pour chaque animal, nous avons donc corrélé le nombre de cellules CD34⁺ mobilisées à J5 avec la concentration plasmatique de moyenne de FL durant la période témoin (Figure 30). Une seconde corrélation a été réalisée entre le nombre cumulé de cellules CD34⁺ mobilisées entre J3 et J6 et la moyenne du taux plasmatique de FL durant la période témoin (Figure 30).

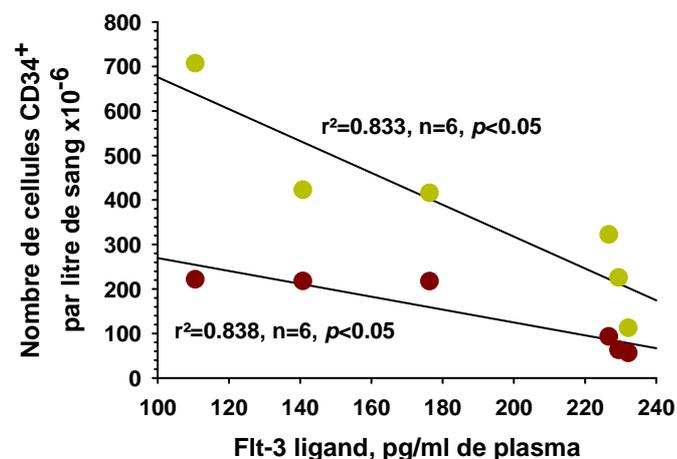


Figure 30 : Corrélation entre le nombre de cellules CD34⁺ mobilisées à J5 (cercles marrons) ou entre J3 et J6 (cercles verts) et la concentration plasmatique moyenne de la période témoin (J-3 à J0). Chaque point représente un animal et les lignes représentent les régressions linéaires.

Les analyses par régressions linéaires montrent qu'il existe une forte corrélation inverse entre le taux plasmatique moyen de FL avant la mobilisation et le nombre de cellules CD34⁺ mobilisées à J5 ($r^2=0,838$, $n=6$, $p<0,05$) d'une part, et le nombre cumulé de cellules CD34⁺ mobilisées entre J3 et J6 ($r^2=0,833$, $n=6$, $p<0,05$) d'autre part. Ainsi, nous avons pu

confirmer que la concentration plasmatique initiale de FL est un bon indicateur de la capacité de mobilisation d'un individu comme cela avait été suggéré précédemment (Gazitt et Liu, 2000; Haidar *et al.*, 2002).

2.1.2 Variation du taux plasmatique de FL au cours de la mobilisation

Comme cela a été évoqué, l'hypothèse de régulation de la concentration plasmatique de FL était un équilibre entre production et consommation de la protéine. Nous nous attendions donc à observer une diminution du taux de FL plasmatique associée à l'augmentation du nombre de cellules consommatrices durant la période de mobilisation. Bien que les nombres de CFU-GM et de cellules CD34⁺ soient nettement augmentés dans la moelle osseuse (Figure 31-A) et dans le sang (non présenté) pendant la mobilisation, le suivi de la concentration plasmatique de FL (Figure 31-B) ne montre aucune modification durant les 5 premiers jours.

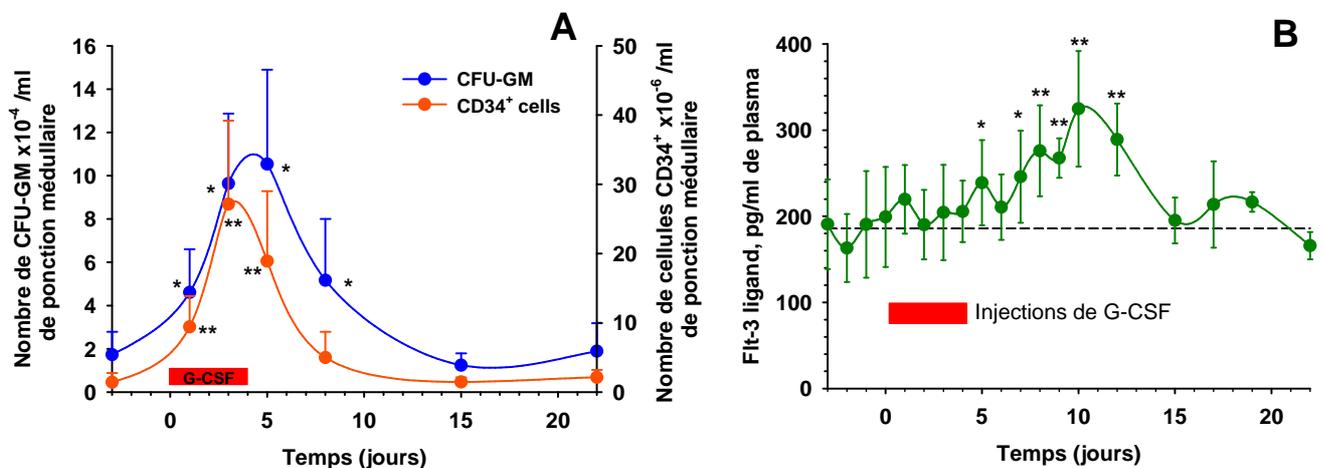


Figure 31 : Evolution de la concentration plasmatique de FL (A) et des nombres de CFU-GM et de cellules CD34⁺ dans la moelle osseuse (B) durant la mobilisation. Chaque point représente une moyenne \pm ET de 6 animaux. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec la période témoin (J-3 à J0) et les différences significatives sont représentées pour * $p<0,05$ et ** $p<0,01$.

Les variations de la concentration plasmatique de FL ne sont intervenues que tardivement entre les jours 5 et 12. Ainsi, au maximum, une augmentation moyenne de 1,5 fois a pu être observée 10 jours après le début de la mobilisation ($187,9 \pm 51,8$ pg/ml pendant la période témoin vs. $324,8 \pm 67,1$ pg/ml à J10, $p < 0.001$). Parallèlement, nous avons observé une diminution de la concentration en progéniteurs et en cellules CD34⁺ dans la moelle osseuse. Puis le taux plasmatique moyen de FL et les nombres de progéniteurs et de cellules CD34⁺ retournaient à la normale à J15.

Ainsi, cette étude a mis en évidence que l'augmentation du nombre de cellules consommatrices de FL n'induit pas de variation simultanée du taux plasmatique de FL. Donc la concentration plasmatique de FL n'est pas une simple résultante d'un équilibre entre la production et la consommation de la protéine. Les mécanismes de régulation du taux plasmatique de FL sont manifestement plus complexes. En outre, nos résultats suggèrent l'intervention de cellules capables de produire du FL dans différentes situations de stress.

Nous avons cherché à étudier plus précisément les mécanismes de régulations du taux de FL plasmatique. Dans ce but, nous nous sommes intéressés aux cellules capables de produire du FL en situation de stress.

2.2 Etude de l'implication des cellules lymphoïdes chez la souris

Les lymphocytes T ayant été décrit comme capable de produire du FL après irradiation (Chklovskaja *et al.*, 1999), nous avons étudié leur implication dans l'augmentation du taux plasmatique de FL. Pour ce faire, nous avons irradié deux souches de souris de même fond génétique, l'une sauvage (BALB/c) et l'autre présentant un déficit en cellules lymphoïdes matures (NOD/SCID). Ces animaux ont été irradiés en ICT à des doses allant de 0 à 15 Gy pour les BALB/c et de 0 à 4 Gy pour les souris NOD/SCID qui présentent une radiosensibilité plus élevée. Les animaux ont été euthanasiés à différents temps (Jours 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, et 28) après l'exposition.

2.2.1 Evolution des leucocytes et des plaquettes après une irradiation corporelle totale

Chez les animaux non irradiés, il a été montré que le nombre de leucocytes circulants chez les souris NOD/SCID était inférieur à celui observé chez les souris BALB/c (1.35 ± 0.09 vs 4.39 ± 0.22 , $p \leq 0.001$).

L'irradiation a induit chez tous les animaux une diminution du nombre des leucocytes circulants dès le jour 3 (Figure 32). Cette diminution est dose-dépendante et le délai de récupération du nombre de cellules circulantes augmente avec la dose d'irradiation.

En effet, nous avons pu observer, chez les souris BALB/c une récupération complète au jour 28 pour les animaux irradiés à 2 Gy, tandis que les animaux exposés à des doses plus importantes avaient encore, à J28, un nombre de leucocytes inférieur au groupe témoin (Figure 32-A). En revanche, chez les souris NOD/SCID aucun groupe d'animaux n'a atteint une récupération complète au jour 28 (Figure 32-B).

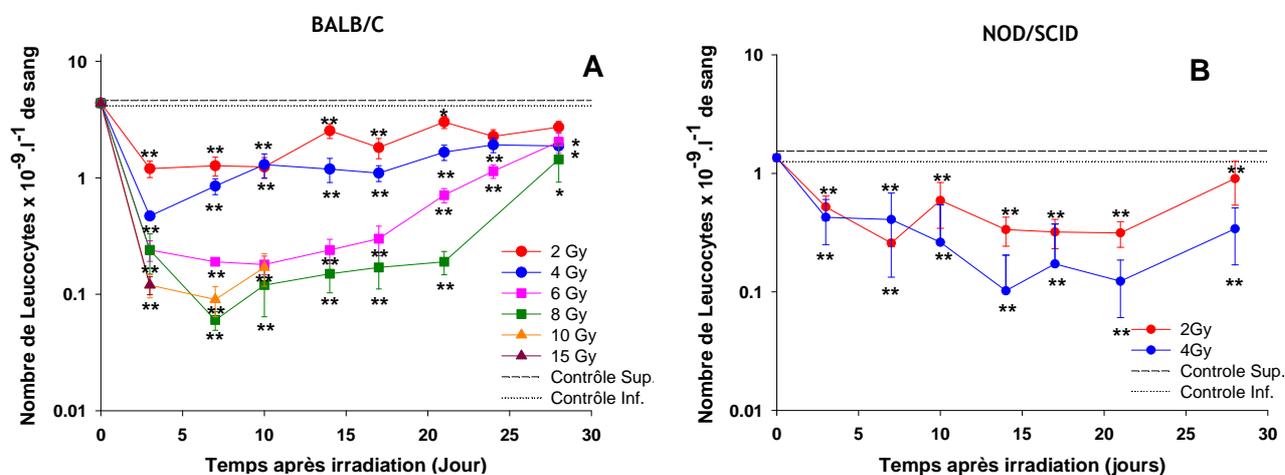


Figure 32 : Effet de l'irradiation corporelle totale sur le nombre de leucocytes circulants chez la souris BALB/c (A) et chez la souris NOD/SCID (B) en fonction du temps après exposition. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 5 animaux. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Nous avons également observé que l'irradiation induit une réduction du nombre de plaquettes circulantes (Figure 33).

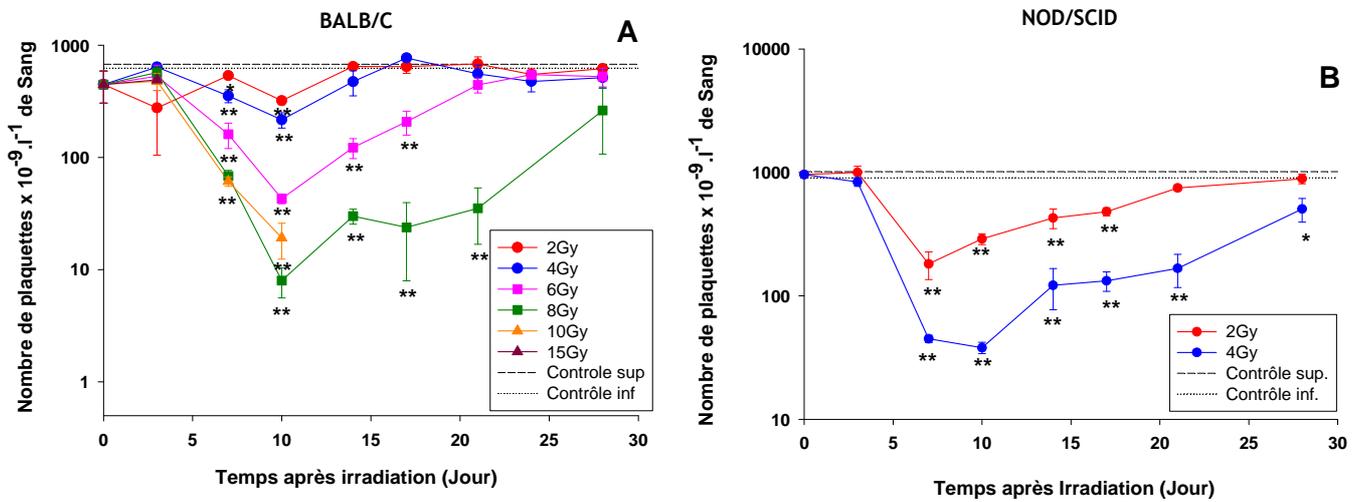


Figure 33 : Effet de l'irradiation corporelle totale sur le nombre de plaquettes circulantes chez la souris BALB/c (A) et chez la souris NOD/SCID (B) en fonction du temps après exposition. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 5 animaux. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Cette diminution a conduit à un nadir au jour 10 chez les souris BALB/c quelle que soit la dose d'exposition et aux jours 7 et 10 respectivement pour les souris NOD/SCID irradiées à 2 et 4 Gy. Suite au nadir, le nombre de plaquettes circulantes a augmenté pour atteindre des valeurs normales au jour 14 pour les souris BALB/c irradiées à 2 et 4 Gy et aux jours 21 et 28 respectivement pour les animaux exposés à 6 et 8 Gy. Chez les souris NOD/SCID, le nombre de thrombocytes n'est plus significativement différent de celui observé chez les animaux témoins au jour 28 pour les souris irradiées à 2 Gy, tandis qu'il le reste pour les animaux irradiés à 4 Gy.

2.2.2 Variation de la concentration plasmatique de FL après des ICT chez les souris BALB/c et NOD/SCID

Le taux basal de FL observé chez les souris BALB/c ($250,4 \pm 7,1$ pg/ml) est comparable à celui des souris NOD/SCID ($262,4 \pm 8,4$ pg/ml, *n.s.*) malgré l'importante réduction du nombre de leucocytes observée chez les animaux immunodéficients. Dans les deux souches de souris, l'irradiation induit une augmentation de la concentration plasmatique de FL dès le jour 3 et quelle que soit la dose d'exposition (Figure 34). Notons que l'évolution de la concentration plasmatique de FL est biphasique chez les souris BALB/c irradiées à 6 et 8 Gy comme chez les souris NOD/SCID irradiées à 2 et 4 Gy. Le second pic sera évoqué ultérieurement.

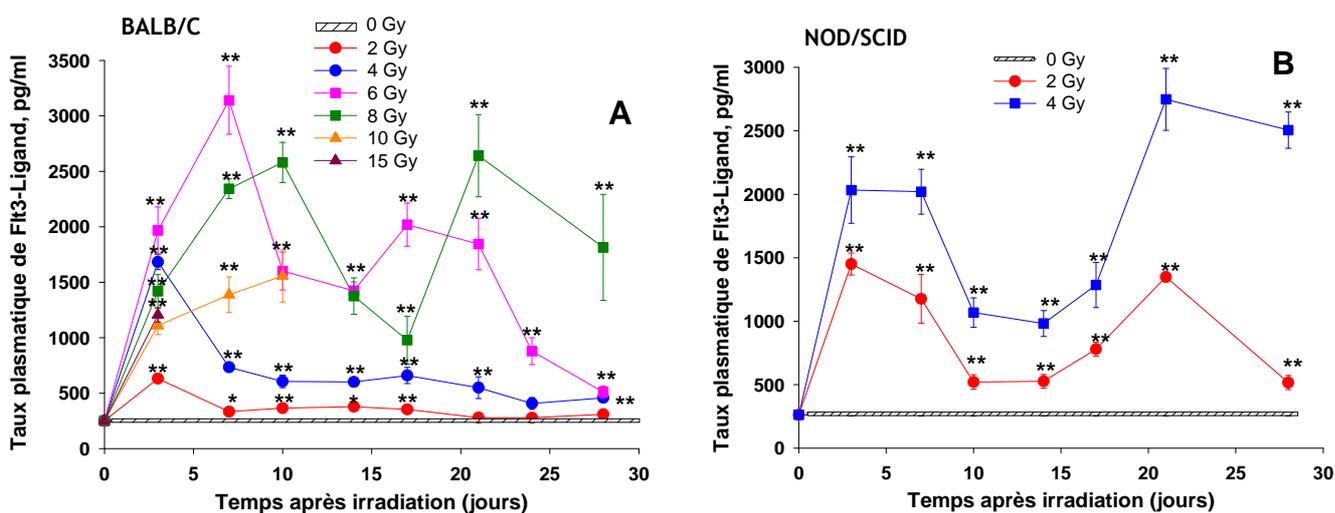


Figure 34 : Effet de l'irradiation corporelle totale sur la concentration plasmatique de FL chez la souris BALB/c (A) et chez la souris NOD/SCID (B) en fonction du temps après exposition. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 5 animaux. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Chez la souris BALB/c, l'augmentation initiale a abouti à un pic de concentration dont le temps est variable en fonction de la dose d'irradiation : pour les animaux irradiés à 2 et 4 Gy le pic est observé au jour 3, contre les jours 7 et 10 respectivement pour les doses de 6

et 8 Gy. Cette étude a également montré que l'augmentation radio-induite initiale de FL serait dose-dépendante pour les irradiations allant de 2 à 6 Gy et que le pic de concentration serait d'autant moins important que la dose était forte pour les doses de 8, 10 et 15 Gy (Figure 34-A).

La dose de 8 Gy est classiquement admise comme la dose létale 50/30 (définie comme la dose induisant le décès de 50 % des animaux à 30 jours) ($DL_{50/30}$) chez la souris (Hendry et Feng-Tong, 1995). Dans notre modèle, la $DL_{50/30}$ a été déterminée expérimentalement à 7,96 Gy. Il apparaît donc que l'augmentation initiale de la concentration plasmatique de FL est dose-dépendante pour les irradiations infra-létales. En revanche, pour les irradiations à doses supra-létales, l'augmentation initiale du taux plasmatique de FL semble être d'autant moins importante que la dose d'exposition est élevée (Figure 35).

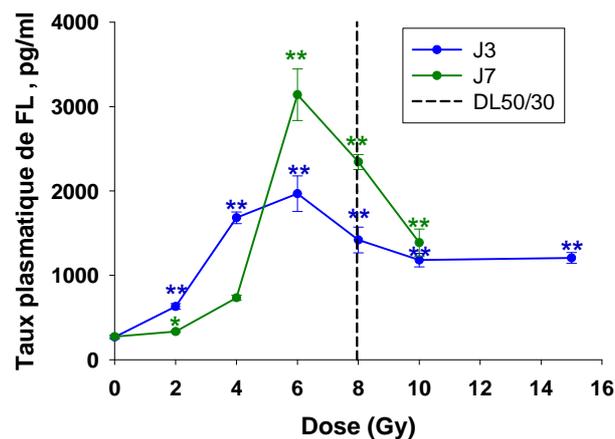


Figure 35 : Effet de la dose d'irradiation sur la concentration plasmatique de FL chez la souris BALB/c au jour 3 (courbe bleue) et au jour 7 (courbe verte). La droite en pointillé représente la $DL_{50/30}$ déterminée expérimentalement à 7,96 Gy. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 5 animaux. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Ainsi, pour les doses inférieures à la $DL_{50/30}$, l'augmentation initiale dose-dépendante de la concentration plasmatique de FL après l'irradiation pourrait être la résultante de la combinaison entre la diminution de la consommation de la protéine et l'augmentation de sa production. Pour les doses supérieures à la $DL_{50/30}$, l'augmentation plus lente de la

concentration plasmatique de FL pourrait être due à la réduction radio-induite du nombre de cellules productrices de FL.

Quelques jours après l'augmentation initiale, une seconde élévation de la concentration plasmatique de FL a été observée chez les souris BALB/c irradiées à 6 et 8 Gy (aux jours 17 et 21 respectivement) (Figure 34-A) puis le taux plasmatique de FL tend à diminuer. Néanmoins, le temps de retour à un taux de FL physiologique augmente avec la dose d'irradiation. Ainsi, les animaux irradiés à 2 Gy et 4 Gy retrouvent un état basal de FL respectivement aux jours 21 et 24, tandis que cet état n'est pas atteint au jour 28 pour les animaux irradiés à 6 et 8 Gy.

Chez la souris NOD/SCID, comme chez la souris BALB/c, l'irradiation a induit une augmentation dose-dépendante de la concentration plasmatique de FL après irradiation aboutissant à un pic au jour 3, suivi par un second pic au jour 21 (Figure 34-B). Néanmoins, la comparaison des deux lignées de souris a montré une cinétique d'évolution du FL différente après irradiation. En effet, à dose d'exposition équivalente, les taux plasmatiques de FL étaient plus importants chez les souris NOD/SCID que chez les souris BALB/c (Figure 36). De plus, une seconde augmentation de la concentration plasmatique de FL est observée chez les souris NOD/SCID au jour 21 pour les doses de 2 et 4 Gy tandis que seul un pic a été observé chez les souris BALB/c. Enfin, le retour au taux basal de FL n'est pas atteint chez les souris NOD/SCID au jour 28 tandis que les souris BALB/c ont retrouvé la valeur de FL physiologique dès les jours 21 et 24 respectivement pour les doses de 2 et 4 Gy.

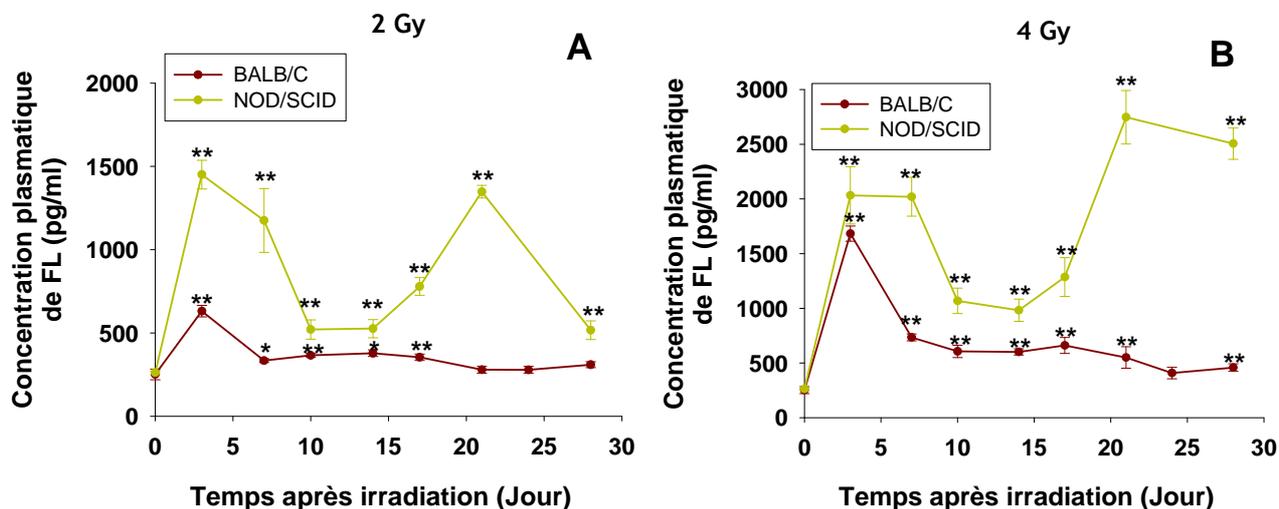


Figure 36 : Comparaison des augmentations radio-induites de la concentration plasmatique de FL en fonction du temps chez les souris BALB/c et NOD/SCID après irradiation corporelle totale à 2 Gy (A) ou 4 Gy (B). Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 5 animaux. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Ainsi, chez les souris NOD/SCID, le déficit constitutif en cellules lymphoïdes n'induit pas de diminution de la concentration plasmatique de FL après irradiation. Il est au contraire associé à des valeurs de FL plasmatique plus élevées. Ces concentrations plasmatiques supérieures à celles des animaux immunocompétents pourraient être liées au déficit en LT lui-même, mais aussi à la radiosensibilité intrinsèque des animaux NOD/SCID qui est plus importante que celle des BALB/c. Quoiqu'il en soit, ce résultat montre que les LT ne sont pas les seules cellules capables de réguler le taux plasmatique de FL.

2.2.3 Effet d'irradiation corporelle totale sur le nombre de progéniteurs survivants dans la moelle osseuse de souris BALB/c et NOD/SCID

Afin de déterminer l'influence du déficit en cellules lymphoïdes matures sur la relation existant entre la concentration plasmatique de FL et le nombre de progéniteurs survivants dans la moelle osseuse, nous avons déterminé, pour chaque groupe d'animaux, le nombre CFC survivantes après irradiation dans la moelle osseuse (Figure 37) et dans la rate. Cette étude a été menée en considérant que la sensibilité des progéniteurs aux cytokines,

présentes dans le milieu de culture, est similaire chez les deux lignées de souris. Cependant, seul 1% des CFC étant localisé dans la rate, les résultats de cet organe n'ont pas été présentés. L'analyse des nombres de progéniteurs survivants dans la moelle osseuse a été réalisée dans les fémurs. L'irradiation étant homogène, l'analyse des fémurs reflétait la réponse médullaire globale. Quelle que soit la lignée de souris considérée et la dose d'exposition, une diminution dose-dépendante du nombre de progéniteurs a été observée au jour 3 après irradiation. Le suivi des nombres de CFC a également montré que le délai de la récupération hématopoïétique augmente avec la dose d'irradiation.

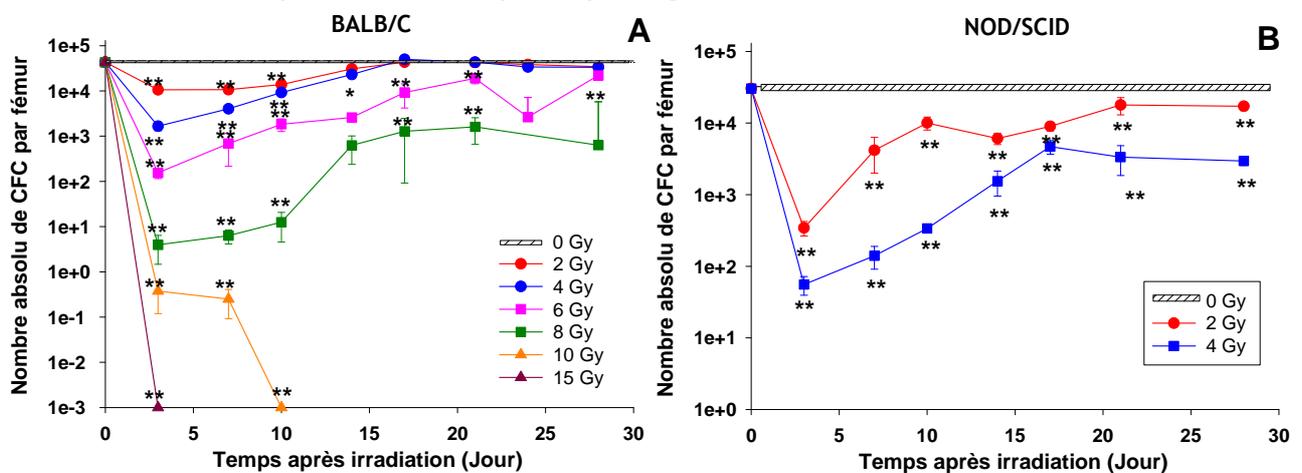


Figure 37 : Effet de l'irradiation corporelle totale sur le nombre de progéniteurs survivants dans la moelle osseuse chez la souris BALB/c (A) et chez la souris NOD/SCID (B) en fonction du temps après exposition. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 5 animaux. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

En effet, chez les souris BALB/c, le nombre de progéniteurs présents dans la moelle osseuse n'est plus significativement différent des animaux témoins aux jours 14 et 17 pour les souris irradiées respectivement à 2 et 4 Gy, tandis que la récupération hématopoïétique n'est pas achevée au jour 28 pour les animaux exposés à 6 et 8 Gy.

De même, chez les souris NOD/SCID, la diminution dose-dépendante du nombre de progéniteurs survivants a été suivie par une récupération hématopoïétique qui reste incomplète au jour 28. Néanmoins, à dose équivalente, l'atteinte hématopoïétique est plus

importante dans la lignée de souris NOD/SCID. Globalement, chez les deux souches de souris étudiées, les nombres de progéniteurs survivants dans la moelle osseuse montrent une évolution inverse à celle observée pour la concentration plasmatique de FL.

Il avait été démontré une corrélation entre le nombre de CFC et le taux sérique de FL chez l'homme (Wodnar-Filipowicz *et al.*, 1996), nous avons donc étudié la relation existant entre les progéniteurs hématopoïétiques et la concentration plasmatique de FL chez les animaux BALB/c et NOD/SCID. Bien qu'une corrélation négative entre la concentration plasmatique de FL et le nombre de CFC ait été mise en évidence, chez la souris BALB/c ($r^2 = -0,764$, $p < 0,001$, $n = 220$) comme chez la souris NOD/SCID ($r^2 = -0,816$, $p < 0,001$, $n = 67$), il existe deux restrictions à cette analyse globale. La première est liée à l'existence d'un seuil de détection lors de la détermination du nombre de progéniteurs qui se situe à 1 CFC pour 10^5 cellules de moelle osseuse soit 0,5 CFC par fémur. Ainsi, pour les animaux irradiés à des doses supérieures à 6 Gy, chez lesquels on ne détecte pas de CFC, il existe une incertitude quant à l'évaluation de l'hématopoïèse. La seconde restriction est liée à la non-linéarité de la relation entre la concentration plasmatique de FL et la dose d'irradiation (Figure 29). Afin de limiter les incertitudes, nous avons donc exclu de l'analyse les animaux exposés à des doses supérieures ou égales à 8 Gy. Malgré ces deux restrictions, la corrélation entre le nombre de progéniteurs survivants et la concentration plasmatique de FL est retrouvée chez les souris BALB/c ($r^2 = -0.684$, $p < 0.001$, $n = 162$). Comme cela est présenté sur les figures 38-A et B, la relation existant entre la concentration plasmatique de FL et le nombre de CFC par fémur n'est pas linéaire quelle que soit la lignée de souris considérée, suggérant l'existence d'un seuil de FL au-delà duquel le nombre de CFC diminue drastiquement.

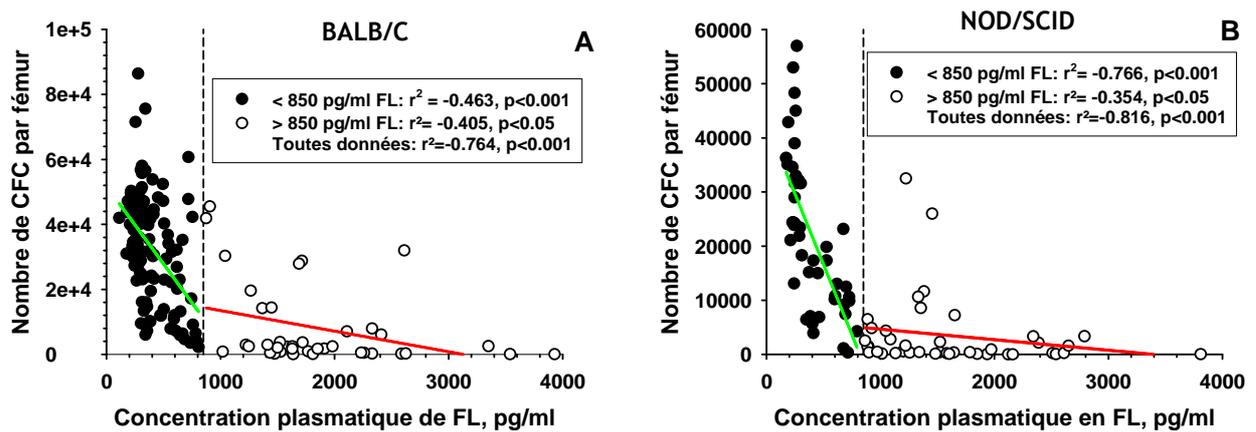


Figure 38 : Corrélation négative entre la concentration plasmatique de FL et le nombre de CFC dans la moelle osseuse après des irradiations corporelles totales à 0, 2, 4 et 6 Gy pour la souche BALB/c (A) et à 0, 2 et 4 Gy pour la souche de souris NOD/SCID (B). Chaque point représente un animal. Les droites représentent les régressions linéaires pour les groupes d'animaux ayant un taux de FL plasmatique supérieur à 850 pg/ml (droites rouges) ou inférieur à 850 pg/ml (droites vertes).

Le seuil de FL a été déterminé graphiquement à 850 pg/ml, définissant ainsi deux groupes d'atteinte médullaire. Un premier groupe comprenant des souris présentant un taux plasmatique de FL inférieur à 850 pg/ml et un nombre de CFC normal ou faiblement diminué a ainsi été caractérisé chez les souris BALB/c et NOD/SCID (cercles pleins, Figures 38-A et B). Le second groupe réunit les animaux ayant une concentration plasmatique de FL supérieure à 850 pg/ml (soit plus de trois fois supérieure au taux basal) et un nombre de CFC drastiquement diminué (cercles vides, Figures 38-A et B). Pour chacun des groupes ainsi définis, et quelle que soit la lignée de souris considérée nous avons pu corrélérer la concentration plasmatique de FL au nombre de CFC survivantes.

Le FL est donc un reflet dans le sang périphérique du nombre de progéniteurs présents dans la moelle osseuse chez la souris BALB/c comme chez la souris NOD/SCID. Ainsi, le déficit constitutif en cellules lymphoïdes matures ne modifie pas la corrélation entre le taux plasmatique de FL et le nombre de progéniteurs survivants dans la moelle osseuse

confirmant que les LT ne jouent pas un rôle prépondérant dans la régulation de la concentration plasmatique du FL après irradiation.

2.2.4 Etude des organes produisant du FL après irradiation

2.2.4.1 Expression de l'ARNm

Afin de déterminer quels organes et quels types cellulaires pouvaient être capables de produire du FL après irradiation, nous avons recherché l'ARNm codant le FL dans la moelle osseuse, la rate, le foie, le cerveau, le thymus et les cellules circulantes de souris BALB/c et NOD/SCID irradiées respectivement à 6 et 4 Gy. Ces doses ont été choisies en raison de leur capacité à induire des variations de la concentration plasmatique de FL de grande amplitude. De plus, la radiosensibilité des souris NOD/SCID étant supérieure à celles des souris BALB/c, nous avons choisi des doses d'irradiation non létales pour les deux lignées de souris inférieure d'environ 20% à la $DL_{50/30}$. La quantité d'ARNm a été déterminée pour chaque organe aux jours 0, 3, 7, 14, 21, 24 et 28. Les résultats ont montré que l'expression de l'ARNm codant le FL était faiblement modifiée dans la moelle osseuse, la rate, le foie et le cerveau après irradiation (Figure 39).

Chez la souris BALB/c, nous avons pu observer une légère augmentation de l'expression de l'ARNm codant le FL dans la moelle osseuse au jour 3 (1.2 ± 0.06) après l'irradiation suivi d'une réduction de cette expression aux jours 7 (0.72 ± 0.03), 21 (0.38 ± 0.02), et 28 (0.46 ± 0.10) (Figure 39-A). La modification majeure observée est une augmentation de $2,27 \pm 0,66$ fois de l'ARNm du FL dans la rate au 7^{ème} jour après irradiation.

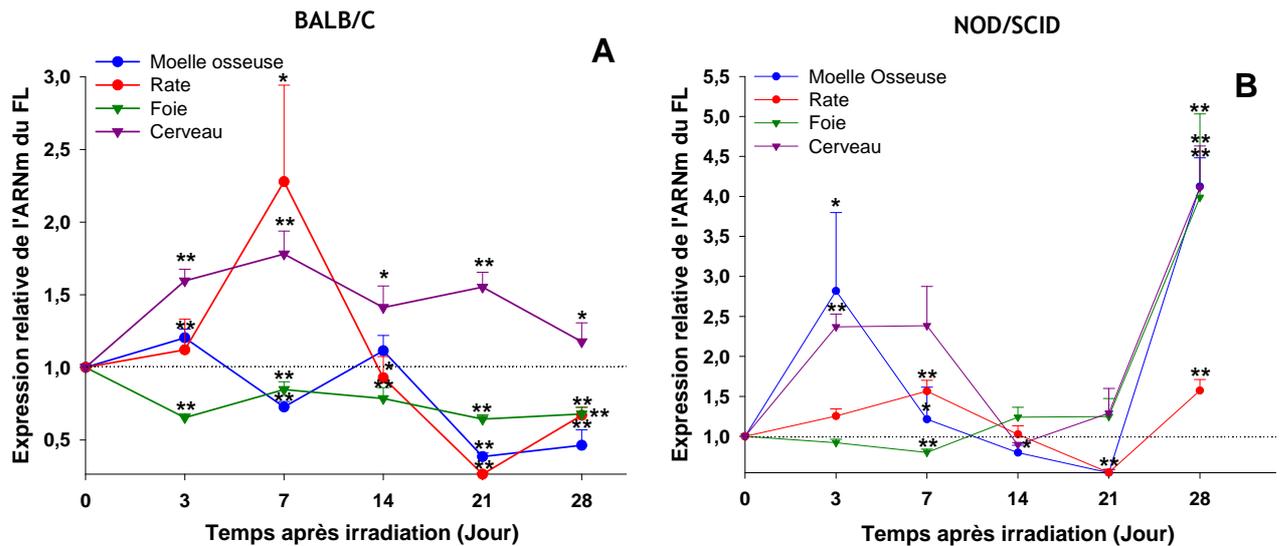


Figure 39 : Effet de l'irradiation sur l'expression de l'ARNm codant le FL en fonction du temps dans la moelle osseuse, la rate, le foie et le cerveau de souris BALB/c irradiées à 6 Gy (A) et de souris NOD/SCID irradiées à 4 Gy (B). Les variations de l'expression de l'ARNm du FL sont exprimées de façon relative par rapport aux témoins non irradiés (droite en pointillés). Chaque point représente une valeur moyenne \pm ES de 5 souris. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives ont été représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Chez la souris NOD/SCID, le profil d'expression de l'ARNm du FL est différent. En effet, nous avons observé une augmentation de sa quantité relative dans la moelle osseuse aux 3^{ème} ($2,81 \pm 0,98$) et 7^{ème} jours ($1,21 \pm 0,40$) après irradiation (Figure 39-B). Au jour 21, l'expression de l'ARNm du FL est diminuée ($0,54 \pm 0,03$) avant d'augmenter de nouveau au jour 28 ($4,12 \pm 0,36$). Peu de variations de l'ARNm du FL ont été observées dans la rate, le foie et le cerveau. Néanmoins, une élévation de sa quantité relative a été observée au jour 28 dans tous les organes considérés. L'ensemble de ces résultats montre que le profil d'expression de l'ARNm codant le FL dans la moelle osseuse, la rate, le cerveau et le foie est différent chez les deux lignées de souris.

Quelle que soit la lignée de souris considérée, les variations les plus importantes de l'expression de l'ARNm codant le FL ont été observées dans le thymus et les cellules circulantes (Figure 40).

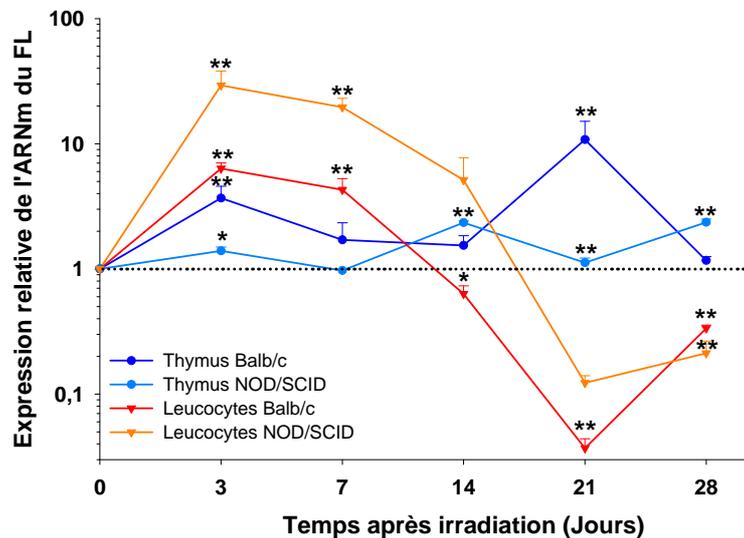


Figure 40 : Effet de l'irradiation sur l'expression de l'ARNm codant le FL en fonction du temps dans le thymus et les leucocytes de souris BALB/c irradiées à 6 Gy (courbes bleu foncé et rouge) et de souris NOD/SCID irradiées à 4 Gy (courbes bleu clair et orange). Les variations de l'expression de l'ARNm du FL sont exprimées de façon relative par rapport aux témoins non irradiés (droite en pointillés). Chaque point représente une valeur moyenne \pm ES de 5 souris. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives ont été représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

L'irradiation a induit, dès le 3^{ème} jour, une augmentation de l'expression de l'ARNm codant le FL dans les leucocytes dans les deux lignées de souris. Néanmoins, les taux relatifs atteints au terme de ces augmentations sont différents en fonction de la lignée considérée. Ainsi, chez la souris BALB/c l'expression de l'ARNm du FL a été augmentée de $6,33 \pm 0,68$ fois tandis que chez la souris NOD/SCID l'augmentation est de $29,24 \pm 8,8$ fois ($p < 0,001$). Au 7^{ème} jour après l'irradiation, l'expression de l'ARNm codant le FL reste

élevée dans les deux lignées de souris. Néanmoins, le taux relatif d'ARNm codant le FL était toujours plus important chez les souris NOD/SCID ($19,59 \pm 3,5$ vs $4,29 \pm 0,96$, $p < 0,001$). Au jour 14, l'expression de l'ARNm codant le FL était similaire chez les deux lignées de souris ($0,63 \pm 0,10$ pour les souris BALB/c vs $5,13 \pm 2,60$ pour les souris NOD/SCID, ns $p = 0,054$). Cette étude a montré également une diminution de l'expression de l'ARNm du FL au jour 21 ($0,03 \pm 0,007$ pour les souris BALB/c et $0,123 \pm 0,01$ pour les souris NOD/SCID, $p < 0,001$) et au jour 28 ($0,33 \pm 0,02$ pour les souris BALB/c et $0,21 \pm 0,05$ pour les souris NOD/SCID, ns $p = 0,065$).

Dans le thymus, l'irradiation a induit une augmentation de l'expression de l'ARNm du FL au jour 3 dans les deux lignées de souris. Cette augmentation est plus importante chez les souris BALB/c que chez les souris NOD/SCID ($3,68 \pm 0,88$ vs $1,39 \pm 0,1$, $p < 0,05$). Aux jours 7 et 14, l'expression de l'ARNm du FL est similaire dans les deux lignées de souris ($1,7 \pm 0,63$ vs $0,97 \pm 0,02$, $p = 0,722$ ns au jour 7, $1,54 \pm 0,3$ vs $2,34 \pm 0,07$, $p = 0,054$ ns au jour 14). En revanche, nous n'avons pu observer une seconde augmentation importante au jour 21 que chez les souris BALB/c ($10,1 \pm 4,3$ vs $1,12 \pm 0,1$ chez les NOD/SCID, $p < 0,01$). A l'inverse, au jour 28, l'expression de l'ARNm codant le FL est normalisée chez les souris BALB/c ($1,16 \pm 0,08$) alors qu'elle est légèrement augmentée chez les souris NOD/SCID ($2,36 \pm 0,13$, $p < 0,01$).

En conclusion, l'étude comparée de la quantité d'ARNm codant le FL présent dans différents organes des BalB/c et NOD/SCID montre que le profil d'expression de cet ARN est différent chez les deux lignées de souris après irradiation. Cette différence peut être liée à la radiosensibilité supérieure des souris NOD-SCID par rapport aux souris Balb/c.. Il est également possible que le déficit constitutif en cellules lymphoïdes existant chez les souris NOD-SCID soit à l'origine de cette différence. La très forte expression de l'ARNm codant le FL chez les souris NOD-SCID à J28, en particulier dans la moelle osseuse et dans le foie, alors que le nombre de lymphocytes circulants reste très bas, plaide en faveur de cette dernière hypothèse.

2.2.4.2 Concentration de la protéine

La quantification de l'ARNm reflète les variations de transcription du gène codant le FL. Néanmoins, seule la protéine est capable d'une activité physiologique. C'est pourquoi nous avons quantifié le FL sous sa forme protéique dans la moelle osseuse, le foie, la rate, le thymus, le SNC, et les leucocytes au jour 3 après irradiation afin de déterminer si ces organes ou cellules pouvaient être responsables de l'augmentation précoce de FL après irradiation. Dans chaque cas, la quantité de FL a été normalisée par rapport à la quantité de protéine totale, déterminée par un test colorimétrique. Cette étude a été menée parallèlement chez la souris BALB/c et chez la souris NOD/SCID. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la quantité basale de FL présente dans chacun des organes est similaire chez les deux lignées d'animaux en dépit du déficit en cellules lymphoïdes (tableau 5), seule une faible différence existe dans le foie.

Organes	BALB/c	NOD/SCID	Signification
Moelle osseuse	0,351 ± 0,01	0,363 ± 0.01	n.s.
Rate	0,908 ± 0,15	0,790 ± 0.26	n.s.
Thymus	0,781 ± 0,15	0,889 ± 0.36	n.s.
Cerveau	0,208 ± 0,02	0,148 ± 0.01	n.s.
Leucocytes	0,038 ± 0,003	0,040 ± 0.001	n.s.
Foie	0,319 ± 0,02	0,203 ± 0.02	$p = 0.016$

Tableau 5 : Quantité basale de FL présent dans la moelle osseuse, la rate, le thymus, le cerveau, les leucocytes et le foie chez les souris BALB/c et NOD/SCID. Chaque valeur est une moyenne ± ES de la quantité déterminée chez 5 souris. Les résultats sont exprimés en pg de FL pour 10 ng de protéine. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison des souris BALB/c et des souris NOD/SCID.

L'irradiation a induit une diminution d'environ deux fois de la quantité de FL présente dans la moelle osseuse au jour 3 (Figure 41) chez la souris BALB/c ($0,351 \pm 0,01$ pg/10 ng de protéines au jour 0 vs $0,163 \pm 0,09$ pg/10 ng de protéines au jour 3) comme chez la souris NOD/SCID ($0,363 \pm 0,01$ pg/10 ng de protéines au jour 0 vs $0,162 \pm 0,01$ pg/10 ng de protéines au jour 3).

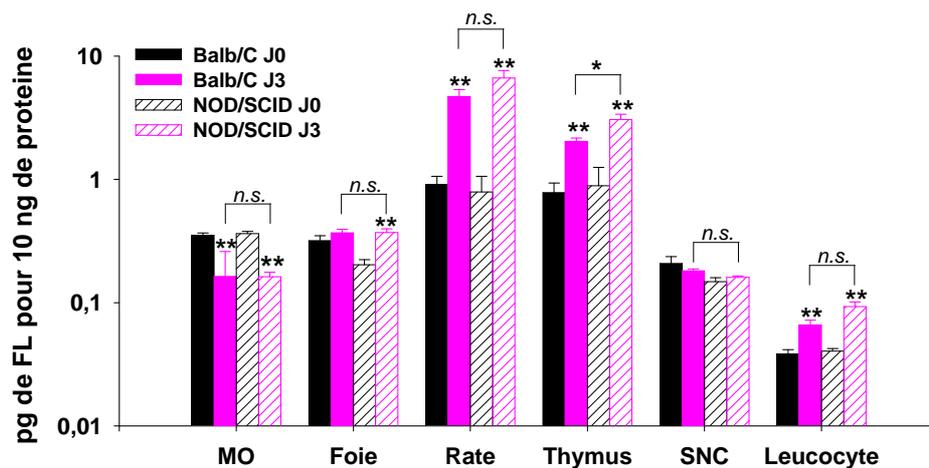


Figure 41 : Effet d'une irradiation corporelle totale sur la quantité de FL présent dans la moelle osseuse, le foie, la rate, le thymus le système nerveux central (SNC) et les leucocytes 3 jours après exposition chez la souris BALB/c (histogrammes pleins) et chez la souris NOD/SCID (histogrammes hachurés). La quantité de FL a été déterminée par test ELISA sur broyat d'organe ou sur cellules lysées et rapportée à la quantité de protéine totale. Chaque histogramme représente une valeur moyenne \pm ES de 5 souris. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives ont été représentées pour * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

De plus, la quantité de FL présente dans la rate, le foie, le thymus et les cellules circulantes augmente significativement quelle que soit la lignée de souris considérée. Cette augmentation est similaire chez les deux types d'animaux pour tous les organes à l'exception du thymus pour lequel l'augmentation est plus importante chez les souris NOD/SCID que chez les souris BALB/c (Figure 41).

Globalement, bien que la détection de la protéine ait été faite sur des extrait d'organes et non sur des cellules isolées, le profil d'expression de la protéine FL observé chez les animaux NOD/SCID est quasi identique à celui des animaux BALB/c en dépit des différences observées au niveau transcriptionnel (cf. paragraphe 2.2.4.1). Ainsi, chez la souris, les cellules lymphoïdes ne sont pas responsables de l'augmentation radio-induite précoce de la concentration plasmatique de FL. De plus, ces résultats suggèrent une régulation post-transcriptionnelle de la production de FL.

2.2.4.3 Analyse phénotypique des cellules circulantes et des cellules de moelle osseuse

Afin d'exclure l'existence de cellules lymphoïdes résiduelles chez les animaux immunodéficients, nous avons réalisé une analyse phénotypique des leucocytes circulants et des cellules médullaires chez les souris BALB/c et chez les souris NOD/SCID.

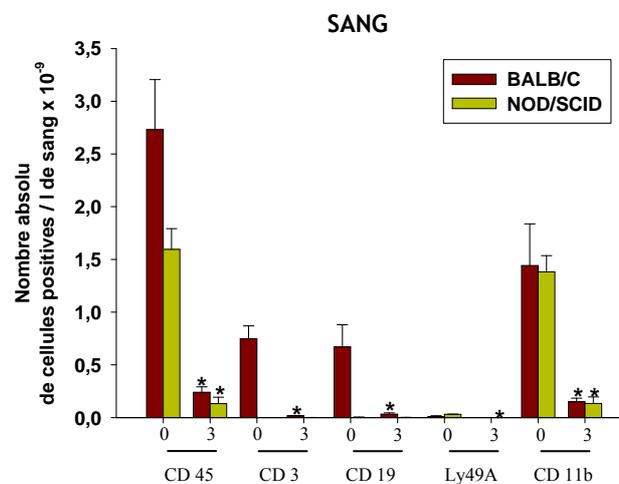


Figure 42 : Effet d'une irradiation corporelle totale sur les populations cellulaires circulantes chez les souris BALB/c et les souris NOD/SCID 3 jours après l'irradiation. Chaque histogramme représente une valeur moyenne \pm ES de 5 souris. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives ont été représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Cette étude a mis en évidence que le nombre absolu de cellules CD45⁺ circulantes est deux fois moins important chez les souris NOD/SCID par rapport à celui observé chez les souris BALB/c (Figure 42). Cette réduction est essentiellement liée à l'absence de lymphocytes T CD3⁺ et lymphocytes B CD19⁺ chez les souris NOD/SCID. Un faible nombre de cellules NK (Ly49A⁺) a été détecté en quantité équivalente dans les deux lignées de souris. De même, le nombre de cellules granulo-monocytaires (CD11b⁺) est similaire chez les souris BALB/c et chez les souris NOD/SCID. L'irradiation a induit chez les deux lignées de souris une diminution du nombre de cellules CD45⁺ très importante qui touche toutes les sous populations cellulaires (CD3⁺, CD19⁺, CD11b⁺ et Ly49A⁺).

Dans la moelle osseuse, les mutations NOD et SCID conduisent à une diminution de 3 fois du nombre de cellules CD45⁺ (Figure 43). Comme dans les cellules circulantes, cette diminution est associée à une réduction des populations CD3⁺, CD19⁺ et CD11b⁺. De même, l'irradiation induit une réduction drastique des différentes populations cellulaires étudiées.

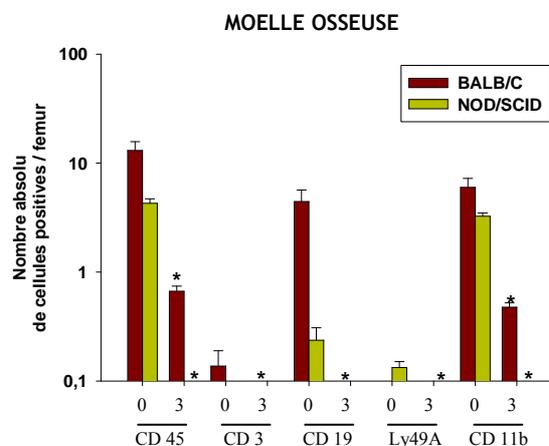


Figure 43 : Effet d'une irradiation corporelle totale sur les cellules médullaires chez les souris BALB/c et les souris NOD/SCID 3 jours après l'irradiation. Chaque histogramme représente une valeur moyenne \pm ES de 5 souris. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les animaux non irradiés et les différences significatives ont été représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Nous avons ainsi confirmé l'absence de cellules lymphoïdes chez les souris NOD/SCID excluant *de facto* leur implication dans l'augmentation radio-induite de FL chez ces animaux. Ce résultat suggère donc l'existence d'autres types cellulaires capables d'intervenir dans la régulation du taux plasmatique de FL en réponse à une irradiation.

2.2.4.4 Localisation par immunohistochimie du FL dans la moelle osseuse, la rate, et le thymus de souris BALB/c

L'implication des LT dans l'augmentation précoce de FL après irradiation semblant exclue, nous avons cherché à localiser les foyers de production (les cellules productrices) de cette protéine par immuno-histologie au sein de différents organes. Nous avons focalisé ce travail sur les organes présentant une modification remarquable de la quantité de protéine FL au 3^{ème} jour après irradiation. Ainsi, la moelle osseuse (diminution de la quantité de FL), la rate et le thymus (augmentation de la quantité de FL) ont été étudiés. Les marquages ont été réalisés en parallèle sur des organes de souris BALB/c 3 jours après une irradiation à 6 Gy et sur des organes de souris témoins (Figures 44, 45 et 46). Dans tous les organes, nous avons observé un marquage intra-cellulaire et un marquage extra-cellulaire. Ainsi, dans la moelle osseuse des souris témoins (Figure 44-A et B), nous avons observé un marquage en petits foyers au sein desquels certaines cellules présentent un marquage intra cellulaire. De plus, nous avons observé un marquage extra cellulaire, plus diffus qui pourrait correspondre à une localisation du FL sur la matrice extra-cellulaire.

L'irradiation a induit une réduction drastique du nombre de cellules hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse ainsi qu'un envahissement hémorragique du compartiment médullaire. Bien que nous ayons constaté la persistance de quelques petits foyers après un marquage anti-FL, il nous a semblé que leur nombre et leur taille étaient réduits comparativement aux animaux témoins. Cependant, nous n'avons pas réalisé d'étude quantitative.

Dans la rate (Figure 45), nous avons également observé le marquage de quelques cellules isolées, de foyers, ainsi qu'un marquage plus diffus, principalement au niveau des centres germinatifs. L'irradiation a induit une réduction de la taille des centres germinatifs et un envahissement de la rate par des hématies. Le marquage anti-FL après irradiation a montré la présence de la protéine dans un grand nombre de cellules dans les centres germinatifs, comme dans la pulpe rouge ainsi qu'une coloration générale de l'organe.

Dans le thymus (Figure 46), le marquage a mis en évidence la présence de FL dans un nombre important de cellules de grande taille de la médulla et du cortex. Nous avons également observé un marquage diffus autour des septae interlobulaires. L'irradiation a induit une diminution et une désorganisation du thymus. De plus, le marquage anti-FL a montré une augmentation très importante de la quantité de la protéine au sein de l'organe. En effet, de nombreuses cellules ainsi que l'ensemble de la matrice extracellulaire apparaissent très fortement marqués. Le marquage FL serait vraisemblablement lié aux cellules stromales thymiques. En effet, les cellules positives pour le FL dans les thymus témoins ont la morphologie de cellules stromales et non de cellules lymphoïdes. De même, le marquage général du thymus après l'irradiation correspond mieux à une population de cellules stromales qu'à des cellules lymphoïdes dont le nombre est drastiquement réduit 3 jours après l'irradiation.

Globalement, les résultats obtenus par immunohistologie coïncidaient avec la quantification en FL réalisée par ELISA (paragraphe 2.2.4.2). En effet, la diminution de la quantité de FL observée dans la moelle osseuse comme son augmentation dans la rate et le thymus après irradiation, sont confirmés par le marquage anti-FL. De plus, ces études *in situ* confortent l'hypothèse selon laquelle l'augmentation précoce de FL ne serait pas liée aux populations cellulaires lymphoïdes. En effet, la morphologie des cellules marquées comme le marquage extra-cellulaire, présent dans la moelle osseuse, la rate et le thymus, suggèrent fortement l'implication de cellules stromales dans la régulation du FL après irradiation.

2.3 Implication des cellules lymphoïdes chez l'homme

Afin d'étudier l'implication des cellules lymphoïdes dans les variations plasmatiques de FL chez l'homme, nous avons suivi 10 patients recevant différents traitements aplasians en vue d'une greffe de moelle osseuse. Cette cohorte se divisait en trois groupes de traitement, 4 patients ont reçu une chimiothérapie seule (BCNU, Etoposide, Cytosine arabinose et Melphalan), 4 patients ont reçu à la fois une chimiothérapie (Cytosine arabinose) et une ICT à 10 Gy, et 2 patients ont été traités par chimiothérapie (Cytosine arabinose) et sérum anti-lymphocytaire (voir paragraphe matériels et méthodes).

2.3.1 Evolution de la concentration plasmatique de FL au cours du traitement

Quel que soit le protocole de traitement et chez tous les patients, une augmentation de la concentration plasmatique de FL a été observée après le début du traitement aplasiant. Cette élévation précoce du taux plasmatique de FL est de forte amplitude et concomitante avec une diminution du nombre de leucocytes circulants. Comme l'illustre la figure 47 le taux maximal de FL correspond au moment où la leucopénie est la plus sévère. Enfin, parallèlement à la récupération hématopoïétique le taux plasmatique de FL décroît pour tendre vers des valeurs physiologiques.

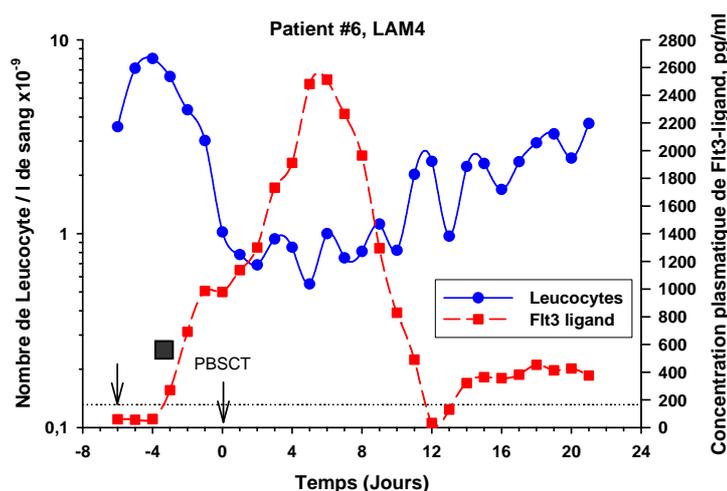


Figure 47 : Evolution comparée du nombre de leucocytes et de la concentration plasmatique de FL après une irradiation corporelle totale (flèche), un traitement cyclophosphamide (carré gris) et une allo-greffe de cellules souches périphériques réalisée au jour 0 chez le patient #6. La ligne en pointillé représente la concentration plasmatique moyenne de FL avant le traitement.

2.3.2 Effet du traitement aplasiant sur l'expression du FL membranaire à la surface des cellules circulantes

Les variations de la concentration plasmatique de FL et du nombre de leucocytes circulants étant concomitantes, nous avons étudié un lien éventuel entre ces deux paramètres. Ainsi, nous avons cherché à déterminer le rôle des cellules circulantes dans l'augmentation plasmatique de FL associée à l'aplasie médullaire en suivant l'expression de la forme membranaire du FL à la surface des leucocytes de 7 patients traités par radiothérapie et/ou chimiothérapie (pour exemple, Figure 48).

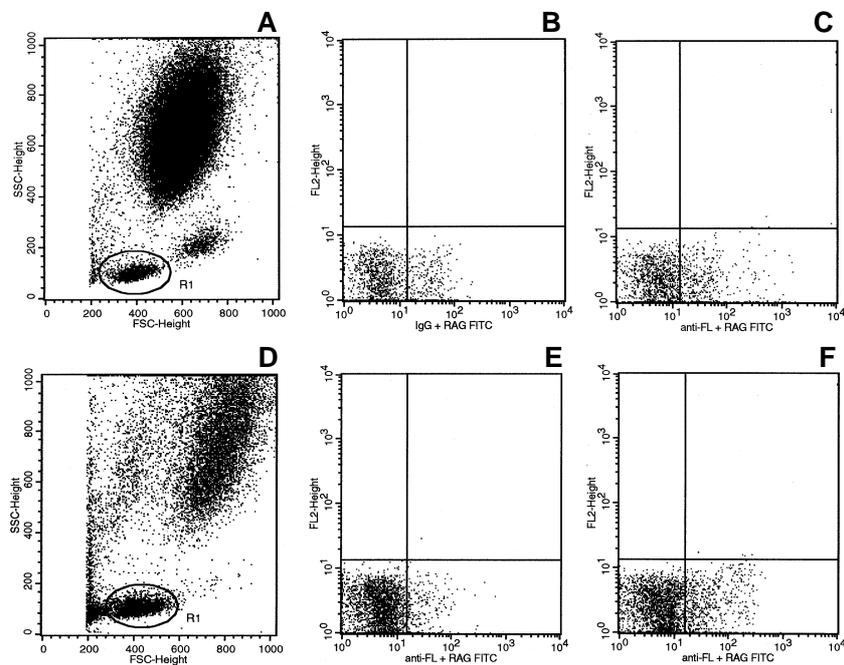


Figure 48 : Suivi des cellules circulantes chez le patient #1 durant la période témoin i.e. avant le début du traitement (A, B, C) et huit jours après le début du suivi soit J3 post greffe (D, E, F). Les plots A et D représentent les analyses de diffraction de la lumière où R1 correspond aux lymphocytes, B et E les contrôles isotypiques et C et F les marquages par anticorps anti-FL.

Avant le début du traitement, la forme membranaire du FL a été détectée sur $15,2 \pm 6,2$ % des leucocytes et l'intensité moyenne de fluorescence est de $93,8 \pm 44,3$ (unités arbitraires). Quel que soit le protocole aplasiant subi par les patients, ni le pourcentage de cellules positives pour la forme membranaire du FL, ni l'intensité moyenne de

fluorescence n'ont varié significativement après le traitement. Ces résultats suggèrent donc que le taux plasmatique de FL n'est pas régulé par l'expression membranaire de la protéine par les leucocytes. Cette présomption est encore amplifiée par le fait que la numération leucocytaire est effondrée à J3 post greffe.

2.3.3 Effet du traitement aplasiant sur l'expression de l'ARNm codant le FL dans les cellules circulantes

Afin de compléter l'étude de l'implication des cellules circulantes dans les variations plasmatiques de FL au cours de l'aplasie, nous avons suivi l'expression de l'ARNm codant le FL dans les cellules circulantes de trois patients (patients #2, #4, #8). Durant le traitement aplasiant (*i.e.* avant la greffe), nous n'avons pas observé de variation de l'expression de l'ARNm du FL chez ces patients, bien que le taux plasmatique de FL ait augmenté rapidement (pour exemple Figure 49). Ce résultat suggère que l'implication des cellules lymphoïdes dans l'élévation précoce du FL plasmatique n'est pas majeure. Après la greffe, nous avons observé une augmentation tardive mais importante de l'expression de l'ARNm du FL dans les cellules circulantes, suggérant une contribution possible de leur part au maintien du pic plasmatique de FL (pour exemple Figure 49).

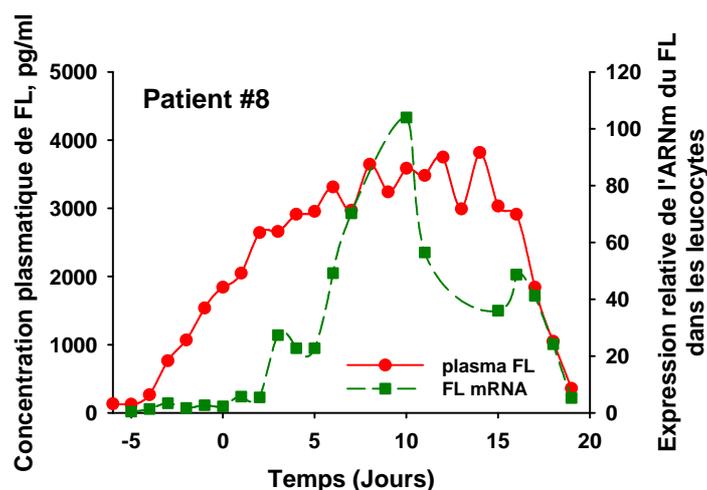


Figure 49 : Evolution comparée de la concentration plasmatique de FL et de l'expression relative de l'ARNm codant le FL chez le patient #8 ayant reçu une irradiation corporelle totale, un traitement cyclophosphamide et une allo-greffe de cellules souches réalisée au jour 0.

Bien que nous n'ayons pas réalisé d'analyse phénotypique précise, l'ensemble de ces résultats suggèrent que les cellules lymphoïdes n'ont pas un rôle prépondérant dans l'augmentation plasmatique initiale de FL après un traitement aplasiant mais qu'elles pourraient prendre part au maintien du pic plasmatique.

2.3.4 Effet du traitement par sérum anti-lymphocytaire sur le taux plasmatique de FL

Dans le but de définir plus précisément le rôle des cellules lymphoïdes *in vivo*, nous avons suivi deux patients recevant un traitement cyclophosphamide associé à un sérum anti-lymphocytaire (SAL) qui réduit considérablement le nombre de lymphocytes circulants. L'augmentation précoce de la concentration plasmatique de FL chez les patients recevant le SAL est similaire à celle observée chez les 8 autres patients. En effet, les élévations initiales des taux de FL présentent des cinétiques et des amplitudes d'augmentation semblables chez les patients traités par SAL ou par les autres protocoles (pour exemple Figure 50). Ce résultat confirme donc que les cellules lymphoïdes ne sont pas responsables de l'élévation précoce de la concentration plasmatique de FL.

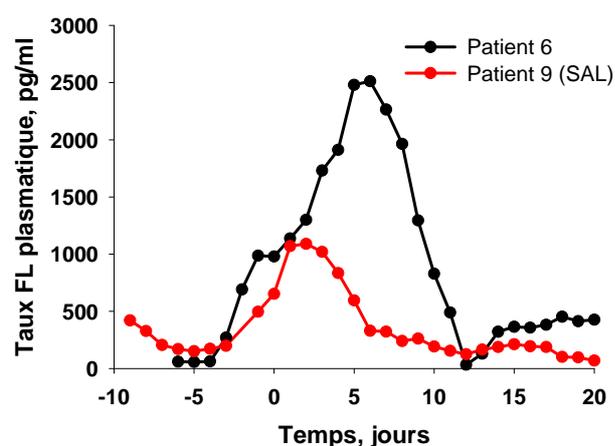


Figure 50 : Evolution comparée des concentrations plasmatiques de FL chez le patient #6 traité par irradiation corporelle totale, cyclophosphamide et allo-greffe de cellules souches et le patient #9 traité par sérum anti-lymphocytaire, cyclophosphamide et allo-greffe de cellules souches.

Cependant, le taux maximal de FL a été atteint au jour 2 chez les patients traités par SAL tandis que le temps moyen du pic de FL chez les autres patients est au jour 7,4 (Tableau 6). De plus, en dépit d'une durée d'aplasie moyenne plus longue chez les patients SAL, la concentration plasmatique maximale de FL est très largement inférieure à celle observée chez les autres patients suivis (Tableau 5).

	Non-SAL	SAL
Date moyenne du pic de FL	Jour 7,4	Jour 2
Taux maximal en FL	3024 ± 2199	911,2 ± 252
Durée d'aplasie	10 Jours	19 Jours

Tableau 5 : Effet du traitement par sérum anti-lymphocytaire sur l'augmentation de la concentration plasmatique de FL et sur la durée d'aplasie.

Le traitement SAL induit donc à la fois une diminution de l'amplitude et un raccourcissement du pic de FL (pour exemple Figure 50), suggérant un rôle des cellules lymphoïdes dans le maintien d'un taux de FL plasmatique élevé après un traitement aplasiant. Ces résultats correspondent à ceux obtenus par le suivi de l'expression de l'ARNm confirmant ainsi que les cellules lymphoïdes ne sont pas impliquées dans l'augmentation initiale du taux de FL plasmatique mais qu'elles prennent part à son maintien durant l'aplasie chez l'homme. Ainsi, comme nous l'avons observé dans le modèle murin, il est probable que les cellules responsables de l'élévation initiale de la concentration plasmatique de FL soient d'origine non lymphoïdes.

2.4 Implication d'autres types cellulaires

Les résultats obtenus *in vivo* chez la souris et en clinique humaine suggérant très fortement l'implication de populations cellulaires stromales dans les régulations du FL, nous avons étudié la capacité de différentes lignées cellulaires (murines et humaines) à produire du FL en réponse à une irradiation.

2.4.1 Culture de cellules stromales murines (MS-5)

2.4.1.1 Effet de l'irradiation et du TNF α sur la survie cellulaire

Nous avons suivi l'effet de l'irradiation sur la survie cellulaire de la lignée MS-5. Cette étude a mis en évidence une inhibition radio-induite de la croissance cellulaire (Figure 51).

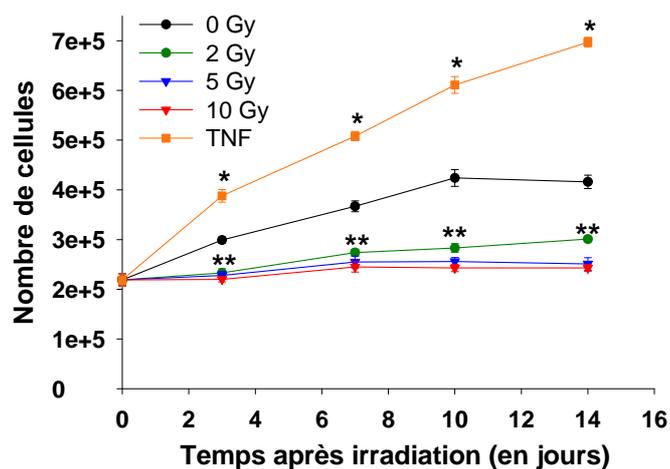


Figure 51 : Effet de l'irradiation sur la survie des cellules MS-5. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 3 expérimentations réalisées en triplicate. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les cellules non irradiées et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

En effet, les nombres de cellules récoltées après des irradiations à 2, 5, ou 10 Gy sont inférieurs aux témoins quel que soit le temps considéré. A l'inverse, l'incubation en présence de TNF α (10 ng/ml), a induit une stimulation de la croissance des cellules MS-5 observable dès J3 ($0,38 \cdot 10^6 \pm 0,012 \cdot 10^6$ cellules vs $0,29 \cdot 10^6 \pm 0,06 \cdot 10^6$ cellules, $p \leq 0.05$). Cette augmentation de prolifération a été maintenue durant toute la durée de la

stimulation par TNF α aboutissant à un nombre de cellules très supérieur aux témoins à J14 ($0,69.10^6 \pm 0,010.10^6$ cellules vs $0,41.10^6 \pm 0,013.10^6$ cellules, $p \leq 0.05$).

2.4.1.2 Production de FL par MS-5 dans le surnageant de culture

Le suivi de la quantité de FL présente dans le surnageant de culture des cellules MS-5 a mis en évidence que des irradiations à 2 ou 5 Gy n'induisent pas de modification de la production de FL soluble (Figure 52). En revanche, après une exposition 10 Gy, la quantité de FL soluble mesurée dans le surnageant de culture est augmentée aux jours 10 ($589,84 \pm 35,87$ pg/ 10^6 cellules vs $450,38 \pm 19,57$ pg/ 10^6 cellules, $p \leq 0.01$) et 14 ($826,03 \pm 49,237$ pg/ 10^6 cellules vs $756,54 \pm 62,42$ pg/ 10^6 cellules, $p \leq 0.05$). De même, la stimulation des cellules par du TNF α conduit à une augmentation de la concentration en FL soluble dans le surnageant de culture observable du jour 7 ($469,12 \pm 12,67$ pg/ 10^6 cellules vs $299,16 \pm 24,83$ pg/ 10^6 cellules, $p \leq 0.05$) au jour 14 ($817,69 \pm 5,88$ pg/ 10^6 cellules vs $648,72 \pm 33,81$ pg/ 10^6 cellules, $p \leq 0.05$).

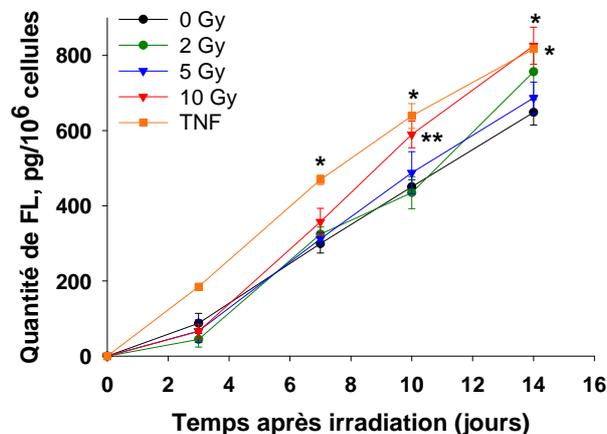


Figure 52 : Effet de l'irradiation et du TNF α sur la production de FL soluble par cellules MS-5. La quantification de FL a été réalisée par test ELISA dans les surnageants de cultures. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 3 expérimentations réalisées en triplicate. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les cellules non irradiées et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Ces résultats montrent que la lignée de cellules MS-5 produit du FL soluble à l'état basal, mais aussi que l'irradiation à forte dose comme la stimulation par TNF α induisent une augmentation de la quantité de FL soluble sécrété par ces cellules dans le surnageant de culture.

2.4.1.3 Etude de la quantité intracellulaire de FL

La quantification du FL intracellulaire, réalisé sur des lysats de cellules en triton X100, a montré que cette protéine est présente constitutivement dans les cellules MS-5. L'irradiation n'a pas conduit à une variation significative de la concentration intracellulaire en FL quelle que soit la dose d'exposition (Figure 53). En revanche, la stimulation par le TNF α a conduit à une diminution progressive de la quantité de FL présente dans les cellules aboutissant à un taux de $13,6 \pm 1,38$ pg/10⁶ cellules au jour 14 tandis que les cellules non stimulées présentent une quantité de FL de $95,20 \pm 11,35$ pg/10⁶ cellules, $p \leq 0.05$.

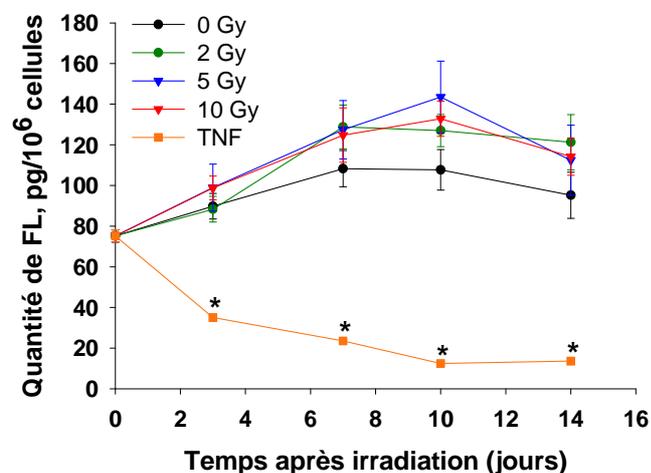


Figure 53 : Effet de l'irradiation et du TNF α sur la quantité intra-cellulaire de FL dans les cellules MS-5. La quantification de FL a été réalisée dans des lysats cellulaires. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 3 expérimentations réalisées en triplicate. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les cellules non irradiées et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Globalement, l'étude menée sur la lignée MS-5 a montré que l'irradiation des cellules stromales murines induisait une inhibition de leur croissance mais ne modifiait pas la quantité de FL présente dans leur cytoplasme. De plus, ce travail a mis en évidence que seule une irradiation à 10 Gy est capable de conduire à une augmentation de la quantité de FL soluble sécrété dans le milieu de culture. Le suivi de la stimulation des cellules MS-5 par le TNF α a montré une augmentation importante de la prolifération cellulaire et une augmentation de la sécrétion de FL soluble dans le surnageant de culture, parallèlement à une diminution de la quantité de FL intra-cytoplasmique. Ceci suggère que la sécrétion de FL induite par le TNF α passe par le relargage d'un stock intra-cytoplasmique de la cytokine. Cependant, la différence entre la cinétique de production du FL dans le surnageant et la cinétique de diminution intra-cytoplasmique du FL montre que le relargage du stock intra cytoplasmique de FL n'est pas suffisant pour expliquer l'augmentation de concentration observée dans le milieu de culture. Il existe donc une sécrétion directe du FL dans le milieu de culture. Ceci est en accord avec l'existence d'un épissage différentiel de l'ARNm codant le FL, permettant de produire soit une forme directement soluble de la molécule, soit une forme membranaire protéolysable.

2.4.2 Culture de cellules ostéoblastiques humaines (MG-63)

Les ostéoblastes sont des cellules du micro-environnement médullaire qui sont capables de réguler activement l'hématopoïèse précoce, en particulier au niveau des niches hématopoïétiques (Calvi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Afin de déterminer leur capacité à produire du FL et s'ils pouvaient intervenir dans sa régulation après irradiation, nous avons exposé des cellules MG-63 à un rayonnement gamma aux doses de 2, 5, ou 10 Gy. Pendant 14 jours, nous avons suivi à la fois le nombre de cellules survivantes, la quantité de FL sécrétée dans le milieu de culture et la quantité de FL présente dans le cytoplasme des cellules.

2.4.2.1 Effet de l'irradiation sur la survie cellulaire

Les cellules ont été irradiées à 80 % de confluence. Les résultats obtenus montrent que l'exposition diminue le potentiel de croissance des cellules MG-63. En effet, pour les doses de 2, 5 et 10 Gy le facteur d'expansion à J3 était de $4,69 \pm 0,35$, $2,81 \pm 0,21$ et de $1,34 \pm 0,06$ fois respectivement tandis qu'il était de $9,11 \pm 3,08$ pour les cellules non irradiées. Ainsi, l'irradiation induit une diminution dose-dépendante de la prolifération cellulaire (Figure 54). En effet, au 3^{ème} jour après l'exposition, le nombre moyen de cellules MG-63 était réduit, comparativement au témoin non irradié, d'un facteur 2 à 2 Gy ($3,35 \cdot 10^6 \pm 1,13 \cdot 10^6$ cellules vs $1,73 \cdot 10^6 \pm 0,12 \cdot 10^6$ cellules), d'un facteur 3 à 5 Gy ($3,35 \cdot 10^6 \pm 1,13$ cellules vs $1,03 \cdot 10^6 \pm 0,08 \cdot 10^6$ cellules) et d'un facteur 7 à 10 Gy ($3,35 \cdot 10^6 \pm 1,13 \cdot 10^6$ cellules vs $0,49 \cdot 10^6 \pm 0,02 \cdot 10^6$ cellules).

La diminution radio-induite de la prolifération cellulaire a été maintenue jusqu'au jour 14 quelle que soit la dose d'exposition.

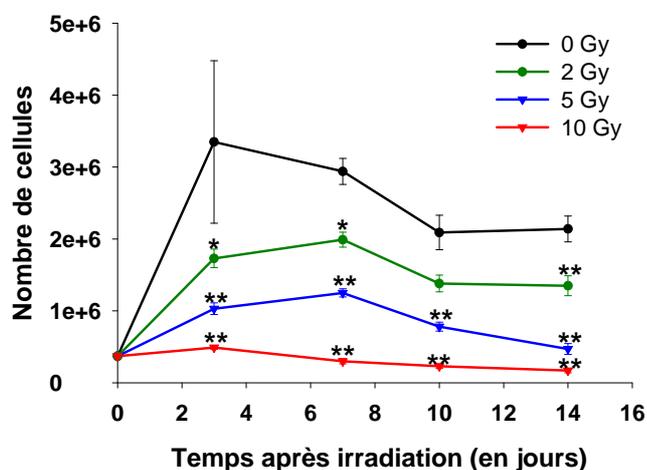


Figure 54 : Effet de l'irradiation sur la survie des cellules MG-63. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 3 expérimentations réalisées en triplicat. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les cellules non irradiées et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

2.4.2.2 Production de FL par MG-63 dans le surnageant de culture

Afin de déterminer si la lignée MG-63 était capable de produire du FL soluble, nous avons quantifié cette protéine par test ELISA dans les surnageants de culture durant 14 jours après l'irradiation (Figure 55). Nous avons mis en évidence une production constitutive de FL soluble par MG-63 d'environ 10 pg/jour pour 10^6 cellules. Dès le 7^{ème} jour après l'irradiation, une augmentation dose-dépendante de la production de FL soluble a été observée quelle que soit la dose. En effet, les quantités de FL soluble mesurées à 2, 5 et 10 Gy sont respectivement de $67,01 \pm 8,95$, $123,19 \pm 16,94$ et de $432,98 \pm 115,27$ pg/ 10^6 cellules. La production de FL soluble s'est poursuivie jusqu'au 14^{ème} jour après irradiation aboutissant à des quantités très importantes à 5 Gy ($826,53 \pm 148,12$ pg/ 10^6 cellules) et 10 Gy ($951,35 \pm 178,41$ pg/ 10^6 cellules). Ces quantités correspondent à des productions d'environ 59 pg/jour/ 10^6 cellules pour une irradiation à 5 Gy et 68 pg/jour/ 10^6 cellules pour une irradiation à 10 Gy, soit respectivement 6 et 7 fois plus qu'à l'état basal.

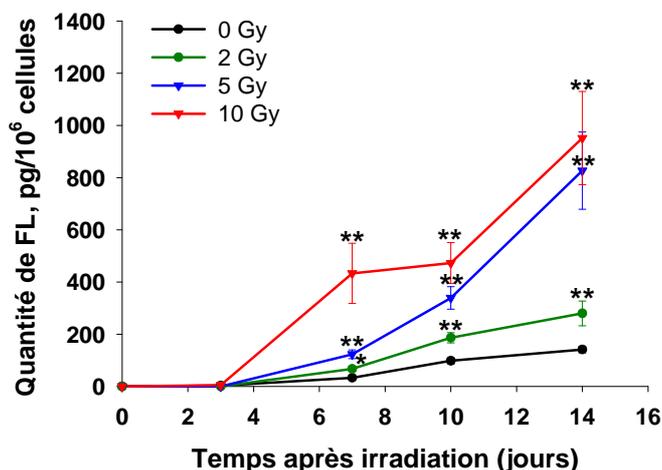


Figure 55 : Effet de l'irradiation sur la production de FL soluble par cellules MG-63. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 3 expérimentations réalisées en triplicate. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les cellules non irradiées et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Ainsi, nous avons mis en évidence la sécrétion constitutive de FL soluble par la lignée MG-63 et sa capacité à produire du FL soluble de façon dose-dépendante en réponse à une irradiation.

2.4.2.3 Etude de la quantité intracellulaire de FL

L'analyse des lysats cellulaires a montré une faible quantité de FL cytoplasmique dans les cellules MG-63 non irradiées ($2,21 \pm 0,56$ pg/ 10^6 cellules) (Figure 56). Les irradiations à 2 ou 5 Gy n'ont pas modifié cette quantité quel que soit le temps après exposition considéré. En revanche, l'irradiation à 10 Gy a induit une augmentation de la quantité de FL intra cytoplasmique. Cette modification a été observée tardivement, en effet l'élévation n'est significative qu'à partir du 10^{ème} jour après l'irradiation.

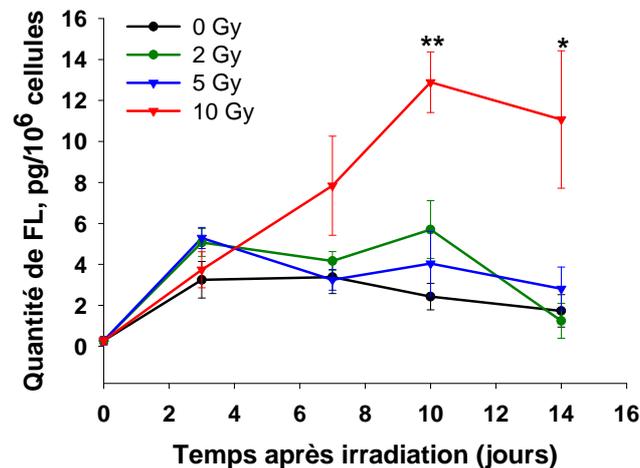


Figure 56 : Effet de l'irradiation sur la quantité intra cellulaire de FL dans les cellules MG-63. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 3 expérimentations réalisées en triplicate. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les cellules non irradiées et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Cette étude menée sur la lignée ostéoblastique humaine MG-63 a mis en évidence que ce type cellulaire est capable de produire du FL soluble à l'état physiologique et qu'une irradiation induit une augmentation dose-dépendante de cette production. De plus, nous avons constaté que la quantité de FL présente dans le cytoplasme n'est pas modifiée par les irradiations de 2 ou 5 Gy, mais qu'une dose plus forte telle que 10 Gy est apte à induire une élévation de la concentration cytoplasmique en FL.

2.4.3 Culture de cellules stromales humaines (HS-5)

Nous avons également suivi l'effet de l'irradiation sur la survie cellulaire, la production de FL soluble et la quantité de FL présent dans le cytoplasme de cellules stromales humaines HS-5.

2.4.3.1 Effet de l'irradiation sur la survie cellulaire

Comme pour les autres lignées étudiées, nous avons observé une modification radio-induite de la survie cellulaire (Figure 57).

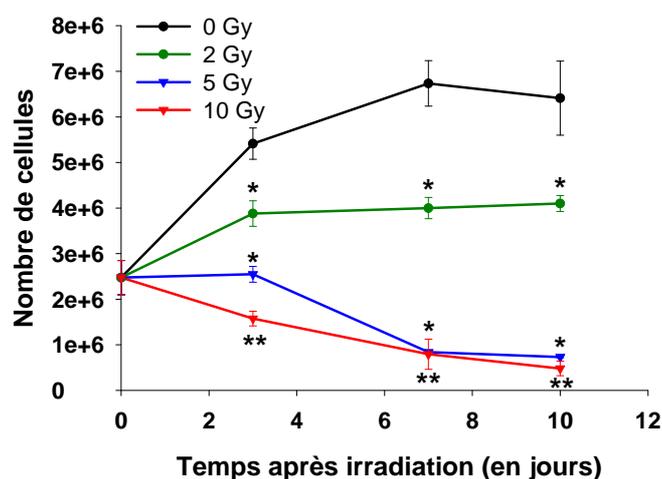


Figure 57 : Effet de l'irradiation sur la survie cellulaire des cellules HS5. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 3 expérimentations réalisées en triplicate. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les cellules non irradiées et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

En effet, une irradiation à 2 Gy diminue significativement la capacité de prolifération des cellules HS-5. Des irradiations à 5 et 10 Gy induisent une mort cellulaire menant à un faible nombre de cellules survivantes à J10 ($0,733.10^6 \pm 0,01. 10^6$ cellules à 5 Gy et $0,480.10^6 \pm 0,15. 10^6$ cellules à 10 Gy vs $6,4.10^6 \pm 0,81.10^6$ cellules à 0 Gy).

2.4.3.2 Production de FL par HS5 dans les surnageants de cultures

L'étude de la quantité de FL soluble présente dans les surnageants de la lignée HS5 nous a permis de mettre en évidence que ces cellules sont capables de produire constitutivement du FL (Figure 58). Cette production est d'environ 10 pg/jour pour 10^6 cellules.

L'irradiation induit une augmentation dose-dépendante de la quantité de FL présente dans les surnageants de culture visible à partir du 7^{ème} jour et qui se poursuit au 10^{ème} jour pour toutes les doses d'irradiation. La quantité de FL présent dans les surnageants de cultures des cellules irradiées à 2, 5 et 10 Gy est respectivement de $159,5 \pm 18,7$ pg/ 10^6 cellules, $347,9 \pm 9,2$ pg/ 10^6 cellules et $701,5 \pm 129,2$ pg/ 10^6 cellules contre $96,3 \pm 10,3$ pg/ 10^6 cellules pour le témoin non irradié dix jours après l'irradiation.

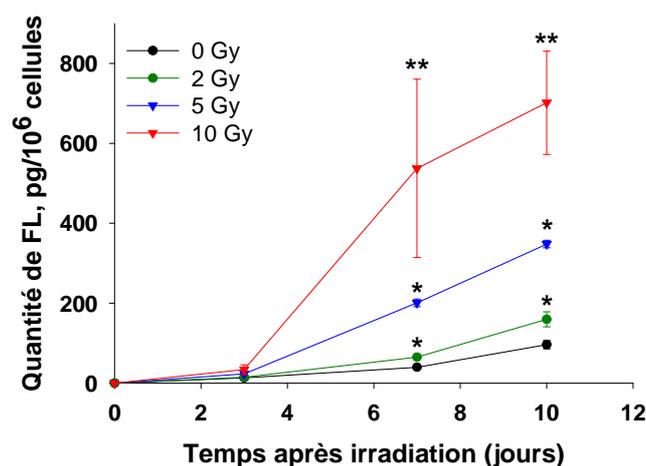


Figure 58 : Effet de l'irradiation sur la production de FL soluble par les cellules HS5. Chaque point représente la valeur moyenne \pm ES de 3 expérimentations réalisées en triplicate. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les cellules non irradiées et les différences significatives sont représentées pour : * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$.

Ainsi, nous avons mis en évidence que les cellules stromales HS5 produisent constitutivement du FL soluble et que l'irradiation induit une augmentation dose-dépendante de cette production.

2.4.3.3 Suivi de la quantité intracellulaire de FL

Le suivi de la quantité de FL intracytoplasmique montre la présence d'un faible stock intracellulaire (entre 1 et 2 pg/10⁶ cellules) (Figure 59).

L'irradiation semble induire une légère augmentation de la quantité de FL présente dans le cytoplasme des cellules. Néanmoins, cette élévation n'est significative que pour la dose de 5 Gy à J10 (4,8 ± 0,162 pg/10⁶ cellules vs 1,53 ± 0,2 pg/10⁶ cellules, p=0,024). Pour les autres temps et les autres doses d'irradiation, les différences ne sont pas significatives en raison de l'hétérogénéité des valeurs obtenues au cours des dosages.

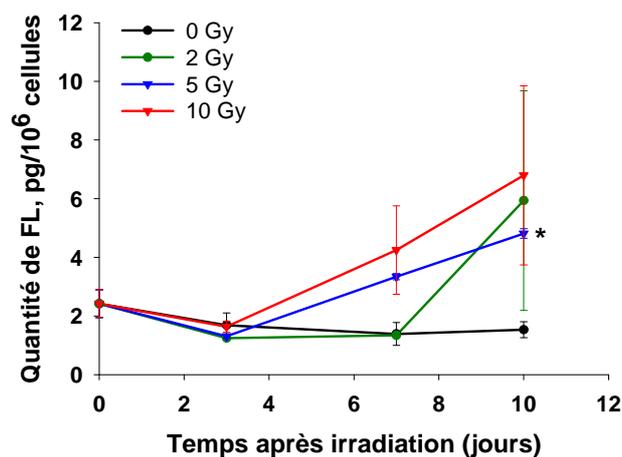


Figure 59 : Effet de l'irradiation sur la quantité de FL intracytoplasmique présent dans les cellules HS5. Chaque point représente la valeur moyenne ± ES de 3 expérimentations réalisées en triplicate. Les analyses statistiques ont été réalisées par comparaison avec les cellules non irradiées et les différences significatives sont représentées pour : * p<0.05.

Ainsi, l'étude de la production de FL par la lignée HS5 montre clairement que ces cellules stromales sont capables de produire du FL constitutivement. D'autre part, nous avons montré que l'irradiation induit une augmentation dose-dépendante de la quantité de FL soluble relarguée dans les surnageants de culture, bien que nous n'ayons pas observé de variation majeure de la quantité de FL intracytoplasmique.

Globalement, l'étude menée *in vitro* a mis en évidence que différents types cellulaires (cellules stromales, cellules ostéoblastiques et cellules myofibroblastiques) sont capables de produire du FL, en particulier après une irradiation. Néanmoins, la production radio-induite de FL semble différente en fonction du type cellulaire considéré.

DISCUSSION

1 Le Flt3-Ligand comme bio-indicateur de la sévérité de l'atteinte médullaire radio-induite

L'aplasie médullaire radio-induite est liée à la disparition de la majorité des cellules souches et immatures de la moelle osseuse. Il en résulte un défaut de renouvellement des différentes populations cellulaires sanguines conduisant à une pancytopenie radio-induite (Andrews, 1980). Ainsi, l'atteinte hématopoïétique se traduit en périphérie par une diminution de toutes les populations cellulaires circulantes (lymphocytes, monocytes, polynucléaires, plaquettes et hématies) (Andrews, 1980; Dutreix *et al.*, 1987). La sévérité de cette atteinte hématopoïétique dépend de la dose et de l'hétérogénéité d'irradiation. Selon le degré de sévérité, elle peut conduire à une diminution transitoire des éléments figurés du sang comme, dans les cas les plus graves, à une pancytopenie profonde et durable associée à de forts risques hémorragiques et infectieux. De plus, la capacité de récupération hématopoïétique et le choix du traitement sont également dépendant de la sévérité de l'atteinte médullaire radio-induite. En effet, le choix d'un traitement de soutien (par perfusion d'électrolytes, de fluides et/ou transfusion de cellules circulantes et par antibiothérapie) éventuellement associé à une stimulation de l'hématopoïèse (par injection de cytokines) ne peut être fait que s'il existe un nombre suffisant de cellules souches et immatures aptes à la reconstitution hématopoïétique. De même, une greffe de moelle osseuse ne doit être pratiquée que chez les patients présentant une éradication complète ou quasi complète de la moelle osseuse afin de limiter les risques de rejet de greffe ou de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD). Il est donc capital dans le choix d'une stratégie thérapeutique d'être capable d'évaluer l'hématopoïèse résiduelle chez le patient considéré. Ce problème se pose particulièrement dans les cas d'irradiations accidentelles où la dose reçue par la moelle osseuse est inconnue.

Une première approche consiste donc à évaluer la dose reçue par le patient. Cette estimation est classiquement réalisée en dosimétrie biologique par cytogénétique (AIEA, 1986; AIEA, 2001). Cette technique consiste en l'analyse et le dénombrement d'aberrations chromosomiques radio-induites portées par les lymphocytes circulants (Bender *et al.*, 1988). Elle permet donc à partir d'un échantillon sanguin d'estimer une dose moyenne à l'organisme. Néanmoins, cette technique reste une approche globale qui ne peut prendre en compte l'hétérogénéité de l'exposition qu'avec l'aide de modèles mathématiques (Sasaki et Miyata, 1968; Dolphin, 1969). De plus, elle ne donne qu'une estimation de la dose d'irradiation, et pas de l'atteinte hématopoïétique.

L'évaluation de l'atteinte médullaire peut être réalisée en suivant la pente des lymphocytes durant les 48 premières heures qui suivent l'exposition (Andrews, 1980). Comme le représente la figure 60, ce suivi permet d'évaluer la sévérité de l'atteinte selon 4 catégories : atteinte modérée, sévère, très sévère ou létale.

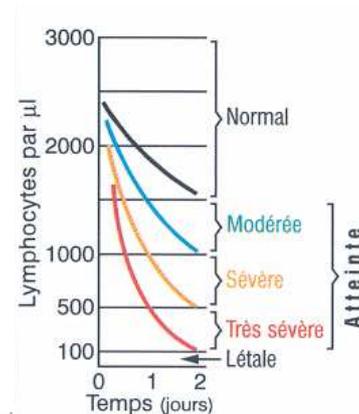


Figure 60 : Evolution du nombre absolu de lymphocytes durant les premières 48 heures après l'irradiation. La pente de la chute permet d'estimer la sévérité des dommages et de classer les victimes en 5 catégories. D'après Andrews, 1980.

Ces méthodes ont été utilisées après l'accident d'irradiation de Chernobyl pour classer les patients en 4 groupes de pronostic sur l'estimation du degré de sévérité de l'atteinte hématopoïétique à partir de la dose reçue estimée par cytogénétique et par pente de chute des lymphocytes (Silini et Gouskova, 1991). Le premier groupe comprenait les patients ayant reçu des doses correspondant à un syndrome hématopoïétique peu sévère

(1-2 Gy), le deuxième groupe correspond à une atteinte médullaire intermédiaire (2-4 Gy), le troisième groupe correspond à une atteinte sévère (4-6 Gy) et le dernier groupe correspond à une atteinte extrêmement sévère (6-16 Gy). Chacune de ces catégories correspond à un traitement. Ce peut être un simple suivi associé ou non à un soutien transfusionnel pour les patients présentant un syndrome hématopoïétique peu sévère ou un traitement spécifique principalement constitué d'injection de cytokines stimulant la régénération médullaire pour les patients présentant une atteinte hématopoïétique intermédiaire. Les patients appartenant aux deux catégories d'atteinte les plus sévères ont reçu un traitement par greffe de moelle osseuse (Baranov *et al.*, 1995; Guskova *et al.*, 2001).

Il a été possible de définir des modèles prédictifs définissant le nombre de cellules souches hématopoïétiques survivant après irradiation à partir de l'évolution des nombres de cellules circulant dans le sang (Fliedner *et al.*, 1990; Weinsheimer *et al.*, 1991). Cependant, ces modèles restent des évaluations indirectes de l'hématopoïèse résiduelle. D'autres études ont été menées afin d'évaluer directement l'hématopoïèse résiduelle soit par quantification du nombre de progéniteurs circulants dans le sang (Thierry *et al.*, 1985) soit par l'étude du contenu en cellules souches et progéniteurs de la moelle osseuse (Belkacemi *et al.*, 2003). Néanmoins, ces techniques d'évaluation de l'hématopoïèse résiduelle ne semblent pas satisfaisantes. En effet, la détection des progéniteurs circulants nécessite 12 jours de culture interdisant une estimation des dommages médullaires radio-induit précoce après l'irradiation. De même, l'évaluation de l'hématopoïèse résiduelle par la quantification des cellules souches médullaires est rendue incertaine par la rapidité relative de disparition de cette population cellulaire après l'irradiation (environ 48 heures).

Une autre méthode d'évaluation de la réserve en progéniteurs hématopoïétiques a été développée dans une étude récente (Grande et Bueren, 2004). Ce travail a mis en évidence l'existence d'une forte corrélation entre le nombre de progéniteurs mobilisables par G-CSF

après une ICT et la dose d'irradiation dans 3 lignées de souris génétiquement distinctes. De plus, une seconde corrélation a été établie entre le nombre de progéniteurs mobilisables par G-CSF et la réserve de CFU-GM présente dans la moelle osseuse des animaux. L'apport d'une telle approche est considérable dans la mesure où elle pourrait permettre de quantifier directement l'hématopoïèse résiduelle après irradiation. Néanmoins, une durée de 16 jours étant nécessaire pour l'obtention du nombre de progéniteurs mobilisables, et bien qu'elle puisse être réduite à 5 jours par détection par cytométrie de flux des cellules CD34⁺, cette technique d'évaluation est difficilement utilisable en cas d'irradiation accidentelle. De plus, le nombre de cas où elle est applicable reste limité dans la mesure où sa validité n'a pas été démontrée pour les irradiations à fortes doses et les irradiations hétérogènes. Ainsi, quelle que soit la méthode d'évaluation de l'hématopoïèse résiduelle, la notion d'hétérogénéité n'est pas prise en considération.

L'évaluation de l'hétérogénéité d'une irradiation pourrait être réalisée par le suivi de paramètres biochimiques reflétant l'activité de différents organes. Cependant, malgré la diversité des paramètres étudiés (gamma GT, ASAT, ALAT, urée, créatinine, lactate deshydrogénase amylase), aucun ne s'est révélé spécifique d'une atteinte radio-induite à un organe (Donnadieu-Claraz *et al.*, 1999) hormis l'amylase (Barrett *et al.*, 1982; Junglee *et al.*, 1986; Dubray *et al.*, 1992). En effet, seule cette enzyme montre une augmentation précoce et dose-dépendante de sa concentration sanguine après irradiation des glandes parotides. Ainsi, le suivi de l'amylasémie dans les premières heures qui suivent l'irradiation pourrait donner une notion de l'hétérogénéité de l'irradiation, en particulier de la dose reçue au niveau de la tête et du cou. La combinaison de la cytogénétique pour l'estimation de la dose, la pente de chute des lymphocytes pour l'estimation des dommages au système hématopoïétique et des variations de l'amylasémie pourrait donner une idée de l'atteinte radio-induite et de son hétérogénéité. Plus récemment, l'utilisation de la citrulline a été décrite comme bio-indicateur de l'atteinte de l'épithélium intestinal chez l'animal (Lutgens *et al.*, 2003) et chez l'homme (Lutgens *et al.*, 2004). Là encore, la

combinaison avec d'autres bio-indicateurs permettrait de renseigner sur l'étendue des dommages radio-induits. Cependant, aucun de ces paramètres ne permet d'estimer directement les dommages à la moelle osseuse.

Il avait été montré que le taux sérique de FL était augmenté dans des aplasies médullaires spontanées comme l'anémie de Fanconi et l'aplasie médullaire idiopathique (Lyman *et al.*, 1995b). Une seconde étude a mis en évidence une forte augmentation de la concentration sérique de FL dans le cas d'aplasie médullaire induite par chimiothérapie. De plus, ce travail a montré l'existence d'une corrélation négative entre le nombre de progéniteurs présents la moelle osseuse et le taux sérique de FL (Wodnar-Filipowicz *et al.*, 1996). L'hypothèse a donc été faite que le taux de FL sanguin pourrait être un bio-indicateur du statut médullaire.

Chez l'homme, la concentration sérique basale de FL a été initialement évaluée entre 10 et 100 pg/ml de sérum (Lyman *et al.*, 1995b), puis réévaluée à 53 ± 35 pg/ml de sérum (Todd *et al.*, 1997), et à 113 ± 24 pg/ml de plasma dans notre étude (Huchet *et al.*, 2003). Cette dernière valeur est proche de la concentration plasmatique qui avait été mesurée chez le primate non-humain à 136 ± 12 pg/ml au cours de l'étude préliminaire visant à étudier la possibilité d'utiliser le FL comme bio-indicateur d'atteinte radio-induite (Bertho *et al.*, 2001). Ce travail avait montré que la concentration plasmatique de FL ne variait pas en fonction du cycle circadien et qu'elle était similaire chez les mâles et les femelles. L'étude que nous avons menée chez l'homme a confirmée que le sexe n'influe pas sur le taux basal de FL plasmatique (Huchet *et al.*, 2003). De plus, elle a mis en évidence qu'il n'était pas modifié par l'âge du patient.

Les différentes études que nous avons menées, chez l'homme (Huchet *et al.*, 2003) et chez la souris (Prat *et al.*, 2005) ont permis de mettre en évidence que l'irradiation induit une augmentation précoce de la concentration plasmatique de FL conformément à ce qui avait été démontré chez le primate non-humain (Bertho *et al.*, 2001). De plus ces différents travaux montrent que cette augmentation de la concentration plasmatique de FL existe

aussi bien après des irradiations homogènes (Prat *et al.*, 2005) qu'après des irradiations hétérogènes (Huchet *et al.*, 2003). Enfin, nous avons pu mettre en évidence dans un modèle murin que l'augmentation précoce de la concentration plasmatique de FL est dose-dépendante et d'autant plus importante que la fraction de moelle osseuse irradiée est grande. Le taux plasmatique de FL a montré une évolution inverse à celle des leucocytes, des plaquettes et des nombres de progéniteurs survivants dans les territoires médullaires irradiés. Notons que nous avons également observé une diminution du nombre de progéniteurs dans les zones non irradiées. Cette diminution est d'autant plus faible que la fraction de moelle osseuse protégée est petite et suggère une délocalisation de certains progéniteurs de la zone protégée vers la zone irradiée. Quoi, qu'il en soit, à l'échelle de l'animal, le nombre de CFC médullaires totales a montré une diminution précoce conduisant à une aplasie dont la profondeur augmente avec la fraction de moelle osseuse exposée. Il nous a donc été possible de mettre en évidence l'existence d'une forte corrélation entre le nombre total de CFC survivantes chez les animaux et le taux plasmatique de FL quelles que soient la dose et la configuration de l'irradiation. Ceci démontre que le suivi du FL plasmatique est un bio-indicateur du statut fonctionnel global de la moelle osseuse après une irradiation hétérogène chez la souris. Afin de définir si le suivi précoce du taux de FL plasmatique pouvait nous renseigner de façon prédictive sur l'atteinte médullaire radio-induite, nous avons corrélé son taux au 3^{ème} jour après irradiation avec le nombre moyen total de CFC par animal, la durée moyenne de la leucopénie, la durée moyenne de la thrombopénie et la durée moyenne de l'aplasie médullaire. Nous avons pu montrer qu'il existe de fortes corrélations entre le taux de FL au jour 3 et ces différents paramètres, suggérant ainsi que son suivi pourrait permettre de mieux évaluer l'atteinte hématopoïétique dans le cas d'irradiations hétérogènes. De plus, nous avons pu construire des régressions linéaires permettant de prédire le nombre de CFC présentes dans la moelle osseuse au jour 3 et les durées de leucopénie et de thrombopénie à partir du taux plasmatique de FL dosé au 3^{ème} jour après l'irradiation. Une régression

linéaire permettant de prédire la durée de l'aplasie médullaire a également pu être construite, néanmoins, le nombre de cas où cette équation s'applique est faible et sa fiabilité n'est que de 57%. La raison majeure de cette imprécision est sans doute liée au fait que pour les animaux irradiés en champ large ou à forte dose, la récupération hématopoïétique n'était pas complète à la fin de notre étude. De plus, il n'est pas possible d'intégrer les animaux décédés à la suite de l'irradiation. Nous avons donc fait une approximation de la durée de l'aplasie pour construire la régression linéaire. Cette imprécision de la durée d'aplasie se répercute donc obligatoirement sur la fiabilité de l'équation et pourrait être éventuellement corrigée par une extension de l'étude dans le temps.

Les résultats de l'étude chez le primate non-humain (Bertho *et al.*, 2001) avaient montré d'une part, une augmentation dose-dépendante du taux plasmatique de FL après irradiation et d'autre part qu'il pouvait être corrélé à la durée d'aplasie des neutrophiles, au nombre de neutrophiles au nadir et aux périodes de latence des neutrophiles et des plaquettes. Néanmoins, cette étude restait indirecte dans la mesure où les paramètres sanguins ne sont que le reflet de l'activité médullaire. Notre étude dans le modèle murin a permis d'étudier directement la relation existant entre le taux plasmatique de FL et l'hématopoïèse résiduelle grâce au suivi des progéniteurs hématopoïétiques. En outre, elle a montré que le FL est un reflet périphérique du statut médullaire global et que son dosage permet de prédire différents paramètres de la sévérité de l'atteinte médullaire (nombre de progéniteurs survivants au jour 3 dans l'ensemble de la moelle osseuse, durée de leucopénie et durée de thrombopénie). Ainsi, les résultats ont permis de valider, dans un modèle murin, l'utilisation du FL comme bio-indicateur de l'atteinte médullaire radio-induite en situation d'irradiation homogène comme en situation d'irradiation hétérogène. Afin d'étudier si le FL pouvait également être utilisé comme bio-indicateur de l'atteinte médullaire globale chez l'homme, nous avons suivi des patients traités par irradiation localisée (Huchet *et al.*, 2003). Pour chaque patient, nous avons déterminé le volume

médullaire irradié et la dose cumulée d'irradiation. De plus, nous avons suivi la NFS et la concentration plasmatique de FL. Comme cela avait été observé dans les études précédentes (Bertho *et al.*, 2001), le taux plasmatique de FL montre une évolution inverse aux nombres de leucocytes et de plaquettes. De plus, une corrélation inverse a été mise en évidence entre ces paramètres sanguins et la concentration plasmatique de FL durant la radiothérapie, suggérant que le FL puisse être bio-indicateur de l'atteinte médullaire radio-induite chez l'homme. Cette étude a également mis en évidence l'existence d'une corrélation entre le taux plasmatique de FL et à la fois le volume médullaire irradié et la dose cumulée d'irradiation. Ce dernier résultat confirme donc chez l'homme que le FL est le reflet périphérique direct de l'atteinte médullaire radio-induite et qu'il est donc capable de nous renseigner précocement sur l'hématopoïèse résiduelle chez un patient irradié.

Les résultats des différentes études réalisées chez la souris, le primate non-humain et l'homme montrent clairement que le suivi de la concentration plasmatique de FL peut être utilisé comme bio-indicateur pronostic de l'atteinte médullaire radio-induite en situation d'irradiation homogène comme hétérogène. De plus, le dosage du FL répond aux exigences d'un bon bio-indicateur utilisable en cas d'irradiations accidentelles (Greenstock et Trivedi, 1994; Brooks, 1999). En effet, le dosage du FL est réalisé dans un fluide biologique simple à prélever : le sang. De plus, le volume d'échantillon nécessaire au dosage est faible (1 ml). La technique de mesure de la concentration de FL plasmatique (test ELISA) est simple, fiable, reproductible, et facilement automatisable. De plus, les résultats sont obtenus en quelques heures, donnant à ce dosage un avantage non négligeable sur les techniques classiques qui demandent plusieurs jours. La seconde condition que doit remplir un bon bio-indicateur est qu'il dépende de la dose et de l'exposition (Brooks, 1999). Or nous avons vu que le FL remplit parfaitement cette condition puisqu'il augmente de façon dose-dépendante après irradiation (Bertho *et al.*, 2001; Prat *et al.*, 2005) et que ces augmentations sont corrélées au volume médullaire irradié (Huchet *et al.*, 2003). De

plus, le taux basal de FL est bas et ne varie ni en fonction de l'âge, ni en fonction du sexe que ce soit chez le primate non-humain (Bertho *et al.*, 2001) ou chez l'homme (Huchet *et al.*, 2003). Ainsi, le rapport signal/bruit de fond est très élevé permettant une interprétation facilitée des résultats. Enfin, les seules pathologies pouvant modifier le taux basal de FL sont les aplasies médullaires spontanées telles que l'anémie de Fanconi (Wodnar-Filipowicz *et al.*, 1996) et l'aplasie médullaire idiopathique (Lyman *et al.*, 1995b). Ainsi, la présence d'une autre pathologie chez un irradié accidentel ne modifiera pas le résultat du dosage du FL plasmatique ; il en serait de même pour un traitement par cytokine incluant du FL. Cette protéine est donc un bio-indicateur spécifique de l'atteinte médullaire radio-induite, en situation d'irradiation homogène comme hétérogène : son dosage est capable de nous renseigner de façon fiable sur le statut médullaire global et sur la capacité de récupération hématopoïétique d'un patient.

Cette notion de bio-indicateur spécifique de l'atteinte hématopoïétique a été reconnue puisque lors de la conférence de consensus sur le traitement des victimes d'irradiation accidentelle (Jouet *et al.*, 2003), les experts ont, sur la base de ces travaux, intégré le dosage du FL au bilan biologique à réaliser dans les 48 premières heures après une irradiation accidentelle. Néanmoins, l'utilisation de ce bio-indicateur dans les protocoles de diagnostic et de classification des irradiations accidentelles serait facilitée par la construction d'un modèle mathématique applicable systématiquement qui évaluerait le nombre de progéniteurs survivants à partir du dosage du FL plasmatique. Ainsi, un modèle mathématique proche de celui qui avait été défini pour évaluer la diminution du pool de cellules souches médullaire après une irradiation homogène à partir des variations des granulocytes sanguins pourrait être utilisé (Fliedner *et al.*, 1996).

Cependant, dans le cas d'irradiations accidentelles, les dommages radio-induits ne se limitent pas à la moelle osseuse. D'autres organes ou tissus sont souvent fortement altérés. C'est pourquoi la prise en charge d'un irradié accidentel doit tenir compte de tous les signes cliniques.

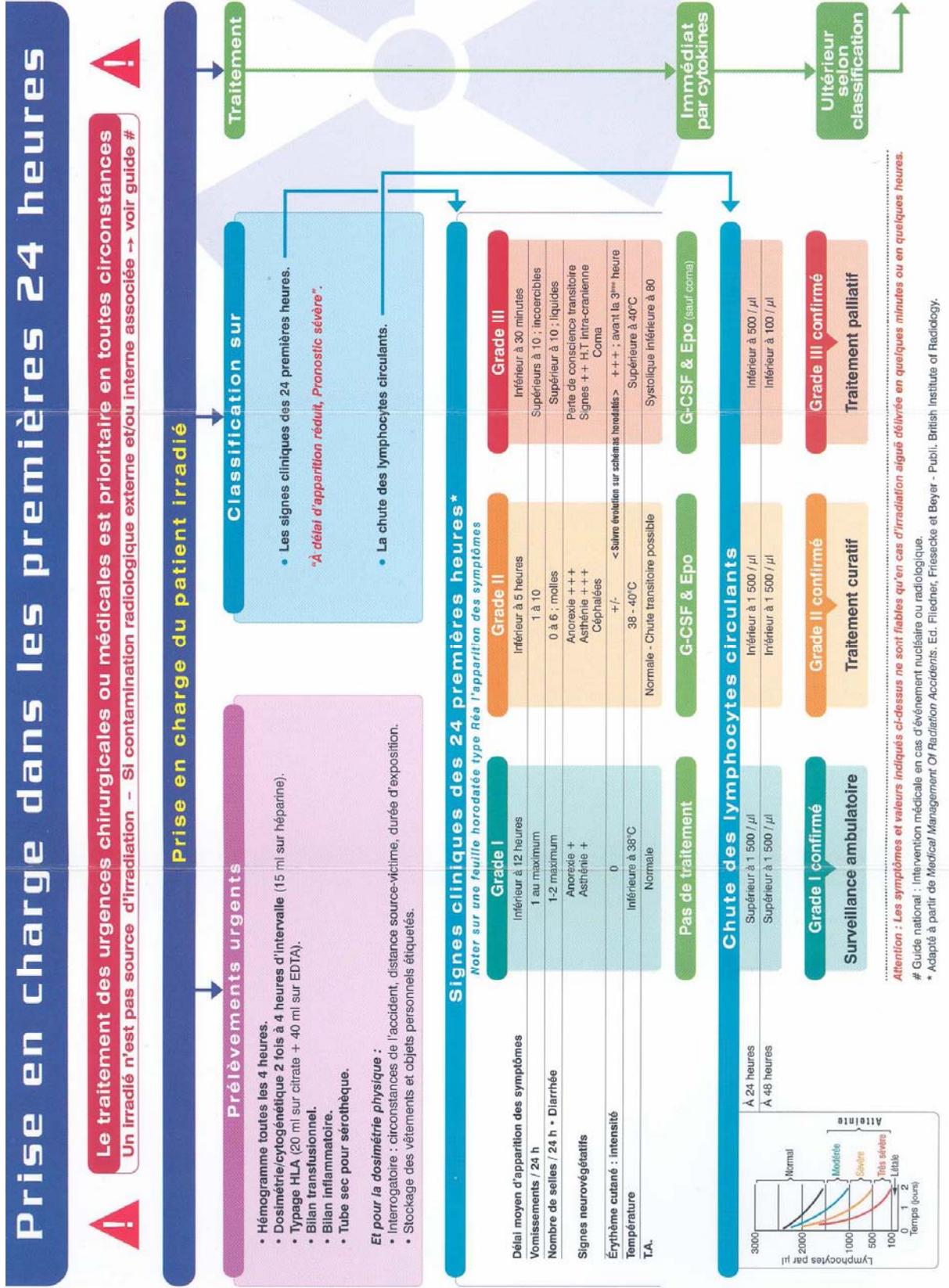


Figure 61 : Diagramme de prise en charge des irradiés accidentels.

La figure 61 représente le diagramme de la prise en charge d'un irradié accidentel dans les premières 24 heures. La classification est basée sur 2 points : les signes cliniques des 24 premières heures qui permettent une première estimation de la l'atteinte radio-induite et la chute des lymphocytes circulants qui confirme sa sévérité.

Néanmoins, la classification des patients est rarement aussi aisée, c'est pourquoi l'addition du dosage du FL plasmatique permettrait d'améliorer la discrimination des patients en terme d'atteinte hématopoïétique dans les 72 premières heures.

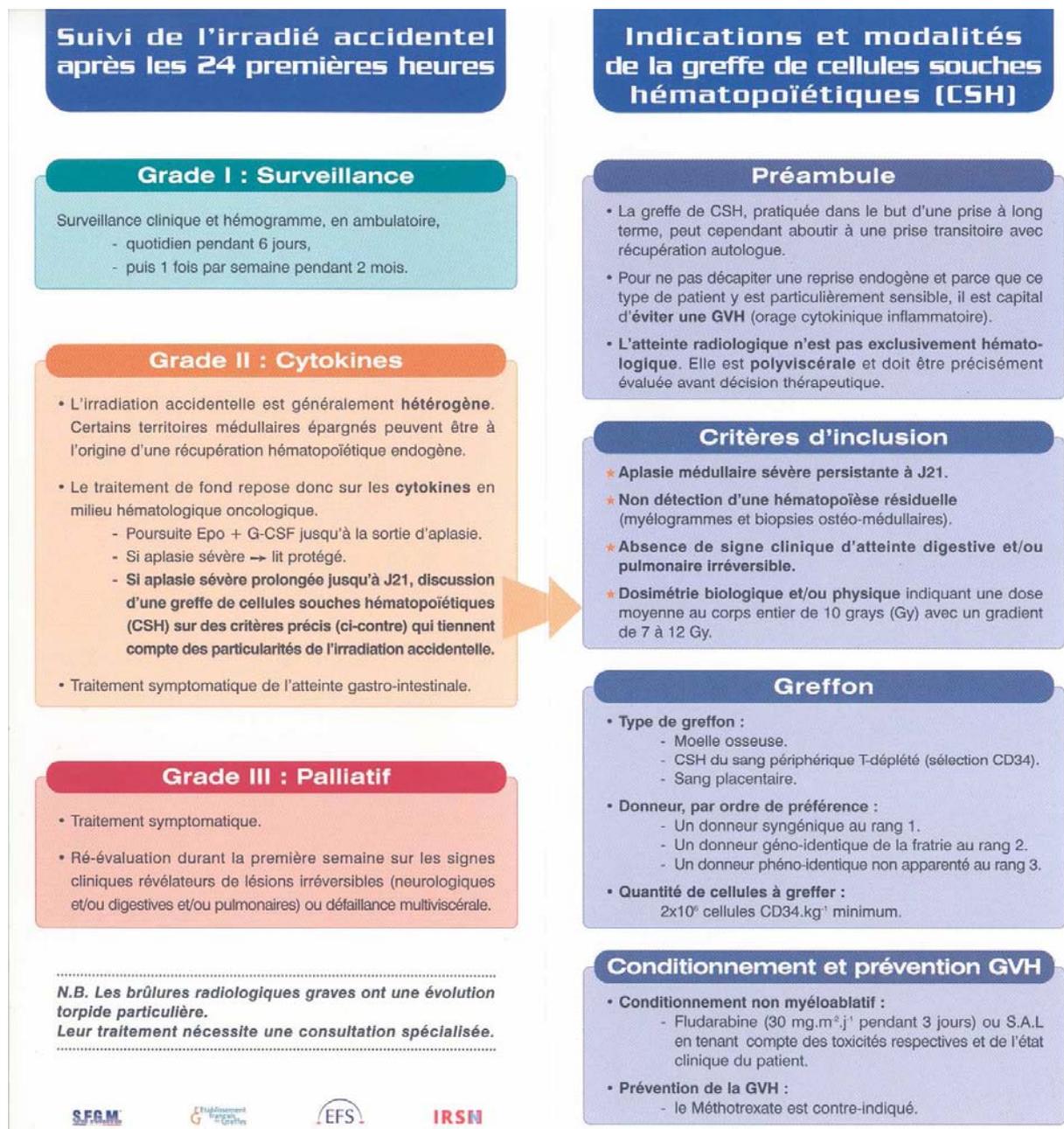


Figure 62 : Diagramme de suivi des irradiés accidentels après les premières 24 heures.

Pour les patients présentant une atteinte de grade 2 comme de grade 3, le traitement du syndrome hématopoïétique est réalisé par des injections de cytokines (G-CSF + Epo) (Figure 61). La procédure actuelle n'envisage la greffe de moelle osseuse qu'après une aplasie sévère et prolongée jusqu'à J21 après irradiation (Figure 62).

Or, le FL permettrait de prédire si le traitement G-CSF + Epo peut conduire à une sortie d'aplasie ou si le patient présente une atteinte hématopoïétique plus sévère nécessitant une greffe de moelle osseuse. Sur ce point, ce nouveau bio-indicateur pourrait se révéler capital en raison du temps gagné. En effet, grâce à son dosage, la greffe de moelle osseuse pourrait être envisagée précocement, ce qui permettrait de disposer de plus de temps pour la recherche d'un donneur compatible, augmentant ainsi les chances de prise de greffe.

2 Mécanismes de régulation du FL : régulation par un équilibre entre production et consommation ?

L'utilisation du FL comme bio-indicateur en clinique humaine nécessite une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la concentration plasmatique de cette cytokine. L'hypothèse initiale était que le taux plasmatique de FL résultait d'un équilibre entre la production de la protéine et sa consommation par les cellules porteuses du récepteur Flt3 (Fichelson, 1998). Cette hypothèse est en accord avec la production ubiquitaire de la protéine dans l'organisme (Lyman *et al.*, 1993a; Hannum *et al.*, 1994; Hunte *et al.*, 1996; Lisovsky *et al.*, 1996a; McClanahan *et al.*, 1996), avec l'expression restreinte du récepteur par les progéniteurs myéloïdes (Matthews *et al.*, 1991; Lyman *et al.*, 1993b; Rosnet *et al.*, 1993) et lymphoïdes (Hunte *et al.*, 1996; Ray *et al.*, 1996; Bertho *et al.*, 2000) et avec l'augmentation de la concentration plasmatique de FL dans les situations d'aplasies acquises (Lyman *et al.*, 1995b) ou induites (Wodnar-Filipowicz *et al.*, 1996).

Afin de tester l'hypothèse d'une régulation par un équilibre entre production et consommation de la protéine, nous avons réalisé une mobilisation par G-CSF chez le primate non-humain. Une telle mobilisation a pour effet de délocaliser les progéniteurs hématopoïétiques dans la circulation générale et de stimuler la moelle osseuse (Goldman, 1995). Ainsi, nous avons augmenté artificiellement le nombre de cellules consommatrices de FL. Certains travaux avaient suggéré que la concentration plasmatique de FL avant mobilisation pouvait être prédictive du nombre de CD34⁺ mobilisable (Gazitt et Liu, 2000; Haidar *et al.*, 2002). Nous avons donc corrélé le taux plasmatique moyen de FL avec d'une part le nombre de CD34⁺ mobilisé dans le sang au jour 5, et d'autre part avec le nombre total de CD34⁺ mobilisés entre les jours 3 et 6. Cette analyse confirme clairement que le taux plasmatique de FL mesuré pendant la période témoin est un excellent indicateur prédictif de la capacité de mobilisation d'un individu. Ceci présente un intérêt majeur pour la clinique humaine. En effet, le dosage du FL avant la mobilisation pourrait permettre de définir le nombre de cycles de mobilisation nécessaires à l'obtention d'un nombre suffisant de cellules CD34⁺ en vue d'une greffe de cellules souches périphériques. Cette étude a également montré que dès le premier jour après le début de la mobilisation, le nombre de progéniteurs présents dans la moelle osseuse est augmenté. Cette élévation atteint son maximum à J5. Parallèlement, nous avons suivi le taux plasmatique de FL. Etonnamment ce paramètre est invariant pendant les 5 premiers jours. Ainsi, une forte augmentation du nombre de cellules consommatrices de FL n'induit pas de diminution de sa concentration plasmatique. La poursuite du suivi du taux plasmatique de FL après la mobilisation montre même une augmentation qui débute au jour 5 et qui se poursuit jusqu'au jour 12. Puis le taux de FL plasmatique est normalisé au jour 15, qui correspond au retour à un nombre de progéniteurs médullaires physiologique. Ce résultat est en accord avec ce qui avait été décrit chez les patients mobilisés en vue d'une leucaphérèse (Dettke *et al.*, 2001). En effet, une augmentation plasmatique de la concentration de FL avait été observée au jour 5 post-mobilisation et le taux de FL s'était normalisé très

rapidement après la leucaphérèse. Ceci pourrait indiquer que la diminution du nombre de cellules mobilisées est capable de conduire à une normalisation du FL. Globalement, les résultats de cette étude n'ont pas permis de confirmer l'hypothèse d'une régulation par équilibre entre production et consommation. De plus, ils suggèrent fortement l'existence d'un mécanisme plus complexe capable d'induire et d'augmenter la production de FL en lien très strict avec l'activité médullaire. Dans ce cadre, l'implication des lymphocytes T décrits comme pouvant intervenir dans l'augmentation plasmatique de FL (Chklovskaja *et al.*, 1999) ne semble pas essentielle. Afin de mieux définir le rôle de ces cellules dans la régulation du taux plasmatique de FL, nous avons comparé les variations de concentration plasmatique de FL radio-induite chez deux souches de souris : la lignée BALB/c et la lignée NOD/SCID dépourvue de cellules lymphoïdes.

Les résultats de cette étude ont montré qu'il existe une augmentation dose-dépendante de la concentration plasmatique de FL chez les souris BALB/c comme chez les souris NOD/SCID en dépit de leur déficit en cellules lymphoïdes. Chez les deux souches de souris, l'évolution de la concentration plasmatique de FL est inversement corrélée aux variations des nombres de leucocytes, de plaquettes et de CFC médullaires. Ce résultat démontre d'une part, que le FL est bio-indicateur de l'atteinte hématopoïétique quel que soit le patrimoine génétique des souris et d'autre part, que les cellules lymphoïdes ne sont pas indispensables à l'augmentation plasmatique de FL après irradiation chez la souris. Une étude clinique a permis de confirmer, chez l'homme, que les lymphocytes T n'étaient pas les régulateurs majoritaires de l'augmentation plasmatique initiale de FL après un traitement aplasiant. En effet, l'augmentation initiale de la concentration plasmatique de FL est similaire chez les patients traités par sérum anti-lymphocytaire et chez les patients traités par radiothérapie et/ou chimiothérapie. Néanmoins, il existe une différence notable entre l'évolution du taux plasmatique de FL chez la souris et chez l'homme. En effet, seul dans le modèle murin, une seconde augmentation de FL plasmatique a pu être observée. Ce second pic de FL se produit entre J14 et J21 après irradiation et a été

observé chez les souris BALB/c comme chez les souris NOD/SCID. Il n'est donc pas induit par les cellules lymphoïdes. Ainsi, les variations de la concentration plasmatique de FL, qu'elles soient précoces ou tardives, semblent dépendantes d'une autre population cellulaire, aussi bien chez la souris que chez l'homme.

Afin de vérifier quels organes ou cellules pouvaient être impliqués dans la régulation du FL après irradiation, nous avons quantifié l'expression de l'ARNm du FL et la protéine dans différents organes des deux lignées de souris. En accord avec la littérature (Lyman *et al.*, 1993a; Hannum *et al.*, 1994; Hunte *et al.*, 1996; McClanahan *et al.*, 1996), les résultats ont montré que l'ARNm du FL est présent dans tous les organes testés. Bien qu'après irradiation, le profil d'expression de l'ARNm du FL soit différent chez les deux lignées de souris, la quantité de protéine dosée dans les organes est quasi-identique. L'irradiation induit donc une diminution de la quantité de FL présente dans la moelle osseuse, et une augmentation de sa quantité dans la rate, le thymus, et les leucocytes. Les analyses phénotypiques confirmant l'absence de cellules lymphoïdes chez les souris NOD/SCID, nous avons ainsi démontré que les lymphocytes T ne sont pas les régulateurs majoritaires de la concentration plasmatique de FL après irradiation comme cela avait été suggéré précédemment (Chklovskaja *et al.*, 1999). De plus, d'autres cellules largement distribuées dans l'organisme semblent impliquées dans cette régulation. Il n'est pas impossible que les cellules endothéliales ou les fibroblastes de moelle osseuse, décrits comme capables de produire du FL (Lisovsky *et al.*, 1996a; Solanilla *et al.*, 2000b), prennent part à la régulation du FL plasmatique. Des marquages immuno-histochimiques ont été réalisés, afin de localiser les cellules productrices dans la moelle osseuse, la rate et le thymus de souris BALB/c. Avant irradiation, dans les trois organes, nous avons observé deux types de marquage. D'une part un marquage diffus, qui pourrait correspondre à une localisation du FL sur la matrice extra-cellulaire comme cela a été décrit pour d'autres cytokines (Allouche, 1995). D'autre part, nous avons observé un marquage en foyers au sein desquels certaines cellules apparaissaient fortement marquées. Ces cellules ont une morphologie de

cellules stromales, particulièrement dans le thymus. Après irradiation, le nombre de foyers dans la moelle osseuse semble diminué. A l'inverse, dans la rate et le thymus, nous avons observé un nombre accru de foyers ainsi qu'une coloration générale plus importante de l'organe. Les résultats de ces marquages sont en parfaite adéquation avec ceux obtenus par dosages protéiques. De plus, les cellules stromales présentent une radio-résistance relativement importante (Hendry et Feng-Tong, 1995), ce qui pourrait expliquer l'augmentation dose-dépendante de la concentration plasmatique de FL jusqu'à 6 Gy et la diminution de la taille du pic de FL au-delà de cette dose d'irradiation chez la souris.

Ces résultats suggèrent la capacité des cellules stromales à produire du FL après irradiation. Néanmoins, ils ne donnent pas d'indication précise sur la nature du mécanisme qui conduit à une augmentation très importante de la concentration plasmatique de FL (10 à 30 fois) après irradiation. Cependant, la moelle osseuse est un organe hiérarchique qui produit un nombre considérable de cellules de différentes natures à partir d'une petite population de progéniteurs. Il est donc parfaitement concevable, qu'en réponse à une perte cellulaire radio-induite, les cellules stromales du micro-environnement médullaire, de la rate et du thymus soient capables de produire une élévation générale du FL. En effet, les cellules stromales sont reliées entre-elles par de nombreuses jonctions GAP qui permettent en particulier une harmonisation de la régulation hématopoïétique par les cellules stromales (Montecino-Rodriguez et Dorshkind, 2001). De plus, il a été montré *in vitro* que ces jonctions GAP étaient relativement résistantes à l'irradiation (Umezawa *et al.*, 1990) et *in vivo* que leur nombre est augmenté dans la zone frontière entre l'endosteum et la moelle osseuse après une irradiation ou un traitement aplasiant (Rosendaal *et al.*, 1994). Une étude récente a également mis en évidence que l'augmentation du nombre de jonctions GAP était corrélée à une augmentation des communications inter cellulaires après irradiation (Azzam *et al.*, 2003). Enfin, il a été démontré que les jonctions GAP étaient capitales pour la récupération hématopoïétique après des traitements cytoablatifs (Montecino-Rodriguez et Dorshkind, 2001) et que leur

nombre diminuait après cette récupération hématopoïétique (Rosendaal *et al.*, 1994). Ainsi, les cellules stromales médullaires comme thymiques sont capables de former un syncytium fonctionnel en situation d'agression physiologique qui pourrait répondre à une irradiation, entre autres, par une production massive de FL. Cette hypothèse de réponse globale du stroma médullaire suggère que le FL pourrait être une molécule clef dans la régulation homéostatique de l'hématopoïèse. Une telle hypothèse avait été formulée pour l'IL-7 dont le taux circulant est fortement augmenté en association avec une déplétion en lymphocytes T (Fry *et al.*, 2001) et a été confirmée plus récemment (Lenz *et al.*, 2004). Ainsi, l'augmentation systémique de FL pourrait être la résultante de la réponse globale du stroma à des événements ou des stimuli locaux.

Au niveau local, cette production de FL pourrait être initiée par un mécanisme indirect (via des facteurs solubles) ou direct (par contact inter cellulaire) similaire à celui décrit pour les cellules endothéliales (Solanilla *et al.*, 2000a). Un tel modèle de régulation a été décrit pour l'IL-7 lors de la lymphopénie (Fry et Mackall, 2001). Il est possible par analogie de construire une hypothèse de régulation de la production du FL par les cellules stromales. Un tel modèle consiste en une boucle de régulation selon laquelle les cellules souches hématopoïétiques et immatures produiraient un facteur soluble et/ou membranaire inhibiteur ou régulateur de la production de FL par les cellules stromales. Comme dans le cas de l'IL-7 (Fry et Mackall, 2001), cette molécule pourrait être le TGF β . Elle est produite par de nombreux types cellulaires parmi lesquels les progéniteurs hématopoïétiques (Ploemacher *et al.*, 1993). En outre, elle est capable d'inhiber la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques malgré une stimulation par le FL (Jacobsen *et al.*, 1996).

Dans un tel système, la diminution radio-induite du nombre de progéniteurs présents au contact des cellules stromales induirait une diminution ou une perte du régulateur négatif et donc une levée de l'inhibition de la production de FL. Les cellules stromales produiraient alors une grande quantité de FL qui aurait pour effet d'augmenter l'adhésion

des cellules immatures survivantes au stroma par activation de bêta-1-intégrine tels que VLA-4 (very late antigen-4) et VLA-5 comme cela a été décrit pour les cellules endothéliales (Solanilla *et al.*, 2003). Ainsi, les progéniteurs seraient soumis directement aux régulations du micro-environnement. Le FL pourrait également inhiber l'apoptose des progéniteurs (Drouet *et al.*, 1999; Majka *et al.*, 2001), empêcher leur maturation et maintenir leur clonogénicité afin de restaurer le pool de cellules immatures (Solanilla *et al.*, 2000b).

Peu de facteurs solubles sont connus pour stimuler la production de FL. Néanmoins, il a été décrit que l'IL-1 α était capable d'induire une augmentation la quantité de FL présent dans les cellules stromales de moelle osseuse (Lisovsky *et al.*, 1996a). De même, le couple IL-6/IL-6 récepteur soluble et à un moindre niveau l'IL-6 seule sont capables d'augmenter la production de FL dans des fibroblastes (Peters *et al.*, 2001). Enfin, le TNF α a été décrit comme capable d'augmenter l'ARNm codant le FL dans des lignées de cellules stromales (Dormady *et al.*, 2001). Par ailleurs, une étude réalisée *in vitro* sur une coculture de cellules CD34⁺ et de cellules endothéliales a montré que le TGF- β , l'IFN- α et le MIP1- α pourraient également stimuler la production de FL (Solanilla *et al.*, 2000b).

Il a été décrit que l'irradiation induit des augmentations de concentration plasmatique de différentes cytokines, parmi lesquelles on trouve l'IL-6 (Herodin *et al.*, 1992; Van der Meeren *et al.*, 2001). Il est donc envisageable que ce taux élevé de cytokine circulante induise une production de FL par les cellules stromales. De plus, l'irradiation augmente la production de nombreuses cytokines par les cellules stromales elles-même. En particulier, il a été montré *in vitro* que les cellules endothéliales de moelle osseuse sont capables de produire de l'IL-1 α , de l'IL-6 et du MIP-1 α (Gaugler *et al.*, 1998). De plus, une élévation des ARNm codant pour l'IL-1 α , l'IL-6 et le TNF α a été décrite dans le tissu hématopoïétique après irradiation *in vivo* (Chang *et al.*, 1997). Une régulation paracrine, voire autocrine selon laquelle une élévation très localisée de certaines cytokines induirait une augmentation de la production de FL peut donc être envisagée également (Figure 63).

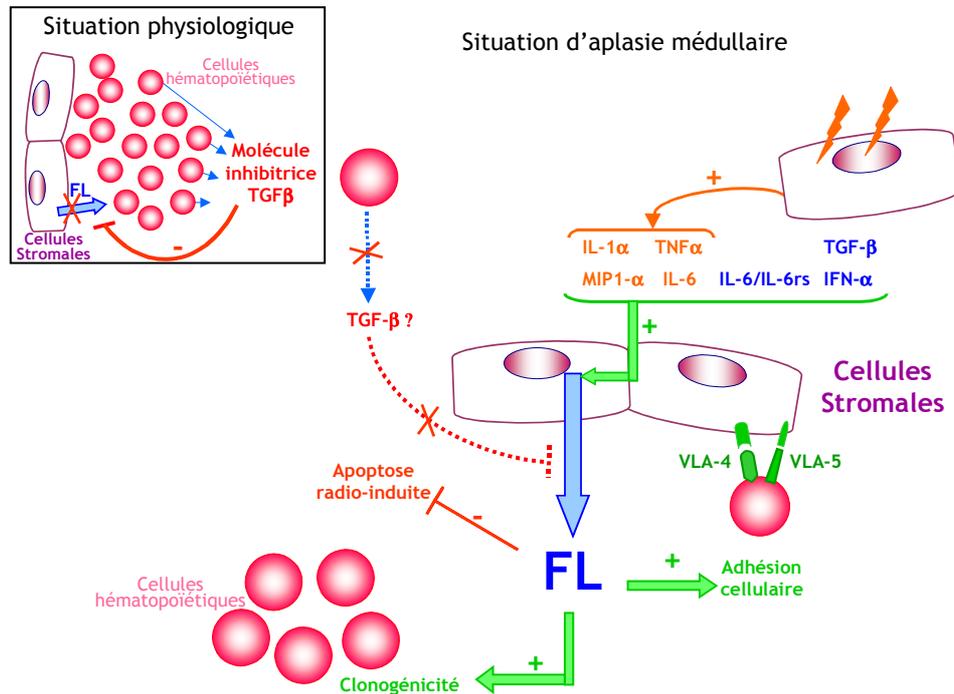


Figure 63 : Schéma récapitulatif des hypothèses de régulations du FL.

Bien que différents mécanismes semblaient capables d'induire une production de FL par les cellules stromales, nous avons d'abord cherché à confirmer leur aptitude à produire du FL en réponse à une irradiation. Parmi ces cellules, on trouve des fibroblastes, des adipocytes, et des ostéoblastes qui dérivent tous de cellules souches mésenchymateuses (Pittenger *et al.*, 1999). Nous avons donc étudié différentes lignées cellulaires : une lignée stromale fibroblastique humaine (HS-5) (Roeklein et Torok-Storb, 1995), une lignée pré-adipocytaire murine (MS-5) toutes deux capables de soutenir l'hématopoïèse, et une lignée ostéoblastique humaine (MG-63). Cette étude a mis en évidence que le FL est présent dans les lysats cellulaires et dans les surnageants de cultures des trois lignées cellulaires indiquant que les cellules produisent constitutivement du FL, mais aussi qu'elles sont capables de le relarguer dans le milieu. L'irradiation induit une augmentation du relargage de FL par les cellules MS-5, MG-63 et HS-5. Cette augmentation semble intervenir

tardivement en réponse à l'irradiation. Néanmoins, il n'est pas impossible que l'augmentation intervienne dans les premières heures qui suivent l'irradiation mais qu'elle ne soit détectable que bien après en raison du seuil de détection de notre méthode de dosage. Quoi qu'il en soit, la réponse à l'irradiation n'est pas identique pour les 3 lignées cellulaires. En effet, l'augmentation de la quantité de FL dans le milieu de culture n'intervient qu'après une irradiation à forte dose pour la lignée MS-5 tandis qu'elle est dose-dépendante pour la lignée MG-63. De plus, chez MS-5, l'amplitude de l'augmentation est beaucoup plus faible que chez MG-63 et HS-5, suggérant une régulation de la production de FL différente chez ces lignées. Néanmoins, quelle que soit la lignée considérée, l'origine du FL présent dans les surnageants de culture peut être de deux types. En effet, il peut être issu, d'une part, d'une lyse de la forme membranaire de la protéine, comme cela a été décrit pour les lymphocytes T (Chklovskaja *et al.*, 1999), et d'autre part, d'un relargage à partir du stock intracytoplasmique. C'est pourquoi, nous avons suivi la quantité de FL intracytoplasmique dans ces trois lignées. Cette étude a montré que la concentration intracellulaire de FL ne varie pas après irradiation chez MS-5 quelle que soit la dose. Chez MG-63, bien que les irradiations à 2 et 5 Gy ne provoquent pas de variation de la quantité de FL intracytoplasmique, une irradiation à 10 Gy induit une augmentation cette quantité. De même, nous avons observé une concentration de FL plus importante dans les lysats cellulaires de HS-5 après une irradiation à 10 Gy. Il est remarquable qu'en aucun cas, nous n'ayons pu observer une vidange du stock intracytoplasmique. Cependant, un relargage à partir de ce stock immédiatement compensé par une néosynthèse de la protéine n'est pas à exclure. Quoi qu'il en soit, le suivi de la quantité intracytoplasmique de FL semblent confirmer que la capacité de réponse à l'irradiation, en terme de production de FL, est moindre pour la lignée MS-5 comparativement aux lignées MG-63 et HS-5.

Afin de vérifier que les faibles variations de FL observées chez MS-5 étaient bien liées à la qualité du stimulus et non à la capacité intrinsèque de la lignée à produire du FL, nous

avons cultivé les cellules en présence de TNF α , décrit comme étant capable de stimuler la production de FL (Dormady *et al.*, 2001). Les résultats ont montré que la quantité de FL dans le surnageant de culture est très augmentée par le TNF α , en association à une forte diminution de la quantité de FL intra-cytoplasmique, suggérant un relargage massif du stock intra-cellulaire non compensé par une néosynthèse de la protéine. Cette étude permet d'une part de confirmer l'aptitude de la lignée MS-5 à produire du FL. D'autre part, elle a mis en évidence que le mécanisme de relargage du FL est différent selon le stimulus (irradiation ou TNF α) ou la lignée considérée.

Ainsi, l'étude réalisée *in vitro* a clairement confirmé la capacité de différentes cellules stromales à produire constitutivement du FL comme cela avait été décrit précédemment (Lisovsky *et al.*, 1996a). De plus, nous avons mis en évidence que des cellules stromales de différentes natures pouvaient répondre à une irradiation par augmentation du relargage de FL dans le milieu environnant. Bien que ceci reste à vérifier sur des cultures primaires de cellules stromales médullaires, ce point présente un intérêt tout particulier, dans la mesure où les types cellulaires que nous avons testés sont tous étroitement impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse. En effet, les fibroblastes (Charbord, 1992) et plus récemment les ostéoblastes (Calvi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003) ont été décrits comme étant des acteurs majoritaires des niches hématopoïétiques, concept initialement proposé par Schofield (Schofield, 1978) pour expliquer la dépendance des cellules souches à leur micro-environnement. Ainsi, il a été montré que les cellules stromales étaient capables d'influer sur les cellules souches hématopoïétiques via des cytokines ou des molécules d'adhésions (Charbord, 1992). En outre, il a été suggéré que le micro-environnement médullaire participait à l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques via une conjonction de différents signaux existant au sein de la niche hématopoïétique (Hackney *et al.*, 2002). Récemment, il a été établi que le micro-environnement médullaire régule à la fois l'auto-renouvellement des cellules souches via une voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Reya *et al.*, 2003) et leur quiescence

via la voie Angiopoietine/Tie2 (Arai *et al.*, 2004). Néanmoins, il joue également un rôle important dans la différenciation des cellules. Ainsi, il a été montré récemment l'implication de cellules stromales dans la lymphopoïèse B (Tokoyoda *et al.*, 2004). En outre, ce travail propose un modèle de différenciation impliquant plusieurs types de niches hématopoïétiques. Ainsi, les précurseurs les plus précoces de la lymphopoïèse B seraient en contact avec des cellules stromales exprimant le CXCL12 qui formeraient une première niche ayant pour vocation de les emprisonner et de permettre leur survie. Les précurseurs quitteraient les cellules exprimant le CXCL12, migreraient à travers le mésenchyme pour atteindre des cellules exprimant de l'IL-7. Ces cellules formeraient un second type de niche qui induirait une expansion des précurseurs (Tokoyoda *et al.*, 2004).

Un tel modèle paraît très intéressant pour une analogie avec le FL. En effet, il est parfaitement concevable que les cellules souches hématopoïétiques se trouvent dans une niche « dédiée à l'auto-renouvellement ». Certaines cellules souches quitteraient alors ce compartiment et migreraient par attraction via le SDF-1 (Aiuti *et al.*, 1997) vers des cellules exprimant le FL qui formeraient une seconde niche capable d'induire l'expansion et la différenciation de ces progéniteurs. Cette hypothèse est particulièrement bien confortée par le fait que chez la souris, seules les cellules souches hématopoïétiques Lin⁻Sca1⁺c-Kit⁺Flt3⁻ sont capables de conduire à une restauration de toutes les lignées (Adolfsson *et al.*, 2001) : elles constitueraient les cellules présentes dans la niche d'auto-renouvellement. De plus, il a été montré que l'augmentation de l'expression du récepteur du FL (Flt3) par les cellules Lin⁻Sca1⁺c-Kit⁺ est associée à une perte de leur capacité d'auto-renouvellement et de reconstitution myéloïde à long terme (Adolfsson *et al.*, 2001). Cette seconde population cellulaire serait donc celle présente dans les niches de prolifération et de différenciation. De plus, les résultats de nos travaux ayant montré que les cellules stromales constituant les niches hématopoïétiques sont capables de produire du FL, cette hypothèse paraît particulièrement recevable. Enfin, la capacité des cellules stromales à produire une grande quantité de FL en réponse à un stress comme l'irradiation

fait de cette protéine un régulateur majeur de l'homéostasie hématopoïétique. Cependant, l'existence de plusieurs types de niches hématopoïétiques dédiées à différents processus peut paraître antinomique de l'hypothèse d'une réponse syncytiale à l'irradiation développée précédemment. Néanmoins, il n'est pas inconcevable de penser que dans un cadre physiologique, l'hématopoïèse est régulée grâce à des niches distinctes et qu'en situation pathologique, telle que celle créée par l'irradiation, l'ensemble du stroma médullaire se coordonne pour produire une réponse appropriée à l'atteinte hématopoïétique induite. Cette hypothèse est confortée par les marquages immunohistologiques que nous avons réalisés dans le thymus et qui montrent une coloration générale de l'organe après irradiation.

S'il apparaît très clairement, à l'issue de ce travail, que les cellules stromales jouent un rôle majeur dans la régulation du FL, les processus qui conduisent à la production de cette protéine restent mal définis. Cependant, quelques expérimentations pourraient nous renseigner facilement sur ces mécanismes moléculaires. En premier lieu, le suivi de l'expression de l'ARNm codant le FL dans les lignées de cellules stromales devrait permettre de déterminer clairement si le relargage de FL est consécutif à une régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Cette étude est en cours au laboratoire. Cette étude pourrait être complétée par une inhibition de la synthèse des ARNm par actinomycine D et/ou de la synthèse protéique par cycloheximide, par exemple. Par la suite, il serait particulièrement intéressant de déterminer si la production de FL par les cellules stromales est induite directement par l'irradiation ou indirectement via des facteurs solubles. Pour ce faire, une première expérimentation consistant en l'incubation de cellules stromales non irradiées avec du surnageant de cellules stromales irradiées devrait permettre de définir si la présence de facteurs solubles est suffisante à la production de FL. Si tel était le cas, différents facteurs solubles pourraient être dosés et inhibés individuellement afin de caractériser les inducteurs solubles de la production de FL après irradiation.

Comme cela a été longuement évoqué, l'interaction entre les cellules stromales et les cellules souches hématopoïétiques est capitale dans la régulation de l'hématopoïèse. C'est pourquoi l'étude de la production de FL par les cellules stromales doit également être menée dans un modèle de co-culture cellules stromales/cellules souches hématopoïétiques. Un tel modèle permettrait de comprendre de quelle façon les interactions cellules/cellules sont capables d'influer sur la production de FL par les cellules stromales et en particulier de déterminer si une déplétion en cellules souches induit une augmentation de la production de FL. Une fois les mécanismes de production du FL mieux caractérisés, il serait intéressant de vérifier *in vivo* la part prise par les cellules stromales dans l'augmentation de la concentration plasmatique de FL. Une telle étude nécessite de pouvoir quantifier spécifiquement le FL produit par les cellules stromales. Dans cet objectif, il serait intéressant de travailler sur un modèle de souris NOD/SCID greffées avec des cellules stromales humaines. Ainsi, la quantification du FL humain présent dans le sang après irradiation nous renseignerait spécifiquement sur la production radio-induite de FL par les cellules stromales.

En conclusion, les travaux que nous avons réalisés ont clairement démontré que le FL est un excellent bio-indicateur de l'atteinte hématopoïétique radio-induite en situation d'irradiation homogène, comme hétérogène. L'utilisation d'un tel marqueur en clinique humaine devrait permettre d'améliorer considérablement la prise en charge des irradiés accidentels. De plus, l'intégration du dosage du FL dans le suivi de patients en cours de radiothérapie ou de chimiothérapie permettrait d'avoir une connaissance permanente du statut médullaire individuel de chaque patient. Il serait ainsi plus facile d'adapter le traitement à chaque situation clinique et d'anticiper les pancytopenies de haut grade. Le FL présente un autre intérêt considérable en clinique humaine dans le cadre des mobilisations réalisées en vue de collection de cellules souches hématopoïétiques. En effet, son dosage permettant de prédire l'efficacité de la mobilisation, il peut nous

renseigner spécifiquement sur le nombre de cycles de mobilisation à réaliser pour obtenir la quantité suffisante de cellules souches hématopoïétiques nécessaires à la greffe d'un patient.

Notre étude des mécanismes de régulation du FL a montré que le taux plasmatique de cette protéine n'est pas la résultante d'un équilibre passif entre la production de la protéine et sa consommation mais que cette régulation fait intervenir des mécanismes complexes. En outre, nous avons décrit un rôle central des cellules stromales dans la production de FL, en particulier après un stress comme l'irradiation. Ces résultats confrontés à ceux de la littérature mettent en évidence que le FL est une cytokine majeure de l'homéostasie hématopoïétique dont l'étude approfondie pourrait permettre de mieux comprendre le fonctionnement des niches hématopoïétiques.

REFERENCES

- Abboud C. N. **1995**. "Human bone marrow microvascular endothelial cells: elusive cells with unique structural and functional properties." *Exp Hematol* **23**(1): 1-3.
- Adolfsson J., Borge O. J., Bryder D., Theilgaard-Monch K., Astrand-Grundstrom I., Sitnicka E., Sasaki Y. et Jacobsen S. E. **2001**. "Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity." *Immunity* **15**(4): 659-69.
- Agrawal D. K., Hopfenspirger M. T., Chavez J. et Talmadge J. E. **2001**. "Flt3 ligand: a novel cytokine prevents allergic asthma in a mouse model." *Int Immunopharmacol* **1**(12): 2081-9.
- AIEA **1986**. Technical report: dosimetry: chromosomal aberration analysis for doses assessment. Vienna.
- AIEA **2001**. Cytogenetic analysis for doses assessment: A manual. Technical reports series n° 405. Vienna.
- Aiuti A., Webb I. J., Bleul C., Springer T. et Gutierrez-Ramos J. C. **1997**. "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." *J Exp Med* **185**(1): 111-20.
- Akashi K., Kondo M., Cheshier S., Shizuru J., Gandy K., Domen J., Mebius R., Traver D. et Weissman I. L. **1999**. "Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**: 1-12.
- Allouche M. **1995**. "Basic fibroblast growth factor and hematopoiesis." *Leukemia* **9**(6): 937-42.
- Andreoni C., Moreau I. et Rigal D. **1990**. "Long-term culture of human bone marrow. I. characterization of adherent cells in flow cytometry." *Exp Hematol* **18**(5): 431-7.
- Andrews G. A. **1980**. Medical management of accidental total-body irradiation. Amsterdam, Elsevier.
- Andrews R. G., Singer J. W. et Bernstein I. D. **1989**. "Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties." *J Exp Med* **169**(5): 1721-31.
- Arai F., Hirao A., Ohmura M., Sato H., Matsuoka S., Takubo K., Ito K., Koh G. Y. et Suda T. **2004**. "Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche." *Cell* **118**(2): 149-61.
- Azzam E. I., de Toledo S. M. et Little J. B. **2003**. "Expression of CONNEXIN43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses." *Cancer Res* **63**(21): 7128-35.
- Baranov A. E., Guskova A. K., Nadejina N. H. et Nugis V. Y. **1995**. "Chernobyl experience: Biological indicators of exposure to ionising radiation." *Stem Cells* **13**(sup1): 69-77.
- Barrett A., Jacobs A., Kohn J., Raymond J. et Powles R. L. **1982**. "Changes in serum amylase and its isoenzymes after whole body irradiation." *Br Med J (Clin Res Ed)* **285**(6336): 170-1.
- Baum C. M., Weissman I. L., Tsukamoto A. S., Buckle A. M. et Peault B. **1992**. "Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7): 2804-8.

- Becquerel H. **1896**. "Sur les radiations émises par les sels d'uranium." *Compte rendu des séances de l'académie des sciences* **122**: 689-694.
- Belkacemi Y., Bouchet S., Frick J., Huchet A., Pene F., Aigueperse J., Gourmelon P., Lopez M. et Gorin N. C. **2003**. "Monitoring of residual hematopoiesis after total body irradiation in humans as a model for accidental x-ray exposure: dose-effect and failure of ex vivo expansion of residual stem cells in view of autografting." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **57**(2): 500-7.
- Bellantuono I. **2004**. "Haemopoietic stem cells." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(4): 607-20.
- Belloni P. N. et Nicolson G. L. **1988**. "Differential expression of cell surface glycoproteins on various organ-derived microvascular endothelia and endothelial cell cultures." *J Cell Physiol* **136**(3): 398-410.
- Benboubker L., Watier H., Carion A., Georget M. T., Desbois I., Colombat P., Bardos P., Binet C. et Domenech J. **2001**. "Association between the SDF1-3'A allele and high levels of CD34(+) progenitor cells mobilized into peripheral blood in humans." *Br J Haematol* **113**(1): 247-50.
- Bender M. A., Awa A. A., Brooks A. L., Evans H. J., Groer P. G., Littlefield L. G., Pereira C., Preston R. J. et Wachholz B. W. **1988**. "Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation." *Mutat Res* **196**(2): 103-59.
- Bensinger W., Appelbaum F., Rowley S., Storb R., Sanders J., Lilleby K., Gooley T., Demirer T., Schiffman K., Weaver C. et al. **1995**. "Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells." *J Clin Oncol* **13**(10): 2547-55.
- Bertho J. M., Chapel A., Loilleux S., Frick J., Aigueperse J., Gorin N. C. et Gourmelon P. **2000**. "CD135 (Flk2/Flt3) expression by human thymocytes delineates a possible role of FLT3-ligand in T-cell precursor proliferation and differentiation." *Scand J Immunol* **52**(1): 53-61.
- Bertho J. M., Demarquay C., Frick J., Joubert C., Arenales S., Jacquet N., Sorokine-Durm I., Chau Q., Lopez M., Aigueperse J., Gorin N. C. et Gourmelon P. **2001**. "Level of Flt3-ligand in plasma: a possible new bio-indicator for radiation-induced aplasia." *Int J Radiat Biol* **77**(6): 703-12.
- Bertho J. M., Frick J., Demarquay C., Lauby A., Mathieu E., Dudoignon N., Jacquet N., Trompier F., Chapel A., Joubert C., Lopez M., Aigueperse J., Gorin N. C., Gourmelon P. et Thierry D. **2002**. "Reinjection of ex vivo-expanded primate bone marrow mononuclear cells strongly reduces radiation-induced aplasia." *J Hematother Stem Cell Res* **11**(3): 549-64.
- Bhatia M., Wang J. C., Kapp U., Bonnet D. et Dick J. E. **1997**. "Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5320-5.
- Billiau A., Edy V. G., Heremans H., Van Damme J., Desmyter J., Georgiades J. A. et De Somer P. **1977**. "Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63." *Antimicrob Agents Chemother* **12**(1): 11-5.
- Blazar B. R., McKenna H. J., Panoskaltis-Mortari A. et Taylor P. A. **2001**. "Flt3 ligand (FL) treatment of murine donors does not modify graft-versus-host disease (GVHD) but FL treatment of recipients post-bone marrow transplantation accelerates GVHD lethality." *Biol Blood Marrow Transplant* **7**(4): 197-207.
- Boggs D. R. **1984**. "The total marrow mass of the mouse: a simplified method of measurement." *Am J Hematol* **16**(3): 277-86.
- Bosma G. C., Custer R. P. et Bosma M. J. **1983**. "A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse." *Nature* **301**(5900): 527-30.

- Bradley T. R. et Metcalf D. **1966**. "The growth of mouse bone marrow cells in vitro." *Aust J Exp Biol Med Sci* **44**(3): 287-99.
- Brasel K., Escobar S., Anderberg R., de Vries P., Gruss H. J. et Lyman S. D. **1995**. "Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells." *Leukemia* **9**(7): 1212-8.
- Brasel K., McKenna H. J., Morrissey P. J., Charrier K., Morris A. E., Lee C. C., Williams D. E. et Lyman S. D. **1996**. "Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice." *Blood* **88**(6): 2004-12.
- Brecher G., Beal S. L. et Schneiderman M. **1986**. "Renewal and release of hemopoietic stem cells: does clonal succession exist?" *Blood Cells* **12**(1): 103-27.
- Brooks A. L. **1999**. "Biomarkers of exposure, sensitivity and disease." *Int J Radiat Biol* **75**(12): 1481-503.
- Brown P., Levis M., Shurtleff S., Campana D., Downing J. et Small D. **2005**. "FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression." *Blood* **105**(2): 812-20.
- Brown P. et Small D. **2004**. "FLT3 inhibitors: a paradigm for the development of targeted therapeutics for paediatric cancer." *Eur J Cancer* **40**(5): 707-21, discussion 722-4.
- Burger H., Dorssers L. C., van Leen R. W. et Wagemaker G. **1990**. "Nucleotide sequence of the gene encoding rhesus monkey (*Macaca mulatta*) interleukin-3." *Nucleic Acids Res* **18**(22): 6718.
- Calvi L. M., Adams G. B., Weibrecht K. W., Weber J. M., Olson D. P., Knight M. C., Martin R. P., Schipani E., Divieti P., Bringham F. R., Milner L. A., Kronenberg H. M. et Scadden D. T. **2003**. "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." *Nature* **425**(6960): 841-6.
- Carow C. E., Levenstein M., Kaufmann S. H., Chen J., Amin S., Rockwell P., Witte L., Borowitz M. J., Civin C. I. et Small D. **1996**. "Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias." *Blood* **87**(3): 1089-96.
- Castro-Malaspina H., Gay R. E., Resnick G., Kapoor N., Meyers P., Chiarieri D., McKenzie S., Broxmeyer H. E. et Moore M. A. **1980**. "Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny." *Blood* **56**(2): 289-301.
- Chakravarty P. K., Alfieri A., Thomas E. K., Beri V., Tanaka K. E., Vikram B. et Guha C. **1999**. "Flt3-ligand administration after radiation therapy prolongs survival in a murine model of metastatic lung cancer." *Cancer Res* **59**(24): 6028-32.
- Chambrette V., Hardy S. et Nenot J. C. **2001**. "Les accidents d'irradiation. Mise en place d'une base de donnée ACCIRAD à l'IPSN." *Radioprotection* **36**: 477-510.
- Chang C. M., Limanni A., Baker W. H., Dobson M. E., Kalinich J. F. et Patchen M. L. **1997**. "Sublethal gamma irradiation increases IL-1alpha, IL-6, and TNF-alpha mRNA levels in murine hematopoietic tissues." *J Interferon Cytokine Res* **17**(9): 567-72.
- Charbord P. **1992**. "[Communication between stem cells and the hematopoietic microenvironment. Experimental data and models of interaction]." *Rev Fr Transfus Hemobiol* **35**(5): 335-62.
- Charbord P., Lerat H., Newton I., Tamayo E., Gown A. M., Singer J. W. et Herve P. **1990**. "The cytoskeleton of stromal cells from human bone marrow cultures resembles that of cultured smooth muscle cells." *Exp Hematol* **18**(4): 276-82.
- Charbord P., Tamayo E., Saeland S., Duvert V., Poulet J., Gown A. M. et Herve P. **1991**. "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in human long-term bone marrow cultures: endogenous production in the adherent layer and effect of exogenous GM-CSF on granulomonopoiesis." *Blood* **78**(5): 1230-6.

- Charbord P., Tavian M., Humeau L. et Peault B. **1996**. "Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment." *Blood* **87**(10): 4109-19.
- Chen C. Z., Li M., de Graaf D., Monti S., Gottgens B., Sanchez M. J., Lander E. S., Golub T. R., Green A. R. et Lodish H. F. **2002**. "Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15468-73.
- Chklovskaja E., Jansen W., Nissen C., Lyman S. D., Rahner C., Landmann L. et Wodnar-Filipowicz A. **1999**. "Mechanism of flt3 ligand expression in bone marrow failure: translocation from intracellular stores to the surface of T lymphocytes after chemotherapy-induced suppression of hematopoiesis." *Blood* **93**(8): 2595-604.
- Chklovskaja E., Nissen C., Landmann L., Rahner C., Pfister O. et Wodnar-Filipowicz A. **2001**. "Cell-surface trafficking and release of flt3 ligand from T lymphocytes is induced by common cytokine receptor gamma-chain signaling and inhibited by cyclosporin A." *Blood* **97**(4): 1027-34.
- Civin C. I., Strauss L. C., Brovall C., Fackler M. J., Schwartz J. F. et Shaper J. H. **1984**. "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells." *J Immunol* **133**(1): 157-65.
- Cole L. J., Haire H. M. et Alpen E. L. **1967**. "Effectiveness of small external epicondylar lead cuffs against lethal x-radiation in dogs. USNRDL-TR-1068." *Res Dev Tech Rep*: 1-18.
- Corre J., Planat-Benard V., Corberand J. X., Penicaud L., Casteilla L. et Laharrague P. **2004**. "Human bone marrow adipocytes support complete myeloid and lymphoid differentiation from human CD34 cells." *Br J Haematol* **127**(3): 344-7.
- Cosset J. M. **1998**. "[Chemoradiotherapy: history and state of the art]." *Cancer Radiother* **2**(6): 653-6.
- Cosset J. M. et Gourmelon P. **2002**. "[Accidents in radiotherapy: historical account]." *Cancer Radiother* **6 Suppl 1**: 166s-170s.
- Cosset J. M., Socie G., Dubray B., Girinsky T., Fourquet A. et Gluckman E. **1994**. "Single dose versus fractionated total body irradiation before bone marrow transplantation: radiobiological and clinical considerations." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **30**(2): 477-92.
- Coulombel L., Auffray I., Gaugler M. H. et Roseblatt M. **1997**. "Expression and function of integrins on hematopoietic progenitor cells." *Acta Haematol* **97**(1-2): 13-21.
- Cristy M. **1981**. "Active bone marrow distribution as a function of age in humans." *Phys Med Biol* **26**(3): 389-400.
- Dainiak N. **2002**. "Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation." *Exp Hematol* **30**(6): 513-28.
- Dennis J. E. et Charbord P. **2002**. "Origin and differentiation of human and murine stroma." *Stem Cells* **20**(3): 205-14.
- Dettke M., Jurko S., Ruger B. M., Leitner G., Greinix H. T., Kalhs P., Fischer M. B. et Hocker P. **2001**. "Increased serum flt3-ligand in healthy donors undergoing granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral stem cell mobilization." *J Hematother Stem Cell Res* **10**(2): 317-20.
- Dexter T. M., Allen T. D. et Lajtha L. G. **1977**. "Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro." *J Cell Physiol* **91**(3): 335-44.

- Dolphin G. W. **1969**. Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. Dans "Handling of radiation accidents". Vienne.
- Domen J. **2000**. "The role of apoptosis in regulating hematopoiesis and hematopoietic stem cells." *Immunol Res* **22**(2-3): 83-94.
- Donnadieu-Claraz M., Benderitter M., Joubert C. et Voisin P. **1999**. "Biochemical indicators of whole-body gamma-radiation effects in the pig." *Int J Radiat Biol* **75**(2): 165-74.
- Dormady S. P., Bashayan O., Dougherty R., Zhang X. M. et Basch R. S. **2001**. "Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment." *J Hematother Stem Cell Res* **10**(1): 125-40.
- Dosil M., Wang S. et Lemischka I. R. **1993**. "Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells." *Mol Cell Biol* **13**(10): 6572-85.
- Doyonnas R., Nielsen J. S., Chelliah S., Drew E., Hara T., Miyajima A. et McNagny K. M. **2005**. "Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells." *Blood*.
- Drexler H. G. **1996**. "Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells." *Leukemia* **10**(4): 588-99.
- Drouet M., Mathieu J., Grenier N., Multon E., Sotto J. J. et Herodin F. **1999**. "The reduction of in vitro radiation-induced Fas-related apoptosis in CD34+ progenitor cells by SCF, FLT-3 ligand, TPO, and IL-3 in combination resulted in CD34+ cell proliferation and differentiation." *Stem Cells* **17**(5): 273-85.
- Drouet M., Mourcin F., Grenier N., Leroux V., Denis J., Mayol J. F., Thullier P., Lataillade J. J. et Herodin F. **2004**. "Single administration of stem cell factor, FLT-3 ligand, megakaryocyte growth and development factor, and interleukin-3 in combination soon after irradiation prevents nonhuman primates from myelosuppression: long-term follow-up of hematopoiesis." *Blood* **103**(3): 878-85.
- Dubray B., Girinski T., Thames H. D., Becciolini A., Porciani S., Hennequin C., Socie G., Bonnay M. et Cosset J. M. **1992**. "Post-irradiation hyperamylasemia as a biological dosimeter." *Radiother Oncol* **24**(1): 21-6.
- Dutreix J., Girinski T., Cosset J. M., Bernard A., Pico J., Baume D., Bayle C. et Benk V. **1987**. "Blood cell kinetics and total body irradiation." *Radiother Oncol* **9**(2): 119-29.
- Edwan J. H., Perry G., Talmadge J. E. et Agrawal D. K. **2004**. "Flt-3 ligand reverses late allergic response and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic inflammation." *J Immunol* **172**(8): 5016-23.
- Edwan J. H., Talmadge J. E. et Agrawal D. K. **2005**. "Treatment with Flt3 ligand plasmid reverses allergic airway inflammation in ovalbumin-sensitized and -challenged mice." *Int Immunopharmacol* **5**(2): 345-57.
- Escribano S., Cuenllas E., Gaitan S. et Tejero C. **1998**. "Delayed neutrophil apoptosis after total body irradiation in mice. The role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neutrophil function." *Exp Hematol* **26**(10): 942-9.
- Farese A. M., Hunt P., Boone T. et MacVittie T. J. **1995**. "Recombinant human megakaryocyte growth and development factor stimulates thrombocytopoiesis in normal nonhuman primates." *Blood* **86**(1): 54-9.

- Fichelson S. **1998**. "The FLT3/FLK2 ligand: structure, functions and prospects." *Eur Cytokine Netw* **9**(1): 7-22.
- Fina L., Molgaard H. V., Robertson D., Bradley N. J., Monaghan P., Delia D., Sutherland D. R., Baker M. A. et Greaves M. F. **1990**. "Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells." *Blood* **75**(12): 2417-26.
- Fliedner T. M., Graessle D., Paulsen C. et Reimers K. **2002**. "Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure." *Cancer Biother Radiopharm* **17**(4): 405-26.
- Fliedner T. M., Maiwald M., Weinsheimer W. et Szepesi T. **1990**. "Prediction of clinical outcome of radiation accident victims." *Prog Clin Biol Res* **352**: 459-70.
- Fliedner T. M., Nothdurft W. et Steinbach K. H. **1988**. "Blood cell changes after radiation exposure as an indicator for hemopoietic stem cell function." *Bone Marrow Transplant* **3**(2): 77-84.
- Fliedner T. M., Tibken B., Hofer E. P. et Paul W. **1996**. "Stem cell responses after radiation exposure: A key to the evaluation and prediction of its effects." *Health Phys* **70**(6): 787-97.
- Fong C. L. et Hui K. M. **2002**. "Generation of potent and specific cellular immune responses via in vivo stimulation of dendritic cells by pNGVL3-hFLex plasmid DNA and immunogenic peptides." *Gene Ther* **9**(17): 1127-38.
- Fortunel N., Hatzfeld J., Aoustin L., Batard P., Ducos K., Monier M. N., Charpentier A. et Hatzfeld A. **2000**. "Specific dose-response effects of TGF-beta1 on developmentally distinct hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood." *Hematol J* **1**(2): 126-35.
- Franco A. J., Sharplin J., Ward W. F. et Hinz J. M. **1991**. "The genetic basis of strain-dependent differences in the early phase of radiation injury in mouse lung." *Radiat Res* **126**(3): 349-56.
- Fratantoni J. C. **1998**. Blood substitutes: unique regulatory aspects. Dans Red blood cell substitutes. New York, M.Dekker.
- Fry T. J., Connick E., Falloon J., Lederman M. M., Liewehr D. J., Spritzler J., Steinberg S. M., Wood L. V., Yarchoan R., Zuckerman J., Landay A. et Mackall C. L. **2001**. "A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis." *Blood* **97**(10): 2983-90.
- Fry T. J. et Mackall C. L. **2001**. "Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis?" *Trends Immunol* **22**(10): 564-71.
- Galmiche M. C., Koteliansky V. E., Briere J., Herve P. et Charbord P. **1993**. "Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway." *Blood* **82**(1): 66-76.
- Gaugler M. H., Squiban C., Claraz M., Schweitzer K., Weksler B., Gourmelon P. et Van der Meeren A. **1998**. "Characterization of the response of human bone marrow endothelial cells to in vitro irradiation." *Br J Haematol* **103**(4): 980-9.
- Gaugler M. H., Squiban C., Mouthon M. A., Gourmelon P. et van der Meeren A. **2001**. "Irradiation enhances the support of haemopoietic cell transmigration, proliferation and differentiation by endothelial cells." *Br J Haematol* **113**(4): 940-50.
- Gazitt Y. et Liu Q. **2000**. "High steady-state plasma levels of flt3-ligand in the peripheral blood is a good predictor for poor mobilization of CD34+ PBSC in patients undergoing high-dose chemotherapy and stem cell rescue." *J Hematother Stem Cell Res* **9**(2): 285-93.
- Gilliland D. G. et Griffin J. D. **2002**. "Role of FLT3 in leukemia." *Curr Opin Hematol* **9**(4): 274-81.

- Girard M., Giraud S., Courtioux B., Jauberteau-Marchan M. O. et Bouteille B. **2005**. "Endothelial cell activation in the presence of African trypanosomes." *Mol Biochem Parasitol* **139**(1): 41-9.
- Glimm H., Eisterer W., Lee K., Cashman J., Holyoake T. L., Nicolini F., Shultz L. D., von Kalle C. et Eaves C. J. **2001**. "Previously undetected human hematopoietic cell populations with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID-beta2 microglobulin-null mice." *J Clin Invest* **107**(2): 199-206.
- Goldman J. **1995**. "Peripheral blood stem cells for allografting." *Blood* **85**(6): 1413-5.
- Gong J. K. **1978**. "Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells." *Science* **199**(4336): 1443-5.
- Goodell M. A., Brose K., Paradis G., Conner A. S. et Mulligan R. C. **1996**. "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." *J Exp Med* **183**(4): 1797-806.
- Goodell M. A., Rosenzweig M., Kim H., Marks D. F., DeMaria M., Paradis G., Grupp S. A., Sieff C. A., Mulligan R. C. et Johnson R. P. **1997**. "Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species." *Nat Med* **3**(12): 1337-45.
- Gothot A., Pyatt R., McMahel J., Rice S. et Srour E. F. **1997**. "Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0 /G1 phase of the cell cycle." *Blood* **90**(11): 4384-93.
- Grande T. et Bueren J. A. **1994**. "Involvement of the bone marrow stroma in the residual hematopoietic damage induced by irradiation of adult and young mice." *Exp Hematol* **22**(13): 1283-7.
- Grande T. et Bueren J. A. **2004**. "A new approach to evaluate the total reserve of hematopoietic progenitors after acute irradiation." *Radiat Res* **162**(4): 397-404.
- Gratwohl A., John L., Baldomero H., Roth J., Tichelli A., Nissen C., Lyman S. D. et Wodnar-Filipowicz A. **1998**. "FLT-3 ligand provides hematopoietic protection from total body irradiation in rabbits." *Blood* **92**(3): 765-9.
- Grayson J. M., Harrington L. E., Lanier J. G., Wherry E. J. et Ahmed R. **2002**. "Differential sensitivity of naive and memory CD8+ T cells to apoptosis in vivo." *J Immunol* **169**(7): 3760-70.
- Greenstock C. L. et Trivedi A. **1994**. "Biological and biophysical techniques to assess radiation exposure: a perspective." *Prog Biophys Mol Biol* **61**(2): 81-130.
- Guskova A. K., Baranov A. E. et Gusev I. A. **2001**. Acute radiation sickness: underlying principles and assessment. Dans "Medical management of radiation accident", 2ème Edition.
- Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C. D., Buzney E. A., Khan M. K., Flint A. F., Kunkel L. M. et Mulligan R. C. **1999**. "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation." *Nature* **401**(6751): 390-4.
- Hackney J. A., Charbord P., Brunk B. P., Stoeckert C. J., Lemischka I. R. et Moore K. A. **2002**. "A molecular profile of a hematopoietic stem cell niche." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 13061-6.
- Haidar J. H., Bazarbachi A., Mahfouz R., Haidar H. A., Jaafar H. et Daher R. **2002**. "Serum Flt3 ligand variation as a predictive indicator of hematopoietic stem cell mobilization." *J Hematother Stem Cell Res* **11**(3): 533-8.

- Hangoc G., Daub R., Maze R. G., Falkenburg J. H., Broxmeyer H. E. et Harrington M. A. **1993**. "Regulation of myelopoiesis by murine fibroblastic and adipogenic cell lines." *Exp Hematol* **21**(4): 502-7.
- Hannum C., Culpepper J., Campbell D., McClanahan T., Zurawski S., Bazan J. F., Kastelein R., Hudak S., Wagner J., Mattson J. et al. **1994**. "Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs." *Nature* **368**(6472): 643-8.
- Hartong S. C., Neelis K. J. et Wagemaker G. **2003**. "Co-administration of Flt-3 ligand counteracts the actions of thrombopoietin in myelosuppressed rhesus monkeys." *Br J Haematol* **121**(2): 359-67.
- Heike T. et Nakahata T. **2002**. "Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines." *Biochim Biophys Acta* **1592**(3): 313-21.
- Hellman S., Botnick L. E., Hannon E. C. et Vigneulle R. M. **1978**. "Proliferative capacity of murine hematopoietic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(1): 490-4.
- Hendry J. H. et Feng-Tong Y. **1995**. Response of bone marrow to low LET irradiation. Dans "Radiation Toxicology, Bone marrow and Leukemia". London, Taylor & Francis.
- Herodin F., Bourin P., Mayol J. F., Lataillade J. J. et Drouet M. **2003**. "Short-term injection of antiapoptotic cytokine combinations soon after lethal gamma -irradiation promotes survival." *Blood* **101**(7): 2609-16.
- Herodin F., Mestries J. C., Janodet D., Martin S., Mathieu J., Gascon M. P., Pernin M. O. et Ythier A. **1992**. "Recombinant glycosylated human interleukin-6 accelerates peripheral blood platelet count recovery in radiation-induced bone marrow depression in baboons." *Blood* **80**(3): 688-95.
- Hirschi K. et Goodell M. **2001**. "Common origins of blood and blood vessels in adults?" *Differentiation* **68**(4-5): 186-92.
- Ho A. D. **2005**. "Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells." *Exp Hematol* **33**(1): 1-8.
- Hott M. et Marie P. J. **1987**. "Glycol methacrylate as an embedding medium for bone." *Stain Technol* **62**(1): 51-7.
- Huang S., Law P., Francis K., Palsson B. O. et Ho A. D. **1999**. "Symmetry of initial cell divisions among primitive hematopoietic progenitors is independent of ontogenic age and regulatory molecules." *Blood* **94**(8): 2595-604.
- Huchet A., Belkacemi Y., Frick J., Prat M., Muresan-Kloos I., Altan D., Chapel A., Gorin N. C., Gourmelon P. et Bertho J. M. **2003**. "Plasma Flt-3 ligand concentration correlated with radiation-induced bone marrow damage during local fractionated radiotherapy." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **57**(2): 508-15.
- Hudak S., Leach M. W., Xu Y., Menon S. et Rennick D. **1998**. "Radioprotective effects of flk2/flt3 ligand." *Exp Hematol* **26**(6): 515-22.
- Humphries R. K., Eaves A. C. et Eaves C. J. **1981**. "Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(6): 3629-33.
- Hunte B. E., Hudak S., Campbell D., Xu Y. et Rennick D. **1996**. "flk2/flt3 ligand is a potent cofactor for the growth of primitive B cell progenitors." *J Immunol* **156**(2): 489-96.

- Hussain M. M., Mahley R. W., Boyles J. K., Lindquist P. A., Brecht W. J. et Innerarity T. L. **1989**. "Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animal species." *J Biol Chem* **264**(30): 17931-8.
- Inoue T., Hirabayashi Y., Mitsui H., Sasaki H., Cronkite E. P., Bullis J. E., Jr., Bond V. P. et Yoshida K. **1995**. "Survival of spleen colony-forming units (CFU-S) of irradiated bone marrow cells in mice: evidence for the existence of a radioresistant subfraction." *Exp Hematol* **23**(12): 1296-300.
- Issaad C., Croisille L., Katz A., Vainchenker W. et Coulombel L. **1993**. "A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34⁺⁺/CD38⁻ progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays." *Blood* **81**(11): 2916-24.
- Itoh K., Tezuka H., Sakoda H., Konno M., Nagata K., Uchiyama T., Uchino H. et Mori K. J. **1989**. "Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow." *Exp Hematol* **17**(2): 145-53.
- Iwakawa M., Noda S., Ohta T., Ohira C., Lee R., Goto M., Wakabayashi M., Matsui Y., Harada Y. et Imai T. **2003**. "Different radiation susceptibility among five strains of mice detected by a skin reaction." *J Radiat Res (Tokyo)* **44**(1): 7-13.
- Jackson K. A., Majka S. M., Wang H., Pocius J., Hartley C. J., Majesky M. W., Entman M. L., Michael L. H., Hirschi K. K. et Goodell M. A. **2001**. "Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells." *J Clin Invest* **107**(11): 1395-402.
- Jacobsen S. E., Veiby O. P., Myklebust J., Okkenhaug C. et Lyman S. D. **1996**. "Ability of flt3 ligand to stimulate the in vitro growth of primitive murine hematopoietic progenitors is potently and directly inhibited by transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha." *Blood* **87**(12): 5016-26.
- Jazwiec B., Solanilla A., Grosset C., Mahon F. X., Dupouy M., Pigeonnier-Lagarde V., Belloc F., Schweitzer K., Reiffers J. et Ripoche J. **1998**. "Endothelial cell support of hematopoiesis is differentially altered by IL-1 and glucocorticoids." *Leukemia* **12**(8): 1210-20.
- Jouet J. P., Gorin N. C. et Gourmelon P. **2003**. Gestion médicale des victimes d'irradiation lors d'un accident nucléaire ou d'un acte de malveillance de grande ampleur. Paris, Expansion Scientifique Française.
- Junglee D., Katrak A., Mohiuddin J., Blacklock H., Prentice H. G. et Dandona P. **1986**. "Salivary amylase and pancreatic enzymes in serum after total body irradiation." *Clin Chem* **32**(4): 609-10.
- Kataoka S., Satoh J., Fujiya H., Toyota T., Suzuki R., Itoh K. et Kumagai K. **1983**. "Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity." *Diabetes* **32**(3): 247-53.
- Kaushansky K., Broudy V. C., Lin N., Jorgensen M. J., McCarty J., Fox N., Zucker-Franklin D. et Lofton-Day C. **1995**. "Thrombopoietin, the Mpl ligand, is essential for full megakaryocyte development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3234-8.
- Kimura S., Roberts A. W., Metcalf D. et Alexander W. S. **1998**. "Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(3): 1195-200.
- Kirito K., Fox N., Komatsu N. et Kaushansky K. **2005**. "Thrombopoietin enhances expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through HIF-1 α ." *Blood*.

- Kittler E. L., McGrath H., Temeles D., Crittenden R. B., Kister V. K. et Quesenberry P. J. **1992**. "Biologic significance of constitutive and subliminal growth factor production by bone marrow stroma." *Blood* **79**(12): 3168-78.
- Kondo M., Weissman I. L. et Akashi K. **1997**. "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." *Cell* **91**(5): 661-72.
- Kottaridis P. D., Gale R. E. et Linch D. C. **2003**. "Flt3 mutations and leukaemia." *Br J Haematol* **122**(4): 523-38.
- Laharrague P., Cousin B., Corberand J. X., Penicaud L. et Casteilla L. **1999**. "L'adipocyte médullaire: une cellule pleine d'avenir." *Médecine/Sciences* **15**: 504-509.
- Laharrague P., Larrouy D., Fontanilles A. M., Truel N., Campfield A., Tenenbaum R., Galitzky J., Corberand J. X., Penicaud L. et Casteilla L. **1998**. "High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture." *Faseb J* **12**(9): 747-52.
- Lansdorp P. M., Sutherland H. J. et Eaves C. J. **1990**. "Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow." *J Exp Med* **172**(1): 363-6.
- Lapidot T. et Petit I. **2002**. "Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells." *Exp Hematol* **30**(9): 973-81.
- Lataillade J. J., Clay D., Bourin P., Herodin F., Dupuy C., Jasmin C. et Bousse-Kerdiles M. C. **2002**. "Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism." *Blood* **99**(4): 1117-29.
- Laver J. **1989**. "Radiobiological properties of human hematopoietic and stromal marrow cells." *Int J Cell Cloning* **7**(4): 203-12.
- Laver J., Ebell W. et Castro-Malaspina H. **1986**. "Radiobiological properties of the human hematopoietic microenvironment: contrasting sensitivities of proliferative capacity and hematopoietic function to in vitro irradiation." *Blood* **67**(4): 1090-7.
- Lenz D. C., Kurz S. K., Lemmens E., Schoenberger S. P., Sprent J., Oldstone M. B. et Homann D. **2004**. "IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(25): 9357-62.
- Levis M., Allebach J., Tse K. F., Zheng R., Baldwin B. R., Smith B. D., Jones-Bolin S., Ruggeri B., Dionne C. et Small D. **2002**. "A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo." *Blood* **99**(11): 3885-91.
- Lisovsky M., Braun S. E., Ge Y., Takahira H., Lu L., Savchenko V. G., Lyman S. D. et Broxmeyer H. E. **1996a**. "Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells." *Leukemia* **10**(6): 1012-8.
- Lisovsky M., Estrov Z., Zhang X., Consoli U., Sanchez-Williams G., Snell V., Munker R., Goodacre A., Savchenko V. et Andreeff M. **1996b**. "Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax." *Blood* **88**(10): 3987-97.
- Loeffler M. et Roeder I. **2004**. "Conceptual models to understand tissue stem cell organization." *Curr Opin Hematol* **11**(2): 81-7.
- Lok S. et Foster D. C. **1994**. "The structure, biology and potential therapeutic applications of recombinant thrombopoietin." *Stem Cells* **12**(6): 586-98.

- Lord B. I. **1990**. "The architecture of bone marrow cell populations." *Int J Cell Cloning* **8**(5): 317-31.
- Lutgens L. C., Deutz N., Granzier-Peeters M., Beets-Tan R., De Ruyscher D., Gueulette J., Cleutjens J., Berger M., Wouters B., von Meyenfeldt M. et Lambin P. **2004**. "Plasma citrulline concentration: a surrogate end point for radiation-induced mucosal atrophy of the small bowel. A feasibility study in 23 patients." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **60**(1): 275-85.
- Lutgens L. C., Deutz N. E., Gueulette J., Cleutjens J. P., Berger M. P., Wouters B. G., von Meyenfeldt M. F. et Lambin P. **2003**. "Citrulline: a physiologic marker enabling quantitation and monitoring of epithelial radiation-induced small bowel damage." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **57**(4): 1067-74.
- Lyman S. D. et Jacobsen S. E. **1998**. "c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities." *Blood* **91**(4): 1101-34.
- Lyman S. D., James L., Escobar S., Downey H., de Vries P., Brasel K., Stocking K., Beckmann M. P., Copeland N. G., Cleveland L. S. et et al. **1995a**. "Identification of soluble and membrane-bound isoforms of the murine flt3 ligand generated by alternative splicing of mRNAs." *Oncogene* **10**(1): 149-57.
- Lyman S. D., James L., Johnson L., Brasel K., de Vries P., Escobar S. S., Downey H., Splett R. R., Beckmann M. P. et McKenna H. J. **1994**. "Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells." *Blood* **83**(10): 2795-801.
- Lyman S. D., James L., Vanden Bos T., de Vries P., Brasel K., Gliniak B., Hollingsworth L. T., Picha K. S., McKenna H. J., Splett R. R. et et al. **1993a**. "Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells." *Cell* **75**(6): 1157-67.
- Lyman S. D., James L., Zappone J., Sleath P. R., Beckmann M. P. et Bird T. **1993b**. "Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptor-like tyrosine kinase gene." *Oncogene* **8**(4): 815-22.
- Lyman S. D., Seaberg M., Hanna R., Zappone J., Brasel K., Abkowitz J. L., Prchal J. T., Schultz J. C. et Shahidi N. T. **1995b**. "Plasma/serum levels of flt3 ligand are low in normal individuals and highly elevated in patients with Fanconi anemia and acquired aplastic anemia." *Blood* **86**(11): 4091-6.
- Lyman S. D., Stocking K., Davison B., Fletcher F., Johnson L. et Escobar S. **1995c**. "Structural analysis of human and murine flt3 ligand genomic loci." *Oncogene* **11**(6): 1165-72.
- Mahmud N., Pang W., Cobbs C., Alur P., Borneman J., Dodds R., Archambault M., Devine S., Turian J., Bartholomew A., Vanguri P., Mackay A., Young R. et Hoffman R. **2004**. "Studies of the route of administration and role of conditioning with radiation on unrelated allogeneic mismatched mesenchymal stem cell engraftment in a nonhuman primate model." *Exp Hematol* **32**(5): 494-501.
- Majka M., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J., Ehrenman K., Pietrkowski Z., Kowalska M. A., Gewirtz A. M., Emerson S. G. et Ratajczak M. Z. **2001**. "Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner." *Blood* **97**(10): 3075-85.
- Maraskovsky E., Brasel K., Teepe M., Roux E. R., Lyman S. D., Shortman K. et McKenna H. J. **1996**. "Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified." *J Exp Med* **184**(5): 1953-62.

- Maraskovsky E., Daro E., Roux E., Teepe M., Maliszewski C. R., Hoek J., Caron D., Lebsack M. E. et McKenna H. J. **2000**. "In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand." *Blood* **96**(3): 878-84.
- Marie P. **2001**. "Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste." *Médecine/Sciences* **17**: 1252-1259.
- Masek L. C. et Sweetenham J. W. **1994**. "Isolation and culture of endothelial cells from human bone marrow." *Br J Haematol* **88**(4): 855-65.
- Matthews W., Jordan C. T., Wiegand G. W., Pardoll D. et Lemischka I. R. **1991**. "A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations." *Cell* **65**(7): 1143-52.
- Mayani H., Dragowska W. et Lansdorp P. M. **1993**. "Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines." *Blood* **82**(9): 2664-72.
- Mayani H. et Lansdorp P. M. **1994**. "Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood." *Blood* **83**(9): 2410-7.
- McClanahan T., Culpepper J., Campbell D., Wagner J., Franz-Bacon K., Mattson J., Tsai S., Luh J., Guimaraes M. J., Mattei M. G., Rosnet O., Birnbaum D. et Hannum C. H. **1996**. "Biochemical and genetic characterization of multiple splice variants of the Flt3 ligand." *Blood* **88**(9): 3371-82.
- McKenna H. J., de Vries P., Brasel K., Lyman S. D. et Williams D. E. **1995**. "Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hematopoietic progenitor cells." *Blood* **86**(9): 3413-20.
- McKenna H. J., Stocking K. L., Miller R. E., Brasel K., De Smedt T., Maraskovsky E., Maliszewski C. R., Lynch D. H., Smith J., Pulendran B., Roux E. R., Teepe M., Lyman S. D. et Peschon J. J. **2000**. "Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells." *Blood* **95**(11): 3489-97.
- Meierhoff G., Dehmel U., Gruss H. J., Rosnet O., Birnbaum D., Quentmeier H., Dirks W. et Drexler H. G. **1995**. "Expression of FLT3 receptor and FLT3-ligand in human leukemia-lymphoma cell lines." *Leukemia* **9**(8): 1368-72.
- Metcalf D. et Moore M. A. S. **1971**. Hematopoietic cells. Amsterdam, London, North-Holland publishing compagny.
- Mikhail A. A., Beck E. X., Shafer A., Barut B., Gbur J. S., Zupancic T. J., Schweitzer A. C., Cioffi J. A., Lacaud G., Ouyang B., Keller G. et Snodgrass H. R. **1997**. "Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development." *Blood* **89**(5): 1507-12.
- Montecino-Rodriguez E. et Dorshkind K. **2001**. "Regulation of hematopoiesis by gap junction-mediated intercellular communication." *J Leukoc Biol* **70**(3): 341-7.
- Moore K. A. **2004**. "Recent advances in defining the hematopoietic stem cell niche." *Curr Opin Hematol* **11**(2): 107-11.
- Moore M. A. **1991**. "Review: Stratton Lecture 1990. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators." *Blood* **78**(1): 1-19.
- Moreau I., Duvert V., Caux C., Galmiche M. C., Charbord P., Banchereau J. et Saeland S. **1993**. "Myofibroblastic stromal cells isolated from human bone marrow induce the proliferation of both early myeloid and B-lymphoid cells." *Blood* **82**(8): 2396-405.

- Morrison S. J., Wandycz A. M., Hemmati H. D., Wright D. E. et Weissman I. L. **1997**. "Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors." *Development* **124**(10): 1929-39.
- Murray L., Chen B., Galy A., Chen S., Tushinski R., Uchida N., Negrin R., Tricot G., Jagannath S., Vesole D. et et al. **1995**. "Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood." *Blood* **85**(2): 368-78.
- Nakao M., Yokota S., Iwai T., Kaneko H., Horiike S., Kashima K., Sonoda Y., Fujimoto T. et Misawa S. **1996**. "Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia." *Leukemia* **10**(12): 1911-8.
- Nenot J. C. **1990**. "Overview of the radiological accidents in the world, updated December 1989." *Int J Radiat Biol* **57**(6): 1073-85.
- Nicola N. A., Metcalf D., Matsumoto M. et Johnson G. R. **1983**. "Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor." *J Biol Chem* **258**(14): 9017-23.
- Norol F., Drouet M., Pflumio F., Leonardi M., Mourcin F., Debili N., Job A., Vainchenker W., Kuentz M. et Herodin F. **2002**. "Ex vivo expansion marginally amplifies repopulating cells from baboon peripheral blood mobilized CD34+ cells." *Br J Haematol* **117**(4): 924-34.
- Olmsted-Davis E. A., Gugala Z., Camargo F., Gannon F. H., Jackson K., Kienstra K. A., Shine H. D., Lindsey R. W., Hirschi K. K., Goodell M. A., Brenner M. K. et Davis A. R. **2003**. "Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15877-82.
- Papayannopoulou T. et Craddock C. **1997**. "Homing and trafficking of hemopoietic progenitor cells." *Acta Haematol* **97**(1-2): 97-104.
- Papayannopoulou T., Nakamoto B., Andrews R. G., Lyman S. D. et Lee M. Y. **1997**. "In vivo effects of Flt3/Flk2 ligand on mobilization of hematopoietic progenitors in primates and potent synergistic enhancement with granulocyte colony-stimulating factor." *Blood* **90**(2): 620-9.
- Peters M., Solem F., Goldschmidt J., Schirmacher P. et Rose-John S. **2001**. "Interleukin-6 and the soluble interleukin-6 receptor induce stem cell factor and Flt-3L expression in vivo and in vitro." *Exp Hematol* **29**(2): 146-55.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S. et Marshak D. R. **1999**. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143-7.
- Ploemacher R. E., van Soest P. L. et Boudewijn A. **1993**. "Autocrine transforming growth factor beta 1 blocks colony formation and progenitor cell generation by hemopoietic stem cells stimulated with steel factor." *Stem Cells* **11**(4): 336-47.
- Poulton L. D., Smyth M. J., Hawke C. G., Silveira P., Shepherd D., Naidenko O. V., Godfrey D. I. et Baxter A. G. **2001**. "Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice." *Int Immunol* **13**(7): 887-96.
- Prat M., Demarquay C., Frick J., Thierry D., Gorin N. C. et Bertho J. M. **2005**. "Radiation-induced increase in plasma Flt3 ligand concentration in mice: evidence for the implication of several cell types." *Radiat Res* **163**(4): 408-17.
- Prochazka M., Gaskins H. R., Shultz L. D. et Leiter E. H. **1992**. "The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8): 3290-4.

- Rafii S., Shapiro F., Pettengell R., Ferris B., Nachman R. L., Moore M. A. et Asch A. S. **1995**. "Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors." *Blood* **86**(9): 3353-63.
- Rafii S., Shapiro F., Rimarachin J., Nachman R. L., Ferris B., Weksler B., Moore M. A. et Asch A. S. **1994**. "Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion." *Blood* **84**(1): 10-9.
- Ramos C. A., Venezia T. A., Camargo F. A. et Goodell M. A. **2003**. "Techniques for the study of adult stem cells: be fruitful and multiply." *Biotechniques* **34**(3): 572-8, 580-4, 586-91.
- Rappold I., Ziegler B. L., Kohler I., Marchetto S., Rosnet O., Birnbaum D., Simmons P. J., Zannettino A. C., Hill B., Neu S., Knapp W., Alitalo R., Alitalo K., Ullrich A., Kanz L. et Buhring H. J. **1997**. "Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase." *Blood* **90**(1): 111-25.
- Ray R. J., Paige C. J., Furlonger C., Lyman S. D. et Rottapel R. **1996**. "Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7." *Eur J Immunol* **26**(7): 1504-10.
- Reya T., Duncan A. W., Ailles L., Domen J., Scherer D. C., Willert K., Hintz L., Nusse R. et Weissman I. L. **2003**. "A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells." *Nature* **423**(6938): 409-14.
- Roecklein B. A. et Torok-Storb B. **1995**. "Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes." *Blood* **85**(4): 997-1005.
- Ropenga A., Chapel A., Vandamme M. et Griffiths N. M. **2004**. "Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat." *Radiat Res* **161**(5): 597-602.
- Rosendaal M., Green C. R., Rahman A. et Morgan D. **1994**. "Up-regulation of the connexin43+ gap junction network in haemopoietic tissue before the growth of stem cells." *J Cell Sci* **107** (Pt 1): 29-37.
- Rosnet O., Buhring H. J., deLapeyriere O., Beslu N., Lavagna C., Marchetto S., Rappold I., Drexler H. G., Birg F., Rottapel R., Hannum C., Dubreuil P. et Birnbaum D. **1996**. "Expression and signal transduction of the FLT3 tyrosine kinase receptor." *Acta Haematol* **95**(3-4): 218-23.
- Rosnet O., Marchetto S., deLapeyriere O. et Birnbaum D. **1991a**. "Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family." *Oncogene* **6**(9): 1641-50.
- Rosnet O., Mattei M. G., Marchetto S. et Birnbaum D. **1991b**. "Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene." *Genomics* **9**(2): 380-5.
- Rosnet O., Schiff C., Pebusque M. J., Marchetto S., Tonnelle C., Toiron Y., Birg F. et Birnbaum D. **1993**. "Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells." *Blood* **82**(4): 1110-9.
- Rossner M. T., McArthur G. A., Allen J. D. et Metcalf D. **1994**. "Fms-like tyrosine kinase 3 catalytic domain can transduce a proliferative signal in FDC-P1 cells that is qualitatively similar to the signal delivered by c-Fms." *Cell Growth Differ* **5**(5): 549-55.
- Rougier F., Dupuis F. et Denizot Y. **1996**. "Human bone marrow fibroblasts--an overview of their characterization, proliferation and inflammatory mediator production." *Hematol Cell Ther* **38**(3): 241-6.
- Rusten L. S., Lyman S. D., Veiby O. P. et Jacobsen S. E. **1996**. "The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro." *Blood* **87**(4): 1317-25.

- Sang H., Pisarev V. M., Munger C., Robinson S., Chavez J., Hatcher L., Parajuli P., Guo Y. et Talmadge J. E. **2003**. "Regional, but not systemic recruitment/expansion of dendritic cells by a pluronic-formulated Flt3-ligand plasmid with vaccine adjuvant activity." *Vaccine* **21**(21-22): 3019-29.
- Sasaki M. S. et Miyata H. **1968**. "Biological dosimetry in atomic bomb survivors." *Nature* **220**(173): 1189-93.
- Sasaki Y., Ando K., Komura K., Niwa O., Sasaki M. S. et Suzuki N. **2001**. The Tokai-Mura criticality accident: biomedical and environmental effects. Chiba, Japan.
- Schmid I., Uittenbogaart C. H., Keld B. et Giorgi J. V. **1994**. "A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry." *J Immunol Methods* **170**(2): 145-57.
- Schofield R. **1978**. "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." *Blood Cells* **4**(1-2): 7-25.
- Schuler W., Weiler I. J., Schuler A., Phillips R. A., Rosenberg N., Mak T. W., Kearney J. F., Perry R. P. et Bosma M. J. **1986**. "Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency." *Cell* **46**(7): 963-72.
- Schweitzer K. M., Vicart P., Delouis C., Paulin D., Drager A. M., Langenhuijsen M. M. et Weksler B. **1997**. "Characterization of a newly established human bone marrow endothelial cell line: distinct adhesive properties for hematopoietic progenitors compared with human umbilical vein endothelial cells." *Lab Invest* **76**(1): 25-36.
- Shah A. J., Smogorzewska E. M., Hannum C. et Crooks G. M. **1996**. "Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38- cells and maintains progenitor cells in vitro." *Blood* **87**(9): 3563-70.
- Siena S., Di Nicola M., Bregni M., Mortarini R., Anichini A., Lombardi L., Ravagnani F., Parmiani G. et Gianni A. M. **1995**. "Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy." *Exp Hematol* **23**(14): 1463-71.
- Silini G. et Gouskova A. **1991**. "Biological dosimetry at Chernobyl." *Prog Clin Biol Res* **372**: 129-44.
- Simmons P. J., Levesque J. P. et Zannettino A. C. **1997**. "Adhesion molecules in haemopoiesis." *Baillieres Clin Haematol* **10**(3): 485-505.
- Simmons P. J., Masinovsky B., Longenecker B. M., Berenson R., Torok-Storb B. et Gallatin W. M. **1992**. "Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells." *Blood* **80**(2): 388-95.
- Simmons P. J. et Torok-Storb B. **1991**. "CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow." *Blood* **78**(11): 2848-53.
- Simmons P. J., Zannettino A., Gronthos S. et Leavesley D. **1994**. "Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma." *Leuk Lymphoma* **12**(5-6): 353-63.
- Solanilla A., Dechanet J., El Andaloussi A., Dupouy M., Godard F., Chabrol J., Charbord P., Reiffers J., Nurden A. T., Weksler B., Moreau J. F. et Ripoche J. **2000a**. "CD40-ligand stimulates myelopoiesis by regulating flt3-ligand and thrombopoietin production in bone marrow stromal cells." *Blood* **95**(12): 3758-64.
- Solanilla A., Grosset C., Duchez P., Legembre P., Pitard V., Dupouy M., Belloc F., Viallard J. F., Reiffers J., Boiron J. M., Coulombel L. et Ripoche J. **2003**. "Flt3-ligand induces adhesion of

- haematopoietic progenitor cells via a very late antigen (VLA)-4- and VLA-5-dependent mechanism." *Br J Haematol* **120**(5): 782-6.
- Solanilla A., Grosset C., Lemerrier C., Dupouy M., Mahon F. X., Schweitzer K., Reiffers J., Weksler B. et Ripoche J. **2000b**. "Expression of Flt3-ligand by the endothelial cell." *Leukemia* **14**(1): 153-62.
- Spangrude G. J., Heimfeld S. et Weissman I. L. **1988**. "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." *Science* **241**(4861): 58-62.
- Srouf E. F., Brandt J. E., Briddell R. A., Leemhuis T., van Besien K. et Hoffman R. **1991**. "Human CD34+ HLA-DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis." *Blood Cells* **17**(2): 287-95.
- Stein M. I., Zhu J. et Emerson S. G. **2004**. "Molecular pathways regulating the self-renewal of hematopoietic stem cells." *Exp Hematol* **32**(12): 1129-36.
- Stirewalt D. L. et Radich J. P. **2003**. "The role of FLT3 in haematopoietic malignancies." *Nat Rev Cancer* **3**(9): 650-65.
- Suzuki J., Fujita J., Taniguchi S., Sugimoto K. et Mori K. J. **1992**. "Characterization of murine hemopoietic-supportive (MS-1 and MS-5) and non-supportive (MS-K) cell lines." *Leukemia* **6**(5): 452-8.
- Taichman R. S. **2005**. "Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche." *Blood* **105**(7): 2631-9.
- Taichman R. S. et Emerson S. G. **1994**. "Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor." *J Exp Med* **179**(5): 1677-82.
- Taichman R. S., Reilly M. J. et Emerson S. G. **1996**. "Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures." *Blood* **87**(2): 518-24.
- Tamayo E., Charbord P., Li J. et Herve P. **1994**. "A quantitative assay that evaluates the capacity of human stromal cells to support granulomonopoiesis in situ." *Stem Cells* **12**(3): 304-15.
- Tavassoli M. **1982**. "Radiosensitivity of stromal cells responsible for in vitro maintenance of hemopoietic stem cells in continuous, long-term marrow culture." *Exp Hematol* **10**(5): 435-43.
- Tavassoli M. **1989**. Fatty involution of bone marrow and the role of adipose tissue in hematopoiesis. Clifton, Humana press.
- Teixido J., Hemler M. E., Greenberger J. S. et Anklesaria P. **1992**. "Role of beta 1 and beta 2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma." *J Clin Invest* **90**(2): 358-67.
- Terstappen L. W., Gandour D., Huang S., Lund-Johansen F., Manion K., Nguyen M., Mickaels R., Olweus J. et Topker S. **1993**. "Assessment of hematopoietic cell differentiation by multidimensional flow cytometry." *J Hematother* **2**(3): 431-47.
- Terstappen L. W., Huang S., Safford M., Lansdorp P. M. et Loken M. R. **1991**. "Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells." *Blood* **77**(6): 1218-27.
- Thierry D., Jullien D., Rigaud O., Hardy M., Vilcoq J. R. et Magdelenat H. **1985**. "Human blood granulocyte macrophage progenitors (GM-CFU) during extended field radiation therapy." *Acta Radiol Oncol* **24**(6): 521-6.

- Thomas E. D., Storb R. et Buckner C. D. **1976**. "Total-body irradiation in preparation for marrow engraftment." *Transplant Proc* **8**(4): 591-3.
- Till J. E. et McCulloch E. A. **1961**. "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." *Radiat Res* **14**: 213-22.
- Todd G. D., Haug J. S., Bremer R., Link D., Goodnough L., Adkin D., Brown R. et DiPersio J. **1997**. "Flt3 Ligand levels vary before and during G-CSF administration. 39th ASH meeting, San Diego." *Blood* **90**(sup1&2): 393a.
- Tokoyoda K., Egawa T., Sugiyama T., Choi B. I. et Nagasawa T. **2004**. "Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development." *Immunity* **20**(6): 707-18.
- Tubiana M. et Lalanne M. **1963**. "[Hematologic Course Of Patients Subjected To Total-Body Irradiation For Organ Transplantation.]." *Ann Radiol (Paris)* **17**: 561-80.
- Umemoto Y., Tsuji K., Yang F. C., Ebihara Y., Kaneko A., Furukawa S. et Nakahata T. **1997**. "Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells." *Blood* **90**(9): 3438-43.
- Umezawa A., Harigaya K., Abe H. et Watanabe Y. **1990**. "Gap-junctional communication of bone marrow stromal cells is resistant to irradiation in vitro." *Exp Hematol* **18**(9): 1002-7.
- Van der Meeren A., Monti P., Lebaron-Jacobs L., Marquette C. et Gourmelon P. **2001**. "Characterization of the acute inflammatory response after irradiation in mice and its regulation by interleukin 4 (IL4)." *Radiat Res* **155**(6): 858-65.
- Van der Meeren A., Monti P., Vandamme M., Squiban C., Wysocki J. et Griffiths N. **2005**. "Abdominal radiation exposure elicits inflammatory responses and abscopal effects in the lungs of mice." *Radiat Res* **163**(2): 144-52.
- Veiby O. P., Borge O. J., Martensson A., Beck E. X., Schade A. E., Grzegorzewski K., Lyman S. D., Martensson I. L. et Jacobsen S. E. **1997**. "Bidirectional effect of interleukin-10 on early murine B-cell development: stimulation of flt3-ligand plus interleukin-7-dependent generation of CD19(-) ProB cells from uncommitted bone marrow progenitor cells and growth inhibition of CD19(+) ProB cells." *Blood* **90**(11): 4321-31.
- Verfaillie C. M. **1993**. "Soluble factor(s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation." *Blood* **82**(7): 2045-53.
- Verfaillie C. M. **1998**. "Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process." *Blood* **92**(8): 2609-12.
- Verfaillie C. M., McCarthy J. B. et McClave P. B. **1991**. "Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alterations in their interaction with fibronectin." *J Exp Med* **174**(3): 693-703.
- Watowich S. S., Wu H., Socolovsky M., Klingmuller U., Constantinescu S. N. et Lodish H. F. **1996**. "Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development." *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 91-128.
- Watt S. M., Williamson J., Genevier H., Fawcett J., Simmons D. L., Hatzfeld A., Nesbitt S. A. et Coombe D. R. **1993**. "The heparin binding PECAM-1 adhesion molecule is expressed by CD34+ hematopoietic precursor cells with early myeloid and B-lymphoid cell phenotypes." *Blood* **82**(9): 2649-63.

- Weaver C. H., Tauer K., Zhen B., Schwartzberg L. S., Hazelton B., Weaver Z., Lewkow L., Allen C., Longin K. et Buckner C. D. **1998**. "Second attempts at mobilization of peripheral blood stem cells in patients with initial low CD34+ cell yields." *J Hematother* **7**(3): 241-9.
- Weil M. M., Stephens L. C., Amos C. I., Ruifrok A. C. et Mason K. A. **1996**. "Strain difference in jejunal crypt cell susceptibility to radiation-induced apoptosis." *Int J Radiat Biol* **70**(5): 579-85.
- Weinsheimer W., Szepesi T. et Fliedner T. M. **1991**. "Early indicators of response to accidental radiation exposure and the relevance for clinical management strategies." *Prog Clin Biol Res* **372**: 155-65.
- Weiss L. et Geduldig U. **1991**. "Barrier cells: stromal regulation of hematopoiesis and blood cell release in normal and stressed murine bone marrow." *Blood* **78**(4): 975-90.
- Weissman I. L. **2000**. "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution." *Cell* **100**(1): 157-68.
- Wilkins B. S. et Jones D. B. **1995**. "Immunohistochemical characterization of intact stromal layers in long-term cultures of human bone marrow." *Br J Haematol* **90**(4): 757-66.
- Wilkins R. C., Kutzner B. C., Truong M. et McLean J. R. **2002**. "The effect of the ratio of CD4+ to CD8+ T-cells on radiation-induced apoptosis in human lymphocyte subpopulations." *Int J Radiat Biol* **78**(8): 681-8.
- Wodnar-Filipowicz A., Lyman S. D., Gratwohl A., Tichelli A., Speck B. et Nissen C. **1996**. "Flt3 ligand level reflects hematopoietic progenitor cell function in aplastic anemia and chemotherapy-induced bone marrow aplasia." *Blood* **88**(12): 4493-9.
- Wognum A. W., Eaves A. C. et Thomas T. E. **2003**. "Identification and isolation of hematopoietic stem cells." *Arch Med Res* **34**(6): 461-75.
- Wolf N. S. **1979**. "The haemopoietic microenvironment." *Clin Haematol* **8**(2): 469-500.
- Wright D. E., Bowman E. P., Wagers A. J., Butcher E. C. et Weissman I. L. **2002**. "Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines." *J Exp Med* **195**(9): 1145-54.
- Wright E. G. **1998**. "Radiation-induced genomic instability in haemopoietic cells." *Int J Radiat Biol* **74**(6): 681-7.
- Yamamoto Y., Kiyoi H., Nakano Y., Suzuki R., Koderu Y., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Yagasaki F., Shimazaki C., Akiyama H., Saito K., Nishimura M., Motoji T., Shinagawa K., Takeshita A., Saito H., Ueda R., Ohno R. et Naoe T. **2001**. "Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies." *Blood* **97**(8): 2434-9.
- Yamazaki K. et Allen T. D. **1991**. "Ultrastructural and morphometric alterations in bone marrow stromal tissue after 7 Gy irradiation." *Blood Cells* **17**(3): 527-49.
- Yin A. H., Miraglia S., Zanjani E. D., Almeida-Porada G., Ogawa M., Leary A. G., Olweus J., Kearney J. et Buck D. W. **1997**. "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* **90**(12): 5002-12.
- Yokota T., Meka C. S., Kouro T., Medina K. L., Igarashi H., Takahashi M., Oritani K., Funahashi T., Tomiyama Y., Matsuzawa Y. et Kincade P. W. **2003**. "Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells." *J Immunol* **171**(10): 5091-9.

- Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W. G., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J. Q., Harris S., Wiedemann L. M., Mishina Y. et Li L. **2003**. "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." *Nature* **425**(6960): 836-41.
- Ziegler B. L., Valtieri M., Porada G. A., De Maria R., Muller R., Masella B., Gabbianelli M., Casella I., Pelosi E., Bock T., Zanjani E. D. et Peschle C. **1999**. "KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells." *Science* **285**(5433): 1553-8.

LISTE DE PUBLICATIONS ET CONGRES

Publications dans des revues à comités de lecture

Denis F, Bougnoux P, de Poncheville L, **Prat M**, Catroux R and Tranquard F. In vivo quantification of tumor vascularisation assessed by Doppler sonography in rat mammary tumor. *Ultrasound in Med and Biol.* 28(4): 431-437, **2002**.

Huchet A, Belkacemi Y, Frick J, **Prat M**, Muresan-Kloos I, Chapel A, Gorin NC, Gourmelon P, Bertho JM. Plasma Flt-3 ligand concentration is correlated to radiation-induced bone marrow damage during local fractionated radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 57(2) :508-515, **2003**.

Colas S, Paon L, Denis F, **Prat M**, Louisot P, Hoinard C, Le Floch O, Ogilvie G et Bougnoux P. Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. *International Journal of Cancer.* Apr 10;109(3): 449-54, **2004**.

Prat M, Demarquay C, Frick J, Thierry D, Gorin NC, Bertho JM. Radiation induced increase in plasma flt3-ligand concentration in mice: evidence for the implication of several cell types. *Radiation research.* 163(4): 408-417, **2005**.

Bertho JM, **Prat M**, Frick J, Demarquay C, Gaugler MH, Dudoignon N, Clairand I, Chapel A, Gorin NC, Thierry D, Gourmelon P. Application of autologous hematopoietic cell therapy to a non human primate model of heterogeneous high dose irradiation. *Radiation research.* 163(5): 557-570, 2005.

Prat M, Frick J, Laporte J.Ph, Thierry D, Gorin NC, Bertho JM. Kinetics of plasma Flt3-Ligand concentration in hematopoietic stem cell transplanted patients. Sous presse.

Bertho JM, Frick J, **Prat M**, Demarquay C, Dudoignon N, Trompier F, Gorin NC, Thierry D, Gourmelon P, Comparison of autologous cell therapy and G-SCF injection vs G-CSF injection alone for the treatment of acute radioation syndrome in a non human primate model. . *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* sous presse, 2005.

Congrès internationaux : communications orales

Prat M, Frick J, Baudelin C, Sache A, Aigueperse J, Bertho JM. Correlation between plasma Flt3-ligand (FL) concentration and bone marrow colony forming cells (CFC) in irradiated mice. 32nd annual meeting of European Society for Radiation Biology, Liège, Belgique, Septembre **2002**.

Bertho JM, Chapel A, **Prat M**, Frick J, Demarquay C, Dudoignon N, Thierry D. Application de la thérapie par expansion *ex vivo* des cellules hématopoïétiques à un modèle d'irradiation accidentelle. Congrès annuel de la SFDP, Montpellier, 11-13 Juin **2003**.

Bertho JM, Frick J, Demarquay C, **Prat M**, Dudoignon N, Chapel A, Thierry D. Application de la thérapie par expansion *ex vivo* de cellules hématopoïétiques à un modèle

d'irradiation accidentelle. 6^{eme} colloque international de radiobiologie fondamentale et appliquée, Batz sur mer, 30 Juin-4 Juillet 2003.

Bertho JM, Prat M, Frick J, Chapel A, Thierry D. Flt-3 ligand variations during G-CSF mobilization in a non human primate model. 32nd annual meeting of the International Society for Experimental Hematology, Paris, France, 5-8 Juillet 2003. Exp. Hematol., 31(sup1):80a, 2003.

Congrès internationaux : posters

Prat M, Demarquay C, Frick J, Thierry D, Bertho JM. Corrélation entre le taux plasmatique de Flt-3 ligand et le nombre de progéniteurs survivants dans la moelle osseuse de souris irradiées. 6^{eme} colloque international de radiobiologie fondamentale et appliquée, Batz sur mer, 30 Juin-4 Juillet 2003.

Huchet A, Belkacemi Y, Frick J, Prat M, Muresan-kloos I, Altan D, Chapel A, Gorin NC, Gourmelon P, Bertho JM. Corrélation entre le Flt-3 ligand plasmatique et les éléments figurés du sang au cours de la radiothérapie localisée et fractionnée. 6^{eme} colloque international de radiobiologie fondamentale et appliquée, Batz sur mer, 30 Juin-4 Juillet 2003.

Huchet A, Belkacemi Y, Frick J, Prat M, Chapel A, Bertho JM. Flt-3 ligand variations during fractionnated radiation therapy. 32nd annual meeting of the International Society for Experimental Hematology, Paris, France, 5-8 Juillet 2003. Exp. Hematol., 31(sup1):218a, 2003.

Prat M, Demarquay C, Frick J, Chapel A, Thierry D, Bertho JM. Correlation between plasma Flt-3 ligand concentration and bone marrow surviving progenitors in irradiated mice. 32nd annual meeting of the International Society for Experimental Hematology, Paris, France, 5-8 Juillet 2003. Exp. Hematol., 31(sup1):236a, 2003.

Bertho JM, Prat M, Frick J, Laporte JPh, Gorin NC, Thierry D. Follow-up of plasma Flt3 ligand concentration in haematopoietic stem cell transplanted patients. 33rd annual meeting of European Society for Radiation Biology, Budapest, Hongrie, Août 2004.

Prat M, Demarquay C, Frick J, Thierry D, Gorin NC, Bertho JM. Sequential implication of lymphoid and stromal cells in FL variations after irradiation in mice. 33rd annual meeting of European Society for Radiation Biology, Budapest, Hongrie, Août 2004.

Prat M, Demarquay C, Frick J, Thierry D, Gorin NC, Bertho JM. Plasma FL concentration variations after heterogeneous irradiation in mice. 33rd annual meeting of European Society for Radiation Biology, Budapest, Hongrie, Août 2004.