



HAL
open science

CONTRIBUTION DES RÉCEPTEURS À DOMAINE DE MORT ET DES RÉCEPTEURS DE LA FAMILLE TOLL À L'HÉMATOPOÏÈSE HUMAINE

Karelle de Luca

► **To cite this version:**

Karelle de Luca. CONTRIBUTION DES RÉCEPTEURS À DOMAINE DE MORT ET DES RÉCEPTEURS DE LA FAMILLE TOLL À L'HÉMATOPOÏÈSE HUMAINE. Immunologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2006. Français. NNT: . tel-00140434

HAL Id: tel-00140434

<https://theses.hal.science/tel-00140434>

Submitted on 6 Apr 2007

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

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

THESE

PRESENTEE DEVANT L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON I

POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME DE DOCTORAT

(ARRETE DU 25 AVRIL 2002)

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 14 DECEMBRE 2006

PAR

KARELLE DE LUCA

**CONTRIBUTION DES RECEPTEURS A DOMAINE DE MORT ET DES
RECEPTEURS DE LA FAMILLE TOLL A L'HEMATOPOÏESE HUMAINE**

DIRECTEUR DE THESE : DR THIERRY DEFRANCE

JURY:

DR CLAUDINE SCHIFF, RAPPORTEUR

PR KAÏSS LASSOUED, RAPPORTEUR

DR SIMON FILLATREAU, EXAMINATEUR

PR ROBERT GARRONE, EXAMINATEUR

DR THIERRY DEFRANCE, DIRECTEUR DE THESE

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur R. GARRONE

M. le Professeur G. ANNAT

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie

Humaine

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur L. COLLET

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier le Dr Thierry Defrance qui a dirigé mes recherches. Je le remercie pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et son soutien dans les aléas de la thèse.

Merci au Dr Fabian Wild de m'avoir accueillie toutes ces années dans l'unité 404 !

Aux membres du jury,

Je tiens à remercier le Docteur Claudine Schiff et le Pr Kaïss Lassoued pour avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteur.

Mes remerciements s'adressent également au Dr Simon Fillatreau et au Pr Robert Garrone qui ont eu l'amabilité d'évaluer ce travail.

À l'équipe,

Je remercie Paul de m'avoir supporté toutes ces années, et pour toutes nos conversations et confidences.

À Chantal que j'ai rencontrée alors qu'elle appartenait à l'U404 (et non je ne vous dirais pas depuis quand je suis là).

Je remercie Valérie pour son aide technique et amicale, récemment arrivée et que j'aurais l'occasion de mieux connaître au cours de ces prochains mois.

Je ne peux oublier Momo et tous ces innombrables petits services rendus... (Vive la biblio...) et notre amitié en dehors de ces murs.

Anne-Sophie qui m'a aidée à prendre confiance en moi sur bien des aspects ces derniers mois, amie de labo mais surtout, amie tout court.

Et Lolo la grosse mite pour sa bonne humeur, sa finesse (!) et ses conseils scientifiques.

Sans oublier celles qui sont passées par là : Anca, Montse, Ala'a, Lou la petite stagiaire...

Au CERVI,

À tous ceux que j'ai croisés dans l'unité 404, ou dans les couloirs, les pauses cafés (rares) le FACS, le PBES et au détour d'une bière au Ninkasi et avec qui j'ai échangé rires, et longues discussions sur la condition humaine ou sous humaine de thésard... À notre vie extra-labo.

À ma famille,

À maman : merci pour tout et pour m'avoir soutenue, toujours,

À mon frère, mon père et mon grand-père que j'aurais aimé voir présent lors de cet aboutissement.

À mes amis,

À Marianne, toujours là.

Nadège, Virginie et David, amis de thèse et de vie, d'embûches et de loisirs!

À Vanessa, Hanane, Lydie, Christelle, Karine, Olivier, Guillaume et Adèle, Princesse Nathalie, Caroline, Sophie, Carole Frufu, Damien, Marie, Grégoire, Julien, Johan pour tout ce que nous avons partagé (Badminton, restos, concerts, week-ends, mariages et naissances...).

À tous les autres que je ne peux citer tant la liste est longue, mais que je n'oublie pas...

À Karim

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	4
RESUME	6
ABSTRACT	7
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	8
CHAPITRE 1: HEMATOPOÏESE	8
1. LA CELLULE SOUCHE HEMATOPOÏETIQUE (CSH)	8
1.1. <u>Le phénotype</u>	9
1.1.1. <i>La CSH murine</i>	9
1.1.2. <i>La CSH humaine</i>	10
1.1.3. <i>CSH non conventionnelle (side population)</i>	11
1.2. <u>Engagement ou auto-renouvellement : la niche hématopoïétique</u>	12
1.2.1. <i>La division cellulaire des CSH</i>	12
1.2.2. <i>La niche hématopoïétique</i>	12
1.2.3. <i>Autorenouvellement des CSH dans la niche hématopoïétique</i>	15
1.2.3.1. <i>Les protéines de la famille Notch</i>	15
1.2.3.2. <i>Les cytokines hématopoïétiques</i>	16
1.3. <u>Colonisation de la moelle osseuse et mobilisation</u>	16
2. LES LIGNAGES HEMATOPOÏETIQUES	18
2.1. <u>L'arbre hématopoïétique</u>	18
2.1.1. <i>Modèles murins</i>	18
2.1.1.1. <i>Le modèle binaire</i>	18
2.1.1.2. <i>Alternatives au modèle binaire</i>	19
2.1.2. <i>Modèle humain</i>	21
2.1.2.1. <u><i>Le lignage myéloïde : CMP, GMP et MEP</i></u>	21
2.1.2.2. <u><i>Le lignage lymphoïde : CLP, ETP</i></u>	22
2.1.3. <i>Régulation transcriptionnelle de la différenciation des progéniteurs à partir de la CSH</i>	23
2.2. <u>Le lignage lymphoïde</u>	25
2.2.1. <i>Développement des lymphocytes B</i>	25
▪ <i>Les différentes étapes du développement B humain</i>	25
▪ <i>Régulation par les facteurs de transcription</i>	29
▪ <i>Régulation par les cytokines</i>	31
2.2.2. <i>Développement des lymphocytes T</i>	32
▪ <i>Les différentes étapes du développement T humain</i>	32
▪ <i>Régulation par les facteurs de transcription et les cytokines</i>	33
2.2.3. <i>Développement des cellules NK</i>	34
▪ <i>Les différentes étapes du développement des cellules NK</i>	34
▪ <i>Régulation par les facteurs de transcription et les cytokines</i>	35
2.2.4. <i>Développement des cellules dendritiques</i>	36
▪ <i>Régulation par les facteurs de transcription</i>	37

▪ <i>Régulation par les cytokines</i>	37
2.3. Développement des lignages myéloïdes	38
2.3.1. <i>Développement des monocytes/macrophages</i>	38
2.3.2. <i>Développement des granulocytes</i>	38
▪ <i>Régulation par les facteurs de transcription</i>	40
▪ <i>Régulation par les cytokines</i>	40
2.3.3. <i>Développement des Mégacaryocytes/Erythrocytes</i>	41
CHAPITRE II : LES RECEPTEURS TOLL	43
1. STRUCTURE DES TLR	44
2. PRESENTATION DES TLR ET DE LEURS LIGANDS	44
2.1. <u>TLR2, TLR1/2, TLR2/6</u>	44
2.2. <u>TLR3</u>	45
2.3. <u>TLR4</u>	45
2.4. <u>TLR5</u>	46
2.5. <u>TLR7/8</u>	46
2.6. <u>TLR9</u>	46
3. VOIE DE SIGNALISATION DES TLR	48
3.1. <u>Les protéines adaptatrices</u>	48
3.1.1. <i>MyD88</i>	48
3.1.2. <i>TIRAP/Mal</i>	48
3.1.3. <i>TRIF</i>	49
3.1.4. <i>TRAM</i>	49
3.2. <u>Voie dépendante de MyD88</u>	49
3.3. <u>Voie dépendante de TRIF</u>	51
CHAPITRE III : DUALITE FONCTIONNELLE DE LA VOIE DE SIGNALISATION FADD	52
1. LE MECANISME D' APOPTOSE	52
1.1. <u>Présentation générale des récepteurs à domaine de mort</u>	52
1.2. <u>Les composants de la voie de signalisation des RM</u>	55
1.2.1. FADD	55
1.2.2. TRADD	56
1.2.3. RIP	56
1.2.4. Les caspases	56
1.2.5. c-FLIP	57
1.3. <u>Initiation du signal apoptotique</u>	58

2. L'ACTIVATION CELLULAIRE	62
2.1. <u>Les activités non-apoptotiques des RM</u>	62
2.2. <u>Les fonctions non apoptotiques de FADD</u>	62
2.2.1. <i>FADD et le développement hématopoïétique</i>	62
2.2.2. <i>FADD et le cycle cellulaire</i>	66
2.2.3. <i>FADD et immunité innée</i>	67
2.3. <u>Les fonctions non-apoptotiques des caspases</u>	68
2.4. <u>Les fonctions de c-FLIP</u>	69
2.5. <u>FADD, Caspase-8 et c-FLIP agissent indépendamment des RM?</u>	70
OBJECTIFS	73
RESULTATS	75
ARTICLE I	75
ARTICLE II	101
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	137
FADD ET HEMATOPOÏÈSE	138
TLR ET HEMATOPOÏÈSE	141
1. <i>Pourquoi les TLR-L exercent-ils des effets opposés sur la lymphopoïèse et la myélopoïèse?</i>	
2. <i>Mécanisme d'action des TLR sur l'hématopoïèse : effet instructeur ou permissif ?</i>	
3. <i>L'hématopoïèse d'urgence</i>	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145
ANNEXE	170

LISTE DES ABREVIATIONS

BCR	B Cell Receptor
bHLH	basic Helix Loop Helix
BLNK	B cell Linker/SPL-25/BASH
BSAP	B-cell Specific Activator Protein
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid
Btk	Bruton's Tyrosine Kinase
CARD	Caspase Activation and Recruiting Domain
CBF-1	C-promoter Binding Factor-1
CFC	Colony Forming Cell
CFU	Colony Forming Unit
CLA	Cutaneous Lymphocyte Antigen
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
DC	Dendritic Cell
DEM	Domaine Effecteur de Mort
DISC	Death Inducing Signaling Complexe
DL1	Delta Like1
DM	Domaine de Mort
DRC	Domaines Riches en Cystéine
dsARN	double strand ARN
EBF	Early B cell Factor
Egr	Early growth response gene
ELMP	Early Lymphoid and Myeloid Progenitor
ETP	Earliest T Progenitor
FADD	Fas Associated Death Domain
FADD-DN	Dominant Négatif de FADD
Flt3/Flt3-L	Fms like tyrosine Kinase 3/ Ligand
FOG-1	Friend Of GATA-1
FTOC	Fetal Thymic Organ Culture
G-CSF	Granulocyte -Colony Stimulating Factor
G-CSF-R	Granulocyte -Colony Stimulating Factor -Receptor
<i>gld</i>	generalised lymphoproliferative disease
GM-CSF	Granulocyte Monocyte- Colony Stimulating Factor
GM-CSF-R	Granulocyte Monocyte- Colony Stimulating Factor -Receptor
GMP	Granulocyte-Macrophage Progenitor
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase-3β
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HSA	Heat Stable Antigen
IKK	IκB Kinase
IRAK	IL-1 Receptor Associated Kinase
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRF	Interferon Regulatory Factor
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
KIR	Killer Inhibitor Receptor
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein
LEF-1	Lymphoid-Enhancer binding Factor 1

LMPP	Lymphoid primed Multipotent Progenitor
<i>lpr</i>	lymphoproliferation
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Acide lipotéichoïque / Lipoteichoic Acid
LTC-IC	Long Term Culture-Initiating Cell
LT-HSC	Long Term-Hematopoietic Stem Cell
LSK	Lineage⁻ c-Kit⁺Sca-1⁺
MAL	MyD88-Adaptor-Like protein
MALP-2	Mycoplasmal Lipopeptide 2
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
M-CSF	Monocyte- Colony Stimulating Factor
M-CSF-R	Monocyte- Colony Stimulating Factor -Receptor
MEP	Megacaryocyte-Erythrocyte Progenitor
MMP	Multipotent Progenitor
MyD88	Myeloid Differentiation factor 88
NIK	NF-κB Inducing Kinase
NK	Natural Killer cell
NOD-SCID	Non Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PGN	Peptidoglycans
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLC-γ1	Phospholipase-Cγ1
PRR	Pathogen Recognition Receptor
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue
RAG	Recombinaison Activating Gene
RAIDD	RIP-Associated ICH/CED-3 homologous protein with a Death Domain
RIP	Receptor Interacting Protein
SCF	Stem Cell Factor
SDF1	Stromal Derived Factor 1
ST-HSC	Short Term-Hematopoietic Stem Cell
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TAB1, -2	TAK1-Binding proteins -1 et -2
TAK1	TGF-β Activated Kinase
TBK1	TANK Binding Kinase 1
TIR	Toll/IL-1 Receptor domain
TIRAP	TIR domain-containing Adaptor Protein
TLR	Toll-Like Receptors
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
TPO	Thrombopoïétine
TRADD	TNF Receptor Associated Death Domain
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
TRAM	TRIF-Related Adaptor Molecule
TRIF	TIR Related adaptor protein inducing IFN-β
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA-4	Very Late Antigen 4

RESUME

La voie de signalisation des récepteurs à domaine de mort (RDM) intervient dans l'hématopoïèse. En effet, l'inactivation de FADD, la molécule adaptatrice des RDM, dans le compartiment lymphocytaire murin résulte en une absence totale de lymphocytes B en périphérie. Nos travaux ont révélé que l'inactivation de la fonction FADD inhibe profondément la production de cellules hématopoïétiques humaines à la fois B et non-B. Ces données suggèrent une implication de FADD dans l'expansion des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques humains.

Outre les RDM, les récepteurs Toll (TLR), dévolus à la reconnaissance des pathogènes, sont également capables de recruter FADD. Ceci nous a conduit à nous intéresser au rôle des TLR dans l'hématopoïèse humaine. Nous avons montré que les CSH et les progéniteurs hématopoïétiques humains expriment des TLR fonctionnels (TLR1, 2, 3 et 6 notamment). Nos résultats démontrent que la stimulation des TLR sur les CSH et les progéniteurs hématopoïétiques humains est susceptible de remodeler le développement hématopoïétique en favorisant l'engagement myéloïde au détriment du développement lymphocytaire B. Ce processus pourrait contribuer au renforcement du bras de l'immunité innée au cours des infections microbiennes.

ABSTRACT

FADD is an adaptor protein that was originally isolated as a transducer of apoptotic signals for death domain-containing receptors (DR). Analysis of FADD^{-/-} RAG1^{-/-} complementation mice revealed that FADD also plays a critical role in both B and T cell early development possibly through positive regulation of lymphocyte proliferation. Our results reveal that the invalidation of FADD's functions in HSCs dramatically impair hematopoietic development and B cell development. These data suggest that FADD is implicated in HSC expansion and in B cell commitment.

Other receptors like Toll-Like Receptors (TLR) which constitute a subgroup of the Pathogen Recognition Receptors (PRR) family which are non-polymorphic receptors devoted to pathogen recognition, have been shown to recruit FADD. This led us to study the functions of TLR in human hematopoiesis. Here we show that HSCs and progenitors express functional TLRs (TLR1, 2, 4, 6). HSCs stimulation by TLR agonists is susceptible to skew hematopoietic development toward myeloid differentiation at the expense of B cell development. This process could contribute to reinforce innate immunity in the course of microbial infections.

- CHAPITRE I -

L'HEMATOPOIESE

L'hématopoïèse permet à une cellule souche hématopoïétique de générer et d'entretenir les progéniteurs hématopoïétiques ainsi que les cellules matures du sang et du système immunitaire. Au cours du développement, l'hématopoïèse s'établit séquentiellement en différents sites anatomiques. Chez l'embryon, l'hématopoïèse primitive a lieu dans la région AGM pour Aorte, Gonades et Mésonephros, puis colonise le foie fœtal et la rate, avant de migrer dans la moelle osseuse avant la naissance (pour revue : (Jaffredo et al., 2005)). Chez la souris, la rate demeure un site d'hématopoïèse chez l'adulte.

1. LA CELLULE SOUCHE HEMATOPOÏËTIQUE

Les deux principales caractéristiques qui définissent les cellules souches, et les cellules souches hématopoïétiques (CSH) en particulier, sont : a) la capacité d'autorenouvellement, b) la capacité de différenciation pluripotente. La CSH donne naissance à toutes les cellules du sang par un processus de différenciation multi-étapes qui se traduit tout d'abord par la formation de progéniteurs multipotents.

L'existence de la CSH a été mise en évidence pour la première fois par l'étude de Till et McCulloch en 1961 montrant qu'une souris irradiée de façon létale puis reconstituée par la moelle osseuse d'un donneur syngénique développe des foyers d'expansion clonale dans la rate (Colony Forming Unit-Spleen/CFU-S) composés à la fois d'érythrocytes, de cellules myéloïdes ou de type granuleux (Till and Mc, 1961). L'origine clonale de ces foyers de cellules hématopoïétiques fut démontrée un peu plus tard par Becker *et coll.* en créant par irradiation du donneur des cassures chromosomiques spécifiques dans les cellules de moelle osseuse (Becker et al., 1963). L'analyse de chaque CFU-S du receveur montra la présence de cassures chromosomiques identiques, et démontra donc leur origine à partir d'une cellule unique et le caractère clonal de la différenciation hématopoïétique.

L'analyse phénotypique des CSH et de leurs progéniteurs a énormément progressé ces dernières années tant chez la souris que chez l'Homme ce qui fait de la CSH la cellule souche la mieux caractérisée. Cependant, les mécanismes responsables de la prise de décision entre auto-renouvellement ou différenciation demeurent complexes.

1.1. Phénotype des CSH

1.1.1. La cellule souche hématopoïétique murine

La contribution du groupe de Weissman à cette étude fut déterminante. Ses travaux montraient que les progéniteurs B n'exprimaient pas de marqueurs de lignage B. Cette observation fut à l'origine du concept que la cellule souche hématopoïétique ne devait pas exprimer de marqueurs de lignage mature (Muller-Sieburg et al., 1986). On exclut ainsi les marqueurs des lignages T (CD3, CD4, CD 8), B (B220), granulocytaire (Mac-1, Gr-1) et érythroïde (Ter119). Puis la disponibilité de nouveaux anticorps monoclonaux montra que l'expression de Sca-1 (Ly.6 A/E) combinée à l'expression faible de Thy-1 ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{Thy}^{\text{lo}}$) permettait de définir une population enrichie en cellules capables de clonogénicité et de reconstituer des souris irradiées (Spangrude et al., 1988). En 1992, c-Kit (CD117, récepteur au Stem Cell Ligand/SCF) fut identifié comme un second marqueur des CSH pluripotentes dès lors définies comme $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$ ou plus brièvement par l'acronyme LSK (Ikuta and Weissman, 1992) (Cf tableau1). Deux types de CSH ont ensuite été définies selon la longévité de la reconstitution après implantation dans des souris irradiées de façon létale. En effet, parmi ce groupe de cellules, on distingue d'une part les cellules souches pluripotentes, clonogéniques, et majoritairement quiescentes (Long Term-Hematopoietic Stem Cells /LT-HSCs) capables de reconstituer les souris receveuses à vie, des CSH dites « Short-Term » capables de reconstituer les souris irradiées pour une période de 8 à 12 semaines (ST-HSC) (Christensen and Weissman, 2001). Sur le plan phénotypique, ces populations de CSH peuvent être discriminées par l'expression du récepteur tyrosine kinase Flk2/Flt3 :

- $\text{Thy}^{\text{lo}} \text{Flt3}^-$: LT-HSCs. 2/3 de ces cellules sont quiescentes comme le montre une analyse par Hoechst 33342/PyroninY (Passegue et al., 2005). Cette quiescence semble être nécessaire pour la prise de greffe de ces cellules lors d'une reconstitution d'un hôte irradié (Passegue et al., 2005; Zhang et al., 2006a).
- $\text{Thy}^{\text{lo}} \text{Flt3}^+$: ST-HSCs. A ce stade, les cellules expriment la sialomucine CD34 et représentent la première étape de l'engagement progressif et irréversible (en anglais : « commitment ») de la population LT-HSC dont elle dérive. 50% de ces cellules sont quiescentes, un quart d'entre elles sont en phase G1 et 15% en phase S-G2/M.

1.1.2. La cellule souche hématopoïétique humaine

Les premières études chez l'Homme démontrant l'existence d'un précurseur pluripotent ont fait appel à des tests de clonogénicité appelés « Colony Forming Cell » (CFC). Les cellules de

moelle osseuse sont ensemencées en milieu semi-solide afin d'analyser la fréquence de cellules pouvant former des unités clonales (CFU/Colony Forming Unit) de type granulocytaire/monocytaire (CFU-GM) ou érythroïde (Burst Forming Unit-Erythroid/BFU-E). Dexter a développé un système de culture à long terme à partir de stroma de moelle osseuse et ce chez la souris (Dexter et al., 1977). À partir de ce test fut mis au point chez l'Homme le test de culture à long terme initié par une cellule de moelle osseuse (Long Term Culture-Initiating Cell/LTC-IC). Ce test permet d'identifier un précurseur très immature capable de générer des cellules hématopoïétiques après mise en culture sur cellules stromales médullaires. La numération des cellules LTC-IC se fait en dilution limite et après 4 à 5 semaines de culture, on analyse le potentiel des cellules générés de former des CFU-GM, BFU-M ou CFU-GEMM en milieu semi-solide.

En 1984, Civin décrit un anticorps (My-10) généré par immunisation de souris avec la lignée leucémique myéloïde, KG-1a (Civin et al., 1984). Cet anticorps s'est avéré reconnaître la molécule d'adhésion CD34. Son expression est restreinte à 1-5% des cellules de la moelle osseuse. Parmi les cellules CD34⁺, on compte la majorité des cellules capables de reconstituer *in vivo* un système hématopoïétique, toutes les cellules capables de LTC-IC, et une partie des CFC.

Cependant, la seule expression de CD34 ne permet d'isoler qu'une population très hétérogène comprenant à la fois les CSH pluripotentes et les progéniteurs hématopoïétiques multipotents. De nombreux groupes se sont donc attelés à mieux caractériser cette population par une combinaison d'autres marqueurs. Ainsi, comme chez la souris, on peut exclure les marqueurs de lignages matures (Verfaillie et al., 1990):

- Lignage lymphoïde : CD2, CD3, CD16, CD19, CD56,
- Lignage érythroïde : Glycophorine A ou CD71.
- Lignage myéloïde : CD1a, CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD57.

Un moyen simple pour obtenir les cellules Lin⁻ s'est avéré être l'utilisation du CD38 dont l'expression est corrélée avec celle des marqueurs de lignages (Hao et al., 1998; Terstappen et al., 1991). Ceci peut être démontré dans les tests LTC-IC ou CFC où les cellules CD34⁺CD38⁻ donnent lieu à une plus forte expansion cellulaire et à une production de CFU plus durables que les CD34⁺CD38⁺. L'augmentation de l'expression du CD38 est donc corrélée à un stade de différenciation plus avancé des CSH. Cette combinaison de marqueurs est valide pour la distinction des CSH les plus primitives tant dans la moelle osseuse, que dans le sang de cordon ombilical ou le foie fœtal, site embryonnaire tardif de l'hématopoïèse. L'expression du CD38 sur les CD34 est également corrélée à une plus grande proportion de cellules cyclantes (Hao et al., 1995). Les CD34⁺CD38⁻ sont quiescentes dans leur quasi-totalité dans la moelle osseuse et légèrement plus en

cycle dans le sang de cordon. Le phénotype $CD34^+CD38^-$ demeure à l'heure actuelle le plus communément admis pour discriminer et isoler les CSH primitives chez l'Homme.

Un nouveau marqueur, CD133 (AC133) exprimé sur une partie des cellules $CD34^+$ a récemment été décrit chez l'Homme (Gallacher et al., 2000). Il discrimine toutes les capacités des précurseurs hématopoïétiques pluripotents.

Cependant, les CSH expriment également certains marqueurs de lignage myéloïde tels que CD33, les CSH $CD33^-$ figurent parmi les plus primitives (Andrews et al., 1989). Ces dernières sont pluripotentes ce qui est démontré par leur capacité à reconstituer des souris immunodéficientes, et conservent leur caractéristique d'auto-renouvellement. Elles peuvent en effet, suite à une transplantation en série dans d'autres animaux irradiés, reconstituer le système hématopoïétique (Taussig et al., 2005).

La xéno-transplantation de ces CSH humaines nouvellement caractérisées dans des souris immunodéficientes NOD-SCID (Non Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency) s'est avérée un bon modèle pour l'identification des CSH primitives. Les cellules capables de reconstituer le système hématopoïétique chez ces souris sont appelées « SRC / Severe Combined Immunodeficient Repopulating Cells » car elles reconstituent un animal immunodéficient. Elles confirment leur caractère LT-HSC si elles sont capables de reconstituer l'animal à vie ce qui les oppose aux ST-HSCs qui ne maintiennent dans ce modèle l'hématopoïèse que pour 12 semaines environ.

1.1.3. CSH non conventionnelle (side population)

L'une des caractéristiques des CSH, qui a notamment été utilisée pour leur identification, est leur capacité à expulser les molécules fluorescentes vitales comme la Rhodamine-123 (Rho) qui marque la membrane des mitochondries et le Hoechst 33342 (Ho) qui marque l'ADN. Cette fonction est gouvernée par une famille de molécules appelée transporteurs ABC dont fait notamment partie la glycoprotéine P (pour la Rhodamine-123) et l'Abcg2 (pour le Hoechst 33342). Ce critère a permis de définir chez l'Homme, la souris et le singe des cellule Ho- ou Rho-. Elles sont désignées comme « side population » car bien qu'étant capables d'une reconstitution hématopoïétique à long terme, elles n'expriment ni CD34, ni CD133 et ont un très faible potentiel clonogénique dans des tests CFC (Goodell et al., 1997).

1.2. Engagement ou auto-renouvellement : la niche hématopoïétique

Lors de son entrée en cycle, la CSH peut soit s'auto-renouveler soit se différencier. Une question persiste : comment cette cellule peut-elle engendrer une telle diversité, et quels sont les mécanismes qui gouvernent ses choix ? Deux courants de pensées s'affrontent :

- Le processus intrinsèque, la différenciation des CSH est gouvernée par l'expression aléatoire d'un programme génétique spécifique d'un lignage,
- Le processus extrinsèque, la différenciation des CSH est gouvernée par les signaux extérieurs que reçoit la cellule tels que les cytokines ou les molécules d'adhésion qui orientent sa décision.

1.2.1. La division cellulaire des CSH

La division cellulaire est majoritairement symétrique et permet d'obtenir deux cellules filles identiques à partir d'une cellule initiale. Il existe deux types de divisions cellulaires. La division symétrique génère deux cellules filles identiques à partir d'une cellule initiale. La division asymétrique donne naissance à deux cellules distinctes. Pour une CSH, cette asymétrie se traduit par la production d'une cellule fille ayant conservé sa capacité d'auto-renouvellement, et d'une autre cellule fille engagée dans le processus de différenciation (progéniteur). Cette asymétrie peut être obtenue de deux manières :

- Par un mécanisme pré-divisionnel, qui induit une redistribution inégale des constituants du cytoplasme (ARNm et/ou protéines) lors de la mitose, maintenant une cellule au stade indifférencié de CSH, l'autre étant engagée dans la différenciation.
- Par un mécanisme post-divisionnel lié à l'exposition des cellules filles à un environnement différent fournissant à chacune des signaux extrinsèques différents. Dans ce cas de figure, la cellule souche subirait une division symétrique, mais l'une de cellules demeurerait dans la niche hématopoïétique, tandis que l'autre s'en éloignerait et recevrait des signaux favorables à sa différenciation.

1.2.2. La niche hématopoïétique

La niche hématopoïétique se définit comme une microstructure anatomique permettant l'implantation et l'auto-renouvellement sans différenciation des CSH (**Figure 1**). Parmi les fonctions de la niche hématopoïétique, on compte donc la protection contre des stimuli de différenciation ou d'apoptose, ou tout signal qui mettrait en danger le compartiment des CSH.

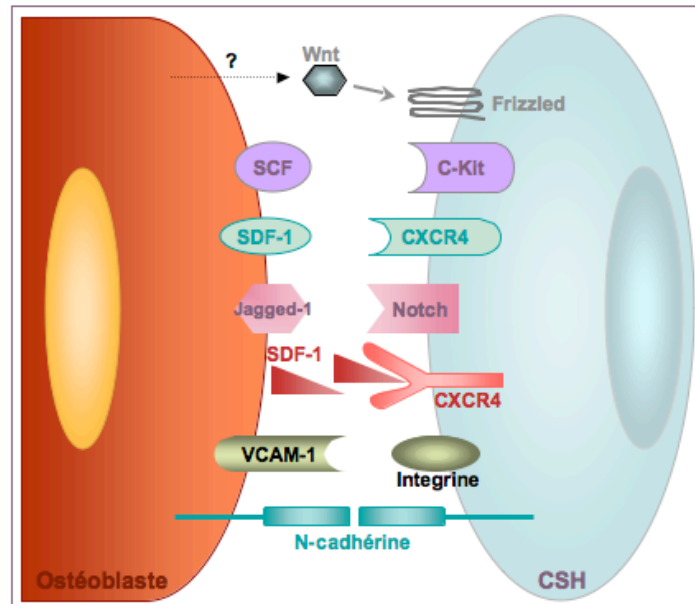


Figure 1: interactions moléculaires dans la niche hématopoïétique. (D'après Wilson et Trumps, 2006)

L'existence de la niche hématopoïétique a été suggérée pour la première fois dans un article de Schofield en 1978 montrant que les CSH seraient associées à d'autres types cellulaires autorisant leur auto-renouvellement tout en inhibant leur différenciation (Schofield, 1978). Des travaux récents sur la fonction des niches ovariennes et testiculaires de la *Drosophila* dans le maintien des cellules souches germinales ont remis ce concept à l'ordre du jour (Kiger et al., 2000; Xie and Spradling, 2000).

Les CSH étant majoritairement quiescentes dans la moelle osseuse, un marquage de leur ADN perdure pendant de longues périodes de temps. Cette propriété a été mise à profit par Zhang *et coll.* pour localiser les CSH *in situ* (Zhang et al., 2003). La majorité des CSH se situe au niveau de l'endoste, membrane qui tapisse la face interne de l'os trabéculaire ou spongieux de l'os long et en contact étroit avec les ostéoblastes, alors que le reste des CSH est localisé au centre de la moelle à proximité des vaisseaux sanguins.

A l'inverse, une étude de Kiel *et al.* a montré que les CSH sont localisées en majorité à proximité des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Kiel et al., 2005). L'ensemble de ces données indique qu'il existe deux niches hématopoïétiques distinctes : la niche endostéale, ou ostéoblastique, située le long de l'os et la niche vasculaire située au cœur de la moelle.

Les ostéoblastes jouent un rôle clé dans la formation de l'os. Ils sont responsables de la synthèse de la majorité des protéines extracellulaires de la matrice osseuse et régule la minéralisation. Ils dérivent de progéniteurs mésenchymateux.

Plusieurs études ont documenté l'importance des ostéoblastes pour la niche hématopoïétique. Le premier élément de preuve fut la découverte que les ostéoblastes secrètent de nombreuses cytokines hématopoïétiques comme le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), le GM-CSF (Granulocyte Monocyte- Colony Stimulating Factor), le M-CSF (Monocyte-Colony Stimulating Factor), l'interleukine 1 (IL-1), l'IL-6, le RANKL (Receptor Activator of NF κ B Ligand), CXCL12/SDF-1 (Stromal Derived Factor 1) et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) (pour revue : (Taichman, 2005)).

L'importance des ostéoblastes dans l'hématopoïèse a été directement mise en évidence *in vivo* par des études dans lesquelles le contingent ostéoblastique a été expérimentalement augmenté ou réduit. L'inactivation par transgénèse du récepteur de type IA à la BMP (Bone Morphogenetic Protein Receptor IA) et l'induction du récepteur PPR qui fixe deux facteurs activateurs des ostéoblastes, l'hormone parathyroïde (PTH) et la PTHrP (PTH-related protein) ont pour effet l'augmentation de la population ostéoblastique. Celle-ci s'accompagne dans les deux cas d'une augmentation du nombre de CSH, sans impact sur l'effectif des progéniteurs (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003).

Dans la troisième étude, Visnjik *et coll.* ont utilisé des souris transgéniques exprimant spécifiquement la thymidine kinase du virus de l'Herpès dans les ostéoblastes ce qui permet d'éliminer sélectivement ces cellules suite à l'injection de ganciclovir *in vivo* (Visnjic et al., 2004). Dans ces souris, la perte osseuse progressive s'accompagne d'une diminution du nombre de CSH et de leur progénie dans la moelle osseuse. De manière intéressante, l'hématopoïèse se relocalise alors dans le foie et la rate. Cette hématopoïèse extramédullaire constitue par ailleurs une réponse typique consécutive à un stress de la moelle osseuse. Après arrêt du traitement au ganciclovir et restauration d'une population normale d'ostéoblastes, on observe une reprise de l'hématopoïèse médullaire.

L'existence d'une deuxième niche dite vasculaire a récemment été démontrée par les travaux de Kiel. Une fraction des CSH exprimant le récepteur CD150 (famille des récepteurs SLAM) est ancrée à l'endothélium des vaisseaux de la moelle osseuse (Kiel et al., 2005). Les cellules endothéliales de ces vaisseaux appelés (BMEC /Bone Marrow Endothelial Cell) expriment des cytokines telles que CXCL12, des molécules d'adhésion (E-Selectin et VCAM1/Vascular Cell Adhesion Molecule 1) connues pour jouer un rôle important lors de la mobilisation, de la colonisation et de la reconstitution des CSH (Avecilla et al., 2004; Rafii et al., 1997).

Les niches ostéoblastique et vasculaire pourraient abriter des CSH amenées à remplir des fonctions différentes. La proportion relativement plus importante de CSH en cycle dans la niche vasculaire suggère qu'elle pourrait héberger préférentiellement les cellules en phase d'auto-renouvellement. Par ailleurs, de par leur localisation, les CSH de la niche vasculaire pourraient se mobiliser plus rapidement en périphérie en cas de stress médullaire. Cette niche vasculaire ne permettrait toutefois de compenser qu'un stress médullaire transitoire ou peu important. En effet, une élimination sélective du contingent de CSH de la niche ostéoblastique (par déplétion des ostéoblastes) aboutit à une déficience de l'hématopoïèse à long terme.

1.2.3. Auto-renouvellement des CSH dans la niche ostéoblastique

1.2.3.1. Les protéines de la famille Notch

Ce sont des récepteurs membranaires très conservés qui régulent le développement des Vertébrés et des Invertébrés. Comme pour d'autres acteurs moléculaires du développement, ce récepteur est également impliqué dans l'homéostasie et la différenciation des cellules souches de nombreux tissus. Plusieurs récepteurs Notch (1 à 4) et 6 ligands (Jagged1-2, DeltaLike1-4/DL1-4) sont exprimés dans la moelle osseuse. La liaison d'un ligand avec l'un des récepteurs provoque le clivage et la libération du fragment intracellulaire de Notch (ICN/intracytoplasmic Notch) qui pénètre dans le noyau et s'associe à CSL (suppresseur de CBF1/C-promoter Binding Factor-1). Il en résulte l'activation de CSL qui initie l'expression des gènes cibles. Notch est impliqué dans l'auto-renouvellement des CSH comme le démontrent les expériences suivantes. L'expression forcée par transgénèse du domaine intracellulaire de Notch dans des cellules souches murines LSK ou des progéniteurs permet de générer des lignées de cellules qui maintiennent leur capacité à se différencier en cellules myéloïdes ou lymphoïdes T *in vitro* (Varnum-Finney et al., 2000). *In vivo*, ces cellules maintiennent leur capacité d'auto-renouvellement et permettent le développement des lignages myéloïdes, granulocytaires, érythroïdes et des lymphocytes T (Varnum-Finney et al., 2000). Chez l'Homme, la culture de CSH en présence de Jagged1 augmente leur capacité de reconstitution *in vivo*. Elles présentent une augmentation de leur capacité de reconstitution *in vivo* (Karanu et al., 2000). Enfin, la création de souris transgéniques chez lesquelles le gène rapporteur de la GFP est placé sous le contrôle du promoteur de Notch a permis de révéler une co-localisation des Notch avec les niches ostéoblastiques et vasculaires (Duncan et al., 2005).

1.2.3.2. Les cytokines hématopoïétiques

- Le Stem Cell Factor (SCF) se présente sous une forme membranaire (souvent associée aux ostéoblastes) ou soluble. Il se lie sous ces deux formes à son récepteur c-KIT qui est exprimé par les CSH mais s'avère être plus efficace pour le maintien du signal d'activation sous forme membranaire (Miyazawa et al., 1995). SCF stimule l'adhésion des CSH au stroma médullaire par l'activation de molécules d'adhésion comme VLA4 et VLA5 (Kinashi and Springer, 1994).

- D'autres cytokines sont des candidates potentielles au maintien, à l'autorenouvellement et à la prolifération des CSH *in vivo* : les interleukines 6 et 3 (IL-3 et IL-6), Flt3-L et la thrombopoïétine (TPO) utilisées seules ou en combinaison *in vitro* montrent une prolifération des CSH avec un potentiel de reconstitution maintenu pour les 5 premières divisions (Bodine et al., 1989; Petzer et al., 1996).

- Wnt/ N-Cadhérine

Wnt représente une large famille de glycoprotéines secrétées. La β -caténine existe sous deux formes dans la cellule : phosphorylée ou non phosphorylée. La phosphorylation de la β -caténine est assurée par la GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β). Elle permet le ciblage de la β -caténine vers le protéasome et sa dégradation. La fixation de Wnt sur son récepteur Frizzled induit l'inhibition de la GSK-3 β et donc l'accumulation de la forme non phosphorylée de la β -caténine dans le cytoplasme puis sa translocation dans le noyau. Elle s'associe au facteur de transcription de la famille LEF/TCF et active ainsi des gènes cibles. Les protéines Wnt sont exprimées par les CSH et par le microenvironnement médullaire. L'interaction de la molécule soluble Wnt, avec son récepteur Frizzled à la surface des CSH, ou la β -caténine induisent l'autorenouvellement des CSH (Reya et al., 2003; Willert et al., 2003). La N-Cadhérine pourrait être le facteur central de l'ancrage des CSH dans la niche ostéoblastique. Elle est exprimée par les cellules ostéoblastiques ainsi que par une proportion de CSH LSK. Il a récemment été montré qu'une métalloprotéase capable de cliver la N-cadhérine est exprimée dans les fibroblastes et les neurones. Cela provoque la redistribution de la β -caténine qui peut lui être associée par sa portion intracytoplasmique. Le seuil d'activation de la voie Wnt est alors diminué ce qui permet l'activation de la cascade décrite précédemment.

1.3. Colonisation de la moelle osseuse et mobilisation

Le processus de migration des CSH du foie fœtal à la moelle osseuse, ou du sang à travers l'endothélium vasculaire jusqu'à leur niche hématopoïétique dans la moelle osseuse nécessite une navigation active appelée adressage. La moelle osseuse constitue le site de résidence des CSH, mais

il arrive qu'elles se localisent dans la rate, dans la plupart des cas par défaut. Les molécules suivantes sont impliquées dans ce processus:

- les molécules d'adhésion: E-selectine, P-selectine, le couple VLA-4 (Very Late Antigen) et son récepteur VCAM1. Les CSH expriment VLA-4 dont les contre-récepteurs ligands sont exprimés par les cellules endothéliales de la moelle osseuse. Il favorise l'attachement des CSH aux cellules du stroma médullaire. Si l'on bloque VLA-4 ou son récepteur VCAM-1 par l'injection d'anticorps bloquants, on inhibe le « homing » des progéniteurs dans la moelle osseuse (Papayannopoulou et al., 1995).

- les cytokines: SCF et Flt3-L (Flt3-Ligand). Flt3 est présent sur les CSH CD34⁺ tandis que son ligand, Flt3-L, est présent sous sa forme soluble ou membranaire à la surface des cellules endothéliales. Flt3-L joue un rôle important en promouvant l'adhésion des CSH aux cellules endothéliales via des interactions avec VLA-4 et VLA-5 (Solanilla et al., 2003).

- les chimiokines: SDF1 /CXCL12 et son récepteur CXCR4. Les CSH humaines expriment CXCR4, le récepteur de CXCL12/SDF-1. CXCL12 est produit par le stroma médullaire et le tissu osseux (ostéoblastes) en gradient dégressif du compartiment extravasculaire médullaire jusqu'à la lumière du vaisseau sanguin. Ce gradient a été démontré comme essentiel dans le processus de migration du foie fœtal à la moelle osseuse, lors du « homing » des CSH transplantées et donc lors de la reconstitution hématopoïétique (Ma et al., 1998; Peled et al., 1999). CXCL12 exerce une action chimioattractante vis-à-vis des CSH, mais il contribue aussi à la rétention des CSH une fois qu'elles ont rejoint leur niche hématopoïétique

Bien que les CSH soient en grande majorité résidentes dans la moelle osseuse, elles sont capables d'une grande mobilité. Ainsi, des situations de stress comme l'inflammation, l'irradiation, la chimiothérapie ou des protocoles cliniques de traitement au G-CSF ou au Cyclophosphamide concourent à la mobilisation des CSH en périphérie (Petit et al., 2002). Ces traitements permettent d'obtenir des CSH par cytophérèse sans avoir recours au prélèvement médullaire plus lourd à mettre en œuvre dans des protocoles de greffe chez des patients atteints de maladies hématologiques.

Les mécanismes de mobilisation des CSH suite au traitement par G-CSF sont maintenant bien décrits. En réponse au G-CSF, les neutrophiles, ostéoblastes de la moelle osseuse produisent de nombreuses protéases telles que MMP-9 (métalloprotéinase-9), l'élastase et les cathepsines G et K qui dégradent les composants (SDF-1, SCF et VCAM-1) responsables de la rétention des CSH dans la niche hématopoïétique. Il s'ensuit la délocalisation des CSH et des progéniteurs dans le sang (Heissig et al., 2002; Kollet et al., 2006; Kollet et al., 2003; Petit et al., 2002).

2. LES LIGNAGES HEMATOPOÏÉTIQUES

2.1. L'arbre hématopoïétique

2.1.1. *Modèles murins*

Les connaissances actuelles sur le développement hématopoïétique des lignages lymphoïdes et myéloïdes ont été principalement acquises dans des modèles murins. Le développement de souris génétiquement modifiées a contribué de façon importante à la description des voies de différenciation, que dans l'élucidation des mécanismes moléculaires et cellulaires qui y sont liés. Les études réalisées par le groupe de Weissman sont incontournables dans ce domaine. Elles ont permis de mettre en place un modèle de décision binaire qui est toutefois remis en question par des études récentes.

2.1.1.1. *Le modèle binaire.*

Des approches similaires à celles précédemment appliquées pour caractériser les CSH ont été testées pour définir les premières étapes de l'engagement de la CSH vers les différents lignages (**Figure 2a**). Elles ont reposé sur l'utilisation de différentes combinaisons de marqueurs membranaires (récepteurs aux cytokines, molécules d'adhésion) pour discriminer les sous-populations hématopoïétiques. C'est en 1997 qu'a été décrite une population de progéniteurs dont le potentiel est restreint au lignage lymphoïde (T, NK et B), désignée sous le terme de Common Lymphoid Progenitor ou CLP (Kondo et al., 1997). Les CLP ont été identifiés au sein de la population $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^{\text{lo}} \text{c-Kit}^{\text{lo}} \text{Thy-1.1}^-$ par leur expression de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-7. Fonctionnellement, les CLP sont définies par leur capacité à reconstituer sélectivement le compartiment lymphoïde (T, B et NK) à l'exclusion d'autres lignages hématopoïétiques après transfert à des souris immunodéficientes irradiées de façon sublétales. Dans ces expériences, la population lymphoïde diminue progressivement, mettant en évidence le faible potentiel d'autorenouvellement des CLP. Les tests de clonogénicité en méthylcellulose (culture semi-solide) ont également été utilisés pour confirmer que les CLP sont dépourvus de potentiel myélo-érythroïde.

Un progéniteur myéloïde dont le potentiel est restreint au lignage myéloïde (CMP/ Common Myeloid Progenitor) a été décrit peu après (Akashi et al., 2000). Cette cellule est caractérisée par la co-expression du récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines $\text{Fc}\gamma$ ($\text{Fc}\gamma\text{R}$) et du CD34. Le CMP se définit donc phénotypiquement comme $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{IL-7R}\alpha^- \text{Fc}\gamma\text{R}^{\text{lo}} \text{CD34}^+$. L'expression différentielle de CD34 et $\text{Fc}\gamma\text{R}$ permet l'identification de progéniteurs au potentiel hématopoïétique plus restreint que celui des CMP : a) les MEP

(Megacaryocyte-Erythrocyte Progenitor) : $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{IL-7R}\alpha^- \text{Fc}\gamma\text{R}^{\text{lo}} \text{CD34}^-$, b) les GMP (Granulocyte-Macrophage Progenitor) : $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{IL-7R}\alpha^- \text{Fc}\gamma\text{R}^{\text{hi}} \text{CD34}^+$.

En 2001, une population de progéniteurs Flt3^+ , les MPP (pour *multipotent progenitors*) LSK, CD34^+ , $\text{Flt3}^{\text{faible}}$, V-CAM-1^+ a été décrite par le groupe de Weissman (Christensen and Weissman, 2001; Kondo et al., 2001). Cette population est intermédiaire entre la ST-HSC et les CLP et CMP. Elle possède une faible capacité d'auto-renouvellement, mais conserve un caractère multipotent de différenciation dans les lignages lymphoïdes et myéloïdes.

Le modèle de Weissman postule que la première décision binaire lymphoïde/myéloïde s'opère précocement ainsi que la dichotomie entre les lignages Mégacaryocytaire /Erythrocytaire et les lignages Monocytaire /Granulocytaire.

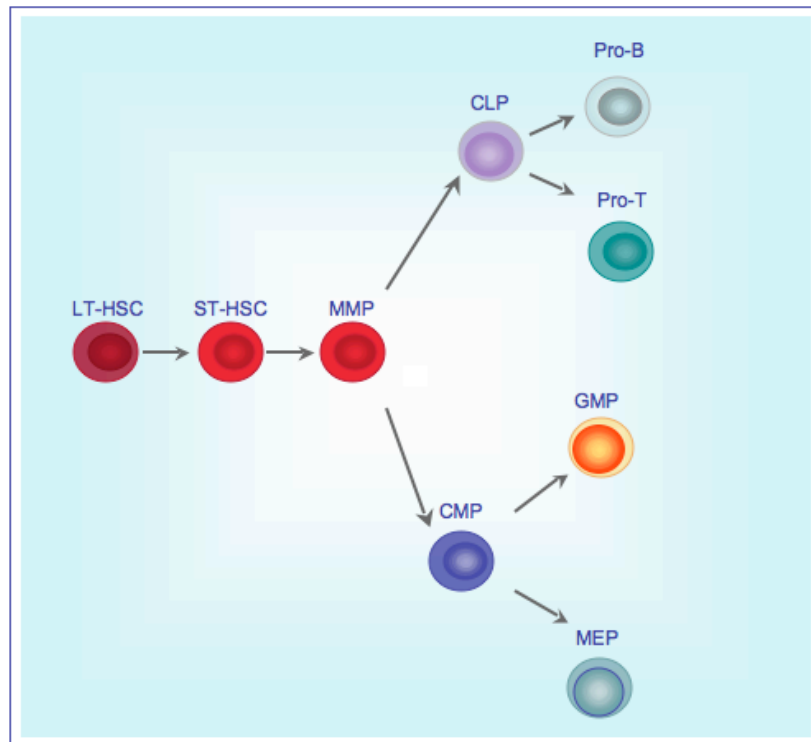


Figure 2a : Modèle murin de l'hématopoïèse selon Weissman

2.1.1.2. Alternatives au modèle de Weissman

Des études récentes ont remis en question la dichotomie parfaite du modèle de Weissman (**Figure 2b**). Adolfsson *et coll.* ont publié en 2005 des travaux mettant en évidence une décision précoce vers le lignage MegE (Megacaryocyte-Erythrocyte) et la distinction d'un progéniteur conservant le potentiel de différenciation en monocyte, granulocyte, et lymphocytes T et B (LMPP /Lymphoid primed Multipotent Progenitor). L'existence d'un tel progéniteur a été contestée en 2006 par les travaux du groupe de Weissman (Forsberg et al., 2006). Il y a donc une controverse.

Il faut toutefois noter que les marqueurs utilisés pour différencier ces populations sont propres à chaque groupe, de même que les protocoles de reconstitution des souris irradiées. (**Tableau 1**)

Une autre controverse existe en ce qui concerne le précurseur des lymphocytes T. Contrairement aux autres lignages hématopoïétiques, les lymphocytes T se développent dans le thymus. Les données de Schwartz *et coll.* suggèrent que le CLP serait incapable de coloniser le thymus et que cette fonction serait assurée par une cellule présente dans le compartiment des CSH LSK (Schwarz and Bhandoola, 2004). Les auteurs décrivent l'existence d'un nouveau progéniteur T (ETP/Earliest T Progenitor) dont le phénotype serait : $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{IL-7R}\alpha^- \text{CD4}^- \text{CD8}^- \text{CD44}^+ \text{CD25}^-$ (Allman et al., 2003). L'ETP possède un fort potentiel de reconstitution du lignage T et n'est pas altéré par l'extinction du facteur de transcription Ikaros (spécifique des lignages lymphoïdes), contrairement au CLP et à la lymphopoïèse B. Ceci démontre une ontogénie indépendante ou bien que ces deux populations, ETP et CLP, sont issues d'une même cellule, mais l'ETP ne dérive pas du CLP.

Au vue de la forte représentation de l'ETP dans le thymus, cette population doit contenir la population de progéniteurs T les plus immatures et représente une population hétérogène. D'autres groupes se sont donc consacrés à l'identification de marqueurs de lignages pour mieux caractériser ce progéniteur thymique. Benz et Bleul ont décrit un progéniteur capable de se différencier en cellules dendritiques (CD), B et T (Benz and Bleul, 2005). Mais ces travaux sont mis en doute par d'autres études qui ne reproduisent pas la différenciation B à partir d'un progéniteur au fort potentiel T (Balciunaite et al., 2005b; Porritt et al., 2004). Balciunaite *et coll.* ont également montré que ces cellules perdaient leur potentiel de différenciation B avant celui du lignage myéloïde, certainement sous l'influence du microenvironnement thymique. De plus, la déficience en PTEN provoque une nette diminution du nombre de CLP et de lymphocytes B, mais augmente les lignages T et myéloïdes. Ces résultats mettent donc en doute cette dichotomie entre lignage T et B (Zhang et al., 2006a). Cette branche de l'arbre hématopoïétique nécessite donc des investigations supplémentaires.

Des différences notables existent entre l'hématopoïèse adulte et fœtale où des progéniteurs au potentiel T/M (macrophage), T/B/M/E (érythrocyte), B/M ou M/B/T mais jamais T/B ont été identifiés (Lu et al., 2002; Mebius et al., 2001)(pour revue (Laios et al., 2006)). Cependant, une étude a mis en évidence un progéniteur $\text{CD45R}^- \text{CD19}^+$ présent dans la moelle osseuse adulte et capable de générer des lymphocytes B et des macrophages (Montecino-Rodriguez et al., 2001). Le groupe de Rolink a également identifié une population dans la moelle osseuse adulte, caractérisée par la combinaison de marqueurs $\text{B220}^+ \text{CD19}^- \text{c-Kit}^{\text{lo}}$, et qui possède un fort potentiel T/B/M

(Balciunaite et al., 2005a; Ceredig et al., 2006). Cette population est nommée ELMP pour Early Lymphoid and Myeloid Progenitor.

Toutes ces études reposent sur l'utilisation de marqueurs phénotypiques différents qui rendent difficile la comparaison des différentes populations.

2.1.2. Le modèle humain

Basées sur les avancées réalisées chez la souris, de nombreuses informations ont pu être obtenues concernant l'arbre hématopoïétique humain grâce à des expériences *in vitro*.

Jusqu'à récemment, le modèle binaire de Weissman prévalait en ce qui concerne l'arbre hématopoïétique humain, et différents groupes se sont attachés à caractériser les populations CLP et CMP à l'aide de différents marqueurs phénotypiques. Néanmoins, les trois dernières années ont vu se multiplier les études remettant en question ce modèle et l'existence du CLP en particulier.

2.1.2.1. Le lignage myéloïde : CMP, GMP et MEP :

En 2002, Manz *et coll.* ont mis en évidence dans la moelle osseuse humaine les populations CMP, GMP et MEP décrites chez la souris (Manz et al., 2002). Leur approche a consisté à rechercher les progéniteurs myéloïdes au sein d'une population définie par l'absence de progéniteurs multipotents et de cellules porteuses de marqueurs de lignage mature (CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56 et la Glycophorine A). Trois populations ont été testées pour leur potentiel hématopoïétique clonogénique en méthylcellulose sur la base d'une combinaison de 3 marqueurs : a) $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^-$, b) $\text{lin}^- \text{CD34}^- \text{CD38}^-$, c) $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$. Cette dernière s'est avérée avoir la plus forte propension au développement myéloïde. Les cellules $\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$ ont été ensuite subdivisées en sous-populations en fonction de l'expression de l'IL-3R α et de CD45RA, dont le potentiel CFU a été analysé en méthylcellulose :

- IL-3R α^{lo} CD45RA $^-$: CMP
- IL-3R α^{lo} CD45RA $^+$: GMP
- IL-3R α^- CD45RA $^-$: MEP

Récemment, les travaux de Edvardsson *et coll.* ont permis d'identifier le récepteur à la thrompoïétine (Tpo-R) comme un marqueur permettant de discriminer les CMP des MEP palliant ainsi l'ambiguïté du marquage IL-3R α . Les CMP sont IL-3R α^{lo} CD45RA $^-$ Tpo-R $^-$ et les MEP IL-3R α^- CD45RA $^-$ Tpo-R $^+$ (Edvardsson et al., 2006).

2.1.2.2. Le lignage lymphoïde : CLP, ETP

De nombreux doutes persistent encore sur l'identification phénotypique du précurseur lymphoïde, mais il est clairement établi qu'il appartient à la population CD34⁺. Le potentiel lymphoïde (B, NK, cellule dendritique/CD) est contenu dans la population CD45RA⁺ (Galy et al., 1995). L'expression du CD7 et du CD10 conjointe sur cette population évolue pour laisser place à des populations dont le potentiel est biaisé soit vers le lignage NK/T (CD7⁺) soit vers le lignage B (CD10⁺) (Haddad et al., 2004; Hao et al., 2001; Rossi et al., 2003). Le CLP peut donc être trié selon la combinaison suivante : CD34⁺CD38^{-/lo} CD45RA⁺CD7⁺CD10⁺.

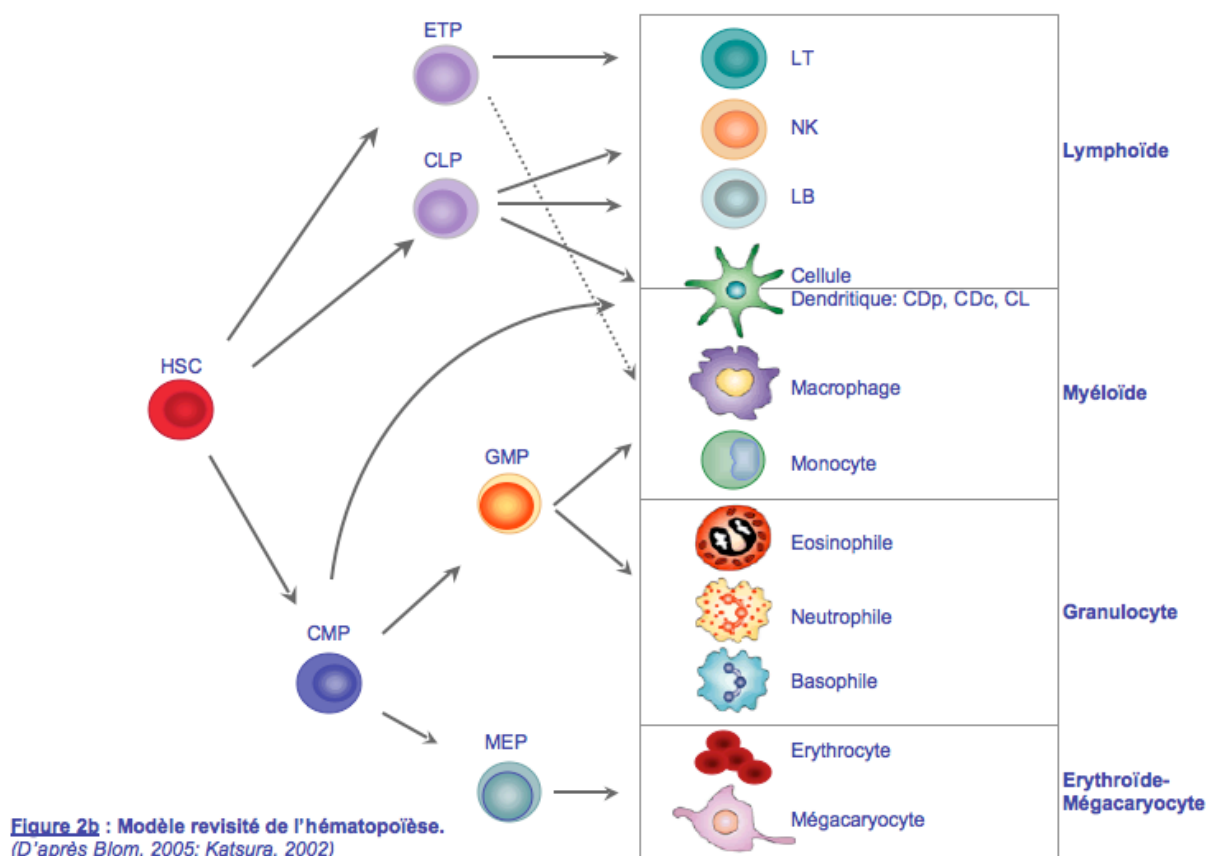
Le progéniteur thymique précoce, comme celui décrit chez la souris, maintient un caractère multipotent vers différents lignages, myéloïdes et lymphoïdes. Il a été caractérisé selon plusieurs discriminations phénotypiques en fonction des groupes et qui peuvent être résumées ainsi :

- a) des progéniteurs T restreints (CD34⁺CD1a⁺) (Weerkamp et al., 2006),
- b) des progéniteurs pluripotents T, B, NK, CD (Haddad et al., 2004; Hao et al., 2001),
- c) des progéniteurs équivalents à l'ETP murin (CD34⁺CD38^{lo}): T, NK, CD (Res et al., 1996)
- d) des progéniteurs multipotents CD34⁺CD1a⁻ : T/B/myéloïde/érythroïde (Weerkamp et al., 2006) ou T/B/myéloïde/érythroïde CDp, CDm (Fohrer et al., 2004).

D'autre part, un progéniteur bipotentiel B/myéloïde a été identifié dans la moelle osseuse (Hou et al., 2005). Défini par l'expression associée de CD34, CD19 et l'absence de CXCR4, ce progéniteur se différencie en cellules B matures exprimant κ/λ et ayant perdu l'expression de CD34 dans des conditions de culture lymphoïde. Lorsque les auteurs ont ensemencé ces cellules en méthylcellulose, ils observent la formation de colonies GM et érythroïdes.

POPULATION	MURIN	HUMAIN
CSH	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺ (LSK)	CD34 ⁺ CD38 ⁻
CLP	Lin ⁻ Sca-1 ^{lo} c-Kit ^{lo} Thy-1.1 ⁺ IL7Rα ⁺	CD34 ⁺ CD38 ^{-/lo} CD45RA ⁺ CD7 ⁺ CD10 ⁺
CMP	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁻ IL-7Rα ⁻ FcγR ^{lo} CD34 ⁺	Lin-CD34 ⁺ CD38 ⁺ IL-3Rα ^{lo} CD45RA ⁻ Tpo-R ⁻
GMP	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁻ IL-7Rα ⁺ FcγR ^{hi} CD34 ⁺	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁺ IL-3Rα ^{lo} CD45RA ⁺
MEP	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁻ IL-7Rα ⁻ FcγR ^{lo} CD34 ⁻	Lin-CD34 ⁺ CD38 ⁺ IL-3Rα ⁻ CD45RA ⁻ Tpo-R ⁺

Tableau 1: Comparaison du phénotype des progéniteurs hématopoïétiques chez la souris et chez l'Homme.



2.1.3. Régulation transcriptionnelle de la différenciation des progéniteurs à partir de la CSH

L'engagement dans un lignage hématopoïétique peut être incité par des facteurs intracellulaires (facteurs de transcription) ou extracellulaires (cytokines, molécules d'adhésion),

chacun pouvant jouer un rôle instructif en induisant de façon active l'engagement (« commitment » en anglais), ou juste permissif et donc additif à d'autres signaux en permettant la croissance et la survie des progéniteurs.

Cet engagement peut être notamment dicté par des modifications qualitatives et quantitatives du profil d'un certain nombre de facteurs de transcription. Deux facteurs en particulier sont impliqués dans la différenciation des CSH en progéniteurs, PU.1 vers les lignages myéloïdes et lymphoïdes, et Ikaros vers le lignage lymphoïde.

PU.1 (Spi-1) est un membre de la famille des facteurs de transcription Ets. PU.1 est exprimé dans les CSH, les progéniteurs multipotents et tous les lignages des cellules du sang en cours de différenciation (McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994). L'inactivation de PU.1 se traduit par un profond défaut du développement des macrophages, cellules B, ostéoclastes et mastocytes, tandis que la différenciation des granulocytes, lymphocytes T et NK présente un net retard et un défaut de différenciation. Les progéniteurs PU.1^{-/-} conservent la capacité à proliférer en présence de cytokines multi-lignée comme l'IL-3, IL-6 et SCF, cependant, elles ne peuvent répondre aux cytokines myéloïdes (G-, M- et GM-CSF) et lymphoïdes (IL-7) en raison de l'absence ou la diminution de l'expression des récepteurs respectifs, l'expression des gènes du G- et M-CSFR étant sous la dépendance du PU.1 (DeKoter and Singh, 2000; DeKoter et al., 1998). Par conséquent, PU.1 contrôle la prolifération, la survie et la différenciation des progéniteurs multipotents induites par les cytokines. De nombreuses études ont montré l'importance du niveau d'expression de PU.1 pour la balance entre engagement myéloïde ou lymphoïde (DeKoter and Singh, 2000; Nutt et al., 2005). En effet, des expériences de réintroduction du gène par des vecteurs rétroviraux dans des progéniteurs PU.1^{-/-} ont montré qu'une faible expression de PU.1 permet l'engagement dans le lignage B, tandis que qu'une expression forte supprime le potentiel B en faveur de la différenciation en macrophages (DeKoter and Singh, 2000).

Ikaros est un facteur de transcription qui appartient à la famille des facteurs à doigt de zinc tout comme Aïlos et Helios. Il est largement exprimé dans le système hématopoïétique, notamment les CSH, les progéniteurs lymphoïdes précoces et les CLP. Les souris qui expriment un dominant négatif de Ikaros (Ik^{DN/DN}) sont incapables de générer les cellules B, T, NK et CD ce qui met en évidence son implication dans la décision vers le lignage lymphoïde, bien que certaines altérations du développement puissent être également observé dans le lignage myéloïde (Georgopoulos, 2002; Georgopoulos et al., 1994; Lopez et al., 2002). Ikaros semble favoriser le lignage lymphoïde notamment par l'induction de l'expression de Flt3 et la répression du GM-CSFR (Nichogiannopoulou et al., 1999).

2.2. Lignage lymphoïde

2.2.1. Développement des lymphocytes B

- Les différentes étapes du développement B humain

Les étapes de développement B chez l'adulte ont lieu dans la moelle osseuse. Ce n'est que dans les années 70 que Max Cooper *et coll.* ont découvert que la cellule B qui arborait une immunoglobuline (Ig) à sa surface provenait d'un précurseur de la moelle osseuse, qui lui ne l'exprimait pas (Raff et al., 1976). La lymphopoïèse B est guidée par le réarrangement des gènes de l'Ig et la construction du récepteur à l'antigène, le BCR (B cell Receptor). Plusieurs points de contrôle permettent de tester ces BCR néoformés pour leur capacité à reconnaître un antigène exogène tout en conservant une réactivité minimale vis-à-vis du soi (Figure 3).

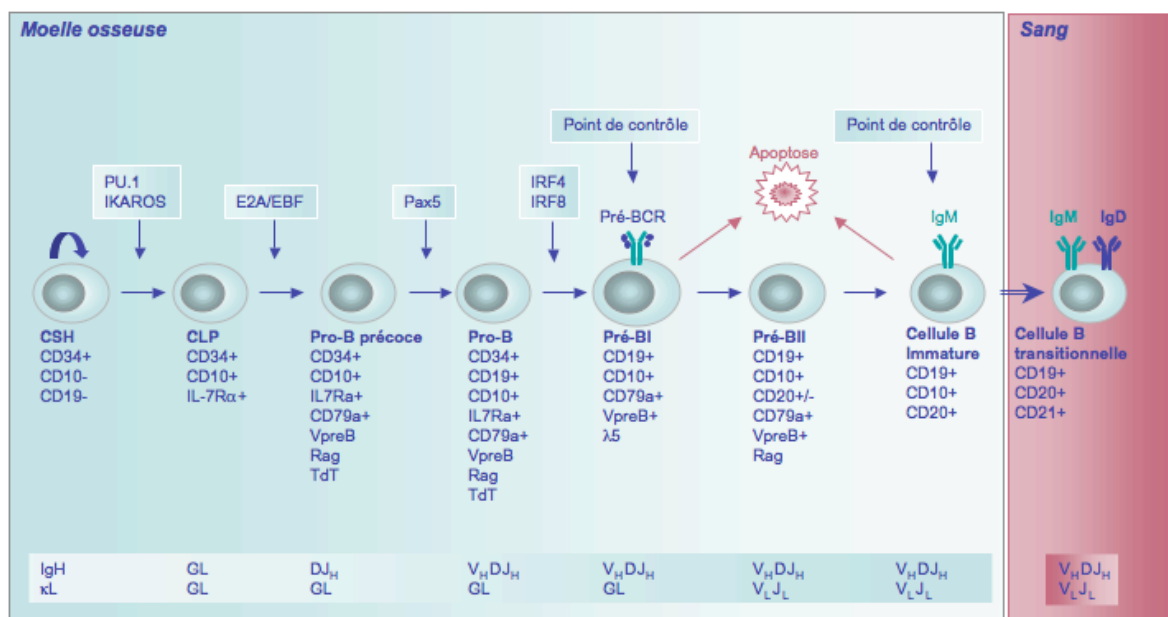


Figure 3: Développement des lymphocytes B. (D'après LeBien, 2000, Blom 2005)

La différenciation B est la conséquence de réarrangements strictement régulés de segments de gènes : V (Variable), D (Diversité), J (Jonction) pour la chaîne lourde de l'Ig (VDJ_H), V et J pour la chaîne légère (VJ_L). Elle se caractérise par la succession de plusieurs stades de différenciation :

- **STADE PRO-B PRECOCE /PRO-B.** Les réarrangements D_HJ_H par les recombinaisons RAG1 et 2 (Recombinaison Activating Gene) peuvent être mis en évidence dès le stade CLP et au stade pro-B précoce $CD34^+CD10^+CD19^-$ (Loken et al., 1987). À ce stade, les cellules expriment également : a) $Ig\alpha/CD79a$, un composant de l'hétérodimère associé à la molécule d'Ig et responsable de la transduction du signal, b) VpreB, un composant de la « pseudo-chaîne légère », sur lequel nous reviendrons plus loin (Bertrand et al., 1997; Dworzak et al., 1998; Wang et al., 1998).

On trouve exprimée dans la grande majorité des cellules à ce stade l'enzyme TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transférase) qui génère une diversité qui se surimpose aux réarrangements VDJ en ajoutant de manière aléatoire des nucléotides entre les segments géniques réarrangés (Ghia et al., 1996; Loken et al., 1987). Le stade pro-B se caractérise par l'acquisition de CD19 sous l'influence de l'expression du facteur de transcription Pax-5.

- **STADE PRE-B.** À ce stade, le réarrangement VDJ des chaînes lourdes est achevé permettant l'expression d'une chaîne lourde μ . La différenciation en cellule pré-BI se caractérise par la perte d'expression du CD34, de la TdT et par l'expression cytoplasmique de la chaîne lourde $Ig\mu$ (Ghia et al., 1996; Loken et al., 1987).

Ce stade se divise en plusieurs sous-populations en fonction de l'activité mitotique des cellules. On distingue les grandes cellules proliférantes pré-BI (Large pre-B), puis les petites cellules pré-BII (Small pre-BII). C'est au stade pré-BI que s'exprime en surface la chaîne lourde μ néoformée en association avec la pseudo-chaîne légère (ΨLC) qui est définie par l'association de VpreB et $\lambda 5/14.1$ (Wang et al., 1998). Le complexe pré-BCR est constitué de ΨLC et des hétérodimères $Ig\alpha/Ig\beta$. VpreB et $\lambda 5$ sont associés de manière non-covalente, alors que $\lambda 5$ se lie de façon covalente au domaine C_H de $Ig\mu$. L'expression à la membrane du pré-BCR se restreint au stade pré-B (Lassoued et al., 1993; Wang et al., 1998).

L'expression du complexe pré-BCR est un point de contrôle au cours du développement B. Il permet d'éliminer les clones B dont le réarrangement VDJ_H a échoué, ou pour lesquels la conformation de la chaîne μ ne permet pas un appariement à la ΨLC . Si le réarrangement du premier locus n'est pas fonctionnel, le deuxième est alors réarrangé. L'échec du réarrangement VDJ_H sur les deux allèles conduit à l'apoptose des cellules B (**Figure 3**). Cette étape représente un point de contrôle crucial du développement B, un pré-BCR non fonctionnel conduisant à la mort de la cellule (Lu and Osmond, 1997).

Les mécanismes qui conduisent à la transmission d'un signal de sélection positive et de prolifération via le pré-BCR sont encore controversés. Dans le premier cas, l'association du pré-BCR et son expression à la surface est suffisante à induire la signalisation par $Ig\alpha/\beta$ puis la cascade

d'activation qui s'ensuit. Dans ce cas, l'expression du complexe $Ig\alpha/\beta$, stabilisée par le pré-BCR suffirait à initier la signalisation comme tendent à le prouver les expériences réalisées avec une forme tronquée de $Ig\alpha/\beta$ à laquelle il manque la partie extra-cellulaire (Corcos et al., 1995; Shaffer and Schlissel, 1997). On ne peut toutefois exclure la possibilité que la surexpression de ce complexe à la surface permette une agrégation non physiologique du pré-BCR. Une autre étude montre que l'expression ciblée à la face interne de la membrane cytoplasmique du motif ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) de $Ig\alpha$ et $-\beta$, et donc dépourvue de la portion extracellulaire, permet la différenciation du stade pro-B à pré-B (Bannish et al., 2001).

Cependant, deux séries d'études réalisées chez l'Homme et chez la souris sont en faveur de l'existence d'un ligand non polymorphe du pré-BCR. L'utilisation d'une forme recombinante soluble du pré-BCR a permis d'identifier sur les cellules stromales la Galectine-1 comme ligand du pré-BCR (Gauthier et al., 2002). Il s'agit d'une lectine qui est capable de se lier à un membre de la famille des intégrines. La liaison de la galectine-1 au pré-BCR permet l'activation de la signalisation via $Ig\alpha/\beta$. La deuxième étude a montré que l'heparan sulfate du stroma est un ligand potentiel chez la souris (Bradl et al., 2003).

L'importance de l'étape de sélection du pré-BCR est mise en évidence par différentes anomalies de $Ig\mu$, de la chaîne légère $14.1/\lambda 5$, ou de l'hétérodimère $Ig\alpha$ ou $-\beta$ chez l'Homme qui provoquent une hypogammaglobulinémie suivie par l'apparition d'infections graves. Ces déficiences se caractérisent par un blocage au stade pro-B dans la plupart des cas, avec une absence de cellules pré-B et de cellules B matures en périphérie (Lopez et al., 2002; Meffre et al., 2001; Minegishi et al., 1998; Yel et al., 1996).

Une fois ce point de contrôle achevé, la signalisation via le pré-BCR induit l'expansion clonale des cellules sélectionnées positivement (**Figure 4**). L'activation du pré-BCR implique la phosphorylation des motifs ITAMs de $Ig\alpha$ et $-\beta$ et la formation d'un complexe associé aux radeaux lipidiques. Ce complexe est formé des tyrosines kinases phosphorylées Lyn, Syk et Btk (Bruton's Tyrosine Kinase) ainsi que d'autres protéines phosphorylées comprenant SLP-65 (BASH ou BLNK/B cell linker), PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) et PLC γ 2 (Phospholipase-C γ 2) (Guo et al., 2000; Kouro et al., 2001). La PI3K et la PLC γ 2 concourent à la libération du calcium intracellulaire et à l'activation de la PKC permettant l'activation de la voie de signalisation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Marshall et al., 2000). Cette voie de signalisation permet la prolifération et la différenciation des cellules pré-B, ainsi que le réarrangement de la chaîne légère (Iritani et al., 1999; Marshall et al., 2000; Nagaoka et al., 2000; Shaw et al., 1999). Dans les cellules pré-B, l'expression de Rag 1 et 2 est diminuée au fur et à mesure que s'achève le réarrangement de $Ig\mu$ afin d'assurer l'exclusion allélique qui interdit le réarrangement du deuxième

allèle pour éviter l'expression de deux chaînes μ dans la même cellule. Ceci permet de maintenir la spécificité clonale du BCR. Après un nombre limité de cycles cellulaires, la cellule pré-BI se différencie en pré-BII, plus petite et quiescente. Cette transition est associée à la réexpression de la machinerie nécessaire à l'initiation du réarrangement de la chaîne légère. Ces cellules initient l'expression de la chaîne légère IgL, en commençant par le locus Igk réarrangeant V à J κ . La chaîne κ est réarrangée en premier, un allèle après l'autre si le premier n'est pas fonctionnel. Si aucun des deux réarrangements n'est productif, il s'en suivra alors le réarrangement de λ . Un réarrangement productif permet l'expression d'une molécule d'IgM membranaire complète caractérisant ainsi le stade B immature.

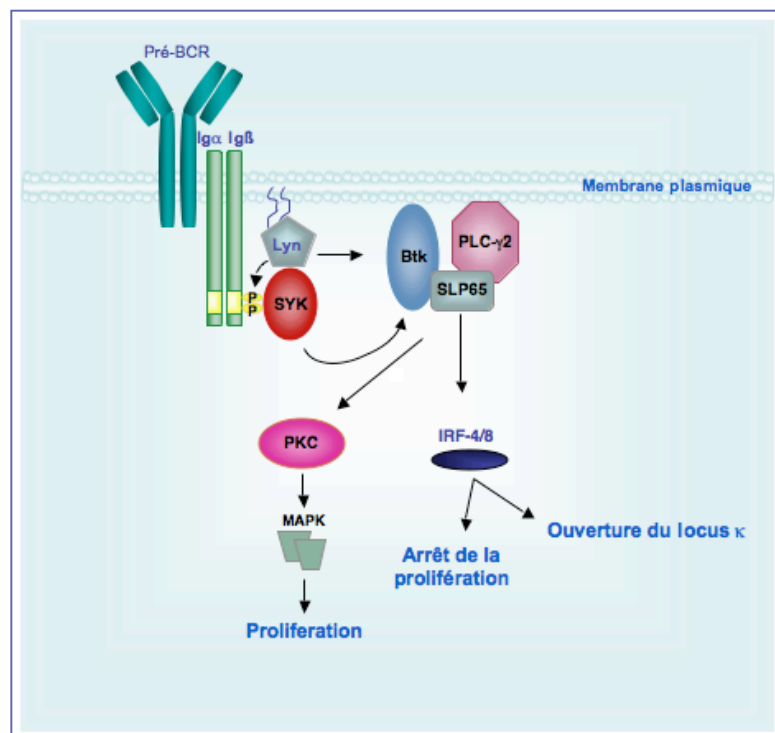


Figure 4: La signalisation par le pré-BCR. (D'après Niuro et Clark, 2002; Melchers, 2005).

- **STADE B IMMATURE.** Un deuxième point de contrôle a lieu afin d'éliminer les cellules B qui n'ont pu réarranger correctement un BCR ou dont le BCR est auto-réactif (Lu and Osmond, 1997). Lorsque aucune affinité pour le soi n'est constatée, la cellule B dite transitionnelle est capable de migrer en périphérie. Cependant, une affinité faible conduit à l'anergie, tandis qu'une affinité forte entraîne la délétion clonale de la cellule par apoptose ou dans certains cas au réarrangement du BCR, processus de révision (receptor editing) (Goodnow et al., 1995; Nemazee and Buerki, 1989; Norvell et al., 1995). Ce réarrangement semble exister tant pour la chaîne lourde que la chaîne légère (pour revue : (Edry and Melamed, 2004)) et pourrait être le mécanisme

principal pour induire la tolérance vis à vis des antigènes membranaires avant même la délétion clonale ((Halverson et al., 2004) et pour revue revue : (Pelandra and Torres, 2006)).

- *Régulation par les facteurs de transcription*

De nombreuses études ont été consacrées au contrôle transcriptionnel de l'engagement B. L'initiation du programme B est régulée par deux facteurs de transcription, E2A et EBF (Early B cell Factor), tandis que l'engagement dans le lignage B est verrouillé par Pax5 (**Figure 3, 9**).

- Le gène *E2A* code pour deux protéines, E12 et E47 qui appartiennent à la famille de facteurs de transcription Hélice Boucle Hélice (bHLH/basic Helix Loop Helix). Ces protéines, ainsi que HEB et E2.2 appartiennent à la famille des protéines E. E2A est largement exprimé dans les tissus sous forme d'hétérodimères. Cependant, dans le lignage B, il fonctionne uniquement sous forme d'homodimère. Les souris *E2A^{-/-}* se caractérisent par un arrêt du développement B à son stade le plus précoce, aucun réarrangement du locus de μ , pas d'expression de CD19, RAG1, $Ig\alpha$ (mb-1), ou Pax5. Cependant, $Ig\beta$ (B29) et IL-7R α sont exprimés (Bain et al., 1994; Zhuang et al., 1996). Il est intéressant de noter que la lymphopoïèse B dépend du dosage des protéines E puisque l'absence de E12 ou E47 bloque sévèrement le développement B tandis qu'il est réduit de moitié chez les souris déficientes pour HEB (Zhuang et al., 1996). L'expression d'un antagoniste des protéines E, Id3 (Inhibitors of DNA binding) par transfert de gène avec des particules rétrovirales dans des CSH humaines inhibe dramatiquement et prématurément leur potentiel de différenciation en cellules B (Jaleco et al., 1999). Cette étude confirme l'importance des protéines E dans le développement B. Dans ces cellules, le potentiel des lignages NK et monocytaire est conservé démontrant l'indépendance de ces lignages pour ces protéines. E2A possède des sites de liaison à l'ADN dans les deux enhancers de κ , mais aucun rôle direct n'a encore été démontré dans l'activation de ce gène (Inlay et al., 2004).

- EBF forme également des homodimères que l'on trouve exprimés à tous les stades du développement B à l'exception du plasmocyte. Les souris déficientes pour EBF ne présentent aucune cellule B mature, et très peu de progéniteurs B, phénotype similaire à celui d'E2A (Lin and Grosschedl, 1995). Ces résultats suggèrent une action concertée de E2A et EBF. Cette hypothèse a été confirmée par la génération de souris *E2A^{+/-}EBF^{+/-}* où le développement B se trouve arrêté au stade pro-B à cause de l'expression réduite des gènes *RAG1* et *RAG2* (O'Riordan and Grosschedl, 1999). Elle est également soutenue par des études moléculaires qui ont montré que E2A et EBF se lient et activent conjointement les promoteurs de $\lambda 5$, *VpreB*, et *Ig\alpha* (Sigvardsson, 2000;

Sigvardsson et al., 2002; Sigvardsson et al., 1997). Cependant, EBF régule seul le promoteur d'Ig β (Akerblad et al., 1999). Ces études ont permis de mettre en évidence l'implication de E2A et EBF dans l'expression de la pseudo-chaîne légère ($\lambda 5$, VpreB), des éléments de signalisation (Ig α , Ig β) du pré-BCR, ainsi que la transcription des sous unités RAG1 et RAG2 de la recombinaison pour V(D)J. E2A et EBF sont également impliqués dans la première étape de réarrangement de IgH au niveau des segments D_H-J_H par la régulation de RAG1 et RAG2.

- Pax5. Bien que l'expression d'E2A et EBF permette le réarrangement de l'IgH, ces facteurs de transcription ne sont pas suffisants pour l'engagement des progéniteurs dans le lignage B en absence de Pax5 (ou BSAP/B-cell specific Activator Protein) (Urbanek et al., 1994). Pax5 est exprimé dans le lignage B et dans le système nerveux central. Il est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de gènes associés au lignage B tels que : CD19, SPL-25, Ig α et LEF-1 (Lymphoid-Enhancer binding Factor1) (Nutt et al., 1998). Pax5 permet aussi l'initiation de la seconde étape du réarrangement des chaînes lourdes V_H-D_HJ_H (Nutt et al., 1999; Zhang et al., 2006b). Il agit en aval de EBF et E2A puisque les cellules pro-B Pax5^{-/-} expriment les gènes cibles d'E2A et EBF. Le développement est bloqué au stade pro-B dans des souris Pax5^{-/-} (Nutt et al., 1999). Comme l'a montré le groupe de Busslinger, Pax5 joue également un rôle important dans la signalisation du pré-BCR. Les cellules pro-B des souris Pax5^{-/-} sont incapables d'initier la signalisation du pré-BCR exprimé à leur surface suggérant que Pax5 pourrait contrôler la transcription d'une molécule cruciale de la voie de signalisation. Leurs travaux ont mis en évidence que Pax5 possède un site de liaison dans la région proximale du promoteur de *SLP-65* et régule ainsi l'expression de ce gène (Schebesta et al., 2002). De manière surprenante, les cellules pro-B Pax5^{-/-} peuvent être maintenues ex-vivo en présence d'IL-7, mais conservent un potentiel lymphomyéloïde qui se révèle dès qu'on les prive d'IL-7 et permet alors l'émergence de cellules NK, CD, macrophages, ostéoclastes et granulocytes (Nutt et al., 1999). De plus, si on reconstitue des souris Rag2^{-/-} avec des cellules pro-B Pax5^{-/-}, on observe une reconstitution à long terme du thymus avec une apparition rapide des cellules T, dès une semaine. On peut voir apparaître en 2-3 mois des macrophages et des granulocytes, et il faut 4 à 6 mois pour générer des érythrocytes (Rolink et al., 1999; Schaniel et al., 2002).

Ce n'est que lorsque Pax5 est exprimé que l'on observe une restriction forte dans le lignage B. Des expériences de suppression de Pax5 dans des progéniteurs B soulignent que Pax5 contribue à l'expression du programme transcriptionnel B et permet son maintien dans le développement B précoce (Mikkola et al., 2002). L'absence de Pax5 permet à ces cellules de se développer en lymphocyte T *in vivo* ou en macrophage *in vitro*. Ces travaux montrent que la perte de Pax5 est suffisante pour inverser l'engagement dans le lignage B. L'expression de Pax5 est certes

responsable de l'activation de gènes du lignage B, mais elle l'est également de la répression de gènes d'autres lignages comme le *M-CSFR* et *Notch1* (Souabni et al., 2002).

- IRF4 et IRF8. Alors que E2A, EBF et Pax5 permettent l'expression du pré-BCR, IRF4 et IRF8 (Interferon Regulatory Factor) semblent être impliqués dans l'arrêt de la signalisation par le pré-BCR. La lymphopoïèse B est bloquée au stade pré-B dans les souris doubles déficientes IRF4^{-/-} IRF8^{-/-}, mais ces cellules continuent à cycler sous l'influence des signaux du pré-BCR (Lu et al., 2003). Certains travaux mettent en évidence l'association entre PU.1 et IRF4 dans l'activation du locus de κ . Bien qu'il n'y ait pas de sites de liaison attribués à ces facteurs de transcription dans les introns de κ , il semble qu'ils puissent se lier à l'enhancer $\epsilon\kappa3'$ (Eisenbeis et al., 1995; Lu et al., 2003; McDevit et al., 2005). Cette fonction de IRF4 pourrait contribuer au défaut d'activation de κ dans les souris IRF4^{-/-}IRF8^{-/-}.

Les quelques études menées chez l'Homme sont en accord avec les résultats obtenus chez la souris. La suppression de PU.1 dans les CSH CD34⁺CD38⁻ provoque l'inhibition de la différenciation en cellules B, monocytes, et CDp confirmant le rôle de ce facteur dans les lignages myéloïdes et lymphoïdes (Schotte et al., 2004).

- *Régulation par les cytokines*

De nombreuses études démontrent l'importance de l'IL-7 dans la différenciation ou l'expansion des progéniteurs B murins (pour revue : (Milne and Paige, 2006)). Cependant, cette cytokine n'est pas absolument requise chez l'Homme ou bien est redondante. En effet, les patients atteints d'immunodéficience sévère liée à l'X (SCID-X) présentant des mutations au niveau de la chaîne γ_c des récepteurs à l'IL-2, 4, 7, 9 et 15, possèdent des nombres normaux voire augmentés de cellules B périphériques (Noguchi et al., 1993). De même, des patients atteints de mutations au niveau de l'IL-7R α ou de la kinase janus (JAK) qui appartient à sa voie de signalisation présentent également un développement lymphoïde B normal (Macchi et al., 1995; Puel et al., 1998; Russell et al., 1995).

Flt3-L pourrait être une cytokine candidate à la régulation du lignage B humain. Il a été rapporté que Flt3-L favorise la prolifération des pro-B CD34⁺CD19⁺ et le développement du lignage B CD19⁺ à partir de CSH CD34⁺ (Namikawa et al., 1996; Rawlings et al., 1997).

Chez la souris, de nombreux travaux mettent en évidence le rôle de CXCL12 ou de molécules d'adhésion comme VLA-4 dans la rétention des progéniteurs B au niveau de la moelle osseuse (Glodek et al., 2003; Tokoyoda et al., 2004).

2.2.2. Développement des lymphocytes T

- *Les différentes étapes du développement T humain*

Dans le thymus, les lymphocytes T se différencient à partir de progéniteurs multipotents dérivés de la moelle osseuse. Les précurseurs thymiques précoces qui colonisent le thymus peuvent se différencier en NK, cellules dendritiques conventionnelles (cCD) et cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp) (Weijer et al., 2002). Les progéniteurs thymiques expriment CD34⁺ mais pas le CD1a qui est acquis au cours de l'engagement dans le lignage T (Blom et al., 1999). À ce stade pré-T CD1a⁺, les cellules ont réarrangé les segments VDJ des TCR β , γ et δ , elles expriment Rag1, CD3 ϵ intracytoplasmique, CD2 et CD7 (Blom et al., 1997; Blom et al., 1999). Il s'ensuit l'acquisition de l'expression de CD4 qui forme la population CD4⁺ immature simple positive/CD4ISP précurseur des lignages T $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (Galy et al., 1993; Hori et al., 1991). C'est à ce stade qu'a lieu la scission entre les deux lignages T (**Figure 5**). C'est également à ce moment que commence la sélection β qui permet la sélection des cellules qui ont correctement réarrangé le TCR β . Cette étape dépend de l'expression d'un pré-TCR constitué de β associé à la chaîne α du pré-TCR (préT α). Un réarrangement correct permet la transduction d'un signal de survie et de différenciation (pour revue (von Boehmer and Fehling, 1997)). Les cellules qui ont échoué au réarrangement du TCR β sont éliminées par apoptose. L'exclusion allélique permet de bloquer le réarrangement de l'autre allèle β et l'initiation du réarrangement du TCR α . La différenciation se poursuit pour donner lieu à la cellule double positive (DP) précoce CD4⁺CD8 $\alpha^{-}\beta^{+}$ (double positive précoce) puis aux cellules doubles positives CD4⁺8 $\alpha\beta^{+}$. Le réarrangement de la chaîne α du TCR est initié une fois celui de la chaîne β accompli au stade DP. Le TCR nouvellement formé est alors testé pour son affinité envers des peptides du soi exprimés par le microenvironnement thymique tels que les cellules épithéliales. Les cellules sélectionnées positivement expriment CD3 et se différencient en cellule simple positive mature (SP) CD4⁺ ou CD8⁺.

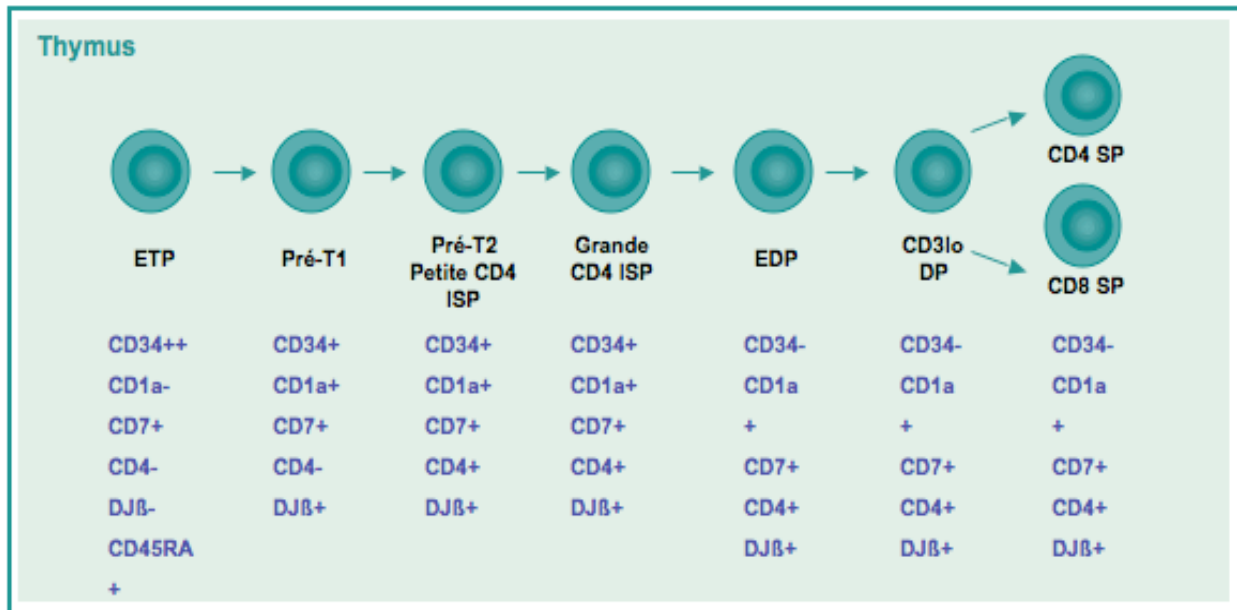


Figure 5: Développement des lymphocytes T chez l'Homme. (D'après Blom 2005)

- *Régulation par les facteurs de transcription et les cytokines*

- **NOTCH1** et ses ligands jouent un rôle primordial dans le développement T (**Figure 9**). L'inactivation du gène Notch1 provoque une inhibition du développement T dans le thymus et stimule l'émergence de cellules B. Il a ainsi été identifié comme déterminant dans le choix de l'engagement T aux dépens du lignage B (Radtko et al., 1999). A l'inverse, l'expression forcée de la portion intracytoplasmique de Notch1 (ICN) dans les précurseurs hématopoïétiques humains induit la différenciation T $\alpha\beta$ dans la moelle osseuse avec apparition de la population de précurseurs $CD34^+CD1a^+$ normalement restreinte au thymus (De Smedt et al., 2002). Les lignées stromales murine S17 ou OP-9, après transfection par le ligand DL1 de Notch permettent de générer des précurseurs $CD7^+$ avec un fort potentiel de différenciation en cellules T/NK (Collins and Dorshkind, 1987; Jaleco et al., 2001; La Motte-Mohs et al., 2005).

- Le rôle de **GATA3** est clairement établi dans la lymphopoïèse T chez la souris, puisque l'inactivation du gène GATA3 bloque le développement T dès les stades précoces (Ting et al., 1996). Peu de données sont disponibles concernant le rôle de ce facteur dans la lymphopoïèse T humaine mais la surexpression de GATA3 dans des CSH $CD34^+$ stimule la différenciation en cellules $CD4^+CD8^+$, et démontre ainsi son rôle dans la lymphopoïèse T précoce.

- Les membres de la famille des **PROTEINES E** sont aussi impliqués dans la différenciation T humaine. En effet, l'expression de leurs antagonistes Id2 et Id3 dans les cellules $CD34^+$ inhibe le développement T en faveur du développement des cellules NK (Heemskerk et al., 1997).

- L'**IL-7** est importante pour le développement T chez la souris, mais essentielle chez l'Homme. Les patients SCID-X sont caractérisés par une absence totale de lymphocytes T alors que le développement B qui est normal (Noguchi et al., 1993; Puel et al., 1998). Les patients porteurs de mutations au niveau de Jak présentent les mêmes anomalies du développement T (Macchi et al., 1995; Russell et al., 1995).

2.2.3. Développement de cellules NK

- *Les différentes étapes du développement NK humain*

Les cellules NK jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée ainsi que dans l'induction d'une réponse adaptative. Les cellules NK partagent avec les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) la capacité de tuer d'autres cellules par la production de cytokines comme l'interféron γ (IFN- γ). On distingue chez l'Homme deux populations de cellules NK, la première exprime fortement CD56 et peu de CD16 alors que la deuxième est CD56⁺CD16^{hi} (Cooper et al., 2001; Nagler et al., 1989). Les fonctions de ces cellules sont différentes en ce sens que la première a une plus faible activité cytolytique et produit plus de cytokines que la seconde. Le consensus est que les cellules NK se différencient dans la moelle osseuse chez l'adulte, mais il reste encore beaucoup à découvrir sur les étapes de leur développement. De nombreuses études confortent l'idée que les cellules NK et T ont une origine commune (Sanchez et al., 1994). Un précurseur thymique humain CD34⁺CD33^{lo} qui possède une bipotentialité NK et CD a récemment été décrit (Marquez et al., 1998).

Le développement du lignage NK chez l'Homme est encore mal connu (**Figure 6**). Ce n'est que très récemment qu'un précurseur capable de se différencier en cellule NK CD56⁺ a été décrit dans les ganglions (Freud et al., 2005). Ce précurseur CD34^{lo}CD45RA⁺CD7^{+/-} α 4 β 7^{hi}CD10⁻ pourrait se trouver en aval du progéniteur lymphoïde CD34⁺CD45RA⁺CD7⁺CD10⁻ ou CD10⁺ que l'on trouve dans la moelle osseuse. Cette cellule pourrait donner lieu à la cellule NK immature (NKi) qui exprime CD161 (NKR-P1) (Bennett et al., 1996). La culture des NKi en présence d'IL-15 ou de Flt3-L permet l'activation de l'expression de CD56 et/ou CD16, ainsi que des récepteurs activateurs (NKG2A) ou inhibiteurs KIR (killer inhibitor Receptor) (Miller and McCullar, 2001; Sivori et al., 2002).

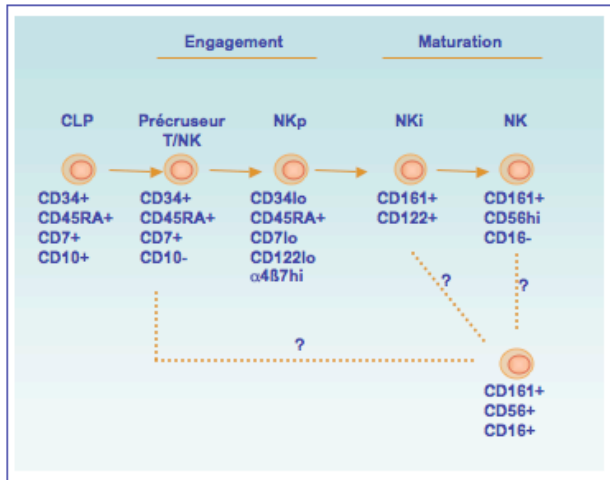


Figure 6: Développement des NK chez l'Homme. (D'après Blom 2005)

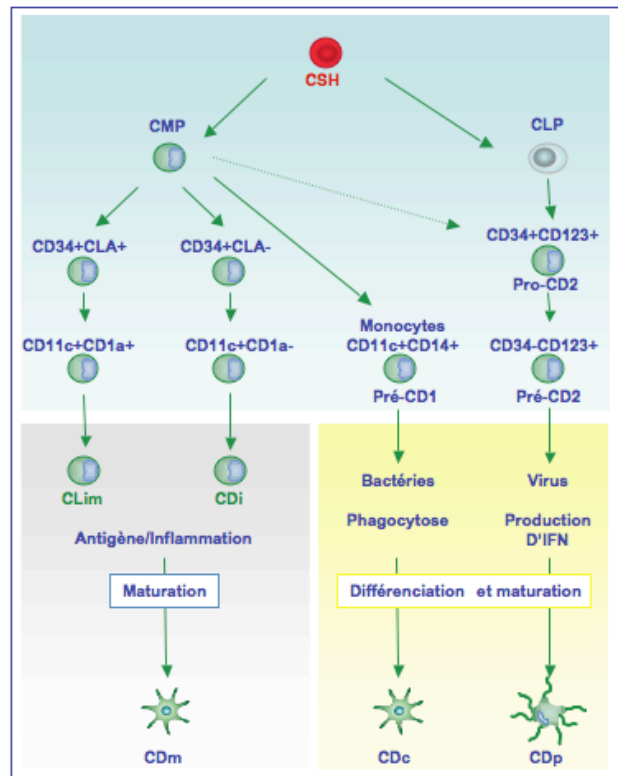


Figure 7: Développement des CD chez l'Homme. (D'après Bancheau, 2000; Liu, 2001-2005)

- Régulation par les facteurs de transcription et les cytokines

- Les **PROTEINES E** telles qu'E2A ou HEB interviennent vraisemblablement comme des régulateurs négatifs de la différenciation NK. En effet, la surexpression dans des CSH humaines de Id2 ou Id3, deux antagonistes des protéines E, favorise le développement NK mais inhibe la différenciation T, B et CDp (Heemskerk et al., 1997; Jaleco et al., 1999; Spits et al., 2000). Par ailleurs, l'inactivation d'Id2 chez la souris provoque l'inhibition du développement des cellules NK (Ikawa et al., 2001). Enfin, les travaux récents du groupe de Spits montrent que la surexpression ou l'inactivation de HEB altère le potentiel de différenciation des CSH CD34⁺ humaines dans le lignage NK.

- **NOTCH-1** est également impliqué dans le développement des cellules NK mais sa contribution reste à clarifier. En effet, la stimulation des CD34 par le ligand DL1 provoque l'engagement dans les lignages T/NK (Jaleco et al., 2001). Ces résultats contrastent avec ceux qui sont obtenus *in vitro* dans le système FTOC. Si l'on inhibe la signalisation de Notch dans ce système, on observe de manière attendue une inhibition du développement T, mais de façon surprenante, une augmentation du développement des cellules NK (De Smedt et al., 2005). Ainsi, Notch pourrait avoir un rôle différent en fonction du stade de développement des cellules NK.

- **L'IL-15** est primordiale pour le développement des cellules NK comme l'indique la déficience en cellules NK observée chez des patients SCID atteints d'un défaut de la chaîne γc (Fischer et al., 2005). L'implication de l'IL-15 est confortée par le fait que des patients déficients pour l'IL-2 ou l'IL-2R α ont des nombres normaux de cellules NK (DiSanto et al., 1990; Roifman, 2005).

2.2.4. Développement des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CD) sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles qui possèdent une grande capacité d'activation des lymphocytes T naïfs et initient ainsi la réponse immunitaire primaire. D'autres fonctions sont également associées à certaines populations de CD comme l'induction de la tolérance périphérique, la polarisation des cellules T et un rôle effecteur dans l'immunité innée contre les pathogènes. L'origine et le développement des CD restent encore confus si l'on considère la multiplicité des populations de CD maintenant décrites (**Figure 7**). Cette multiplicité s'explique soit par l'existence de plusieurs voies de différenciation, soit par l'hétérogénéité des tissus dans lesquels les CD terminent leur maturation. Comme les autres cellules du système immunitaire, les CD immatures (CDim) sont produites à partir des CSH de la moelle osseuse. Sur la base de l'expression de CLA (cutaneous lymphocyte antigen), on peut distinguer deux populations qui proviennent du CMP. La première est CLA⁺, elle acquiert ensuite CD11c et CD1a, et elle est à l'origine de la cellule de Langerhans (CL) immature qui rejoindra ensuite les épithélia pluristratifiés de l'épiderme (Strunk et al., 1997). Cette cellule peut être obtenue *in vitro* par la culture des précurseurs hématopoïétiques en présence de GM-CSF et TNF- α (Caux et al., 1992). La seconde est CLA-CD1a⁻CD11c⁺ et migre vers le derme et autres tissus et devient la CD interstitielle (Strunk et al., 1997).

Parallèlement au développement des cellules de langerhans et des CD interstitielles, il existe deux autres voies de différenciation : myéloïde pour les pré-CD1 (précurseurs de CD), lymphoïde pour les pré-CD2, et sont à l'origine des CD plasmacytoïdes (CDp) productrices d'interféron. Les pré-CD1 expriment les antigènes myéloïdes CD11b, CD11c, CD13, CD14, et CD33 et sont dites CD conventionnelles (CDc). Ces cellules sont des monocytes circulants qui se différencient en cellules immatures CD1 après cinq jours de cultures en présence de GM-CSF et d'IL-4, ou après avoir phagocyté des bactéries (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). L'origine lymphoïde des pré-CD2 est suggérée par l'expression d'antigènes ou de transcrits définis comme lymphoïdes (CD2, CD5, CD7, pré-TCR α , $\lambda 5/14.1$, réarrangement de l'IgH D-J, Spi-B) (Res et al., 1999). De plus, elles ne présentent aucun antigène spécifique du lignage myéloïde tels que CD33, CD11b ou CD13 et possèdent une faible activité de phagocytose (Grouard et al., 1997; Res et al., 1999). Ces cellules

sont retrouvées dans les amygdales, le sang périphérique et le thymus. Cependant, des travaux récents ont démontré que les CDp peuvent également être générées à partir de CMP, GMP, et CLP issues du sang de cordon (Chicha et al., 2004). Ainsi, l'origine des CDp semble être moins restrictive qu'envisagée précédemment et suggère une certaine plasticité de leur développement. Les travaux de Blom ont permis de définir les différentes étapes du développement des CD2/CDp (Blom et al., 2000). Les progéniteurs des CDp appartiennent à la population CD34^{lo}, expriment CD45RA, CD4 et CD123 (chaîne α du récepteur à l'IL-3/IL-3R α) et se définissent comme pro-CD2. La perte de l'expression du CD34 définit le stade pré-CD2. Ces cellules se différencient en CD2 immatures après culture en présence d'IL-3, ou stimulation virale (Grouard et al., 1997).

- *Régulation par les facteurs de transcription*

Les facteurs de transcription impliqués dans le développement des CD myéloïdes sont encore mal connus. Les travaux de Fohrer ont permis de mettre en évidence l'expression des transcrits de PU.1 et Rel B par RT-PCR dans les CD myéloïdes (Fohrer et al., 2004). Ikaros est vraisemblablement impliqué dans le développement des CDc puisque l'expression d'un dominant négatif d'Ikaros interfère avec leur développement (Galy et al., 2000)

- De même que pour les cellules NK, les protéines de la famille E sont importantes pour le développement des CDp puisque la surexpression de Id2 et Id3 bloque leur développement mais n'altère ni le développement des CD myéloïdes, ni leur maturation. Ceci confirme d'ailleurs que les CDp et les lymphocytes T, B et NK ont une origine hématopoïétique commune

- L'expression d'un autre facteur de transcription est restreinte au CDp et à sa progénie mais pas aux CDc : Spi-B (Rissoan et al., 2002; Schotte et al., 2003). L'inhibition de son expression par interférence ARN dans des CD34⁺ humaines compromet le développement des CDp *in vitro* et *in vivo* (Schotte et al., 2004). Par contre, elle favorise le développement myéloïde (Schotte et al., 2004). Un autre membre de la famille Ets, PU.1 est requis dans le développement des CDp et CD14⁺ (Schotte et al., 2004). PU.1 agit donc en amont de Spi-B.

- *Régulation par les cytokines*

Il est clairement établi que le Flt3-L est important pour le développement des CD que ce soit chez l'Homme ou chez la souris. Les souris déficientes pour Flt3-L présentent une forte diminution de nombre de CDc et CDp (McKenna et al., 2000). L'injection quotidienne de Flt3-L à des souris augmente de façon drastique le nombre de CD myéloïdes et lymphoïdes dans le sang et les tissus lymphoïdes. Ces résultats sont confirmés chez l'Homme puisque le traitement de volontaires sains

avec du Flt3-L augmente de 48 fois le nombre de CDc CD11⁺ et de 13 fois la population de CDp CD11c⁻CD123⁺ (Pulendran et al., 2000). Bien que le Flt3-L soit impliqué dans le développement des CDc et des CDp, certaines combinaisons de cytokines permettent d'orienter la différenciation des CD vers l'une ou l'autre population (Blom et al., 2000). Ainsi, la combinaison de GM-CSF/TNF- α stimule la production de CDc et inhibe la différenciation des CDp induite par Flt3-L. A l'inverse, la thrombopoïétine seule n'a aucun impact sur le développement des CDp, cependant elle coopère avec Flt3-L pour le développement et l'expansion des CDp *in vitro* (Chen et al., 2004).

2.3. Développement des lignages myéloïdes

2.3.1. Développement des monocytes/macrophages

Le développement du monocyte est initié à partir du GMP pour donner le monoblaste puis le monocyte circulant qui se différencie dans les tissus en macrophages. Le passage dans les tissus s'accompagne d'une différenciation importante. Le monocyte adapte des morphologies différentes et spécifiques selon les tissus. Sa durée de vie peut être de plusieurs mois. Le monocyte sanguin peut aussi devenir une cellule de Küpffer hépatique, un macrophage alvéolaire... Au fur et à mesure de sa différenciation, il acquiert le M-CSFR et le récepteur Fc γ , puis CD14, CD11b et les molécules F4/80 (**Figure 8**) (Carlsson et al., 1995).

PU.1 est primordial au développement des monocytes et est exprimé tout au long des étapes de différenciation de ce lignage (Nutt et al., 2005). Il active l'expression de CD11b, M- et GM-CSFR, et régule également sa propre expression (DeKoter et al., 1998).

La signalisation par la voie du M-CSF/M-CSFR joue un rôle instructif dans l'engagement dans la différenciation monocytique (Tamura et al., 1999).

2.3.2. Développement des granulocytes.

Les phagocytes poly- et mononucléés participent à la défense de l'organisme lors d'infections et peuvent reconnaître, ingérer et détruire les bactéries et parasites. Le compartiment granulocytaire se compose des polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles. Les neutrophiles représentent la population la plus abondante des leucocytes sanguins. Ils ont une durée de vie courte et sont générés de manière continue dans la moelle osseuse. Ces cellules possèdent des granules qui peuvent être de plusieurs types selon leur localisation cellulaire (granules azurophiles, spécifiques ou gélatineux ainsi que les vésicules sécrétoires) (pour revue : (Borregaard and Cowland, 1997)).

Chacune de ces organelles est caractérisée par son contenu enzymatique et ses protéines anti-microbiennes qui sont utilisées par les neutrophiles pour exercer leurs différentes fonctions lors de l'infection. Comme nous l'avons vu précédemment, les GMP sont à l'origine notamment des progéniteurs granulocytaires (**Figure 8**). La granulopoïèse se distingue par plusieurs stades de différenciation qui ont été caractérisés par cytométrie de flux en se basant sur l'expression de marqueurs de surface myéloïdes (CD11b, CD15, CD16) ainsi que sur leur taille et leur granularité (Terstappen et al., 1990). Le stade le plus précoce, myéloblaste, se caractérise d'une part par le phénotype $FSC^{med}SSC^{lo}CD11b^{-}CD15^{-}CD16^{-}$ et d'autre part par l'acquisition des granules primaires avec leurs protéines associées : MPO, lysosyme et élastase neutrophile. À ce stade ainsi qu'au stade suivant de promyélocyte, les cellules continuent à proliférer. Les cellules se distinguent ensuite par le phénotype suivant : $FSC^{med/hi}SSC^{lo/med}CD11b^{+/-}CD15^{+}CD16^{-}$. L'arrêt du cycle cellulaire aux stades myélocytes et métamyélocytes ($FSC^{lo}SSC^{hi}CD11b^{+/++}CD15^{+}CD16^{+/-}$) est concomitant à l'arrêt de l'expression des granules primaires pour permettre la production de granules secondaires et tertiaires et de leurs protéines associées (lactoferrine et collagénase neutrophile). Le stade mature des neutrophiles est identifié par le phénotype $FSC^{lo}SSC^{hi}CD11b^{+/-}CD15^{+}CD16^{+/++}$ et est associé à l'arrêt de la synthèse des protéines contenues dans les granules. Les cellules ont acquis les caractéristiques qui leur permettent de lutter contre les pathogènes (phagocytose, production de réactifs oxygénés, et libération de granules anti-microbiens). Elles affichent également un noyau pluri-segmenté.

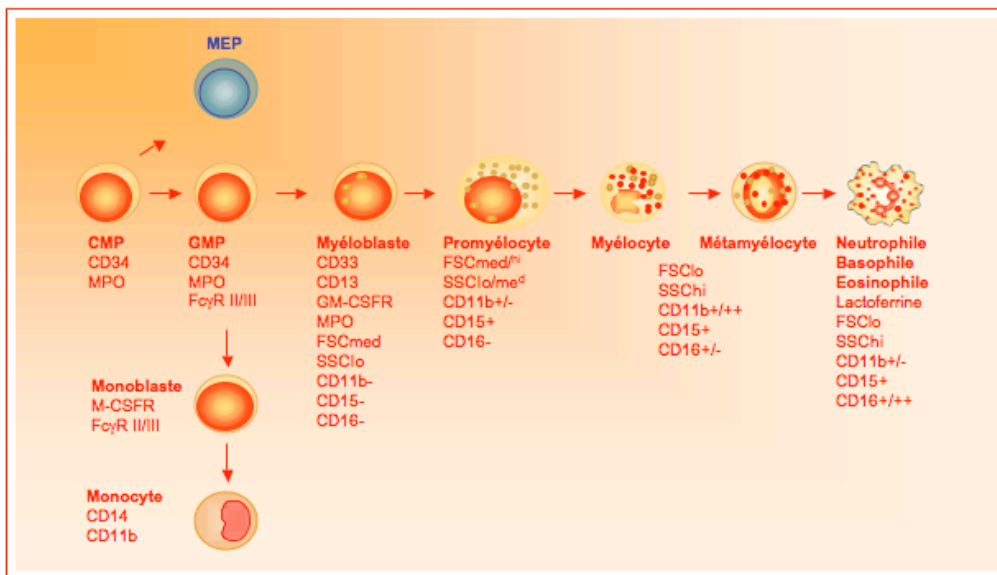


Figure 8 : Développement du lignage monocyttaire/granulocyttaire. (D'après Borregaard, 1997; Carlson, 1995)

- *Régulation par les facteurs de transcription*

C/EBP α (CCAAT enhancer binding protein alpha gene) est exprimé dès l'engagement dans le lignage myéloïde et permet d'instaurer la différenciation dans le lignage granulocytaire suite à l'augmentation de son expression (Zhang et al., 1997). Des souris déficientes pour C/EBP α présentent un blocage de la différenciation des neutrophiles et des éosinophiles mais présentent un développement normal des autres lignages hématopoïétiques comme les monocytes. Cette déficience s'explique notamment par l'absence d'expression du G-CSFR. PU.1 et C/EBP α agissent de concert pour l'expression de M-, G- et GM-CSFR et C/EBP α est impliqué dans l'activation de la MPO (Friedman, 2002). L'engagement dans le lignage monocyttaire ou granulocytaire serait lié aux niveaux d'expression de PU.1 ou C/EBP α (Dahl et al., 2003). Récemment, des travaux ont montré que chacun de ces deux facteurs de transcription régule l'expression de facteurs régulateurs voire même répresseurs qui agissent sur l'activité de l'autre (Laslo et al., 2006). Egr-1 et Egr-2 (Early Growth Response gene-1 et -2) favorisent le développement des macrophages en inhibant notamment Gfi-1. Ce dernier les inhibe à son tour. Ce mécanisme est finement régulé par le niveau d'expression de PU.1 et C/EBP α . Il y a une première étape permissive au développement du lignage granulocytaire grâce à l'expression de C/EBP α , puis la spécificité est maintenue par l'expression de Gfi-1 pour promouvoir les niveaux de transcription physiologiques pour l'expression des gènes qui signent la différenciation des granulocytes.

Il existe six membres dans la famille des facteurs de transcription qui se fixent à la séquence CCAAT, ils sont très proches dans leur structure et certains sont redondants. C/EBP ϵ est nécessaire aux stades tardifs du développement des neutrophiles tandis qu'un autre membre, C/EBP β , est plus particulièrement requis lors de l'infection qui peut être assimilée à un stress provoquant une demande accrue en granulocytes (Hirai et al., 2006; Yamanaka et al., 1997). L'expression de C/EBP β est augmentée dans les progéniteurs des granulocytes de manière privilégiée lors d'infection par *Candida albicans in vivo*. Ces auteurs distinguent l'état basal de l'hématopoïèse où C/EBP α intervient dans la production des granulocytes, et l'état infectieux.

- *Régulation par les cytokines*

G-CSFR est rapidement exprimé dans le lignage granulocytaire. Le G-CSFR et le G-CSF régulent la production et la viabilité de la réserve de neutrophiles dans la moelle osseuse. Leur rôle est mis en évidence chez des souris déficientes pour l'un ou l'autre (Basu et al., 2002; Liu et al., 1996). Elles manifestent une réduction du nombre de granulocytes qui s'explique par un défaut d'expansion et une atteinte de leur différenciation.

L'IL-3, IL-5 et le GM-CSFR sont importants pour le développement des granulocytes éosinophiles en fournissant les signaux nécessaires à leur différenciation et leur prolifération.

2.3.3. Développement des mégacaryocytes et érythrocytes

Les mégacaryocytes et les érythrocytes dérivent du précurseur MEP.

Au cours de la différenciation des mégacaryocytes (MK), d'une part les cellules acquièrent les glycoprotéines CD41 (GPIIb, GPIIIa), CD42a (GPIa) et CD61(GPIIIa) ; et d'autre part, le progéniteur passe de la mitose classique à l'endomitose qui correspond à la réplication de l'ADN sans karyokinèse ni cytokinèse. Il s'ensuit la formation de cellules géantes avec un noyau plurilobé. Cette ploïdisation permet d'augmenter la taille du MK, plus particulièrement le volume du cytoplasme. IL résulte de ce processus la formation de plaquettes par fragmentation du cytoplasme, la ploïdisation permet d'amplifier la taille du MK et donc la production plaquettaire.

La première cellule identifiable de la lignée érythroblastique est le proérythroblaste qui par quatre mitoses successives – érythroblaste basophile I et II, érythroblaste polychromatophile, érythroblaste acidophile – donnera naissance à des réticulocytes. Ces derniers, après expulsion des derniers organites intracellulaires capables de synthèse protéique (mitochondries et ribosomes), ainsi que de leur noyau, deviennent des érythrocytes et entrent dans la circulation sanguine. L'évolution cellulaire au cours de la maturation se traduit par une réduction de la taille cellulaire, une réduction de la taille du noyau avec condensation intense de la chromatine (diminution du rapport nucléo-cytoplasmique), une perte progressive de la basophilie cytoplasmique et surtout une synthèse d'hémoglobine. La différenciation terminale des érythrocytes possède quelques similarités avec l'apoptose comme la condensation de la chromatine, et la dégradation des composants nucléaires.

Les antigènes CD33, CD71, puis glycophorine A (spécifique de ce lignage) sont exprimés, dès le stade proérythroblaste au cours du développement des érythrocytes (Edvardsson et al., 2004).

- GATA-1 a été démontré essentiel au développement mégacaryocytaire/érythrocytaire. Il est exprimé dès le stade CMP et inhibe l'activation de la transcription induite par PU.1 en bloquant la liaison de PU.1 à l'ADN. GATA-1 collabore avec FOG-1 (friend of GATA-1) au cours de l'érythropoïèse et l'absence de FOG-1 est liée au blocage partiel de la différenciation érythrocytaire mais une perte complète du développement des mégacaryocytes (Tsang et al., 1998).

▪ La thrombopoïétine est indispensable à la différenciation des MK notamment aux étapes précoces de leur développement (Guerriero et al., 1995), tandis que l'érythropoïétine est la principale molécule qui permet de réguler l'érythropoïèse. Parmi les cytokines partagées pour la différenciation et la prolifération de ces deux lignages, on note l'IL-3, l'IL-6 et le SCF.

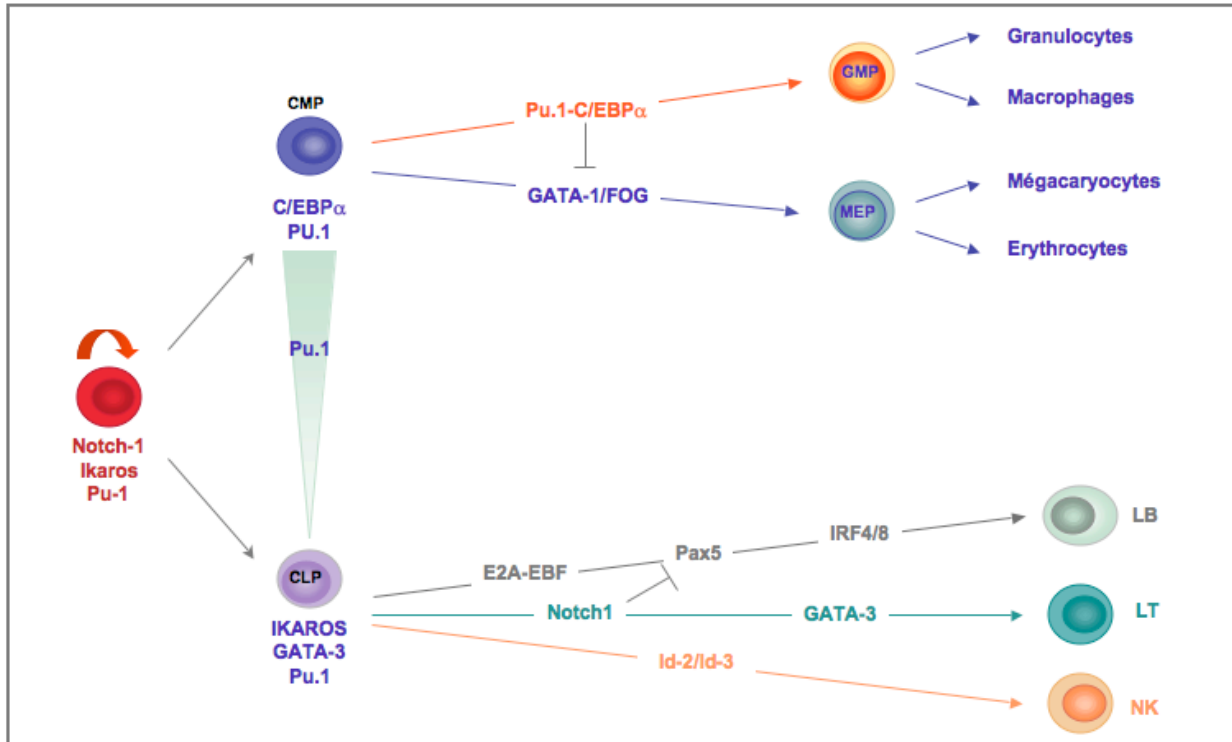


Figure 9: Réseau des facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse. (D'après Rolink, 2005; Laiosa, 2006).

- CHAPITRE II -

LES RECEPTEURS TOLL

Chez les mammifères, la réponse immunitaire dirigée contre un agent pathogène (virus, bactérie, protozoaires) repose conjointement sur les mécanismes de l'immunité innée (spontanée et non spécifique d'un antigène) et de l'immunité spécifique ou adaptative. Le principal défi pour le système immunitaire inné est de discriminer les pathogènes des composants du soi, et ceci à l'aide d'un nombre restreint de récepteurs. La difficulté est augmentée par la tendance des pathogènes à muter. Ce défi est surmonté par l'existence de récepteurs qui reconnaissent des motifs très conservés présents chez les agents pathogènes et qui ne sont pas retrouvés chez les organismes plus évolués. Ces motifs jouent souvent un rôle essentiel dans la biologie des agents infectieux et sont donc peu sujets à des mutations. Ils sont désignés sous l'appellation générique de PAMPs (pour Pathogen Associated Molecular Patterns) et peuvent être partagés par différents types de microorganismes. Le LPS (lipopolysaccharide), le peptidoglycane, l'acide lipoteichoïque, les îlots CpG non méthylé de l'ADN et les lipoprotéines bactériennes font partie des PAMPs. Ces motifs sont reconnus par une famille de récepteurs désignés sous le terme générique de PRR (pour Pattern Recognition Receptors). Ces derniers sont exprimés par de nombreuses cellules du système immunitaire et en particulier par les cellules chargées de la reconnaissance, de la prise en charge et de la présentation de l'antigène (macrophages, CD).

Les récepteurs Toll appartiennent à la famille des PRR. Initialement décrits chez la drosophile, ils sont très conservés dans l'évolution et leurs homologues sont retrouvés chez les insectes, les plantes et les mammifères. Les homologues identifiés chez les mammifères sont désignés sous le terme générique de Toll-Like Receptors ou TLR (Medzhitov et al., 1997; Rock et al., 1998). La famille des TLR comprend 10 membres chez l'Homme et 13 chez la souris. Leur voie de signalisation est partagée avec celle du récepteur de l'IL-1.

Les travaux du groupe de Kelsoe, parmi d'autres, ont établi que les signaux pro-inflammatoires induits par injection de de TNF- α , de LPS ou d'IL-1 β provoquent chez la souris une lymphopoïèse B extramédullaire associée à une augmentation de la granulopoïèse médullaire (Ueda et al., 2005; Ueda et al., 2004). Ces observations indiquaient donc qu'au moins deux stimuli activant la voie de signalisation des TLR (LPS, IL-1 β) étaient susceptibles de moduler le développement hématopoïétique. Nous avons donc souhaité nous assurer de l'éventuelle contribution des TLR au développement hématopoïétique.

1. STRUCTURE DES TLR

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I caractérisées par un domaine extracellulaire constitué de 21 motifs répétés riche en leucine (Leucine Rich Repeat/LRR) comportant de 20 à 29 acides aminés séparés par une région non riche en leucine. Le motif LRR est également retrouvé dans d'autres molécules telles que CD14 et RP-105.

Les TLR possèdent dans leur portion intracytoplasmique un domaine TIR (Toll/IL-1R) qui présente une forte homologie avec le domaine cytoplasmique du récepteur à l'IL-1 (Akira et al., 2001). La différence entre ces deux récepteurs se situe au niveau de leur portion extracellulaire puisque l'IL-1 exprime un domaine de type immunoglobuline. Le domaine TIR est également présent dans la protéine adaptatrice MyD88 (Myeloid differentiation factor 88) en position C-terminale.

2. PRESENTATION DES TLR ET DE LEURS LIGANDS

Les TLR reconnaissent deux grandes classes de ligands:

- Les structures lipidiques et protéiques, issues de bactéries ou de mycobactéries, comme les lipopeptides, le LPS, la flagelline, sont reconnues par les récepteurs TLR4, TLR5 ou TLR2 associé à TLR1 ou -6,
- Les acides nucléiques, bactériens ou viraux sont reconnus par les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9.

2.1. TLR2, TLR1/2, TLR2/6

Des bactéries gram positives comme *Staphylococcus aureus* provoquent un choc septique. Les composants bactériens impliqués sont les peptidoglycanes (PGN), l'acide lipotéichoïque (LTA) et les lipoprotéines. Des études réalisées à partir de lignées cellulaires exprimant TLR2 ou de souris déficientes pour TLR2 ont démontré son implication dans la signalisation induite par PGN et les lipoprotéines (Takeuchi et al., 2001; Yoshimura et al., 1999).

La possibilité que les ligands de TLR2 puissent être reconnus par des hétérodimères formés de TLR2 et d'autres TLR a été évoquée pour la première fois par Aderem et coll. (Ozinsky et al., 2000). En effet, ces auteurs firent l'observation que la production de TNF- α induite par PGN est inhibée à la fois par l'expression d'un dominant négatif de TLR2 et de TLR6. Les macrophages issus de souris déficientes pour TLR6 ne répondent pas à MALP-2 (lipoprotéine di-acétylée)

comme c'est le cas lorsque TLR2 est invalidé suggérant que cet autre ligand est reconnu par le complexe TLR6/TLR2 (Takeuchi et al., 2001).

Outre TLR6, TLR2 est également capable de former un hétérodimère avec TLR1 comme le démontrent les travaux du groupe d'Akira (Takeuchi et al., 2002). L'étude de souris rendues génétiquement déficientes pour TLR1 démontre des altérations de réponse des macrophages au lipopeptide tri-acétylé bactérien synthétique PAM₃CSK₄.

TLR2 a été démontré comme capable de reconnaître des lipoprotéines de nombreuses espèces bactériennes comme *Mycobacterium tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum* et des mycoplasmes, *Mycoplasma fermentas*, dont est issu MALP-2.

2.2. TLR3

La réplication virale dans les cellules infectées induit la synthèse de doubles brins d'ARN (dsRNA) qui peuvent activer les cellules du système immunitaire. Les dsRNA peuvent se lier à et activer la protéine kinase PKR dont la signalisation en aval inhibe la réplication virale et favorise la production de cytokines pro-inflammatoires. Des cellules déficientes pour la PKR maintiennent leur capacité à répondre à des ARN viraux synthétiques comme l'acide polyinosine-polycytidylique (poly(I:C)) suggérant l'existence d'un autre récepteur qui reconnaîtrait les ARN doubles brins. Les souris déficientes pour TLR3 montrent une réponse réduite au poly(I:C) mettant en évidence l'implication de ce nouveau récepteur dans la reconnaissance de ces composés (Alexopoulou et al., 2001). Ces ARN doubles brins sont pris en charges dans les compartiments intracellulaires tels que les endosomes.

2.3. TLR4

Le LPS est une molécule amphiphile de la membrane externe des bactéries Gram négatives. Il représente environ 80% des molécules qui composent le feuillet externe de la membrane externe. Structurellement, le LPS est un glycolipide complexe composé d'une portion polysaccharidique hydrophile et d'un domaine hydrophobe dénommé lipide A, responsable de l'activité biologique du LPS. Les effets du LPS ont été fortement étudiés du fait de sa capacité à activer les cellules de l'hôte comme les monocytes et à provoquer des chocs septiques. La stimulation de macrophages par le LPS provoque la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6.

Le CD14 est une glycoprotéine ancrée dans la membrane et a été historiquement démontré comme le premier récepteur au LPS (Wright et al., 1990). Le CD14 existe sous deux formes : a) soluble : elle permet de transmettre le signal à des cellules n'exprimant pas CD14 comme les cellules endothéliales et épithéliales, b) membranaire : elle s'intègre dans la membrane plasmique par une queue glycosylphosphatidylinositol. Le LPS est capturé dans la circulation sanguine par la

protéine LBP (lipopolysaccharide binding protein) puis ce complexe se fixe au CD14 (Tobias et al., 1995). L'absence de domaine intracellulaire dans la molécule CD14 suggère l'existence d'un récepteur capable de transmettre le signal pro-inflammatoire. Cette hypothèse a reçu confirmation par l'observation que le LPS peut induire une activation cellulaire chez des souris génétiquement déficientes pour CD14. La perte de réponse au LPS chez des souris rendues génétiquement déficientes pour le gène TLR4 démontra à la fin des années 90 que ce gène code pour le récepteur du LPS (Hoshino et al., 1999; Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999).

Cependant, des cellules transfectées avec *tlr4* demeurent insensibles au LPS et ce malgré l'expression conjointe de CD14. Shimazu *et coll.* ont montré que l'association de la molécule MD-2 avec TLR4 permet de transduire le signal initié par la fixation du LPS (Shimazu et al., 1999). Ces résultats sont confirmés par l'observation de souris déficientes pour MD-2 qui ne génèrent aucune réponse suite à la stimulation par le LPS (Nagai et al., 2002).

2.4. TLR5

La flagelline est un constituant du flagelle bactérien, et représente un autre facteur pro-inflammatoire. TLR5 a été identifié comme récepteur à la flagelline et l'activation de la signalisation par TLR5 entraîne la production de TNF- α (Hayashi et al., 2001). L'interaction entre TLR5 et la flagelline s'opère par un site très conservé sur la flagelline qui est essentiel pour la mobilité bactérienne (Smith et al., 2003).

2.5. TLR7/8

L'imiquimod et R-848 (resiquimod) sont des composés de faible poids moléculaire qui ont un fort potentiel antiviral et des propriétés anti-tumorales dans les modèles animaux (Miller et al., 1999). La réponse aux composés de la famille des imidazoquinolines est complètement abolie chez les animaux déficients pour MyD88, une protéine adaptatrice de la voie de signalisation des TLR, laissant présager l'implication des TLR dans ces réponses. Ainsi, les macrophages péritonéaux de souris invalidées pour le gène de TLR7 sont incapables de produire des cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'imiquimod ou au R848 (Hemmi et al., 2002). TLR8 reconnaît quant à lui les imidazoquinolines et les ARN simples brins (Heil et al., 2003; Heil et al., 2004; Jurk et al., 2002).

2.6. TLR9

Les séquences désoxynucléotidiques à motifs CpG non méthylées (ODN) sont trouvées de manière beaucoup plus fréquente dans les génomes bactériens que chez les Vertébrés où celles-ci sont supprimées et souvent méthylées. L'ADN bactérien et les ODN synthétiques stimulent la

prolifération des lymphocytes B matures et activent les macrophages et les CD. Contrairement au LPS, la prise en charge des CpG s'opère dans des compartiments intracellulaires requérant une maturation endosomale. Cette activité immunostimulante des CpG a été décrite pour la première fois par Tokunaga *et coll.* qui ont démontré que l'ADN purifié du bacille Calmette-Guerin augmente l'activité des cellules NK et induit la production d'IFN α/β et γ par les cellules spléniques murines et les leucocytes du sang périphérique humain (Tokunaga et al., 1999). Les souris génétiquement déficientes pour TLR9 générées par le groupe d'Akira ne présentent aucune production de cytokines pro-inflammatoires en réponse aux oligonucléotides à motifs CpG, pas d'activation des cellules B, ni de maturation des CD démontrant qu'il s'agit du récepteur aux oligonucléotides à motifs CpG (Hemmi et al., 2000). Malgré la diversité des aux oligonucléotides à motifs CpG, les souris déficientes pour TLR9 ne répondent à aucun d'entre eux.

TLR	Ligands	Source	Co-récepteur	Protéine adaptatrice
TLR1	Lipopeptides tri-acétylés	Mycobactérie	TLR2	MyD88
TLR2	Peptidoglycanes	Bactérie Gram+	TLR1, TLR6, CD14	MyD88, TIRAP
	Acide lipoteichoïque	Bactérie Gram+		
	Zyosan	Champignon		
TLR3	ARN double brin	Virus		TRIF
TLR4	LPS	Bactérie Gram-	CD14, MD2	MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM
TLR5	Flagelline	Bactérie		MyD88
TLR6	Lipopeptides di acétylés	Mycobactérie	TLR2	MyD88
	Zyosan	champignon		
TLR7	ARN simple brin	Virus		MyD88
	Imiquimod, R848	Synthétique		
TLR8	ARN simple brin	Virus		MyD88
	Imiquimod, R848	Synthétique		
TLR9	ADN du virus de l'Herpes	Virus		MyD88
	CpG ODN	Synthétique		
TLR10				

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des ligands et de leur origine, des co-récepteurs et des molécules adaptatrices impliqués dans la signalisation des TLR humains.

3. VOIES DE SIGNALISATION DES TLR

Le domaine TIR est à l'origine de la signalisation engagée par la stimulation des TLR et de l'IL-1R par leurs ligands respectifs. En effet, une mutation ponctuelle du domaine TIR, responsable de l'échange d'un résidu proline en histidine, invalide la transduction du signal via les TLR. (Hoshino et al., 1999; Poltorak et al., 1998).

Brièvement, deux voies de signalisation principales sont activées par les TLR. La première culmine par l'activation du facteur de transcription NF- κ B, responsable de la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'immunité et l'inflammation. La deuxième conduit à l'activation des kinases MAP p38 et JNK (Jun amino-terminal kinase) qui concourent également à l'induction de la transcription de nombreux gènes et régulent la stabilité de certains ARNm.

Bien que tous les TLR soient à même d'activer NF- κ B et les kinases MAP, l'activation de TLR particuliers résulte en des différences dans le patron d'expression des gènes induits suggérant une certaine spécificité. La découverte de plusieurs protéines adaptatrices recrutées différemment par les TLR est une première indication de cette spécificité moléculaire.

3.1. Les protéines adaptatrices

3.1.1. *MyD88*

La protéine adaptatrice MyD88 a été la première décrite et possède un domaine TIR. Elle est recrutée par interaction homotypique avec le domaine TIR de certains TLR et du récepteur à l'IL-1 (Wesche et al., 1997). Les souris déficientes pour MyD88 ne répondent ni à l'IL-1 ni aux PAMPs tels que LPS, lipopeptides, PGN, CpG, et les imidazoquinolines.

Cependant, alors que l'activation de NF- κ B et des kinases MAP est abolie par l'inactivation du gène de MyD88, l'activation de NF- κ B par le LPS via TLR4 est intacte mais retardée. Cette observation fut le premier élément suggérant l'existence d'une voie de signalisation indépendante de MyD88 empruntée par TLR4.

3.1.2. *TIRAP/Mal*

Une seconde protéine adaptatrice possédant un domaine TIR, Mal (MyD88 Adaptor Like Protein) ou TIRAP (TIR domain-containing Adaptor Protein) a été découverte par deux équipes (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2001). Il s'avère que TIRAP n'intervient pas dans la voie de signalisation de l'IL1 mais est recruté lors de l'activation de TLR2 et TLR4. Le phénotype des souris génétiquement déficientes pour TIRAP et MyD88 est similaire si l'on étudie la réponse aux

ligands de TLR2 et TLR4 : la production de TNF est abolie et l'activation de NF- κ B et des MAPK est retardée (Horng et al., 2002; Yamamoto et al., 2002a).

Cependant, l'activation du facteur de transcription IRF-3 et la production d'IFN- β induites par le ligand de TLR4 (LPS) sont normales dans les macrophages déficients pour TIRAP, MyD88 ou MyD88/TIRAP conjointement. Ainsi, il s'avère que TIRAP est impliqué dans la voie dépendante de MyD88. Ces souris montrent une réponse normale aux agonistes de TLR3, -5, -7 et -9 mais ont un défaut de réponse aux ligands de TLR2. Ces données établissent que TIRAP est impliqué dans la signalisation dépendante de MyD88 pour TLR2 et TLR4 en permettant le recrutement indirect de MyD88 aux récepteurs concernés.

3.1.3. TRIF

Puis, un troisième adaptateur, TRIF (TIR-related adaptor protein inducing interferon) a été décrit comme capable d'interagir avec TLR-3 et TLR-4 et est responsable de l'activation d'IRF-3 (Oshiumi et al., 2003a; Yamamoto et al., 2002b). L'utilisation d'un dominant négatif de TRIF ou l'inhibition de son expression par interférence à ARN bloque la production d'IFN- β suite à la stimulation de TLR3. De même, les souris génétiquement déficientes pour TRIF confirment ces résultats et présentent également un défaut de synthèse d'IFN lors de la stimulation de TLR4 par le LPS (Yamamoto et al., 2003). Ainsi, TRIF initie la signalisation de TLR3, et représente la voie alternative de signalisation de TLR4.

3.1.4. TRAM

TRAM (TRIF-Related Adaptor Molecule) est la quatrième protéine adaptatrice décrite et, de façon surprenante, elle n'est recrutée que par TLR4 pour faire le lien avec TRIF (Fitzgerald et al., 2003b; Oshiumi et al., 2003b). Les souris génétiquement déficientes pour TRAM présentent le même phénotype que celles déficientes pour TRIF. Ainsi, TRAM appartient à la même voie de signalisation. Il est donc nécessaire pour faire le pont entre TLR4 et TRIF tout comme TIRAP lie TLR2 à MyD88.

3.2. Voie dépendante de MyD88

Lors de la stimulation des TLR, MyD88 est recruté par une interaction homotypique via les domaines TIR des protéines. MyD88 recrute à son tour la sérine/thréonine kinase IRAK4 (IL-1 receptor associated kinase). La famille IRAK comprend quatre membres (IRAK-1, -2, -M, -4) qui comportent tous un domaine de mort en position N-terminale impliqué dans l'interaction avec MyD88 (**Figure 9**). Il y a alors formation d'un complexe TLR-MyD88-IRAK4 qui interagit avec

IRAK1, provoquant ainsi sa phosphorylation et son activation. IRAK1 activé s'autophosphoryle alors sur ses résidus N-terminaux ce qui permet ensuite la liaison avec TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor) et son recrutement au sein du complexe de signalisation. Puis les protéines associées IRAK1/TRAF6 se dissocient du complexe pour interagir avec le groupe constitué de TAK1 (TGF- β activated kinase), TAB1, et TAB2 (TAK1-binding proteins). Il s'ensuit la phosphorylation et l'activation de TAK1 qui active la kinase d'I κ B (IKK). Cette dernière phosphoryle I κ B conduisant à l'activation de NF- κ B (Irie et al., 2000; Ninomiya-Tsuji et al., 1999). L'activation de TAK1 conduit également à l'activation des MAPK et à l'activation du facteur de transcription AP-1.

NF- κ B est associé à des protéines inhibitrices, I κ B, qui le séquestrent dans le cytoplasme. L'activation de NF- κ B passe par la phosphorylation de I κ B par un complexe de kinases spécifiques (IKK). Ce complexe de kinases est composé de deux kinases IKK α et IKK β et d'une sous-unité régulatrice NEMO/IKK γ (Karin and Ben-Neriah, 2000). I κ B phosphorylé subit alors une polyubiquitination qui le cible vers le protéasome et induit sa dégradation.

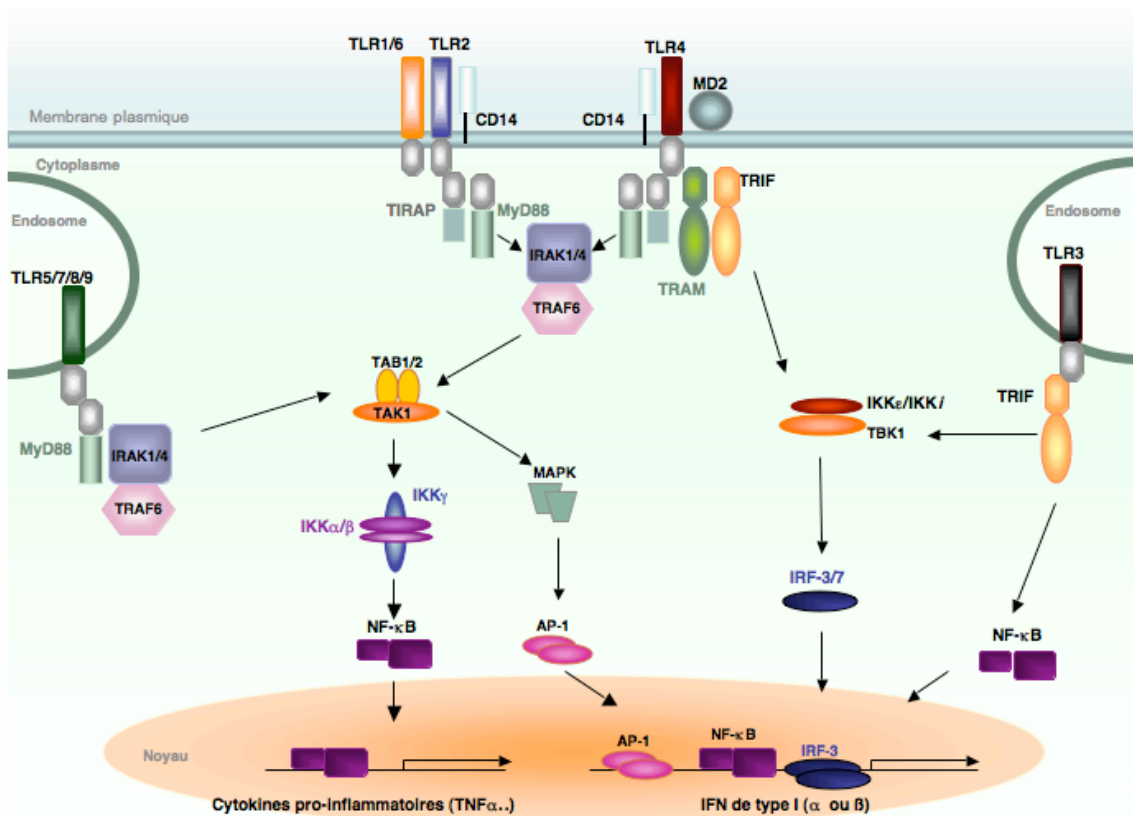


Figure 10: Voies de signalisation des récepteurs Toll. (D'après Akira 2006)

3.3. Voie dépendante de TRIF

La signalisation initiée par TLR3 est totalement indépendante de MyD88 puisque des ARN double brin induisent l'activation de NF- κ B dans des cellules déficientes pour MyD88 (Alexopoulou et al., 2001). TLR3 interagit directement avec TRIF tandis que TLR4 interagit via TRAM. Les virus et les ARN double brins viraux sont de forts activateurs d'IRF-3 qui conduisent à la phase initiale de production d'INF- β (Yoneyama et al., 1998). Il a été démontré que la liaison du ligand à TLR3 ou TLR4 provoque le recrutement de TRIF qui interagit alors avec le complexe TBK1 (TANK binding kinase 1) et IKK ϵ . Hiscott et coll ont montré qu'IRF-3 s'associe aux kinases TBK1 et IKK ϵ /IKK δ . Ces kinases sont responsables de la phosphorylation d'IRF-3 et -7 (Fitzgerald et al., 2003b). D'autre part, l'inactivation de TBK1 et IKK ϵ par une méthode d'interférence à ARN provoque l'inhibition de la phosphorylation d'IRF-3 suite à une stimulation par des virus. Le deuxième groupe a aussi trouvé que la surexpression de TBK1 et IKK ϵ /IKK δ induit l'activation d'IRF-3 et la production d'INF- β (Fitzgerald et al., 2003a; Sharma et al., 2003).

Outre TBK1 et IKK ϵ , TRIF est également capable d'interagir avec RIP1 et d'induire l'activation de NF- κ B (Balachandran et al., 2004).

Cependant, on note un retard d'activation de NF- κ B par la voie TRIF/TRAM comparée à la voie MyD88/TIRAP lors de la stimulation de TLR4 par le LPS. En 2005, deux études ont élucidé cette différence. Il s'avère que l'activation de TRIF par le LPS conduit à la production rapide de TNF sous la dépendance de IRF3. Le TNF ainsi produit a une action autocrine sur son récepteur, le TNF-R, et ce dernier est alors responsable de l'activation de NF- κ B (**Figure 10**) (Covert et al., 2005; Werner et al., 2005).

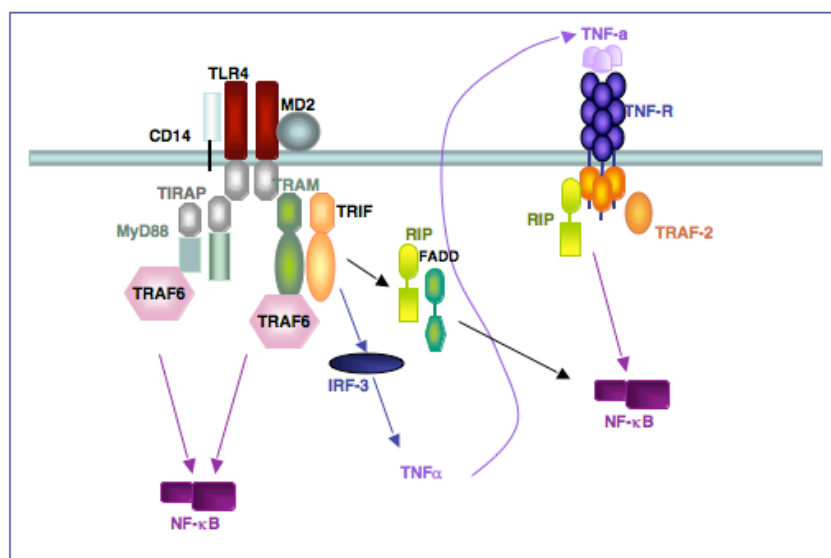


Figure 11: Schéma explicatif de l'activation retardée de NF- κ B par la voie TRIF. (D'après Zhong, 2006)

- CHAPITRE III -

DUALITE FONCTIONNELLE DE LA VOIE DE SIGNALISATION FADD

Les récepteurs de mort (RM) constituent un sous-groupe de la famille du TNF-R et sont au nombre de 6 : Fas, TNF-R1, DR3, DR4, DR5 et DR6. Ils ont tout d'abord été décrits pour leur capacité à transmettre un signal d'apoptose d'où leur dénomination. Toutefois de nombreuses études ont établi que la voie de signalisation des RM intervient également dans des processus non-apoptotiques.

1. LE MECANISME D' APOPTOSE

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui se caractérise sur le plan morphologique par une condensation puis une fragmentation du noyau cellulaire (Kerr et al., 1972). En conditions physiologiques, l'équilibre entre division cellulaire et apoptose est nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire. Au sein du système immunitaire, l'apoptose occupe également une place cruciale : elle conditionne en particulier les processus de sélection des répertoires des lymphocytes T et B et régule l'homéostasie du compartiment lymphocytaire en périphérie.

1.1. Présentation générale des récepteurs à domaine de mort

Comme évoqué précédemment, les récepteurs à domaine de mort appartiennent à la superfamille du TNF-R. Ils sont constitués de domaines riches en cystéine (DRC), dans leur partie extracellulaire, indispensables pour la liaison à leur ligand respectif, et dans leur portion cytoplasmique, d'une séquence peptidique de 80 acides aminés très conservée appelée domaine de mort (DM) (Itoh and Nagata, 1993; Orlinick et al., 1997) (Tableau 3). Le DM est essentiel à la transmission du signal apoptotique. Les six membres clonés de la famille des RM sont brièvement décrits ci-dessous.

- **Fas** (CD95, Apo-1) constitue le prototype de cette famille de molécules. Son ligand (FasL/CD95L/APO-1L/CD178) a été découvert en 1993 et est exprimé par les lymphocytes activés, des cellules tumorales, ou d'autres tissus comme la chambre antérieure de l'œil (Suda et al., 1993). Le rôle crucial du couple Fas/Fas-L dans l'homéostasie du système immunitaire est illustré par l'étude des syndromes lymphoprolifératifs développés soit par les souris dont l'insertion d'un

élément transposable dans l'intron 2 du gène Fas aboutit à l'expression d'une molécule Fas non fonctionnelle (*lpr*/ lymphoprolifération) soit par les souris qui présentent des mutations au niveau du ligand (*gld*/generalised lymphoproliferative disease)(Mariani et al., 1994). Ces souris développent une lymphoadénopathie et une splénomégalie associées à une importante production d'autoanticorps (Adachi et al., 1993). La cause principale de ce syndrome est l'incapacité des souris *lpr* à éliminer en périphérie des lymphocytes autoréactifs par le système Fas/FasL (Singer et al., 1994). Il existe chez l'Homme un syndrome appelé ALPS (Autoimmune lymphoproliferative syndrome) présentant des similitudes avec les atteintes chez les souris *lpr* qui est causé par des anomalies génétiques de Fas, de son ligand, ou d'éléments de la voie de signalisation des RM (Fisher et al., 1995; Rieux-Laucat et al., 1995).

- **TNF-R1** est l'un des deux récepteurs au TNF. Le TNF-R1 humain, cloné en 1990 par Schall et coll. est une glycoprotéine transmembranaire comprenant 4 DRC (Schall et al., 1990). Il est responsable de la transmission de la majorité des fonctions biologiques du TNF (apoptose, effet antiviral, action nécrosante vis-à-vis des tumeurs) (Tartaglia et al., 1993; Vandenabeele et al., 1995). Le signal d'apoptose induit via TNF-R1 passe par le recrutement séquentiel de TRADD et FADD. TNF-R2 joue un rôle d'amplificateur du signal initié par le TNF-R1 (Chan and Lenardo, 2000). La lymphotoxine (LT) est un autre membre de la famille du TNF capable de se fixer aux deux récepteurs, et présente des propriétés similaires au TNF.

- **DR3** (APO-3, Wsl, TRAMP, LARD) a été cloné en même temps par plusieurs groupes (Bodmer et al., 1997; Kitson et al., 1996; Marsters et al., 1996; Screaton et al., 1997b). DR3 est exprimé de façon prédominante dans la rate, le thymus et les lymphocytes. Le signal d'apoptose induit via DR3 passe par le recrutement séquentiel de TRADD et FADD. TWEAK a été initialement décrit comme un ligand de faible affinité de DR3 (Lynch et al., 1999; Marsters et al., 1998; Saas et al., 2000) mais il n'induit que très faiblement l'apoptose. De plus, des souris génétiquement déficientes pour DR3 conservent la capacité de fixer TWEAK (Chicheportiche et al., 1997; Kaptein et al., 2000). Le véritable ligand de DR3 est TL1A (TNF-like factor). Il est responsable de l'activation de NF- κ B ou de l'apoptose dans des lignées cellulaires qui expriment DR3 (Migone et al., 2002).

- **TRAIL-R1/TRAIL-R2**. TRAIL (TNF Receptor Apoptosis-Inducing Ligand) ou APO-2L a été identifié par deux groupes indépendamment et présente une expression quasi-ubiquitaire (Mariani and Krammer, 1998a; Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). Ses récepteurs ont été clonés ultérieurement : TRAIL-R1 (DR4/APO-2) et TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2) (Chaudhary et

al., 1997; MacFarlane et al., 1997; Pan et al., 1997b; Schneider et al., 1997; Screaton et al., 1997a; Walczak et al., 1997; Wu et al., 1997). TRAIL-R1 et 2 présentent deux DRC dans leur portion extracellulaire. On les trouve exprimés dans les tissus sains ainsi que dans de nombreuses lignées tumorales. Ils sont tous deux capables de transmettre un signal de mort et d'activer le facteur de transcription NF- κ B.

Hormis TRAIL-R1 et 2, TRAIL peut également se lier à des récepteurs dépourvus de portion intracytoplasmique. Le premier, TRAIL-R3/DcR1/LIT/TRID présente deux DRC, son ancrage à la membrane s'opère par un domaine glycosyl-phosphatidylinositol (Gpi) (MacFarlane et al., 1997; Pan et al., 1997a; Sheridan et al., 1997). Le transcrite est exprimé de façon constitutive dans les tissus sains, mais faiblement dans les lignées tumorales. Le second, TRAIL-R4/DcR2/TRUNDD a été cloné par homologie avec le domaine extracellulaire de TRAIL-R3, et contient également deux DRC et un DM tronqué (Degli-Esposti et al., 1997; Marsters et al., 1997; Pan et al., 1998b). L'ostéoprotégérine est un récepteur soluble capable de fixer à la fois TRAIL et un autre membre de la famille du TNF appelé TRANCE/RANK-L. Il a été proposé que ces trois récepteurs pourraient jouer le rôle d'antagonistes naturels de la molécule TRAIL (Emery et al., 1998).

TRAIL est capable soit d'induire l'activation de NF- κ B par le biais de DR 4 et 5 soit l'apoptose de nombreuses lignées tumorales, mais n'est pas cytotoxique vis-à-vis des cellules issues de tissus sains (Mariani and Krammer, 1998a; Mariani and Krammer, 1998b).

- **DR6** contient 4 DRC (Pan et al., 1998a). Le transcrite de DR 6 a été retrouvé dans le cœur, le cerveau, le placenta, le pancréas, le thymus. Le signal d'apoptose induit via DR6 passe par le recrutement séquentiel de TRADD et FADD. Aucune étude n'est parue depuis sur ce récepteur et son ligand n'est pas cloné. Le rôle physiologique de DR6 reste à élucider.

RECEPTEUR	DRC	LIGANDS	MOLECULE ADAPTATRICE	AUTRES DENOMINATIONS
TNF-R1	4	TNF α et β LT α	TRADD et FADD	P55R CD120
Fas	3	CD178	FADD	Apo-1/CD 95
DR 3	4	TWEAK/TL1A	TRADD et FADD	LARD/Apo-3 /TRAMP/wsl-1
DR 4	2	TRAIL	FADD	TRAIL-R1
DR 5	2	TRAIL	FADD	TRAIL-R2
DR 6	4	?	TRADD et FADD	-

Tableau 3: Tableau récapitulatif des caractéristiques des récepteurs à domaine de mort.

1.2. Les composants de la voie de signalisation des RM

1.2.1. FADD

Le gène humain codant FADD/MORT1 (Mediator of receptor induced toxicity) a été cloné de façon indépendante par les équipes de Wallach et Dixit en 1995 (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). Son homologue murin fut cloné un an plus tard (Zhang and Winoto, 1996). La surexpression de ce gène provoque l'apoptose des cellules. La protéine humaine contient 208 acides aminés pour un poids moléculaire de 23kD (**Figure 11**). Les protéines humaines et murines partagent 80% de similitude sur les acides aminés et ont une homologie de séquence de 68% (Zhang and Winoto, 1996). Les 70 acides aminés qui constituent le domaine de mort sont localisés dans la partie C-terminale de FADD (position 111 à 180). Celui-ci est impliqué dans des interactions homotypiques avec les DM des récepteurs de mort tels que Fas ou de la protéine adaptatrice TRADD (TNF receptor associated death domain) (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Hsu et al., 1996). Les 76 acides aminés situés dans la région N-terminale (position 1-76) constituent le domaine effecteur de mort (DEM) responsable du recrutement par interaction homotypique avec les caspases initiatrices impliquées dans la cascade apoptotique (caspase-8 ou 10) (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996). Le DM et le DEM ont une structure similaire et sont composés de six hélices α antiparallèles et amphipathiques (Eberstadt et al., 1998; Huang et al., 1996).

FADD est essentiellement exprimé sous forme cytosolique, mais l'agrégation des RM conduit à sa relocalisation à la face interne de la membrane où il initie la formation de la plateforme de signalisation plus communément désignée sous le terme de DISC (Death Inducing Signaling Complexe).

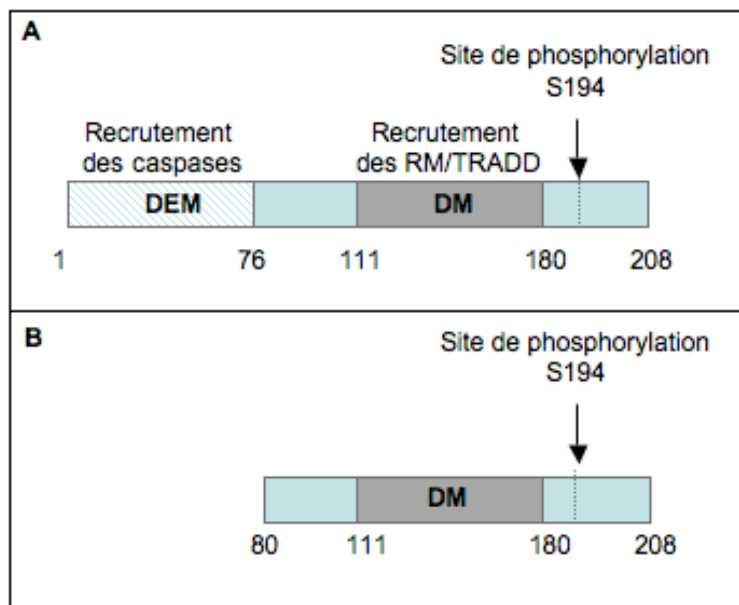


Figure 12: A. Structure de la protéine humaine FADD. **B.** Structure du dominant négatif de FADD.

1.2.2. TRADD

TRADD se lie au TNF-R1 par le biais d'une liaison homotypique impliquant les DM des deux molécules (Hsu et al., 1996; Hsu et al., 1995). La voie d'apoptose et la voie conduisant à l'activation de NF- κ B en réponse au TNF α bifurquent en aval de TRADD. Cette dernière nécessite le recrutement de TRAF2 soit directement (interaction entre la portion N-terminale de TRADD et le domaine TRAF de TRAF2) soit indirectement via l'association séquentielle des protéines TRADD, RIP (Receptor Interacting Protein) et TRAF2. TRADD peut également interagir avec DR3 et DR6 et induire l'apoptose par le recrutement de la molécule adaptatrice FADD, ou l'activation de NF- κ B par la voie TRAF2 (Chinnaiyan et al., 1996; Kitson et al., 1996; Pan et al., 1998a).

1.2.3. RIP

RIP est une autre protéine adaptatrice qui contient un DM dans sa partie N-terminale, et une région d'homologie avec les protéines de type sérine/thréonine kinase dans sa partie C-terminale. RIP interagit avec Fas et TRADD via les interactions homotypiques de leur DM (Stanger et al., 1995). RIP présente comme FADD une dualité fonctionnelle : sa surexpression provoque à la fois l'apoptose et l'activation de NF- κ B (Hsu et al., 1996; Hsu et al., 1995).

1.2.4. Les caspases

Il s'agit de protéases ainsi nommées car elles contiennent une cystéine (c) dans leur site actif et qu'elles clivent leur substrat à la suite d'un acide aspartique (asp). La famille des caspases comporte douze membres. Elles sont synthétisées sous forme de proenzymes (procaspases) inactives appelées

aussi zymogènes. Cette forme inactive se compose d'un prodomaine (en N-terminal) et d'un domaine catalytique (C-terminal). Ce dernier est lui-même organisé en deux sous-unités catalytiques actives d'un poids moléculaire de 20 kDa et 10 kDa respectivement. Elles sont activées par deux clivages protéolytiques séquentiels. Le premier se produit entre les deux sous-unités catalytiques, et le deuxième se produit au niveau d'un résidu d'aspartate du prodomaine et le sépare de la grande sous-unité catalytique. L'étude par cristallographie a montré que l'assemblage des deux sous-unités catalytiques aboutit à la formation d'un hétérotétramère enzymatiquement actif (Rotonda et al., 1996; Walker et al., 1994). Une fois activées, les caspases propagent le signal apoptotique en activant d'autres caspases, phénomène connu sous le nom de « cascade apoptotique ».

Sur la base de leur structure et de leur séquence d'intervention dans la cascade apoptotique, les caspases peuvent être divisées en deux catégories : les caspases initiatrices et les caspases effectrices. Les caspases effectrices ont en général un prodomaine court et clivent différents substrats cellulaires. En revanche, les caspases initiatrices ont un long prodomaine et leur fonction principale est l'activation des caspases effectrices en aval. L'activation des caspases initiatrices est consécutive à leur liaison homotypique à une molécule adaptatrice pas l'intermédiaire de motifs peptidiques présents dans le prodomaine. Ces motifs sont au nombre de deux : le DEM et le CARD (Caspase Activation and Recruiting Domain). Les procaspases-8 et -10 possèdent deux DEM capables d'interagir avec le DEM de la molécule FADD (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996). Les procaspases 1, 2, 3, 4 et 9 contiennent des domaines CARD (Ahmad et al., 1997; Duan and Dixit, 1997).

1.2.5. *c-FLIP*

cFLIP (cellular FLice-like Inhibitory Protein connue aussi sous le nom de I-FLICE, CASPER, CASH, MRIT et Usurpin) a été identifié comme un inhibiteur de la signalisation apoptotique en entrant en compétition avec la caspase-8 pour la fixation à FADD (Goltsev et al., 1997; Han et al., 1997; Hu et al., 1997; Inohara et al., 1997; Irmmler et al., 1997). En effet, c-FLIP contient, comme la caspase-8, deux DEM qui lui permettent d'être recruté par FADD. c-FLIP est retrouvé sous deux formes résultant d'un épissage alternatif : c-FLIP_L et c-FLIP_S. La forme courte c-FLIP_S confère aux lymphocytes T activés la résistance à l'apoptose induite par CD95. c-FLIP_L possède un domaine homologue au domaine enzymatique des caspases, mais présente un site catalytique inactif. c-FLIP_S est quant à lui dépourvu de ce domaine. Le recrutement de c-FLIP_L au niveau du DISC provoque son clivage, sans la cascade d'activation conduisant au processus d'apoptose.

1.3. Initiation du signal apoptotique

La transduction du signal apoptotique par les RM est initiée par l'engagement du récepteur avec son ligand trimérique ou dans certaines conditions par l'oligomérisation autonome de ce même récepteur. Il est communément admis que la liaison du ligand au récepteur entraîne l'oligomérisation du récepteur (Kischkel et al., 1995). Les travaux de Lenardo ont montré un certain degré d'oligomérisation du récepteur Fas et ce en absence de son ligand fonctionnel (Chan et al., 2000; Siegel et al., 2000). Ce pré-assemblage sous forme trimérique fait intervenir des interactions homotypiques entre les domaines PLAD (Pre-Ligand Assembly Domain) présent dans la portion extracellulaire de Fas. La liaison du ligand au récepteur entraîne un changement conformationnel de la portion intracytoplasmique du récepteur et le recrutement des molécules adaptatrices. Fas, TRAIL-R1 et TRAIL-R2 recrutent principalement la molécule adaptatrice FADD, alors que TNF-R1 et DR3 interagissent avec TRADD (Dempsey et al., 2003).

Dans le cas de Fas, TRAIL-R1 et -2, l'association directe avec FADD permet le recrutement de procaspases initiatrices (caspase-8 ou -10) afin de constituer le DISC (Ashkenazi and Dixit, 1998; Wang et al., 2001). L'activation de la caspase-8 par auto-clivage protéolytique au niveau du DISC est responsable de l'initiation de la cascade apoptotique (**Figure 13**). Cette cascade de clivages protéolytiques mène à l'activation des caspases effectrices -3, -6 et -7, responsables de l'acquisition du phénotype apoptotique. La caspase-3 semble toutefois être la cible majeure de la caspase-8.

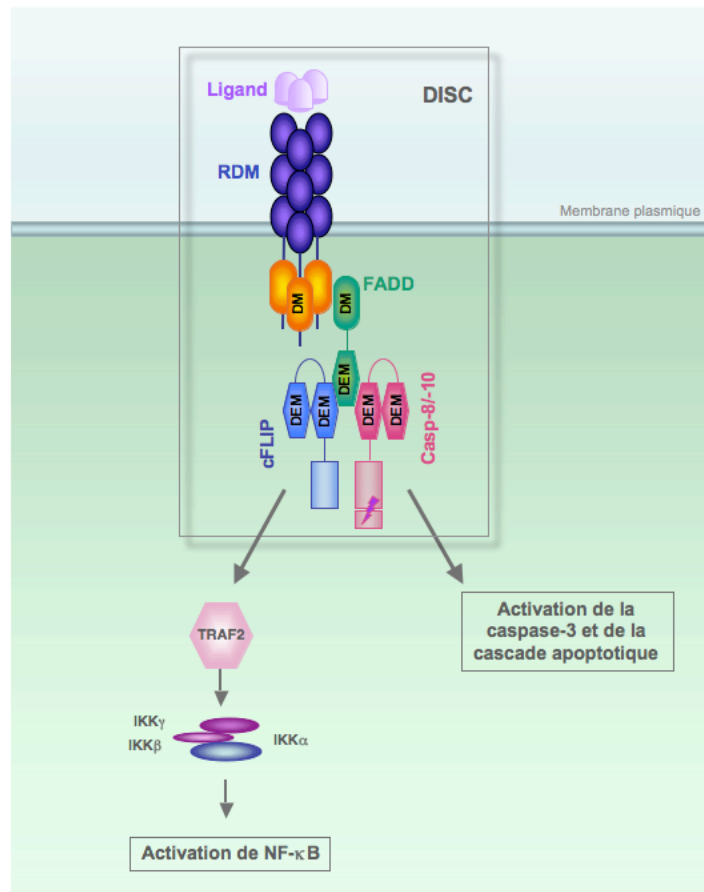


Figure 13: Voie de signalisation des RM.

Au contraire de Fas, TNF-R1 n'induit l'apoptose que dans des conditions particulières comme l'inhibition de la synthèse protéique ou de l'activation de NF-κB (Varfolomeev and Ashkenazi, 2004). En fait, la signalisation principale sous-jacente à l'engagement de ce RM consiste en l'activation de la voie NF-κB, et par conséquent la transcription et l'activation de gènes impliqués dans les processus inflammatoires et anti-apoptotiques. En ce sens, la transduction du signal apoptotique médiée par TNF-R1 est plus complexe que celle médiée par Fas, impliquant en premier lieu le recrutement de la molécule adaptatrice TRADD (Dempsey et al., 2003). Après l'identification des composants du DISC, l'étude de la susceptibilité à l'apoptose des souris déficientes en FADD ou en caspase-8 a montré que le recrutement de ces deux molécules était également nécessaire à l'apoptose induite par l'engagement de TNF-R1 (Varfolomeev et al., 1998; Yeh et al., 1998). Toutefois, aucune association physique de FADD ou de la caspase-8 avec TNF-R1 n'a pu être mise en évidence (Harper et al., 2003).

Récemment, l'identification de deux complexes multimoléculaires distincts, formés de façon séquentielle lors de l'apoptose induite par l'engagement de TNF-R1 a contribué à résoudre cette apparente contradiction (Micheau and Tschopp, 2003). Le premier complexe (complexe I) comprend le TNF-R1, la protéine adaptatrice TRADD, la kinase RIP et la molécule TRAF-2. Il se forme précocement suite à l'engagement du récepteur de mort. La formation de ce complexe I a

pour conséquence l'activation du facteur de transcription NF- κ B via le recrutement du complexe IKK. Plus tardivement, TRADD, RIP et TRAF-2 se dissocient du récepteur, et recrutent FADD et la caspase-8 formant ainsi un complexe cytoplasmique (complexe II). L'agrégation de ce complexe II est dépendante de l'endocytose du récepteur TNF-R1. Dans ce modèle, la capacité du complexe I à induire l'activation de NF- κ B, et par conséquent la transcription de facteurs anti-apoptotiques, c-FLIP en particulier, est un événement crucial dans la balance entre survie et apoptose (Micheau and Tschopp, 2003). Enfin, il a récemment été démontré que l'activation de la voie JNK contribue également à la transduction de signal apoptotique médié par TNF-R1. Ainsi, dans des conditions où la voie NF- κ B est abrogée, l'engagement de TNF-R1 active la voie JNK, avec pour conséquence un clivage de la protéine pro-apoptotique Bid indépendant de la caspase-8. Ce produit de clivage induit le relargage préférentiel de facteurs apoptogènes mitochondriaux tels que SMAC/Diablo, dont le rôle principal consiste en l'inhibition des IAPs et par conséquent en l'amplification du signal apoptotique (Deng et al., 2003). Un schéma résumant la transduction du signal apoptotique par les DR est présenté sur la **Figure 14**.

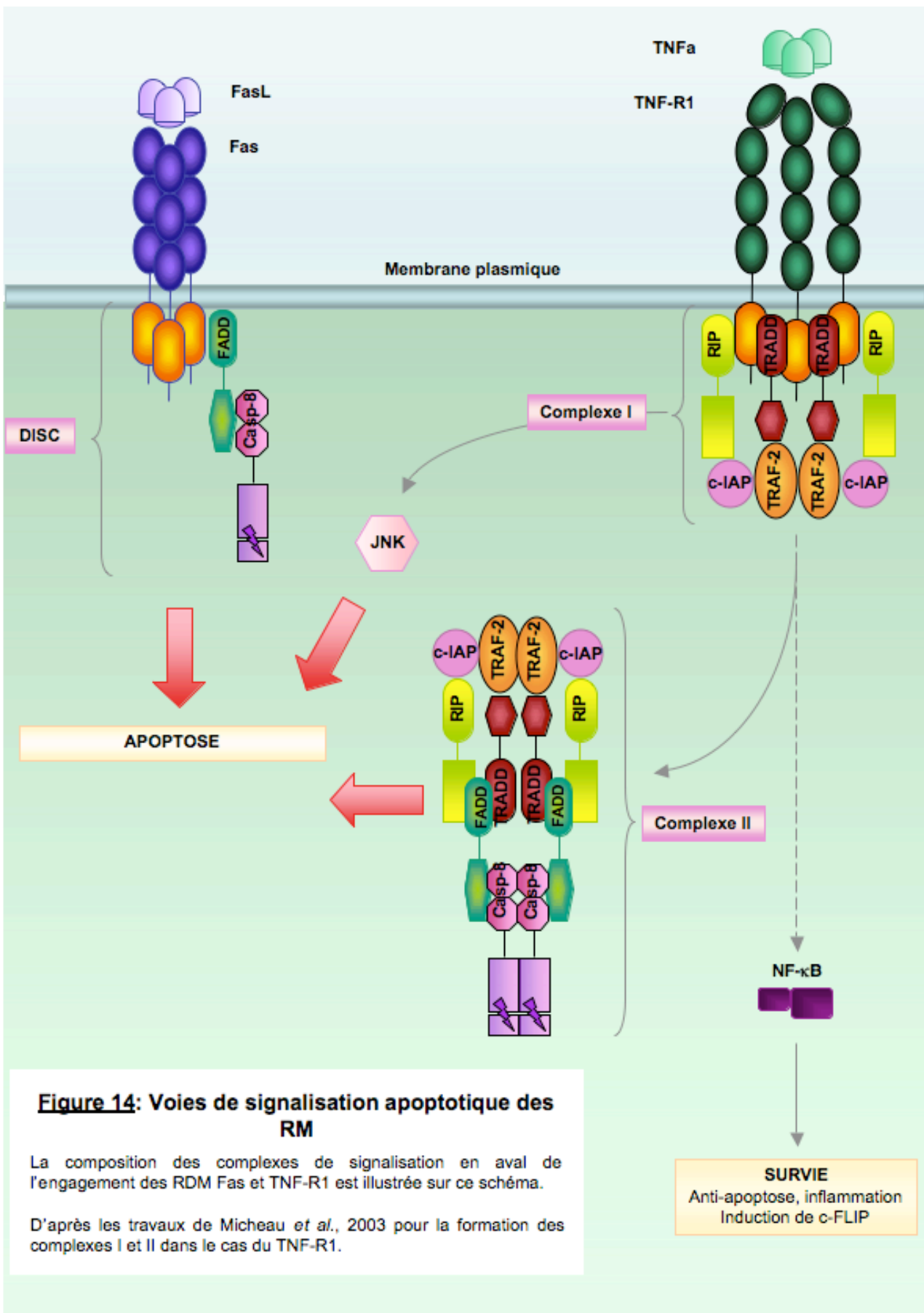


Figure 14: Voies de signalisation apoptotique des RM

La composition des complexes de signalisation en aval de l'engagement des RDM Fas et TNF-R1 est illustrée sur ce schéma.

D'après les travaux de Micheau *et al.*, 2003 pour la formation des complexes I et II dans le cas du TNF-R1.

2. L'ACTIVATION CELLULAIRE

2.1. Les activités non-apoptotiques des RM

La première étude suggérant l'activité non-apoptotique de Fas fut réalisée en 1993. Elle montrait que certains anticorps anti-Fas pouvait stimuler de la prolifération des lymphocytes T (Alderson et al., 1993). D'autres études ont suivi montrant que la stimulation de Fas induisait la prolifération de fibroblastes, de cellules B et de certaines cellules tumorales (Borset et al., 1999; Freiberg et al., 1997; Owen-Schaub et al., 1993; Shinohara et al., 2000). La production de cytokines inflammatoires comme IL-6, IL-8 et TNF α a lieu lors de la stimulation par Fas de macrophages, de fibroblastes et de cellules épithéliales (Ahn et al., 2001; Hagimoto et al., 1999; Imamura et al., 2004; Park et al., 2003).

Les travaux de Desbarats et coll. ont montré que Fas intervient dans le phénomène de régénération hépatique (Desbarats and Newell, 2000). En effet, alors que l'injection d'Ac anti-Fas est létale pour les souris non hepactomisées, elle ne l'est plus lorsqu'elle est pratiquée un jour après une hépatectomie partielle. Au contraire, l'administration d'Ac anti-Fas accélère la régénération hépatique. Les hépatocytes des souris ayant subi une hépatectomie et une injection d'Ac anti-Fas, par rapport aux animaux aux contrôles présentent un plus fort taux de divisions cellulaires. Il l'hépatectomie prévient la perte d'expression de l'isoforme longue de FLIP (FLIP_L) consécutive au traitement des hépatocytes par un Ac anti-Fas. Ces données suggèrent donc que d'une part Fas est impliqué dans la régénération hépatique, et que d'autre part la présence de FLIP_L est requise pour que l'activité stimulatrice des Ac anti-Fas se manifeste.

2.2. Les fonctions non apoptotiques de FADD

Outre sa fonction au sein du DISC pour connecter les RM aux éléments de signalisation de la voie d'apoptose, FADD est impliqué dans d'autres fonctions cellulaires. C'est notamment un élément clef du développement embryonnaire puisque les souris génétiquement déficientes pour FADD meurent *in utero* suite à des défauts cardiaques et hémorragiques (Yeh et al., 1998).

2.2.1. FADD et le développement hématopoïétique

Les groupes qui se sont intéressés à l'exploration des fonctions non-apoptotiques de FADD dans le compartiment hématopoïétique ont eu recours à plusieurs stratégies pour contourner la difficulté posée par le fait que l'inactivation ubiquitaire de FADD est létale. L'extinction de la fonction FADD peut être obtenue de deux façons : soit par inactivation pure et simple du gène, soit par

surexpression une forme tronquée de FADD dépourvue de son domaine effecteur de mort et nommée dominant négatif (FADD-DN) qui n'invalide pas le gène mais la fonction de la protéine sauvage par compétition (**Figure 15**).

Différentes stratégies sont utilisées pour cibler l'invalidation de FADD dans les populations suivantes :

- a) Lignage lymphoïde: reconstitution de blastocystes $Rag1^{-/-}$ dépourvus de lymphocyte T et B avec des cellules souches embryonnaires (ES) $FADD^{-/-}$. Seules les souris exprimant la recombinaison et donc issues des cellules ES $FADD^{-/-}$ sont capables de reconstituer le compartiment lymphoïde. Ces souris seront à présent nommées souris chimères $FADD^{-/-}$ (**Figure 15A**)(Zhang et al., 1998; Zhang et al., 2001).
- b) Cibler le transgène FADD-DN sous le contrôle d'un promoteur spécifique d'un lignage :
 - i) *lck* pour le lignage T qui permet ainsi son expression à partir du stade DN3 chez la souris (*lck*/FADD-DN) (**Figure 15B**), ii) *cd19* pour le lignage B.
- c) L'invalidation du gène de FADD est obtenue en utilisant le système Cre/loxP. Des séquences loxP sont clonées autour de 2 exons du gène de FADD et la recombinaison Cre est exprimée sous la dépendance du promoteur *lck* ou *cd19* et excise ces exons (**Figure 15C**).

En 2005, Pellegrini *et coll.* se sont intéressés aux fonctions de FADD et de la caspase-8 dans le développement hématopoïétique (Pellegrini et al., 2005). Ils ont transduit des cellules souches de foie fœtal de souris avec un FADD-DN et ont montré qu'un faible niveau d'expression de FADD-DN était suffisant pour inhiber la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques suite à une stimulation par des cytokines. Ils n'observent aucun développement de leucocytes dans les souris reconstituées. L'expression de FADD-DN par les progéniteurs hématopoïétiques issus de foie fœtal les rend incapables de former des CFU en méthylcellulose. Ainsi, la fonction de FADD est primordiale dans les étapes précoces du développement hématopoïétique.

De nombreux groupes se sont intéressés aux fonctions de FADD dans le développement T. Toutes les études menées confirment que l'invalidation de FADD bloque l'apoptose induite par Fas de façon spécifique. Elles aboutissent également toutes à la même conclusion : les thymocytes et les lymphocytes T $FADD-DN$ ou $FADD^{-/-}$ présentent un défaut sévère de prolifération à des signaux mitogènes comme CD3/CD28 ou CD3/PMA(Newton et al., 1998; Walsh et al., 1998; Zhang et al., 1998; Zornig et al., 1998).

Les résultats concernant le thymus présentent quelques discordances malgré la similitude des protocoles utilisés. Certaines études notent une diminution de la cellularité dans les thymus

(Kabra et al., 2001; Walsh et al., 1998; Zhang et al., 1998) tandis que d'autres ne notent aucune altération (Newton et al., 1998; Newton et al., 2000; Zornig et al., 1998). Les travaux de Zhang réalisés sur les souris chimères FADD^{-/-} ne décrivent une diminution du nombre de cellules dans le thymus qu'à partir de 5 semaines, il se peut que le moment de l'analyse dans ces différents modèles contribue à cette hétérogénéité (Zhang et al., 1998). Les étapes de sélection des thymocytes sont également perturbées chez ces animaux. L'abrogation de la signalisation par FADD potentialise la sélection négative des thymocytes autoréactifs. FADD participe donc à la transmission de signaux de survie lorsque les thymocytes sont activés par leur TCR (Newton et al., 1998).

Des souris Rag1^{-/-}FADD-DN ont également apporté un éclaircissement sur la fonction de FADD dans le développement T (Newton et al., 2000). Les souris Rag1^{-/-} présentent normalement un blocage de la différenciation au stade pro-T lié à l'absence de réarrangement du TCR. L'expression de FADD-DN permet la différenciation jusqu'au stade pré-T. Ainsi, FADD est impliqué dans la déletion des pro-T qui ne réarrangent pas le TCR. Cette étude démontre aussi que FADD est impliqué dans le processus de prolifération qui accompagne la transition entre DN3 et DN4/pré-T suite à la stimulation du pré-TCR (Kabra et al., 2001; Newton et al., 2000; Walsh et al., 1998; Zornig et al., 1998).

Mais l'observation qui a contribué à initier mon projet de thèse est l'absence totale de lymphocytes B matures en périphérie suggérant l'implication de FADD dans le développement B (Zhang et al., 1998).

Outre le développement T, FADD est également impliqué dans le développement érythroïde comme le montrent des travaux publiés en 2005. La transduction de progéniteurs hématopoïétiques de patients atteints de myélodysplasie avec un dominant négatif de FADD prévient l'activation de la caspase-8 dans des cellules érythroïdes cultivées *in vitro* restaurant ainsi l'érythropoïèse (Claessens et al., 2005).

Les études consacrées au rôle de FADD au cours du développement B sont moins nombreuses. En 2006 a été publié un article dont le protocole repose sur l'inactivation dans les lymphocytes B de FADD par l'utilisation du système FADD-loxé sous le contrôle du promoteur *cd19* (système cre/lox) (Imtiyaz et al., 2006). Cette étude démontre que le développement B à partir du stade pro-B tardif, moment où est activé le promoteur *cd19*, jusqu'au stade B mature est indépendant de FADD. Les auteurs ne notent aucune différence tant dans le développement B, que dans les différentes étapes de contrôle du pré-BCR ou BCR, ni dans les étapes de prolifération clonale. Contrairement aux LT où FADD intervient dans la réponse aux mitogènes, FADD n'est pas impliqué dans la prolifération des LB matures suite à la stimulation du BCR.

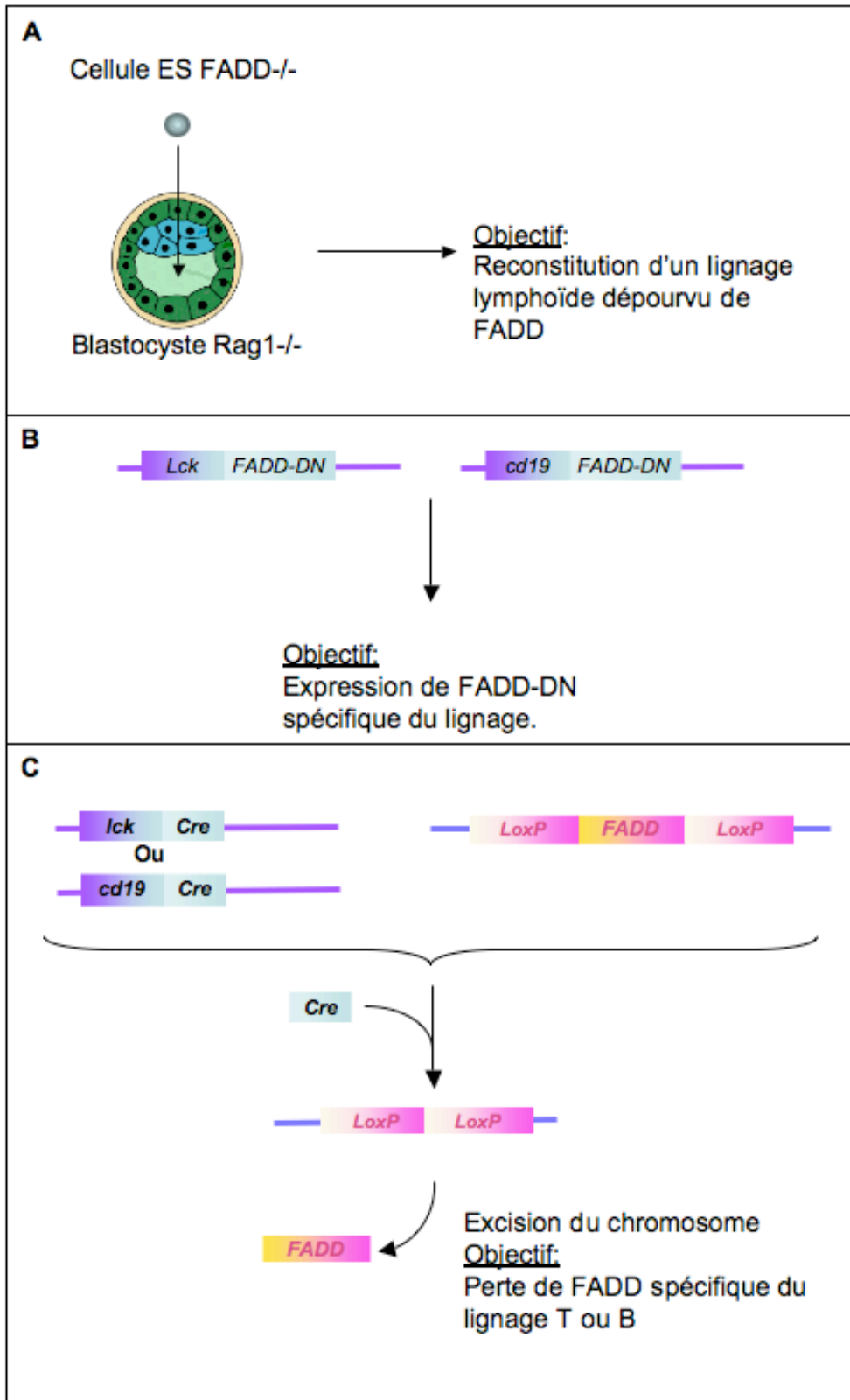


Figure 15: Schéma récapitulatif des techniques d'inactivation de FADD.

2.2.2. FADD et le cycle cellulaire

Une partie du stock cytoplasmique de FADD se présente sous forme phosphorylée sur les résidus sérine et thréonine. La phosphorylation sur le résidu sérine 194 chez l'Homme et 191 chez la souris s'avère jouer un rôle crucial dans la fonction non-apoptotique de FADD (Scaffidi et al., 2000). Ce résidu n'appartient ni au DM ni au DEM. Sa phosphorylation est réalisée par la kinase caséine I α . Elle est maximale à la phase G₂/M du cycle cellulaire (Alappat et al., 2005; Scaffidi et al., 2000).

Des souris transgéniques ont été créées pour exprimer un FADD dans lequel une substitution ponctuelle de la sérine 191 par un acide aspartique (S191D) a été introduite et mime la phosphorylation constitutive de FADD (Hua et al., 2003). Les signaux apoptotiques fournis par les RM tels que Fas ne sont pas affectés par cette mutation. La phosphorylation de FADD n'intervient donc pas dans sa fonction pro-apoptotique (Alappat et al., 2005; Hua et al., 2003; Scaffidi et al., 2000). Cependant, le développement des lymphocytes T présente un blocage à la transition DN3 et donc une diminution du nombre de cellules DN4, associé à un défaut de prolifération au stade CD25⁺CD4⁻CD8⁻. Ces lymphocytes T sont incapables de proliférer et demeurent au stade G₀/G₁ et justifient la diminution du nombre de lymphocytes T matures. Ces résultats suggèrent que FADD non phosphorylé régule l'entrée en cycle des lymphocytes T (Hua et al., 2003). Mais la fonction de FADD s'exerce également à la phase G₂/M. Les lymphocytes T quiescents stimulés par CD3/CD28 n'effectuent qu'une division s'ils expriment FADD(S191D) alors que les lymphocytes T contrôles en effectuent 4 (Hua et al., 2003). Ainsi, FADD et son site de phosphorylation sont importants pour l'entrée en cycle (phase G₀/G₁) et pour la progression lors de la mitose (G₂/M).

L'étude des autres lignages hématopoïétiques chez ces souris FADD(S191D) met également en évidence l'importance de FADD dans leur développement :

- Le nombre de cellules B est diminué de moitié avec un défaut de progression à la transition pro-B/pré-B. Ces résultats confirment les observations des souris chimères FADD^{-/-} → RAG-1^{-/-} (Zhang et al., 1998).
- On note une augmentation du nombre de cellules Mac1⁺.
- Le nombre de globules rouges est considérablement diminué.
- Les granulocytes voient leur nombre augmenté.

Le même groupe s'est intéressé aux protéines du cycle cellulaire dans des lymphocytes T purifiés à partir de souris chimères FADD^{-/-} → RAG-1^{-/-} (Zhang et al., 2001). Il s'avère que l'absence de FADD réduit les niveaux d'expression des cyclines D2 et D3. Cette diminution s'associe à une induction drastique de p21 qui pourrait justifier le défaut de progression de G₁ vers la phase S dans les lymphocytes T déficients pour l'expression de FADD.

L'utilisation d'un dominant négatif de FADD bloque efficacement les signaux apoptotiques fournis par les RM, mais également la prolifération cellulaire des lymphocytes T. Or cette protéine tronquée comporte toujours son site de phosphorylation sur la sérine 191 chez la souris et 194 chez l'Homme. Il est donc étonnant que la fonction de FADD dans le cycle cellulaire soit drastiquement compromise. Toutefois, le groupe de M. Peter a noté que la présence de FADD-DN favorise la phosphorylation du FADD endogène au stade G₂/M et contribuerait ainsi à l'inhibition de la progression du cycle cellulaire quand FADD-DN est exprimé (Alappat et al., 2005).

En conclusion, la phosphorylation de FADD permet de réguler sa fonction dans la prolifération cellulaire. D'autre part, son rôle dans l'apoptose ou la prolifération fait appel à des domaines différents, et il serait intéressant de définir si la sérine 194 chez l'Homme ou 191 chez la souris appartient à un troisième domaine. Enfin, il reste à déterminer comment FADD équilibre le processus entre apoptose et prolifération cellulaire.

2.2.3. FADD et immunité innée

En 2000, Aliprantis *et coll.* démontraient pour la première fois l'interconnexion entre les RM et les TLR lors de la transmission d'un signal d'apoptose par TLR2 (Aliprantis et al., 2000). Des travaux récents ont montré que FADD inhibe la réponse transmise par TLR4 en se liant à la molécule adaptatrice MyD88. La liaison de Fas simultanée à la stimulation par le LPS ou l'IL-1 β potentialise l'activation de NF- κ B dans des macrophages et ce en séquestrant FADD au sein du DISC (Ma et al., 2004).

Les travaux de Balachandran montrent la contribution directe de FADD dans la régulation de l'immunité innée (Balachandran et al., 2004). Les fibroblastes embryonnaires murins dépourvus de l'expression de FADD développent une sensibilité accrue à l'infection virale. Ces cellules sont incapables de monter une réponse aux ARN doubles brins par la production notamment d'interférons de type I. Une nouvelle voie de signalisation faisant interagir FADD, RIP et TBK-1 dans l'activation d'IRF-3 a été décrite suite à ces travaux. Ainsi, une nouvelle fonction de FADD dans l'immunité innée a été découverte et laisse place à de plus amples investigations.

Des résultats viennent d'être publiés qui documentent la contribution de FADD dans la prolifération des LB stimulés par des ligands des TLR (Imtiyaz et al., 2006). En effet, les LB provenant de souris *cd19/FADD*^{-/-} présentent une diminution drastique de leur prolifération quand ils sont cultivés en présence de Poly:IC/TLR3 (qui mime les ARN double brin) ou de LPS/TLR4.

2.3. Les fonctions non-apoptotiques des caspases.

La caspase-8 présente également une dualité fonctionnelle. Le phénotype des souris génétiquement déficientes pour la caspase-8 est assez proche de celui des souris FADD^{-/-} et ces souris meurent également *in utero*. Elles présentent des déformations cardiaques, des défauts de formation du tube neural ainsi qu'une diminution de la densité vasculaire démontrant son importance au cours du développement embryonnaire (Sakamaki et al., 2002; Varfolomeev et al., 1998). Des approches similaires à celles utilisées pour FADD ont été mises en œuvre pour étudier les fonctions de la caspase-8. Des systèmes d'inactivation génique ciblée utilisant le système Cre/lox sous la dépendance du promoteur *lck* permettent de supprimer la caspase-8. Comme FADD, la caspase-8 intervient dans l'homéostasie des lymphocytes T périphériques et participe à leur réponse proliférative suite à différents signaux tels que les anticorps anti-CD3, anti-CD28 ou l'addition d'IL-2 (Salmena et al., 2003). Cependant et contrairement à FADD, la caspase-8 ne semble pas participer pas au développement thymique des lymphocytes T ce qui suggère que tous les effets de FADD ne sont pas liés à l'activation de la caspase-8 (Salmena et al., 2003; Walsh et al., 1998).

Une approche d'inactivation génique conditionnelle a été utilisée par le groupe de Wallach dans laquelle la suppression de la caspase-8 est induite par injection de Poly:IC (expression de Cre sous le contrôle du promoteur *Mx-1* de résistance au myxovirus) (Kang et al., 2004). Deux jours après l'injection de Poly:IC, les auteurs notent une altération de la fonction des progéniteurs hématopoïétiques qui sont incapables de reconstituer la moelle osseuse et les organes lymphoïdes en LB et LT d'animaux irradiés. Cette différence peut s'expliquer par la suppression conditionnelle tardive de la caspase-8 lorsqu'elle s'effectue sous le contrôle du promoteur *lck*.

Les fonctions de la caspase-8 dans l'hématopoïèse ne sont pas restreintes au lignage T. Bien que l'effectif des progéniteurs hématopoïétiques ne soit pas modifié en absence de caspase-8, leur capacité à former des colonies myéloïdes ou B est sévèrement altérée, de même que leur prolifération en réponse à la stimulation par des cytokines (Kang et al., 2004; Pellegrini et al., 2005). Ces progéniteurs sont également incapables de reconstituer les lignages T et B dans la moelle osseuse ou les organes lymphoïdes de souris *Rag1*^{-/-} irradiées. De plus, la différenciation des monocytes en macrophages suite à la stimulation par du M-CSF est également dépendante de la caspase-8 (Kang et al., 2004; Sordet et al., 2002).

Les caspases, notamment la caspase-9 et -3, sont également impliquées, dans le développement érythrocytaire. L'utilisation de l'inhibiteur à large spectre des caspases (z-VAD) bloque la maturation *in vitro* des progéniteurs érythroïdes avant la condensation du noyau et de la

chromatine. L'inactivation de la caspase-3 par interférence à ARN bloque l'érythropoïèse à la transition entre les stades pro-érythroblaste et érythroblaste basophile (Carlile et al., 2004; Zermati et al., 2001). Comme nous l'avons vu précédemment, GATA-1 joue un rôle majeur dans l'érythropoïèse notamment dans la différenciation induite par l'EPO. L'absence d'EPO entraîne la mort par apoptose des cellules érythroïdes et GATA-1 clivé au cours du processus apoptotique. Cependant, il est préservé au cours de la différenciation terminale des érythrocytes dont le processus fait intervenir des caspases et qui ressemble au processus d'apoptose (condensation de la chromatine et dégradation de composants nucléaires) (Zermati et al., 2001).

En 2002, il a été rapporté le cas de deux patients possédant une caspase-8 mutée provoquant une stabilité réduite de la protéine et sa perte d'activité enzymatique. Ces patients présentent une immunodéficiência liée à des défauts d'activation et de prolifération des cellules T, B et NK ainsi qu'un défaut de production des immunoglobulines (Chun et al., 2002). Des résultats similaires sont observés chez la souris. L'impact de cette mutation est cependant moins drastique que l'absence de caspase-8 observée chez les souris puisque hormis le défaut d'activation des leucocytes, aucune atteinte du compartiment cardio-vasculaire ou de l'hématopoïèse n'est observée. Deux possibilités peuvent expliquer ces différences : a) la présence de la caspase-10 chez l'Homme qui est un homologue proche de la caspase-8 et qui est absente chez la souris, b) les différentes activités de la caspase-8 pourraient être liées à des différences structurelles de la protéine, ou indépendante de son activité catalytique. Mais cette dernière hypothèse est peu vraisemblable puisque la fonction de la caspase-8 dans la prolifération cellulaire est abolie en présence d'un inhibiteur spécifique, CrmA, dont le mode d'action est de bloquer l'activité protéolytique de la caspase-8 (Pellegrini et al., 2005).

Nous avons vu précédemment que FADD a récemment été impliqué dans la prolifération des LB stimulés par le LPS ou Poly:IC. En 2005, des résultats similaires incriminant la caspase-8 ont été publiés (Beisner et al., 2005). Ainsi, la caspase-8 n'est pas impliquée dans la prolifération des LB stimulés par CD40 ou IgM, mais les LB de souris *cd19/caspase-8^{-/-}* ne répondent plus aux agonistes de TLR3 et 4. Cette voie de signalisation recrute donc FADD et la caspase-8.

2.4. Les fonctions de FLIP

Les souris génétiquement déficientes pour c-FLIP présentent les mêmes défauts que les souris FADD^{-/-} ou caspase-8^{-/-} et meurent *in utero* laissant présager une fonction commune à ces trois molécules au cours du développement embryonnaire (Yeh et al., 2000).

D'autre part, des lymphocytes T isolés de souris qui n'expriment pas c-FLIP (c-FLIP^{-/-} dans le système lck-Cre) présentent des défauts de prolifération similaires à ceux observés dans des

lymphocytes T de souris déficientes pour FADD ou la caspase-8 (Zhang and He, 2005). De plus, des souris chimères $c\text{-Flip}^{-/-} \rightarrow \text{Rag}^{-/-}$ présentent un défaut en cellules B consécutif au développement B anormal chez ces souris mutantes (Chau et al., 2005).

2.5. FADD, Casapse-8 et c-FLIP agissent indépendamment des RM ?

Pour finir, dans la grande majorité des cas, FADD et la caspase-8 exercent leurs fonctions non-apoptotiques indépendamment de leur association avec les RM. L'étude des souris rendues génétiquement déficientes pour l'expression de différents RM ou des souris atteintes de mutation (*lpr*, *gld*) ne présentent aucun défaut embryonnaire ou hématopoïétique précoce. Au contraire, les souris *lpr* ou $\text{TNF-R1}^{-/-}$ démontrent que ces récepteurs sont impliqués dans l'apoptose des progéniteurs hématopoïétiques (Bryder et al., 2001; Schneider et al., 1999). Il y a augmentation de trente fois du nombre de cellules capables de donner des CFU-C dans la rate des souris *lpr* laissant présager une hématopoïèse extramédullaire due à l'espace limité dans la niche hématopoïétique. De même, on note une augmentation du nombre de CSH dans les souris $p55^{-/-}$ (TNF-R1) et le TNF associé ou non à Fas inhibe l'autorenouvellement des CSH.

Cependant, il serait nécessaire de générer un modèle de souris génétiquement déficientes pour tous les RM afin de s'assurer qu'il n'y a pas de redondance entre ces RM lors du développement embryonnaire et de leur fonctions dans l'hématopoïèse.

Ainsi, on peut noter que FADD, la caspase-8 et c-FLIP agissent de concert dans un contexte souvent indépendant des récepteurs de mort quand il s'agit de leurs fonctions non-apoptotiques. Les autres acteurs moléculaires pouvant recruter FADD, la caspase-8 voire c-FLIP restent à identifier.

Protéine cible	Approche	Observations					Références	
		Générales	Thymus	Thymocytes	Rate	LT spléniques		
FADD	FADD-DN/Lck	Résistance à l'apoptose induite par Fas	Diminution des nombres totaux de cellules	Blocage au stade DN3	Diminution des nombres totaux de cellules	Défaut de prolifération aux mitogènes (CD3/CD28) Diminution du nombre de cellules T	(Walsh et al., 1998)	
	FADD-DN/Lck		Pas d'impact	Diminution de la survie des T activés par leur TCR	-	Défaut de prolifération aux mitogènes (CD3/CD28)	(Newton et al., 1998)	
	Chimères FADD-/-		Diminution de la cellularité et des phénotypes à partir de 5 semaines			Défaut de prolifération aux mitogènes (CD3/CD28)	(Zhang et al., 1998)	
	FADD-DN/Lck		-	Diminution de la prolifération au cours du développement thymique	-	Défaut de prolifération aux mitogènes (CD3/CD28)	(Zornig et al., 1998)	
	FADD-DN/Rag1 ^{-/-}		-			-		(Newton et al., 2000)
	FADD ^{-/-} /Lck-Cre		Diminution des nombres totaux de cellules	Augmentation des DN et diminution des DP : blocage au stade DN3				(Kabra et al., 2001)
Caspase-8	CrmA/Lck		Pas d'impact	Pas d'impact	Pas d'impact	Pas d'impact	(Walsh et al., 1998)	
	Inhibiteurs de caspases (z-VAD, z-IETD)		-	-	-	Inhibition de la prolifération par des Ac anti-CD3	(Kennedy et al., 1999)	
	Casp-8 ^{-/-} /Lck-Cre					Inhibition de la prolifération par des Ac anti-CD3	(Salmena et al., 2003)	

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des études menées sur les fonctions de FADD et de la caspase-8 dans le lignage T.

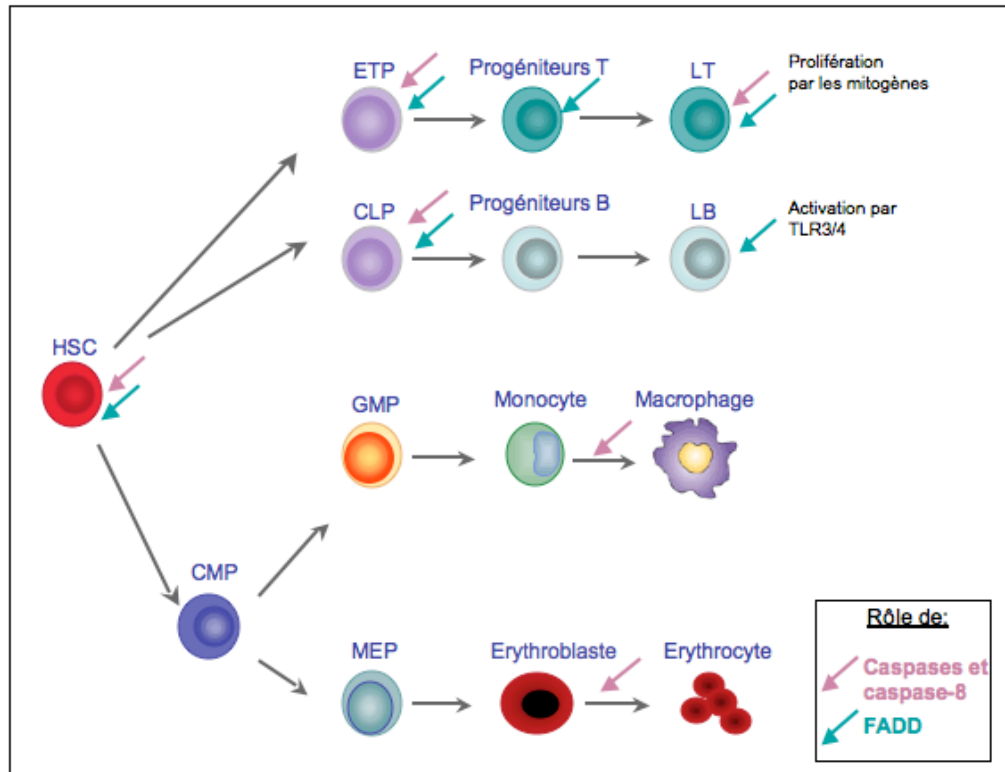


Figure 16: Schéma récapitulatif des implications de FADD et des caspases dans l'hématopoïèse.

OBJECTIFS

Mon équipe d'accueil s'était intéressée au rôle des récepteurs à domaine de mort, Fas en particulier, dans la régulation des réponses lymphocytaires B. A la fin des années 90, il était incontesté que la fonction des récepteurs à domaine de mort et de leurs éléments de signalisation était restreinte à la transduction d'un signal d'apoptose. Toutefois, en 1998, le groupe de Strasser montrait que l'inactivation fonctionnelle de FADD dans le compartiment lymphoïde T inhibait leurs capacités de réponse proliférative en réponse aux signaux transduits par le TCR et le pre-TCR, notamment. Ce sont les travaux de Zhang *et coll.* publiés cette même année qui nous ont conduit à nous intéresser au rôle de la molécule adaptatrice des RM, FADD, dans le développement lymphoïde B. Ces auteurs en utilisant une approche de complémentation génique aboutissant à l'extinction de FADD dans tout le compartiment lymphoïde, confirmaient la fonction de FADD dans la réponse proliférative T mais montraient en plus la complète absence de lymphocytes B matures chez ces animaux. Cette donnée suggérait que FADD pouvait exercer une fonction unique et non redondante au cours du développement B. Nous avons donc entrepris de déterminer à quelle étape du développement B intervenait FADD chez l'Homme. Nous avons utilisé un vecteur lentiviral pour introduire une construction codant pour un dominant négatif de FADD dans les CSH humaines. Puis nous avons analysé la différenciation des CSH transduites dans des systèmes de différenciation *in vitro* dans un premier temps, puis récemment lors de xénotransplantation de souris immunodéficientes (**Article I**).

Au cours de ce travail, plusieurs rapports ont décrit le phénotype consécutif à l'inactivation de certains récepteurs à domaine de mort chez la souris (Adachi et al., 1993; Bryder et al., 2001; Mariani et al., 1994; Schneider et al., 1999; Singer et al., 1994). Aucune de ces souris génétiquement modifiées ne présentait d'anomalies des lymphocytes T et B comparables à celles observées chez les animaux dont le gène FADD avait été invalidé dans le compartiment lymphoïde. Ces données suggéraient que les fonctions non-apoptotiques de FADD étaient peut-être dissociées de son recrutement par les RM. La voie FADD pouvait-elle donc être activée par d'autres récepteurs ? En 2000, Aliprantis *et coll.* publiaient la première observation d'une interaction entre FADD et la voie de signalisation des récepteurs Toll (Aliprantis et al., 2000). Ce travail nous a naturellement conduit à examiner l'expression des TLR sur les cellules hématopoïétiques humaines. D'autant plus que le rôle de l'inflammation dans l'hématopoïèse commençait à être décrit par le groupe de Kelsoe (Ueda et al., 2005; Ueda et al., 2004). Les signaux pro-inflammatoires mimés par

injection de TNF- α ou d'IL-1 β favorisaient la granulopoïèse médullaire et provoquaient la mise en place d'une lymphopoïèse B extramédullaire transitoire. Nous nous sommes donc tournés vers cette famille de récepteurs et nous avons cherché à décrire l'éventuelle contribution des TLR dans l'hématopoïèse. Ce projet a conduit à des résultats originaux qui vous sont présentés dans l'**article II**.

**Dominant negative interfering FADD expression in human HSCs
inhibits B cell commitment by blocking proliferation
of early progenitors.**

Karelle DE LUCA¹, Valérie DUVERT-FRANCES¹, Chantal BELLA², Laurent GENESTIER¹, and
Thierry DEFRANCE^{1,3}

¹ B cell differentiation and apoptosis, INSERM U404-IFR 128 Biosciences Lyon Gerland, 21
Avenue Tony Garnier 69007 LYON, France.

² Plateau technique de cytométrie, IFR 128 Biosciences Lyon Gerland, 21 Avenue Tony Garnier
69007 LYON, France.

³**Corresponding author:** Thierry DEFRANCE. B cell differentiation and apoptosis, INSERM
U404-IFR 128 Biosciences Lyon Gerland, 21 Avenue Tony Garnier 69007 LYON, France. Phone:
+33 437 282 395. Fax: +33 437 282 391. E-mail: defrance@cervi-lyon.inserm.fr

Abstract

The Fas-associated death domain protein (FADD) is a signaling adaptor protein that was originally isolated as a transducer of apoptotic signals for death domain-containing receptors. Analysis of FADD^{-/-} RAG1^{-/-} chimeric mice revealed that FADD also plays a critical role in both B and T cell early development possibly through positive regulation of lymphocyte proliferation. To explore the function of FADD in human B cell development, we decided to use a lentiviral gene delivery system for a dominant negative interfering form of FADD (FADD-DN) into human hematopoietic stem cells (HSC) and to study its impact on subsequent early B cell development. Here we report that HSCs expressing FADD-DN are able to differentiate in B lymphocyte upon differentiation in an *in vitro* B cell development model or when transplanted into sub-lethally irradiated Rag1^{-/-} γ_c ^{-/-} mice. All the stages of the B cell development are represented in both models. However, we have a severely reduced numbers of B cell compared to the cells expressing the GFP alone. Caspase-8 has been shown to exhibit similar functions as FADD in T cell development. Using the *in vitro* B cell differentiation system, we observed the same proliferative defects upon addition of a pan-caspase inhibitor Z-VAD, whereas the B cell differentiation is still complete. The reduced differentiation potential of HSCs in the B cell lineage is also observed for non-B cells for both FADD and caspase-8 suggesting that these two proteins constitute a signaling complex which might be required for HSCs functions.

Introduction

Death receptors (DRs) are surface molecules that when triggered have the capacity to induce apoptosis in mammal cells by forming the death-inducing signaling complex (DISC) (1). The DRs is a subgroup of the TNF-R superfamily that encounters 6 members: Fas/CD95, TNF-R1, DR3, DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2), DR6. The key characteristic of all DRs is a conserved sequence of 80 amino acids in the cytoplasmic tail, the death domain (DD), that is required for apoptosis initiation (1, 2). Upon triggering of apoptosis by Fas-Ligand engagement, the DD of Fas binds to the DD of Fas-associated death domain protein (FADD) and is followed by the recruitment of caspase-8 by their respective death effector domain (DED) (3, 4). By this mechanism, caspase-8 has been shown to be specifically activated and initiates cell death execution by the final activation of effector caspases-3, -6 and -7 (5). The apoptotic signal induced upon ligation of the ligand of the DRs is regulated by the cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP) which is homologous to caspase-8 but lacks a protease activity (6).

In addition to their apoptotic activity, FADD, caspase-8 and c-FLIP display also a role during embryogenesis, differentiation and proliferation. Indeed, mice deficient for FADD, caspase-8 or c-FLIP die *in utero* because of cardiac deformation, vasculature failure, or neural tube defects underlying their functions during embryonic development (5, 7-9). Furthermore, thymocytes and peripheral T cells from transgenic mice expressing a dominant negative interfering FADD (FADD-DN) which lacks the 80 N-terminal amino acids containing the DED show defect DR-induced apoptosis and in activation-induced proliferation (10-12). Similarly, FADD^{-/-} T cells in chimeric mice of the Rag1^{-/-} background also show impaired proliferation following activation (7). T cell specific deletion of caspase-8 or c-FLIP result in similar proliferation defects in peripheral T cells (13-17).

In addition to their role in T cell proliferation, these molecules play also a pivotal role in B cell homeostasis. Loss of function FADD or c-FLIP in chimeric mice of the Rag1^{-/-} background induced a profound defect in B cell development with the quasi absence of mature B cell in periphery (7,

13). However, the temporal requirement of FADD during B cell lineage development has not yet been determined.

In this study, we decided to use a lentiviral gene delivery system for FADD-DN into human HSC and to study its impact on subsequent early B cell development. We showed that expression of FADD-DN in HSC leads to a profound reduction of the B cell commitment. The differentiation is complete even if the total B cell numbers are severely impaired *in vitro* or *in vivo*. The inhibition of the caspase activity by the broad range caspase inhibitor also impairs B cell proliferation but not differentiation. The reduced differentiation potential of HSCs in the B cell lineage is also observed for non-B cells in the presence of FADD-DN or caspase inhibitor suggesting that this pathway play also a pivotal role in other hematopoietic lineage development.

Materials and methods

Cord Blood cell preparation

Umbilical cord blood (CB) samples were obtained from normal full-term deliveries following informed consent from the mothers and with approval of the ethics committees. The CB samples were placed in sterile tubes containing 10 ml of Citrate-Phosphate-Dextrose anticoagulant (Sigma) and processed within 24 hours. CD34⁺ CB cells were enriched by density gradient centrifugation using Ficoll-Hypaque (1,077g/ml, Invitrogen). Positive selection of CD34⁺ cells was performed by StemSep Human CD34 Positive Selection Kit (Stemcell Technologies) according to the manufacturer's instruction. The cells were then isolated by magnetic microbead selection using MidiMACS columns (Miltenyi Biotec). Occasionally, CD34 enriched cells were stained with an anti-CD38-PE and anti-CD34 FITC mAbs or with isotype matched irrelevant control Abs (all from BD Biosciences), and subsequently sorted on a FACSVantage cell sorter (BD Biosciences) as described below.

Construction of the lentiviral vectors.

Plasmid construction. A bicistronic vectors has been constructed with the FADD-DN linked to a downstream internal ribosomal entry site (IRES) and a marker gene that allow independent translation of the products of both genes in the transduced target cells. The IRES-GFP (green fluorescent protein) pWIR-IRES-GFP was kindly provided by Dr F.L. Cosset (ENS Lyon, France) and is further used as a control vector. The FADD-DN composed of amino acid 80-208, which lack the DED, was cloned into the pWIR-IRES-GFP under the control of the EF1 α promoter (18). The packaging plasmids pCMV Δ R8.91 (devoid of all HIV-1 accessory genes) were used to express the HIV-1 gag, pol, tat and rev genes and thereby produce lentiviral structural and regulatory proteins (19, 20). The plasmid pMD.G carrying the vesicular stomatitis virus envelope G protein (VSV-G) coding sequence driven by the CMV promoter was used to pseudotype the vector particles (20).

Vector stock preparation. Stocks of particles were prepared by transient cotransfection of the three plasmids into 293T cells. Vector production and gene delivery were done in a biosafety level 3

environment. Vector-producing cells and transduced cells were fixed by a 30 min incubation in phosphate-buffered saline containing 4% paraformaldehyde before fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis on a Becton Dickinson FACSCalibur.

In vitro culture

B progenitor culture. B-progenitors were assayed as previously described (21, 22). Briefly, 10^5 CD34⁺ cells/well were cultured on preseeded S17 murine stromal layer in 6-well plates. The murine stromal cell line (kindly provided by Dr K Dorschkind) was maintained in alpha-MEM medium supplemented with 2mM L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin, 2% HEPES (all from Invitrogen Life Technologies), and 5% of heat inactivated defined FBS (Hyclone Laboratories). The assay is conducted in RPMI1640 medium supplemented with 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin, 2% HEPES, 3% of heat inactivated defined FBS and β -Mercapto-ethanol (50 mM).

Lentiviral transduction. The sorted HSCs were cultured overnight in the presence of TPO (100 ng/ml), SCF (50 ng/ml), IL-3 (30 ng/ml) and Flt3-L (50 ng/ml), all purchased from Peprotech (Rockyhill, NJ). After overnight culture, the cells were transduced by incubating them for 6 to 12 hours with virus supernatant in 6-well plates. After transduction, the cells were washed and the transduction efficiency was tested by determining the percentage of GFP⁺ cells 2 days after transduction.

Flow cytometry and cell sorting

FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7 and APC conjugated mAb specific for human CD3, CD19, CD21, CD27, CD34, CD38, CD45 and IgD were purchased from BD Biosciences, Dako or eBioscience. Flow Cytometry analyses were conducted on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences), and the data were analyzed with CellQuest Pro software (BD Biosciences). Backgrounds levels were measured with isotype-matched PE-, FITC, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7 and APC-conjugated antibodies.

The CD34⁺CD38⁻ HSCs, CD34⁺CD38⁺ progenitors from CB, CD19⁺CD21⁻ B cell progenitors from human bone marrow and the IgD⁺CD27⁻ mature naïve B cells from tonsils were sorted with a FACS-Vantage (BD Biosciences). Purity of all sorted populations was at least of 97%.

Western Blot analysis

Cells (5x10⁶ per sample) were washed twice in cold PBS. They were then resuspended in 100µl of lysis buffer for cytosolic and membrane bound protein extraction (Tris pH 7,6 20 mM, NaCl 300 mM, Triton X100 2 %, EDTA 10 mM) containing protease inhibitor (1µg/ml leupeptin and 1µg/ml aprotinin) and incubated 15 min at 4°C. The cell-free supernatants were recovered by centrifugation of the suspension at 13000rpm for 15 min at 4°C. The protein concentration of the extracts was determined by the Lowry method (Biorad, Richmond, CA). For each sample, 30µg of protein were loaded on the gel, then separated by 12% SDS-PAGE and transferred to Hybond nitrocellulose membrane (Amersham Life Science). Following transfer, the immunoblots were blocked by incubating with 5% nonfat dry milk in TBS and 0,5% Tween. The blots were next probed overnight with the appropriate dilution of the primary Ab (anti-FADD, -GFP or β-actin) at 4°C and revealed with the HRP-conjugated goat anti-mouse polyclonal Ab (Amercham) for 1h at room temperature. After washing with PBS-Tween, the blots were developed using the ECL chemiluminescence method (Pierce, Rockford, IL) according to the manufacturer's protocol.

RNA isolation and quantitative real-time RT-PCR

Approximately 10⁶ purified cells were homogenized with 1 ml Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies), and total RNA were isolated according to manufacturer's protocol. cDNA were synthesized by extension of a mix of oligo (dT) and random primers with SuperScript III reverse transcriptase (all from Invitrogen Life Technologies) in a mixture containing 1 µg of total RNA first digested by RNase-free DNase (2 U/µg RNA) for 15 min at 37°C. The reaction mix was diluted 1/10 and stored at -20°C until real time PCR analysis. Specific primer sets for human DR, FADD,

caspase-8 and FLIP were designed using BEACON Designer[®] software and purchased from Invitrogen Life Technologies. All primer sets were intron-spanning and the absence of amplicons corresponding to genomic sequence provided evidence for the lack of genomic DNA contamination in the analyzed cDNA samples (data not shown). The real time PCR was performed on an ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) using the Platinum[®] SYBR[®]Green qPCR Supermix UDG with Rox Kit (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions in the Plateau Technique de PCR en temps réel (IFR128). The relative quantity of each transcript was normalized according to the mean of the expression of two different housekeeping genes: GAPDH and EEF1 and multiplied by one thousand.

Primer sequences (forward/reverse):

hCD95: 5'-TCGAAAGAATGGTGTCAATGAAGCC-3'; 3'-

CCTTGAGGATGATAGTCTGAATTTTCTCTG-5'

hDR3: 5'-TGCAGATGAAGCTGGGATGGAG-3'; 3'-CAGGAGGTGCTAGAAGGGTGTG-5'

hDR6: 5'-GTCCCTCCTCCACTTATGTTCCC-3'; 3'-TCCTGGATGCTACTCAGTACCTTTG-5'

hTNFR1: 5'-AACGAGTGTGTCTCCTGTAGTAACTG-3'; 3'-

CGATTTCCCACAAACAATGGAGTAGAG-5'

hTRAIL-R1: 5'-CCTTCAAGTTTGTCGTCGTCGG-3'; 3'-GGCTATGTTCCCATGCTGTGTG-5'

hTRAIL-R2: 5'-ACGATGCTGATAAAGTGGGTCAAC-3'; 3'-GTGGTCCTCAATCTTCTGCTTGG-5'

hFADD: 5'-TGGGGAAGAAGACCTGTGTGC-3'; 3'-TGCTGTCGATCTTGGTGTCTGAG-5'

hCasp8: 5'-GAGGAAATCTCCAAATGCAAAGTGG-3'; 3'-TCTTCAGCAGGCTCTTGTGATTTG-5'

hcFLIP: 5'-GTTTCGGACTATAGAGTGCTGATGG-3'; 3'-TCTCCTTGCTTATCTTGCCTCGG-5'

hEEF1 : 5'-GCTCACCTGCCAAGAGTACC-3'; 3'-GACCAGCCGTCCTTATCAAAGTG-5'

hGAPDH: 5'-CACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'; 3'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-5'

Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} repopulating assays

Newborn (< 1 week old) Rag2^{-/-}γ_c^{-/-} mice received sublethal (3.5 Gy) total body irradiation with an x-ray, and were injected intrahepatically with 0.3 to 0.5 x 10⁶ CD34⁺ CB cells. Six to 8 weeks after transplantation, the bone marrow (BM) from femurs, thymus and spleen were harvested and assessed for levels of GFP-expressing human CD45⁺ cells. Cells were prepared for 4-color flow cytometry to detect the percentage of GFP (GFP⁺) lineage-positive cells.

Results

Expression of the DR and their signaling molecules in distinct hematopoietic populations.

The exact nature of signals mediated by FADD during B cell development remains largely unknown. However, an involvement of DR signals through FADD remains a possibility. To investigate the role of DRs and their signaling molecules in human B cell development, we first analyzed their mRNA expression by quantitative RT-PCR in distinct sorted populations: CD34⁺CD38⁻ HSCs and CD34⁺CD38⁺ progenitors from cord blood, CD19⁺CD21⁻ B cell progenitors from bone marrow, and IgD⁺CD27⁻ mature naïve B cells from tonsils. All DR transcripts were expressed in the CD34⁺CD38⁻ HSCs and CD34⁺CD38⁺ progenitors (Fig. 1A). The expression of CD95, TRAIL-R1 and -R2 transcripts are decreased in the B cell progenitor compartment but enhanced in mature naïve B cells. Although DR3 is expressed in HSC and progenitors, it is almost absent in the B cell lineage (Fig.1A). Finally, TNF-R1 and DR6 are expressed in B cell progenitors but disappeared in mature B cells. The expression of caspase-8 and FLIP display similar profile with an expression sustained during the differentiation from HSCs to mature B cells, whereas FADD transcript shows profound variations of its expression with a maximal expression in HSCs and mature B cells (Fig. 1B).

Lentiviral transduction of CB CD34⁺ cells.

Because of their ability to transduce non-dividing cells, HIV based lentiviral vectors are good tools to mediate the efficient delivery, integration and long-term expression of transgenes in CD34⁺ HSCs. However, as most of the CD34⁺ cells are quiescent, cells isolated from CB were cultured overnight with cytokines to promote the transition G₀/G₁ and enhance the transduction efficiency (23, 24). Cell-free virus-containing supernatants were then added to the CD34⁺ cells at a multiplicity of infection (MOI) of 20. Two days later, the transduction efficiency was estimated by measuring GFP expression by flow-cytometry and reaches 37% ± 6 (n=5, a representative experiment is shown in Fig. 2A). To check the efficiency of the bicistronic vector to deliver two

independent proteins, we sorted GFP expressing (GFP⁺) and non-transduced (GFP⁻) CD34⁺ cells after transduction with FADD-DN-IRES-GFP lentiviral vectors and compared to the expression of 293T cells transfected with the pWIR-FADD-DN/GFP vector by Western blot (Fig 2A). All cells express endogenous FADD proteins. GFP and FADD-DN proteins are concomitantly expressed in GFP⁺ cells whereas no expression is found of either protein in the GFP negative population.

Expression of FADD-DN cells does not affect B cell differentiation in vitro.

To investigate the role of FADD on B cell development, CD34⁺ cells were infected with the FADD-DN-IRES-GFP or GFP control lentiviral particles as described above and cultured for 3 weeks on the S17 stromal cell line. Two days post-infection with FADD-DN-IRES-GFP or GFP control lentivirus, around 40% of the lymphoid cells (based on a FSC/SSC gate) were GFP⁺ (Fig. 2B). After 4 weeks of culture, only 9% of lymphoid cells transduced with FADD-DN-IRES-GFP expressed GFP while 22% of cells infected with GFP control lentivirus were still GFP⁺ (Fig. 2B). If we now analyze the kinetics of the recovery of the GFP⁻ versus GFP⁺ cells according to the initial input on the S17 stromal cells, we observe a distinct failure of the FADD-DN expressing cells to expand compared to GFP alone expressing cells (Fig 3A). This difference is even more drastic when looking at the total B cell numbers emerging from FADD-DN versus GFP transduced cells (Fig. 3B). However, the expression of the transgene FADD-DN leads to a similar proportion of B cell differentiation estimated by percentage of CD19⁺ cells (Fig. 3C) and the same differentiation profile with the development of immature B cells expressing κ/λ lights chains (Fig. 2B).

Caspases are involved in the hematopoietic development.

In order to investigate the eventual contribution of caspases during B cell development, CD34⁺ cells were cultured on S17 with the pan-caspase inhibitor z-VAD. The experimental procedure consisted to add z-VAD from the first day of the culture and all along the 5 weeks, or to add it at the second,

third or fourth week of culture until the end of the experiment. The differentiation is compared to the well without any addition of z-VAD. As control, we checked that z-VAD did not significantly modified proliferation or survival of the stromal S17 cell line. The initial finding was that the expansion of the cells was dramatically impaired when z-VAD was added all along the culture (Fig 5A). The later we add it, the less it exerts its effect, suggesting that it acts on the most immature cells or HSCs, and probably to a less extent on more differentiated cells. The B cell and the non-B cell compartment are both affected by the inhibition of the caspase activity, suggesting again a probable role for caspases on HSCs proliferation (Fig. 5A). Moreover the analysis of the B cell development stages shows no difference upon addition of z-VAD compared to control (Fig 5B), suggesting that inhibition of caspases does not affect the B cell development.

The hematopoietic development is impaired in Rag2^{-/-}γc^{-/-} mice reconstituted with FADD-DN transduced HSCs.

To further study the impact of FADD in the hematopoietic development, we used the immunodeficient Rag2^{-/-}γc^{-/-} mice model (25, 26). Newborns of less than one week were sublethally irradiated before intrahepatic injection of transduced HSCs with either IRES-GFP or FADD-DN-IRES-GFP lentiviral vectors. The efficiency post-transduction was very similar for both lentiviral vectors reaching up to 60% GFP⁺ cells (Fig. 6A and B). Eight weeks after reconstitution of the newborns, bone marrow, spleen and eventually thymus were analyzed for the expression of human CD45 pan hematopoietic antigen. Twenty percent of the total BM mononuclear cells were hCD45⁺ positive and constituted the human hematopoietic population whatever the source of CD34⁺ was (GFP or FADD-DN transduced cells) (Fig. 6A and B). Although the transduction efficiency was very similar two days post-transduction, the GFP⁺ cells in the FADD-DN reconstituted mice was hardly distinguishable whereas 25% of GFP alone expressing cells were detectable among the hCD45⁺ population. As only 3.10⁵ cells were injected per mouse, and approximately 8.10⁵ CD45⁺ cells were harvested in the bone marrow of GFP- or FADD-DN-transduced CD34-reconstituted

mice, we assume that these cells have proliferated and are not the initial injected cells. Preliminary data suggest that the percentage of CD3⁺ or CD19⁺ cells are comparable between GFP and FADD-DN expressing cells further indicating that the major defect is the proliferative capacity of the cells expressing FADD-DN and not their differentiation potential (data not shown).

Discussion

FADD was originally identified as an adapter molecule linking the activated CD95 to the effector molecule caspase-8 (1-4). c-FLIP is an essential cell survival factor that counteracts DR-induced apoptosis by binding to the DEDs of FADD and caspase-8, theoretically allowing it to physically interfere with caspase-8 recruitment to FADD (27). Experiments with gene knock-out and transgenic mice have demonstrated that FADD, caspase-8 and c-FLIP constitute a signaling complex with multiple function in apoptosis, embryonic development and proliferation of mature T cells (5, 7-14, 16, 17). Among these results, some evidence emerge that FADD or c-FLIP are also involved in early B cell development as the extinction of the expression of one of these proteins leads to a deep reduction of mature B cells in periphery (7, 13).

To investigate the role of FADD during B cell development, we generated lentiviral vectors containing a dominant negative mutant of FADD (FADD-DN) linked by an IRES sequence to the GFP. This enables us to transduce with high efficiency human CD34⁺ hematopoietic stem cells and to follow the B cell development *in vitro*, using the co-culture on S17 stromal cell line, or *in vivo* by reconstituting immunodeficient Rag2^{-/-}γc^{-/-} mice. Whether inhibition of FADD was used in our *in vitro* or *in vivo* model, our results show no anomalies of the B cell development but a dramatic defect of B cell numbers, confirming a pivotal role of the FADD/caspase-8 complex in generating mature naïve B cells in periphery. However, our results can not definitively define the temporal requirement of FADD during B cell lineage development. In human, the B cell differentiation starts from the HSCs which give rise to common lymphoid progenitors, then differentiating into CD19⁺/CD34⁺ pro-B, pre-B and immature B cells which express κ/λ light chains (for review (28)). In our *in vitro* model of human B cell development, we did not observe accumulation of cells at the pro-B, pre-B or immature B cell stage despite a profound reduction in the B cell numbers generated, suggesting that FADD would be required earlier than these specific B cell stages. These results diverge from previous data from Hua *et al.* reporting an accumulation of IgM⁺/B220⁺/CD43⁺ pro-B cells in the bone marrow of transgenic mice expressing a mutant form of FADD (FADD S191D)

devoid of its cell proliferation activity (29). These data suggest a role for FADD at the transition between pro-B and pre-B stages and the massive proliferation which go together with this step. These discrepancies may be due to the difference between mice and human, but also because in our *in vitro* model, pro-B cells are hardly apparent. To circumvent this problem, we used the *in vivo* model of Rag1^{-/-}γc^{-/-} mice reconstituted with control- or FADD-DN-transduced CD34⁺ cells. In this model, all stages of the B cell differentiation develop normally and can be easily identified by FACS analysis (data not shown). Although the percentage of GFP⁺ cells in FADD-DN-reconstituted mice is very low, our preliminary data suggest no accumulation of progenitor B cells in the bone marrow (data not shown), indicating again that FADD would be required before the pro-B cell stage. Recent data in mouse also confirm this hypothesis. Indeed the specific deletion of FADD to the B cell lineage, using the Cre/lox approach associated to the specific B cell promoter CD19 to extinguish FADD expression at the early commitment of the B cell lineage, shows no alterations of the early B cell development (30). Finally our results are also in accordance with data from Pellegrini et al. (31) which infected fetal liver stem cells with retroviruses encoding FADD-DN before reconstitution of lethally irradiated mice and showed the absence of lymphoid cells expressing FADD-DN. Using an *in vitro* colony formation assay, they also found that fetal liver stem cells expressing FADD-DN could not proliferate in response to cytokine stimulation. All together these data and ours are in favor of a requirement of FADD in proliferation of committed lymphoid progenitor cells and therefore further studies will be necessary to dissect the exact temporal requirement of FADD during development of these cells.

Mice deficient in the expression of FADD, caspase-8 and c-FLIP have a very similar phenotype allowing us to speculate that they constitute a signaling complex with dual function in apoptosis and proliferation. To address the role of caspases in B cell development, we added the broad spectrum inhibitor z-VAD on our *in vitro* model of B cell differentiation. Our results demonstrate a role for caspases in proliferation but not in the development of progenitor B cells. Many caspases have been involved in the hematopoietic development. In particular caspases-3, -8 and -9 are involved in the

differentiation process of monocytes into macrophages upon stimulation with the macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), whereas caspase-3 is activated when the erythroblast terminally differentiate into erythrocytes (15, 32, 33). Although our results using z-VAD does not allow to define precisely the nature of the caspase(s) involved in the profound reduction of B cell generated in our *in vitro* culture system, previous studies using Crm-A as specific inhibitor of caspase-8 demonstrated a pivotal role of this caspase in the development of lymphoid progenitors (31).

Our results also suggest that FADD and caspases are also implicated in the proliferation of non-B cells and are supported by the data on caspase-8 or FADD inhibition demonstrating the absence myeloid generation in lethally irradiated mice reconstituted with fetal liver stem cells infected with retroviruses encoding FADD-DN or in colony formation assay (31).

Acknowledgements

K. De Luca was the recipient of a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche et des Technologies, and was further supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

References

1. Ashkenazi, A., and V. M. Dixit. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-1308.
2. Ashkenazi, A., and V. M. Dixit. 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11:255-260.
3. Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari, and V. M. Dixit. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81:505-512.
4. Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter, and V. M. Dixit. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827.
5. Varfolomeev, E. E., M. Schuchmann, V. Luria, N. Chiannikulchai, J. S. Beckmann, I. L. Mett, D. Rebrikov, V. M. Brodianski, O. C. Kemper, O. Kollet, T. Lapidot, D. Soffer, T. Sobe, K. B. Avraham, T. Goncharov, H. Holtmann, P. Lonai, and D. Wallach. 1998. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9:267-276.
6. Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J. L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L. E. French, and J. Tschopp. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-195.
7. Zhang, J., D. Cado, A. Chen, N. H. Kabra, and A. Winoto. 1998. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392:296-300.
8. Yeh, W. C., J. L. Pompa, M. E. McCurrach, H. B. Shu, A. J. Elia, A. Shahinian, M. Ng, A. Wakeham, W. Khoo, K. Mitchell, W. S. El-Deiry, S. W. Lowe, D. V. Goeddel, and T. W. Mak. 1998. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279:1954-1958.
9. Yeh, W. C., A. Itie, A. J. Elia, M. Ng, H. B. Shu, A. Wakeham, C. Mirtsos, N. Suzuki, M. Bonnard, D. V. Goeddel, and T. W. Mak. 2000. Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 12:633-642.
10. Newton, K., A. W. Harris, M. L. Bath, K. G. Smith, and A. Strasser. 1998. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *Embo J* 17:706-718.
11. Walsh, C. M., B. G. Wen, A. M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, V. M. Dixit, and S. M. Hedrick. 1998. A role for FADD in T cell activation and development. *Immunity* 8:439-449.
12. Zornig, M., A. O. Hueber, and G. Evan. 1998. p53-dependent impairment of T-cell proliferation in FADD dominant-negative transgenic mice. *Curr Biol* 8:467-470.
13. Chau, H., V. Wong, N. J. Chen, H. L. Huang, W. J. Lin, C. Mirtsos, A. R. Elford, M. Bonnard, A. Wakeham, A. I. You-Ten, B. Lemmers, L. Salmena, M. Pellegrini, R. Hakem, T. W. Mak, P. Ohashi, and W. C. Yeh. 2005. Cellular FLICE-inhibitory protein is required for T cell survival and cycling. *J Exp Med* 202:405-413.
14. Chun, H. J., L. Zheng, M. Ahmad, J. Wang, C. K. Speirs, R. M. Siegel, J. K. Dale, J. Puck, J. Davis, C. G. Hall, S. Skoda-Smith, T. P. Atkinson, S. E. Straus, and M. J. Lenardo. 2002. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419:395-399.
15. Kang, T. B., T. Ben-Moshe, E. E. Varfolomeev, Y. Pewzner-Jung, N. Yogev, A. Jurewicz, A. Waisman, O. Brenner, R. Haffner, E. Gustafsson, P. Ramakrishnan, T. Lapidot, and D.

- Wallach. 2004. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol* 173:2976-2984.
16. Salmena, L., B. Lemmers, A. Hakem, E. Matysiak-Zablocki, K. Murakami, P. Y. Au, D. M. Berry, L. Tamblyn, A. Shehabeldin, E. Migon, A. Wakeham, D. Bouchard, W. C. Yeh, J. C. McGlade, P. S. Ohashi, and R. Hakem. 2003. Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev* 17:883-895.
 17. Zhang, N., and Y. W. He. 2005. An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes. *J Exp Med* 202:395-404.
 18. Salmon, P., V. Kindler, O. Ducrey, B. Chapuis, R. H. Zubler, and D. Trono. 2000. High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood* 96:3392-3398.
 19. Zufferey, R., T. Dull, R. J. Mandel, A. Bukovsky, D. Quiroz, L. Naldini, and D. Trono. 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72:9873-9880.
 20. Zufferey, R., D. Nagy, R. J. Mandel, L. Naldini, and D. Trono. 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15:871-875.
 21. Fluckiger, A. C., E. Sanz, M. Garcia-Lloret, T. Su, Q. L. Hao, R. Kato, S. Quan, A. de la Hera, G. M. Crooks, O. N. Witte, and D. J. Rawlings. 1998. In vitro reconstitution of human B-cell ontogeny: from CD34(+) multipotent progenitors to Ig-secreting cells. *Blood* 92:4509-4520.
 22. Rawlings, D. J., S. G. Quan, R. M. Kato, and O. N. Witte. 1995. Long-term culture system for selective growth of human B-cell progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1570-1574.
 23. Korin, Y. D., and J. A. Zack. 1998. Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J Virol* 72:3161-3168.
 24. Verhoeyen, E., V. Dardalhon, O. Ducrey-Rundquist, D. Trono, N. Taylor, and F. L. Cosset. 2003. IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T lymphocytes. *Blood* 101:2167-2174.
 25. Gimeno, R., K. Weijer, A. Voordouw, C. H. Uittenbogaart, N. Legrand, N. L. Alves, E. Wijnands, B. Blom, and H. Spits. 2004. Monitoring the effect of gene silencing by RNA interference in human CD34+ cells injected into newborn RAG2-/- gammac-/- mice: functional inactivation of p53 in developing T cells. *Blood* 104:3886-3893.
 26. Traggiai, E., L. Chicha, L. Mazzucchelli, L. Bronz, J. C. Piffaretti, A. Lanzavecchia, and M. G. Manz. 2004. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304:104-107.
 27. Thome, M., and J. Tschopp. 2001. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 1:50-58.
 28. Blom, B., and H. Spits. 2006. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 24:287-320.
 29. Hua, Z. C., S. J. Sohn, C. Kang, D. Cado, and A. Winoto. 2003. A function of Fas-associated death domain protein in cell cycle progression localized to a single amino acid at its C-terminal region. *Immunity* 18:513-521.
 30. Imtiyaz, H. Z., S. Rosenberg, Y. Zhang, Z. S. Rahman, Y. J. Hou, T. Manser, and J. Zhang. 2006. The Fas-associated death domain protein is required in apoptosis and TLR-induced proliferative responses in B cells. *J Immunol* 176:6852-6861.
 31. Pellegrini, M., S. Bath, V. S. Marsden, D. C. Huang, D. Metcalf, A. W. Harris, and A. Strasser. 2005. FADD and caspase-8 are required for cytokine-induced proliferation of hemopoietic progenitor cells. *Blood* 106:1581-1589.
 32. Sordet, O., C. Rebe, S. Plenchette, Y. Zermati, O. Hermine, W. Vainchenker, C. Garrido, E. Solary, and L. Dubrez-Daloz. 2002. Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* 100:4446-4453.

33. Zermati, Y., C. Garrido, S. Amsellem, S. Fishelson, D. Bouscary, F. Valensi, B. Varet, E. Solary, and O. Hermine. 2001. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* 193:247-254.

Figure legends

Figure 1. Death receptors and their signaling molecules are differentially expressed in the B cell development. The expression of the transcripts of the death receptors (A) CD95, TNF-R1, TRAIL-R1 and-2, DR3 and DR6 and their signaling molecules (B) FADD, caspase-8 and FLIP, is analyzed by real-time PCR. Their expression is analyzed on CD34⁺CD38⁻ HSCs and CD34⁺CD38⁺ progenitors isolated from CB, CD19⁺CD21⁻ B cell progenitors from BM and IgM⁺CD27⁺ naïve B cells from tonsils. The transcript expression is normalized by the expression of the house keeping genes and results are presented as relative expression.

Figure 2. Impact of FADD-DN on *in vitro* B cell development. (A) The efficiency of transduction of CD34⁺ cells isolated from CB with FADD-DN-IRES-GFP lentiviral vectors is estimated 2 days post-transduction by measuring the GFP expression by flow cytometry. Western blot analysis of the expression of FADD (endogen and FADD-DN transgene) or GFP in sorted GFP⁻ cells and GFP⁺ cells. Control line corresponds to 293T cells transfected with the FADD-DN-IRES-GFP lentiviral vector. (B) The transduction efficiency of CD34⁺ cells isolated from CB with FADD-DN-IRES-GFP or GFP control lentiviral vectors is estimated 2 days post-transduction by measuring the GFP expression by flow cytometry (right panel). Transduced HSCs are cultivated on S17 stromal cell line for 3 weeks and the percentage of GFP positive cells in the lymphoid gate was determined (middle panel). Finally generation of CD19⁺ κ/λ⁺ immature B cell development has been analyzed in the GFP gate of FADD-DN-IRES-GFP- or GFP control-transduced cells. Percentage in the upper right quadrant indicates the percentage of CD19⁺ κ/λ⁺ immature B cell among CD19⁺ cells.

Figure 3. Kinetics of *in vitro* B cell development in FADD-DN-transduced. (A) The emergence of GFP⁺ versus GFP⁻ cells in the lymphoid gate is estimated each week and normalized by the

number of cells initially seeded. **(B)** The B cells numbers that develop in the culture are calculated according to the percentage of CD19⁺ B cells and the total cell numbers among the GFP⁺ or GFP⁻ population. **(C)** The proportion of B cell differentiation is estimated by flow cytometry by CD19⁺ staining in the GFP⁺ or GFP⁻ population.

Figure 4. Effect of the pan-caspase inhibitor z-VAD on *in vitro* B cell development. **(A)** z-VAD was added from the first day of the culture and all along the 5 weeks, or at the second, third or fourth week of culture until the end of the experiment. Its impact on cellular growth of CD19⁺ B cells and CD19⁻ non-B cells is estimated at the end of a five weeks culture in the S17 *in vitro* B cell differentiation model. **(B)** The development along the B cell lineage is estimated by flow cytometry and the percentage of CD19⁺CD34⁺ pro-B cells, CD19⁺κ/λ⁺ immature B cells and CD19⁺cIgM⁺ (cytoplasmic IgM) pre-B/immature B cells was determined in the different condition of z-VAD addition.

Figure 5. Impact of the FADD-DN transgene on B cell differentiation in the Rag2^{-/-}γc^{-/-} model. **(A) and (B)** The transduction efficiency of FADD-DN-IRES-GFP lentiviral vectors or GFP control lentiviral vector is evaluated two days post-transduction of CD34⁺ cells. The transduced HSCs are injected intrahepatically in newborn mice after sublethal irradiation. 8 weeks post reconstitution, the bone marrow is evaluated for the development of human hematopoietic cells on the basis of the human pan-hematopoietic lineage marker CD45 (hCD45) (middle panel). The maintenance of the GFP positive cells in the CD45⁺ gated population is examined in the IRES-GFP compared to the FADD-DN-IRES-GFP.

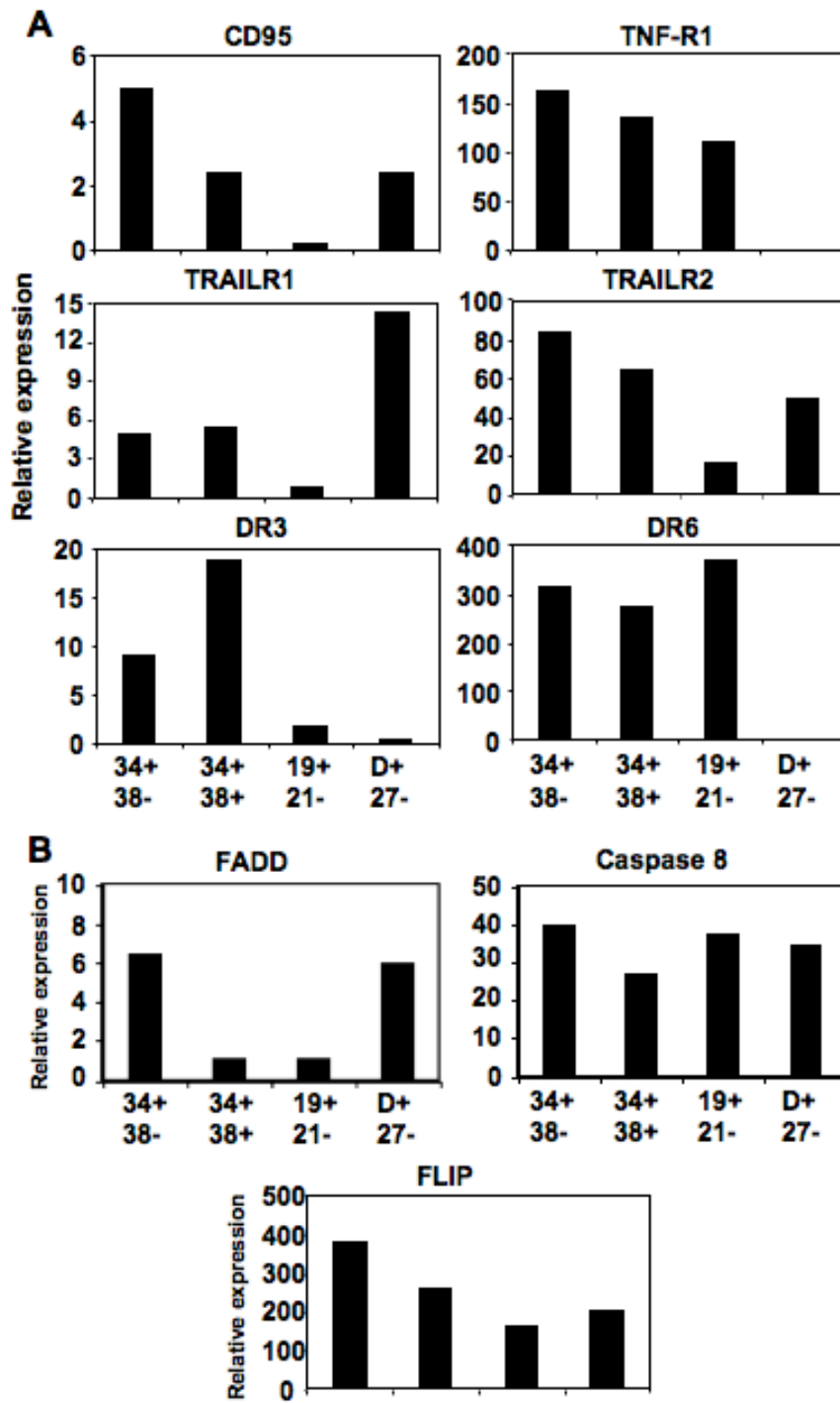


Figure 1, De Luca et al

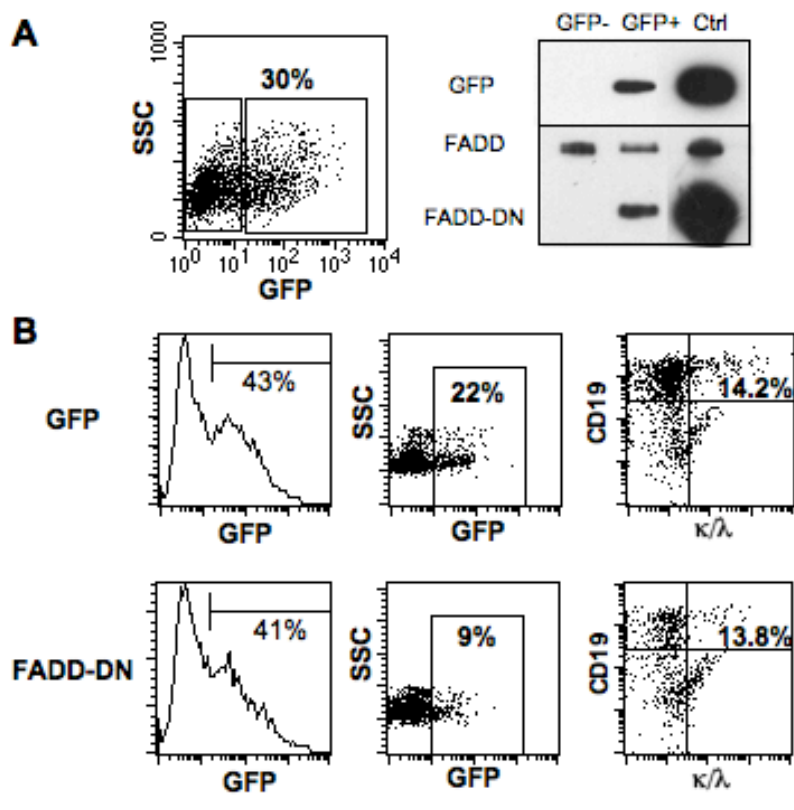


Figure 2, De Luca et al

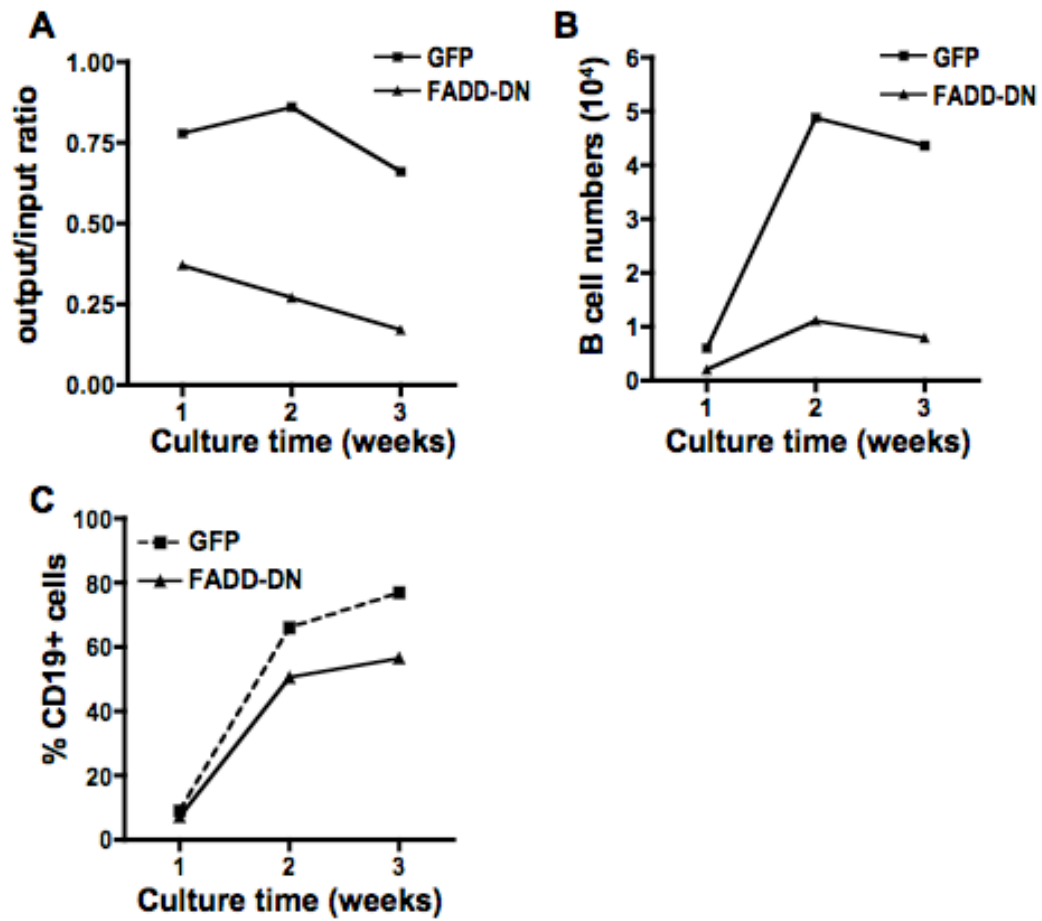


Figure 3, De Luca et al

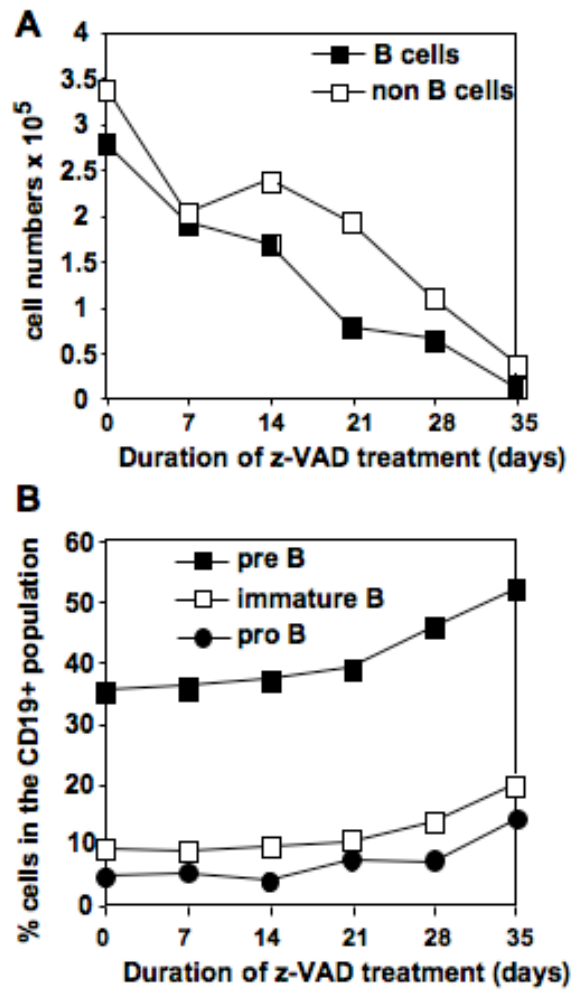


Figure 4, De Luca et al

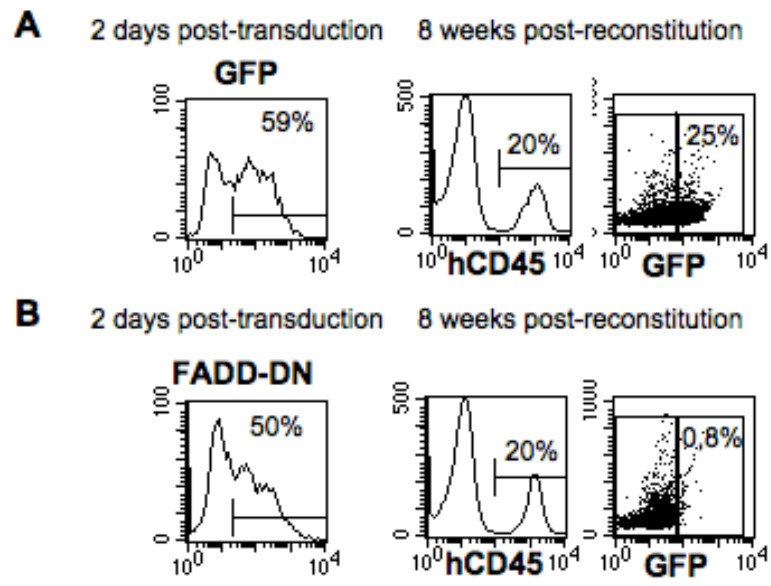


Figure 5, De Luca et al

TLR AGONISTS SKEW HUMAN HEMATOPOIETIC DEVELOPMENT IN FAVOUR OF THE MYELOID LINEAGE

Karelle DE LUCA*, Valérie DUVERT-FRANCES*, Laurent GENESTIER*, Morgan TAILLARDET*, Chantal BELLA**, Stéphane LANTHEAUME*** & Thierry DEFRANCE*

*INSERM, U404, IFR128 Biosciences Lyon-Gerland, 21 Avenue Tony Garnier, Lyon, 69365 cedex 07, FRANCE; Université Claude Bernard Lyon I, Lyon, FRANCE

**Plateau technique de cytométrie en flux, IFR128 Biosciences Lyon-Gerland, 21 Avenue Tony Garnier, 69365, Lyon cedex 07, FRANCE.

*** Department of Obstetrics, Centre Hospitalier de Valence, Valence, 26000, FRANCE.

Running title : TLR agonists skew human hematopoïesis

Keywords : Toll-like receptors, hematopoïesis, hematopoietic stem cells.

Abstract

Infections are known to elicit bone marrow lymphopenia and to promote granulopoiesis. Toll-like receptors (TLRs) constitute a subgroup of the Pathogen Recognition Receptors (PRR) family which are non-polymorphic receptors devoted to pathogen recognition. Their impact on the mature cells of the immune system is well documented but their influence on generation of these cells is still poorly described. In the present work we have explored the impact of TLR ligands (TLR-L) on human hematopoiesis. We show by quantitative RT-PCR analysis that both totipotent hematopoietic stem cells/HSCs (CD34+/CD38-) and lineage-committed progenitors (CD34+/CD38+) express TLR transcripts with a predominant representation of TLR1, 2, 3, 4 and 6. The corresponding TLR agonists (in particular PAM₃CSK₄, the ligand for TLR1/2) were found to promote proliferation of both HSCs and progenitors. When added in long term cocultures of HSCs, seeded on the stromal cell line S17, most TLR-L profoundly inhibit B cell development while preserving the production of myeloid cells. In short-term liquid cultures of HSCs or progenitors, PAM₃CSK₄ induces expression of myeloid markers of the myelo-monocytic, granulocytic and megakaryocytic lineages. These phenotypical modifications are accompanied by a significant modulation of their transcriptional network that is characterized by: i) the induction of transcription factors involved in myeloid commitment (CEBP α , PU.1 and GATA-1) and ii) repression of Pax5, one of the molecular signature of B lineage commitment. Our results suggest that TLR agonists can reprogram human HSCs and bias the lineage commitment of progenitors in order to favour myelopoiesis at the expense of lymphoid B cell development. Implications of these findings on the existence of a multipotential myelo/B cell progenitor in humans will be discussed. In the course of infection, engagement of TLRs by pathogens could contribute to enhance production of effector cells of the innate immune system.

Introduction

The classical model of hematopoiesis proposes that pluripotent hematopoietic stem cells (HSCs) give rise to progenitors that have committed to either a lymphoid cell fate (common lymphoid progenitor/CLP) or myeloid/ erythroid cell fate (common myeloid progenitor/CMP). CLP are believed to ultimately give rise to single-lineage progenitors committed to becoming T, B or NK cells. CMP are postulated to generate two populations of bipotential progenitors: i) the granulocyte/monocyte progenitor (GMP) and ii) the megakaryocyte/erythroid progenitor (MEP) (1). The establishment of all hematopoietic lineages during development is mediated by transcription factors that act in sequential and parallel fashions, building lineage-specific networks or circuits (2, 3). It exists two contrasting lines of thoughts regarding lineage commitment. The stochastic hypothesis implies that lineage choice is a cell-intrinsic process that involves the stochastic upregulation of transcription factors or other regulatory molecules. The instructive hypothesis infers that hematopoietic cell fate is driven by extracellular factors including cytokines, direct cell-cell interactions, or other environmental cues. Hematopoietic factors are known to exert a permissive function, i. e. to promote survival and/or expansion of precommitted progenitors (4). It is conceivable that cytokines can play both an instructive and a permissive role, depending on the context. In line with this hypothesis, it has recently been documented that multipotent progenitors express myeloid receptors such as c-fms, the G-CSF receptor and the alpha chain of the GM-CSF receptor, normally expressed in committed granulocyte and/or macrophage precursors (5).

It has long been known that severe infections and inflammatory signals can affect the production of peripheral blood cells. Experimental pneumococcal infection accelerates the bone marrow release of neutrophils (6, 7). Certain virus such as the Human Herpes virus-7 (HHV7) accelerate the maturation of human hematopoietic progenitors along the myeloid lineage (8). Adjuvants and proinflammatory cytokines such as $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ substantially reduce the numbers of lymphocytes in the bone marrow (9, 10). More recently, the group of Kelsoe has documented that

inflammatory signals such as those provided by endotoxin enhance granulopoiesis at the expense of lymphopoiesis in the mouse (11, 12).

It is now established that the immune system detects conserved microbial structures as danger signals. These pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) provoke an immediate and robust immune response. Toll-like receptors (TLRs) belong to the Pathogen Recognition Receptor (PRR) superfamily which is devoted to the recognition of PAMPs. To date 12 members of the TLR family have been identified in mammals (13). Their most common natural or synthetic ligands include peptidoglycan and PAM₃CSK₄ (TLR1/2), bacterial lipoproteins and MALP2 (TLR2/6), double-stranded RNA and poly:IC (TLR3), LPS (TLR4), flagellin (TLR5), single-stranded RNA and imidazolequinolins (TLR7 and 8), unmethylated CpG oligodeoxynucleotides (TLR9) and a profilin-like molecule (TLR11) (13-16). We now report that both human HSCs and lineage-committed progenitors express functional TLRs. Addition of TLR agonists in long-term cocultures of HSCs and progenitors on the S17 stromal cell line profoundly inhibited B cell development and promoted emergence of myeloid cells. In short-term stromal cell-free cultures of HSCs or progenitors, the TLR1/2 agonist PAM₃CSK₄ induced expression of monocytic and dendritic cell markers. These phenotypical modifications were accompanied by a significant modulation of their transcriptional network characterized by induction of transcription factors involved in myeloid commitment (CEBP α , PU.1 and GATA-1) and repression of Pax5, one of the molecular signature of B lineage commitment. Our results suggest that TLR agonists can bias the developmental programme of human HSCs and progenitors in order to favour the production of macrophages and dendritic cells. In the course of microbial infection, this process could contribute to increase the output of effector cells of the innate immune system.

Materials and Methods

Antibodies

The following antibodies used for phenotyping an isolation of hematopoietic populations were purchased from:

- Becton Dickinson BD/Biosciences/Pharmingen (San Diego, CA): FITC-conjugated anti-CD1a, anti-CD4, anti-CD7, anti-CD15, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD45, anti-CD56, anti-CD57, anti-CD66b mAbs and FITC-conjugated mouse IgM isotypic control; phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD3, anti-CD8, anti-CD7, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD33, anti-CD34, anti-CD38, anti-CD41a and anti-CD116 (GM-CSFR) mAbs; PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD19; allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD34 and anti-CD45 mAbs; PE-Cy7-conjugated anti-CD38.
- Immunotech (Marseille, France): FITC-conjugated anti-CD3 and PE-conjugated anti-CD16 and anti-CD56.
- Dako (Glostrup, Denmark): FITC-conjugated anti-CD11c, FITC-, PE-, PerCP-Cy5.5- and APC-conjugated mouse IgG1 κ used as isotypic control..

Reagents

G-CSF (20 ng/ml) was purchased from Amgen. The source and working concentrations of TLR ligands are as follows: PAM₃CSK₄ (also referred as PAM in the figure legends), 10 μ g/ml (Bachem); poly:IC, 100 μ g/ml, LPS, 1 μ g/ml, R848, 1 μ M and flagelline, 1 μ g/ml (Invivogen); MALP-2, 100 ng/ml (Alexis Biochemicals); CpG 2006, 50 nM (MWG).

Cell preparation

- Hematopoietic stem cells and progenitors. Umbilical cord blood (CB) samples were obtained from normal full-term deliveries following informed consent from the mothers and with approval of the Ethics Committee of the hospital. Whole CD34⁺ CB cells were enriched as follows. Briefly, CB

mononuclear cells were separated by Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation (Invitrogen) and labelled using the StemSep Human CD34 Positive Selection Kit (Stemcell Technologies) according to the manufacturer's instruction. CD34⁺ cells were first enriched by magnetic microbead selection using MidiMACS columns (Miltenyi Biotec) and then sorted on a FACSVantage cell sorter (BD Biosciences).

Hematopoietic stem cells (HSCs) defined as CD34⁺/Lin⁻/CD38^{low} cells and hematopoietic progenitors defined as CD34⁺/Lin⁻/CD38^{high} cells were sorted from enriched CB CD34⁺ cell preparations recovered after one immunomagnetic selection step. FITC-conjugated antibodies to the following markers were used to sort indicated lineage negative (Lin⁻) populations: CD1a, CD3, CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD56, CD57, CD19 and Glycophorine A/CD235.

- B cells. Human B cell precursors were isolated bone marrow (BM) aspirates obtained from consenting normal adult volunteers or from from Rag2^{-/-} γc^{-/-} mice transplanted with human CB CD34⁺ cells (hereunder referred as “humanized mice”). BM mononuclear cells separated by Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation were labelled with anti-CD19 and anti-CD21 antibodies (human BM samples) or with anti-CD19 and anti-CD20 antibodies (mouse BM samples). CD20 was preferred to CD21 antibodies to exclude mature B cells in humanized mice because the latter marker was found to poorly discriminate mature B cells from B cell precursors in this model. Human mononuclear cells isolated from “humanized mice” BM were defined as cells falling within the leukocyte gate and expressing the pan-hematopoietic cell marker CD45. B cell precursors comprising pro-B, pre-B and immature B cells were then sorted as CD19⁺/CD21⁻ cells (human BM samples) or CD45⁺/CD19⁺/CD20⁻ cells (mouse BM samples). Enriched B cell populations were prepared from tonsils as described previously (17). Naïve mature B cells were then sorted as IgD⁺/CD27⁻ according to the classification established by the group of Kupperts (18).

Humanized mice

BALB/C Rag2^{-/-} IL-2Rγc^{-/-} also referred as Rag2^{-/-} γc^{-/-} mice were kindly provided by Dr. Nomura (Central Institute for Experimental animals, Kawasaki, Japan). They were bred and maintained under specific pathogen-free conditions and were fed autoclaved food and water. 2x10⁵ to 5x10⁵ CB CD34⁺ cells were transplanted intrahepatically into sublethally irradiated (2x1.75 Gy) newborn (between 1 and 6 days of age) Rag2^{-/-} γc^{-/-} mice, as previously described (19). Mice were sacrificed between 10 and 15 weeks post-transplantation. Staining with the pan-hematopoietic cell marker CD45 was used to monitor efficiency of the human reconstitution.

Cultures

- In vitro B cell lymphopoiesis. The S17 murine stromal cell line (kindly provided by Dr K Dorschkind (UCLA Institute for Stem Cell Biology and Medicine, Los Angeles, CA, EU) was maintained in α-minimal essential medium (αMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 2% HEPES (all from Invitrogen Life Technologies), and 5% heat-inactivated defined FBS (Hyclone Laboratories). CB CD34⁺ cells were plated on 50% to 60% confluent S17 monolayers in 6-well plates at a density of 1x10⁵ cells/well. Cocultures of S17 and CD34⁺ cells were conducted in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 2% HEPES, 3% heat-inactivated defined FBS and β-mercapto-ethanol (50 mM) as previously described (20, 21). TLR ligands were added weekly at the concentrations indicated below. Phenotypical analysis of the progeny of CD34⁺ cells was performed at day 14.

- stromal cell free cultures for phenotyping studies. Whole CD34⁺, isolated HSCs, progenitors or B cell precursors were seeded in 24 well plates at a density of 2x10⁵ to 5x10⁵ cells/well and cultured in complete RPMI medium (see above) in the presence or absence of PAM₃CSK₄. Each culture point was performed in duplicate wells. Cells were harvested after 6 days of culture and proceeded for immunofluorescence staining.

Functional assays

- Measurement of apoptosis. Cells were cultured in duplicate wells (1×10^5 cells/well in 96 wells plates) with or without an optimal concentration of TLR ligands or G-CSF for 2 to 6 days. The rate of apoptosis was estimated by analysis of phosphatidylserine exposure quantified by surface binding of annexin V according to the instructions of the manufacturer (Bender MedSystems).

- Proliferation. Cells were cultured in triplicate wells (5×10^4 cells/well in 96-well plates) with the given concentrations of TLR ligands or G-CSF for the indicated times. Cells were pulsed with 1 μ Ci/well 3 H-thymidine (Amersham) for the last 16 hours of the culture. They were then harvested using an automated cell harvester (Packard Instrument Company Inc) and 3 H-thymidine incorporation was determined in a scintillation counter (TopCount, Packard Instrument Company Inc.).

RNA isolation and quantitative real-time RT-PCR

Approximately 10^6 purified cells were homogenized with 1 ml Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies), and total RNA were isolated according to manufacturer's protocol. cDNA were synthesized by extension of a mix of oligo (dT) and random primers with SuperScript III reverse transcriptase (all from Invitrogen Life Technologies) in a mixture containing 1 μ g of total RNA first digested by RNase-free DNase (2 U/ μ g RNA) for 15 min at 37°C. The reaction mix was diluted 1/10 and stored at -20°C until real time PCR analysis. Specific primer sets for human TLR1 to 10, the TLR adaptors MyD88 and TRIF, the transcription factors Pax5, PU.1, C/EBP α , GATA-1 and GATA-3 were designed using the BEACON Designer[®] software and purchased from Invitrogen Life Technologies. All primer sets were intron-spanning and the absence of amplicons corresponding to genomic sequence provided evidence for the lack of genomic DNA contamination in the analyzed cDNA samples (data not shown). The real time PCR was performed on an ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) using the Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Supermix UDG with Rox Kit (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions in the Plateau

Technique de PCR en temps réel (IFR128). The relative quantity of each transcript was normalized according to the mean of the expression of two different housekeeping genes: GAPDH and EEF1.

Primer sequences (forward/reverse) are as follows:

hTLR1: S CCCATTCCGCAGTACTCCAT; AS TTTTCCTTGGGCCATTCCA
hTLR2: S TGATGCTGCCATTCTCATTCTTCTG; AS ACTCCAGGTAGGTCTTGGTGTTT
hTLR3: S GCCTTCTGCACGAATTTGACTG; AS TGTAGATGACAAGCCATTATGAGAC
hTLR4: S CTGCAATGGATCAAGGACCA; AS TTATCTGAAGGTTGCACATTCC
hTLR5: S TGCCTTGAAGCCTTCAGTTATG; AS CCACCACCATGATGAGAGCA
hTLR6: S CCCTCAACCACATAGAAACG; AS GAGATATTCCACAGGTTTGG
hTLR7: S TTACCTGGATGGAAACCAGCTACT; AS TCAAGGCTGAGAAGCTAAGCTA
hTLR8: S AACTTTCTATGATGCTTACATTTCTTATGAC; AS GGTGGTAGCGCAGCTCATT
hTLR9: S TGAAGACTTCAGGCCCAACTG; AS TGACACGGTCACCAGGTTGT
hTLR10: S TTTGATCTGCCCTGGTATCTCA; AS AGTTGTTCTTGGGTTGTTTTCTAAC
hMyD88: S AGACAGCAGTGTCCCACGG; AS ATAGCAGATGAAGGCATCGAAACG
hTRIF: S TCTGTAGAAGATACCACCTCTCCAAATAC; AS CCTGGCGTGGAGGATCACAAAG
hPU.1: S TGCCCTATGACACGGATCTATAACC; AS GTGAAGTTGTTCTCGGCGAAGC
hPax5: S TTCCCTGTCCATTCCATCAAGTCC; AS TCCTGTCTGCTGGTCCGAG
hC/EBP α : S CAAGAAGTCGGTGGACAAGAACAG; AS CACGTTGCGCTGCTTGGC
hGATA1: S CAGTCTTTCAGGTGTACCCATTGC; AS GAGCCCCGTCTTGCCGTAG
hEEF1: S GCTCACCTGCCCAAGAGTACC; AS GACCAGCCGTCCTTATCAAAGTG
hGAPDH: S CACCCACTCCTCCACCTTTGAC; AS GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG

Cell morphology

Cytospins of freshly-isolated and cultured CD34⁺ cells were prepared and stained with Giemsa-May-Grünwald (Sigma Diagnostics, St. Louis, Mo), mounted in Immersol (Zeiss) and analyzed on a Zeiss Axioplan 2i microscope with a 100x objective.

Results

Human hematopoietic stem cells and progenitors express functional TLRs.

The pattern of expression of the 10 human TLR transcripts was analyzed by real-time RT-PCR in four cell populations representing distinct stages of hematopoietic development:

i) HSCs (CD34⁺/CD38^{low}), ii) a mixed population of early progenitors including lymphoid, myeloid and erythroid progenitors (CD34⁺/CD38^{high}), iii) a mixed population of B cell precursors including pro-B, pre-B and immature B cells (CD19⁺/CD21⁻), iv) naïve mature B cells (IgD⁺/CD27⁻). HSCs and hematopoietic progenitors were isolated from cord blood, B cell precursors from bone marrow samples and naïve mature B cells from tonsils. All cell subsets were sorted to a purity > 97%. As shown in Fig. 1, TLR transcripts were expressed on all four populations but with a different distribution. With the exception of TLR4, the TLR profiles of HSCs and hematopoietic progenitors were comparable and characterized by the prominent expression of the TLR1, 2, 3 and 6 transcripts. Expression of TLR4 was significant in progenitors but marginal in HSCs. A significant shift in the TLR profile was observed in B cell precursors in which the most highly expressed TLR transcripts are TLR1, 9 and 10. These three TLRs are also prominently expressed in naïve mature B cells together with the TLR6 and 7 transcripts. Qualitatively, TLR9 and 10 appear to have hallmarks of the B cell compartment while TLR3 is overexpressed in the early hematopoietic compartments. The expression of the two main adaptor molecules involved in TLR signaling, namely MyD88 and TRIF, was qualitatively and quantitatively comparable in all four cell subsets considered (data not shown).

In order to test the functionality of the TLRs expressed by HSCs and progenitors, whole CD34⁺ cells that contain HSCs and both lymphoid and myeloid progenitors were positively selected by immunomagnetic cell sorting from CB mononuclear cells and cultured with various natural or synthetic TLR ligands. Their proliferative response (³HTdR incorporation) and rate of apoptosis (Annexin V staining) were estimated at the end of 48 h culture period. As shown in Fig. 2A and B, all TLR agonists tested stimulated the proliferation and repressed apoptosis of CD34⁺ cells to a

variable degree. Flagellin (TLR5 ligand) only marginally stimulated the proliferative response while PAM₃CSK₄ (ligand of the TLR1/2 heterodimer) was the most potent growth stimulator. The impact of this TLR agonist on the growth and survival of CD34⁺ cells was even superior to that of G-CSF a colony-stimulating factor known to promote expansion of committed myeloid progenitors (Fig. 2C and D). To compare the susceptibility of HSCs and progenitors to the growth-stimulatory effect of TLR ligands, CD34⁺/CD38^{low} (HSCs) and CD34⁺/CD38^{high} (progenitors) cells were sorted from CB and cultured with or without PAM₃CSK₄. ³HTdR incorporation was measured at the end of a 48 h culture period. As illustrated by Fig. 2E, PAM₃CSK₄ stimulated the proliferation of both cell types although the amplitude of the response was higher in progenitors than in HSCs. Altogether these observations indicate that human HSCs and early hematopoietic progenitors express functional TLRs and that triggering of the TLR pathway promotes their proliferation.

TLR agonists repress human B cell lymphopoiesis

We next examined whether TLR ligands exerted any influence on the hematopoietic potential of HSCs and progenitors. We first investigated their impact on in vitro B cell lymphopoiesis using long term cultures of CB CD34⁺ cells seeded on the S17 murine bone marrow stromal cell line, a culture system described to support differentiation of CD34⁺ cells along the B lineage pathway (20, 21). Cultures were pursued on S17 for 2 weeks in the presence or absence of various TLR ligands (added twice at day 0 and 7). At the end of the cultures, emerging hematopoietic cells were analyzed for the expression of B cell (CD19), T and NK cell, (CD3, CD16, CD56) pan-myeloid (CD33), monocyte (CD11b, CD14), dendritic cell (CD11c), granulo-monocytic (CD66b, CD114, CD115, CD116) and megakaryocytic (CD41a) lineage markers by flow cytometry. Fig. 3A illustrates the impact of PAM₃CSK₄ on the expression of a series of selected markers. Because of the heterogeneity in size and granulometry of the cells that emerge from the S17 cultures, we chose to show dot plots that combine the fluorescence and side scatter (SSC) parameters. As expected, control cultures produced mainly CD19⁺ B cells, with marginal contribution of myeloid cells. By

contrast, the cell output of PAM₃CSK₄-stimulated cultures is characterized by a drastic reduction of the percentage of CD19-expressing cells and by a significant increase of the proportion of cells (40 % on average) that express the myeloid markers CD33, CD11b, CD11c, CD14 and CD116 (GM-CSF R). The levels of expression of the T (CD3) and NK (CD16, CD56) cell markers and of the other myeloid markers examined (CD114, CD115, CD66b and CD41a) were marginal whatever the culture conditions applied. It thus appears that PAM₃CSK₄ favours emergence of myeloid cells that bear monocytic (CD11b, CD14, CD116) and/or dendritic (CD11c) markers but does not induce differentiation of cells belonging to the T, NK, or megakaryocytic lineages. Fig. 3B shows that the modifications of the staining profiles in PAM₃CSK₄-stimulated cultures truly reflect reduction of the B cell (CD19⁺) numbers and a concomitant rise in the myeloid cells (CD33⁺) numbers produced. It also documents that TLR agonists do not all display equivalent effects on B cell lymphopoiesis and myelopoiesis in the S17 culture model. Some of them reduce B cell lymphopoiesis but fail to enhance myelopoiesis. LPS (TLR4) and CpG oligonucleotides (TLR9) belong to this category. Others, such as PAM₃CSK₄ (TLR1/2), R848 (TLR7 and 8), MALP2 (TLR2/6) and poly:IC (TLR3) repress B cell lymphopoiesis and enhance myelopoiesis. Flagellin, the sole member of the third category, does not modulate B cell lymphopoiesis but stimulates myelopoiesis. Therefore, PAM₃CSK₄ was not only the TLR ligand that displayed the most potent stimulatory effect on the proliferation and myeloid differentiation of CD34⁺ cells but it was also one of the most efficient repressor of their lymphoid differentiation. It was thus chosen in the rest of the study to explore further the modulatory functions of TLR agonists on the hematopoietic potential of human HSCs and progenitors. Altogether these observations show that: i) most TLR agonists repress induction of B lymphopoiesis in long-term cultures of CB CD34⁺ on S17 cells, ii) some TLR ligands (among which PAM₃CSK₄) shift the cell output of this culture system from B cells to myeloid cells.

PAM₃CSK₄ promotes differentiation of isolated progenitors and HSCs along the myeloid pathway

Because the in vitro lymphopoiesis model described above relies on the co-culture of CD34⁺ cells and S17 cells, it cannot be ruled out that the modulatory function of TLR agonists on human hematopoiesis is mediated by the stromal cells. To address this question, stromal-cell free cultures of sorted CB CD34⁺/Lin⁻ cells were supplemented or not with PAM₃CSK₄. Cells were harvested after 6 days of culture and stained with the same set of antibodies that had previously been used for phenotyping the cell populations emerging from the S17 system. The results of a representative experiment illustrated by Fig. 4A show that the myeloid markers (i. e. CD14, CD11b, CD11c and CD116) that appeared in co-cultures of CD34⁺ cells and S17 cells supplemented with PAM₃CSK₄ are also induced when CD34⁺ cells are exposed to PAM₃CSK₄ in the absence of stromal cells. As shown in Fig. 4B, PAM₃CSK₄ stimulation yielded a significant proportion of large cells, highly vacuolated, that are morphologically close to macrophages. The dramatic morphological changes undertaken by CD34⁺ cells in response to PAM₃CSK₄ are also revealed by the emergence of a subset with a high side scatter value (Fig. 4A, upper panel, first dot plots of each row).

CD34⁺ cells constitute a very heterogeneous population, which precludes precise identification of the cellular targets of TLR agonists. We thus decided to conduct the same experiments on isolated HSCs or committed progenitors, that were sorted from CB as CD34⁺/Lin⁻/CD38^{low} cells and CD34⁺/Lin⁻/CD38^{high} cells, respectively. Because of the paucity of HSCs in CB and of the low cell recovery of cultures conducted in medium only, the phenotype of HSCs and progenitors recovered after 6 days of culture with PAM₃CSK₄ (d6/PAM) was compared with that of post-sort HSCs and progenitor populations (d0). Fig. 5A illustrates the selection criteria that were used to sort HSCs and progenitors and the purity of each population after sort. As shown in Fig. 5B, 30 to 40 % of progenitors acquire expression of the myeloid markers CD11b, CD11c and CD116 upon culturing with PAM₃CSK₄. CD14 was also significantly induced on these cells while expression of the lymphoid markers CD19, CD3, CD16 and CD56 and of the erythroid and megakaryocytic markers

CD235 and CD41a remained undetectable. Similar phenotypical modifications were induced by PAM₃CSK₄ on HSCs but with a reduced amplitude since the percentages of cells expressing myeloid markers after culture never exceeded 10%. By contrast, the CD38 marker which is considered as an early indicator of multi-lineage commitment (22) was found to be induced by PAM₃CSK₄ on nearly 70% of HSCs.

Altogether, these observations indicate that direct ligation of the TLR1/2 heterodimer on progenitors and HSCs enhances the myeloid potential of the former and favours engagement of the latter into the myeloid lineage.

PAM₃CSK₄ shifts the transcriptional network of CD34⁺ cells towards the myeloid path

Transcription factors are instrumental in the development of hematopoietic lineages because they establish gene expression programmes that dictate lineage choice (1). We next sought to determine the impact of PAM₃CSK₄ on the transcriptional network of CD34⁺ cells. We chose to analyze expression of four key transcription factors known to determine distinct hematopoietic cell fates. PU.1 governs B cell as well as macrophage development. Low levels of PU.1 are compatible with a B cell fate while high PU.1 levels specify the macrophage lineage (23). PU.1 in mice is also required for the development of myeloid dendritic cells (24). Pax5 is required for B cell commitment and differentiation (25). GATA-1 is a dominant factor for erythroid/megakaryocytic/eosinophil differentiation (26, 27). C/EBP α is a key player in the regulation of granulopoiesis through activation of genes such as that encodes the G-CSF receptor (28, 29). Expression of these four transcriptional regulators was first quantified in the same four cell populations that were previously analyzed for expression of TLR transcripts, i. e. HSCs and progenitors, B cell precursors and naïve mature B cells. As shown in Fig. 6A, the distribution of these transcription factors in the four selected cell subsets fitted with their expected pattern of expression. Pax5 was undetectable in HSCs and progenitors but was expressed at low and high levels in B cell precursors and mature B cells, respectively. By contrast, GATA-1 and C/EBP α were weakly expressed in B cells and HSCs but strongly expressed in progenitors. These

observations also indicate that the mixed progenitor population defined by the CD34⁺/CD38^{high} phenotype is probably enriched for progenitors that are committed to a myeloid cell fate.

Next we analyzed by quantitative RT-PCR, expression of these transcription factors mRNAs in sorted CD34⁺/Lin⁻ cells after 6 days of culture without stromal cells, in the absence or in the presence of PAM₃CSK₄. As illustrated by Fig. 6B (upper panel), PAM₃CSK₄ induces a significant downregulation of Pax5 and the concomitant upregulation of GATA-1 and PU.1. By contrast, the level of expression of the C/EBP α transcripts was only marginally affected by PAM₃CSK₄. We also compared the levels of expression of Pax5 and PU.1 after 2, 4 or 6 days of culture with PAM₃CSK₄. As shown in Fig. 6B, lower panel, the PU.1/Pax5 ratio in PAM₃CSK₄-stimulated cultures increased gradually from day 2 to day 6. The modification of the Pax5/PU.1 balance induced by PAM₃CSK₄ is compatible with an enhancement of the macrophage and myeloid dendritic cell gene expression programmes and a repression of the B cell developmental potential. In addition, the strong upregulation of GATA-1 observed in these experiments indicates that PAM also enhances the megakaryocytic and erythroid potential of CD34⁺ cells.

PAM₃CSK₄ modifies the transcriptional programme of B cell precursors

We have shown that PAM₃CSK₄ represses B cell development and favours engagement of HSCs and progenitors along the myeloid pathway. These observations led us to consider the possibility that TLR agonists could also affect the differentiation of cells that are engaged in the B cell lineage. We first investigated the impact of TLR agonists on the proliferative response and apoptosis rate of B cell precursors. For this purpose CD19⁺/CD21⁻ (pro-B+pre-B+immature B cells) and CD19⁺/21⁺ (mature B) cells were sorted from human BM samples and stimulated or not with the set of TLR ligands used previously. As based on the double CD34/ κ - λ light chain staining (data not shown), the CD19⁺/CD21⁻ population contained on average 15 %, 65 % and 20 % of pro-B, pre-B and

immature B cells respectively. $^3\text{HTdR}$ incorporation and annexin V staining were used to monitor proliferation and apoptosis rates respectively after 2 days of culture. In contrast with their strong impact on HSCs and progenitors, TLR ligands neither stimulated the proliferation nor repressed apoptosis of B cell precursors (Fig. 7A). Nonetheless, a significant growth response was induced from mature B cells upon stimulation with CpG oligonucleotides thus indicating that the lack of response of B cell precursors in these experiments is not imputable to a technical flaw.

We next investigated whether PAM₃CSK₄ exerted any influence on the differentiation programme of B cell precursors. Because of their paucity in human BM samples we decided to use a recently described “humanized mice” model to recover human B cell precursors. For this purpose, irradiated newborn BALB/c-Rag2^{-/-}IL2Rγc^{-/-} were reconstituted by intrahepatic injection of CB CD34⁺ cells as described elsewhere (30). B cells constituted the dominant hematopoietic human population in the bone marrow of these mice 10 weeks post-reconstitution. As shown in Fig. 7B, CD45 and CD19 were used to gate human hematopoietic cells and human B cells respectively and CD20 was used to discriminate B cell precursors (CD19⁺/CD20⁻) from mature B cells (CD19⁺/CD20⁺). The purity of the sorted B cell precursor population was between 97 and 99% (Fig. 7B, lower row, left). This mixed population of B cell precursors contained on average 20 % pro-B (CD34⁺/κ-λ⁻), 60% pre-B (CD34⁻/κ-λ⁻) and 20 % immature (CD34⁻/κ-λ⁺) B cells (Fig. 7B, lower row, right). At the end of a 4 day-culture in the presence or absence of PAM₃CSK₄, B cell precursors were analyzed for: i) their expression of a panel of lymphoid (CD19, CD3, CD16, CD56) and myeloid (CD33, CD11b, CD11c, CD14, CD114, CD115, CD116, CD66b, CD41a, CD235) markers, by flow cytometry, ii) their expression of the PU.1, Pax5, GATA-1 and C/EBPα transcripts by real-time RT-PCR. Phenotypically, the only change induced by PAM₃CSK₄ was a strong repression of CD19 expression as revealed by the 15 fold reduction of the ΔMFI (203 versus 13) in cultures supplemented with PAM₃CSK₄ (Fig. 7C). The loss of CD19 was not consecutive to a generalized

downregulation of surface markers since CD45 expression was only weakly affected in PAM₃CSK₄-stimulated cultures (less than 2 fold reduction of the ΔMFI). As expected the levels of expression of the myeloid transcription factor (PU.1, GATA-1 and C/EBPα) mRNAs were on average 200 to 600 fold less expressed than Pax5 in B cell precursors. Pax5 is known to regulate expression of CD19 amongst other genes (31). In accordance with the loss of CD19 expression in PAM₃CSK₄-stimulated cultures, we found that PAM₃CSK₄ also induced an approximate 5 fold reduction of the levels of expression of the Pax5 transcripts. PAM₃CSK₄ also induced downregulation of the other transcription factor transcripts. Altogether these observations suggest that PAM₃CSK₄, through repression of Pax5 and CD19 expression, is susceptible to increase the lineage plasticity to human B cell precursors.

Discussion.

In the present work we show that human hematopoietic progenitors and HSCs express functional TLRs. This assertion is supported by the observations that TLR triggering on these cells promotes their proliferation as well as important morphological and phenotypical changes. More importantly, our results also indicate that TLR agonists, and PAM₃CSK₄ in particular, repress their lymphoid B cell potential and enhance their capacity to differentiate along the myeloid pathway. These observations are coherent with the recent study of Nagai et al. showing that TLRs are expressed on murine HSCs and progenitors and stimulate their myeloid differentiation pathway at the expense of B cell lymphopoiesis (32). We obtained the first evidence for a possible modulatory function of TLRs on human hematopoiesis in long-term cultures of CD34⁺ cells on the S17 stromal cell line. Four ligands (PAM₃CSK₄, R848, MALP2 and poly:IC) repressed B cell development and enhanced myelopoiesis in this model. Three of them (PAM₃CSK₄, poly:IC and MALP2) bind to the four prominently-expressed TLRs that are shared by HSCs and progenitors, i. e. TLR1, 2, 3 and 6. However, there was no absolute correlation between the level of expression of the TLR transcripts and the ability of their corresponding ligand to repress B cell development or enhance myelopoiesis in the S17 culture system. For example R848 and PAM display a comparable inhibitory activity on B lymphopoiesis despite the fact that the receptors of the former (TLR7 and 8) are weakly expressed in HSCs and progenitors while those of the latter (TLR1 and 2) are prominent in these cells. TLR3 is the most prominent TLR transcript found in HSCs and progenitors. As opposed to the other TLRs, it exclusively recruits the TRIF adaptor molecule. The observation that the TLR3 ligand poly:IC poorly enhances myelopoiesis suggests that activation of the MyD88 pathway could be instrumental in stimulating the myeloid potential of HSCs and progenitors. Alternatively, the differential impact of TLR agonists on lymphopoiesis and myelopoiesis could be related to the distribution of their receptors. TLRs could be differently expressed on discrete hematopoietic progenitor populations (CLP versus CMP for instance) that have not been resolved in the present study. Future experiments will have to address these questions. The contribution of stromal cells to

the TLR-induced modulation of hematopoiesis in the S17 culture system cannot be completely ruled out. However, the experiments we conducted with PAM₃CSK₄ in stromal cell-free cultures clearly establish that TLR agonists are still able to influence the hematopoietic potential of CD34⁺ cells without stromal cell help. This is exemplified by the observation that in such cultures, PAM₃CSK₄ induces expression of myeloid markers, represses Pax5 and upregulates three transcripts involved in myeloid development.

Reprogramming, biased differentiation or expansion of committed precursors?

The question of the cellular target(s) of PAM₃CSK₄ in the early hematopoietic compartment is a crucial issue because it determines the molecular mechanism that underlies the stimulatory effect of TLR agonists on the myeloid differentiation programme. CB CD34⁺ cells constitute a heterogeneous population comprising both HSCs and hematopoietic progenitors that can be multi- (Common Myeloid Progenitor/CMP, Common Lymphoid Progenitor/CLP) or bi-potential (Granulocyte-Macrophage Progenitor/GMP, Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor/MEP). Therefore the global enhancement of the myeloid output observed when CD34⁺ cells are cultured with PAM₃CSK₄ can follow two scenarios which are not mutually exclusive.

The first possibility is that PAM₃CSK₄ primarily acts on HSCs or CLPs to program or re-program their commitment along the myeloid path. As such, it would play a “lineage instructive” function and could operate through enhancement of the myeloid gene expression programme and repression of the lymphoid developmental programme. Such an hypothesis is conceivable since a recent analysis of the transcriptoma of purified HSCs has revealed the presence of myeloid (PU.1 and C/EBP α) and lymphoid (GATA-3) transcription factors (33, 34). These observations are consistent with the hypothesis of multilineage priming in stem cells. PAM₃CSK₄ would thus act by restricting the hematopoietic potential of HSCs. Although PAM₃CSK₄ induces only weak expression of myeloid markers on sorted HSCs, it upregulates CD38 on more than 60% of the cells. If one

assumes that CD38 expression is the signature of early hematopoietic commitment, this observation suggests that PAM₃CSK₄ induces approximately two thirds of the HSC population to lose its stem cell status and become progenitors. This observation is compatible with a lineage instructive role of PAM₃CSK₄ and possibly other TLR agonists. This hypothesis is further substantiated by our observation that PAM₃CSK₄ can repress Pax5 in an homogeneous population of B cell precursors less susceptible to be contaminated with myeloid-committed cells. The poor induction of myeloid markers in cultures of HSCs stimulated by PAM₃CSK₄ suggests that additional signals such as cytokines or other stroma-derived factors would be required for full myeloid maturation of HSCs.

The second possibility is that PAM₃CSK₄ exerts its stimulatory effect on myeloid development by promoting selective differentiation and/or expansion of myeloid-committed progenitors. This hypothesis is supported by the observation that the progenitor population gives rise to higher numbers of fully-differentiated myeloid cells in response to TLR agonists than HSCs. In other words the myeloid reprogramming in HSCs was of lower efficiency than in lineage committed progenitors. This finding suggests that TLR agonists could accelerate maturation of progenitors which are already engaged in the myeloid path or possess a multi-lineage potential. It cannot be excluded that the overall impact of PAM₃CSK₄ on these cells results from its stimulatory effect on both differentiation and growth since it strongly enhanced the proliferative response of hematopoietic progenitors.

Why do TLR agonists display opposite effects on B cell lymphopoiesis and myelopoiesis?

Several lines of evidence indicate that PAM₃CSK₄ does not globally enhance myeloid differentiation but selectively promotes engagement of HSCs and progenitors into the monocytic/dendritic lineages. First, the myeloid markers induced by PAM₃CSK₄ (CD14, CD11c, CD11b, CD116) are typically expressed by macrophages and myeloid dendritic cells. Second, markers of the megakaryocytic/erythrocytic lineages such as CD235/glycophorin A or CD41a were

not significantly induced. Third, although CD11c and CD116 can also be expressed on granulocytes, the typical granulocytic marker CD66b failed to be induced by PAM₃CSK₄. Finally, the morphology of the cells that emerge from PAM₃CSK₄-stimulated cultures is highly evocative of macrophages. Therefore it appears that PAM₃CSK₄ bias the hematopoietic development to produce macrophages and dendritic cells that can cooperate to ensure handling and presentation of microbial Ag and to perform phagocytosis of the whole microorganisms. A similar skewing of the developmental program of murine HSCs and progenitors in favour of macrophages/dendritic cells in response to TLR signals has been reported in the study of Nagai et al. (32). The group of Kelsoe has elucidated one of the mechanisms whereby certain TLR ligands or inflammatory signals can enhance granulopoiesis and suppress lymphopoiesis (11, 12). They demonstrate that precursors of both lineages share a common developmental niche in the bone marrow. By promoting repression of growth and retention factors that are specific to the lymphoid lineage, TLR signals favour egress of lymphocytes out of the bone marrow thus liberating space in the common niche for granulocytic precursors. Our present findings indicate that TLR agonists can also directly affect B lymphopoiesis by repressing the B cell gene expression programme through extinction of Pax5. It is possible that downregulation of Pax5 results from the direct antagonism between the myeloid transcription factors C/EBP α and PU.1 and Pax5. It has been described that enforced expression of C/EBP α in differentiated B cells leads to inhibition of Pax5 (35) and that PU.1 can mediate repression of Pax5 transactivation via its physical interaction with Pax5 (23, 36). Interestingly, although PAM₃CSK₄ failed to induce expression of myeloid markers on B cell precursors it nonetheless promoted significant downregulation of Pax5 and the concomitant extinction of CD19. This suggests that even cells committed to the B cell lineage have conserved a certain degree of “lineage plasticity” that could be exploited in emergency conditions to increase production of hematopoietic cells that would be in higher demand. Alternatively, bipotent B cell/macrophage progenitors could constitute privileged targets for TLR agonists. Such progenitors have been described in the mouse fetal liver (37) and adult bone marrow (38) suggesting that these two lineages are closely related. It is thus

conceivable that such bi-potential progenitors having managed to conserve potentiality for both lineages could easily and rapidly switch-off either one or the other of their differentiation programmes in response to TLR signals, for example. They could thus play a crucial role in emergency situations such as infections that require a rapid response of the hematopoietic system.

It is not yet clear whether TLR-mediated suppression of the lymphoid programme is restricted to the B lineage. Our attempt to address this question by monitoring the impact of PAM₃CSK₄ on GATA-3 expression have been unfruitful. In our hands, constitutive expression of the GATA-3 transcript in CB CD34⁺ cells was marginal and failed to be significantly modulated by PAM₃CSK₄. Co-cultures of human HSCs with a stromal cell line constitutively expressing one of the Notch-1 ligand such as OP9-DL1 (Ross et al., Blood, 105: 1431, 2005) will be useful to address this question.

In conclusion, our data suggest that TLR signals agonists shift the human hematopoietic development in favour of the myeloid path by exerting two functions: i) an instructive function which allows active commitment of HSCs and/or progenitors to the monocyte/dendritic lineages, ii) a permissive function whereby they promote outgrowth and terminal maturation of pre-committed progenitors. In certain occasions such as bacterial infections the balanced production of diverse blood cells by HSCs could be detrimental to the efficient and rapid control of the infectious agent. Increased production of cells with phagocytic properties such as monocytes, macrophages and granulocytes, in other words cells that carry the innate arm of the immune response, is required to damp down the infection while the adaptive immune response builds up. Our results and those of Nagai in the murine system (32) suggest that the hematopoietic system has evolved to exploit the microbial products to respond to the increased demand for innate cells capable to deal efficiently and rapidly with the infection. Microbial infection is sensed by the hematopoietic system as a perturbation that in turns triggers a transient shift in the transcriptional network of HSCs and/or progenitors in order to adjust the overall output of the process with the needs of the organism.

References

1. Laiosa, C.V., M. Stadtfeld, and T. Graf. 2006. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* 24:705-738.
2. Orkin, S.H. 2000. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1:57-64.
3. Singh, H., K.L. Medina, and J.M. Pongubala. 2005. Contingent gene regulatory networks and B cell fate specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4949-4953.
4. Metcalf, D. 1998. Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood* 92:345-347; discussion 352.
5. Billia, F., M. Barbara, J. McEwen, M. Trevisan, and N.N. Iscove. 2001. Resolution of pluripotential intermediates in murine hematopoietic differentiation by global complementary DNA amplification from single cells: confirmation of assignments by expression profiling of cytokine receptor transcripts. *Blood* 97:2257-2268.
6. Marsh, J.C., D.R. Boggs, G.E. Cartwright, and M.M. Wintrobe. 1967. Neutrophil kinetics in acute infection. *J Clin Invest* 46:1943-1953.
7. Terashima, T., B. Wiggs, D. English, J.C. Hogg, and S.F. van Eeden. 1996. Polymorphonuclear leukocyte transit times in bone marrow during streptococcal pneumonia. *Am J Physiol* 271:L587-592.
8. Mirandola, P., P. Secchiero, S. Pierpaoli, G. Visani, L. Zamai, M. Vitale, S. Capitani, and G. Zauli. 2000. Infection of CD34(+) hematopoietic progenitor cells by human herpesvirus 7 (HHV-7). *Blood* 96:126-131.
9. Dorshkind, K. 1988. IL-1 inhibits B cell differentiation in long term bone marrow cultures. *J Immunol* 141:531-538.
10. Nagaoka, H., G. Gonzalez-Aseguinolaza, M. Tsuji, and M.C. Nussenzweig. 2000. Immunization and infection change the number of recombination activating gene (RAG)-expressing B cells in the periphery by altering immature lymphocyte production. *J Exp Med* 191:2113-2120.
11. Ueda, Y., M. Kondo, and G. Kelsoe. 2005. Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med* 201:1771-1780.
12. Ueda, Y., K. Yang, S.J. Foster, M. Kondo, and G. Kelsoe. 2004. Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med* 199:47-58.
13. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
14. Diebold, S.S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and C. Reis e Sousa. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529-1531.
15. Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526-1529.
16. Yarovinsky, F., D. Zhang, J.F. Andersen, G.L. Bannenberg, C.N. Serhan, M.S. Hayden, S. Hieny, F.S. Sutterwala, R.A. Flavell, S. Ghosh, and A. Sher. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308:1626-1629.
17. Hennino, A., M. Berard, P.H. Krammer, and T. Defrance. 2001. FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med* 193:447-458.
18. Klein, U., K. Rajewsky, and R. Kuppers. 1999. Phenotypic and molecular characterization of human peripheral blood B-cell subsets with special reference to N-region addition and J kappa-usage in V kappa J kappa-joints and kappa/lambda-ratios in naive versus memory B-cell subsets to identify traces of receptor editing processes. *Curr Top Microbiol Immunol* 246:141-146; discussion 147.

19. Gimeno, R., K. Weijer, A. Voordouw, C.H. Uittenbogaart, N. Legrand, N.L. Alves, E. Wijnands, B. Blom, and H. Spits. 2004. Monitoring the effect of gene silencing by RNA interference in human CD34+ cells injected into newborn RAG2-/- gammac-/- mice: functional inactivation of p53 in developing T cells. *Blood* 104:3886-3893.
20. Fluckiger, A.C., E. Sanz, M. Garcia-Lloret, T. Su, Q.L. Hao, R. Kato, S. Quan, A. de la Hera, G.M. Crooks, O.N. Witte, and D.J. Rawlings. 1998. In vitro reconstitution of human B-cell ontogeny: from CD34(+) multipotent progenitors to Ig-secreting cells. *Blood* 92:4509-4520.
21. Rawlings, D.J., S.G. Quan, R.M. Kato, and O.N. Witte. 1995. Long-term culture system for selective growth of human B-cell progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1570-1574.
22. Terstappen, L.W., S. Huang, M. Safford, P.M. Lansdorp, and M.R. Loken. 1991. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 77:1218-1227.
23. DeKoter, R.P., and H. Singh. 2000. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288:1439-1441.
24. Guerriero, A., P.B. Langmuir, L.M. Spain, and E.W. Scott. 2000. PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood* 95:879-885.
25. Nutt, S.L., B. Heavey, A.G. Rolink, and M. Busslinger. 1999. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401:556-562.
26. Pevny, L., M.C. Simon, E. Robertson, W.H. Klein, S.F. Tsai, V. D'Agati, S.H. Orkin, and F. Costantini. 1991. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349:257-260.
27. Visvader, J.E., A.G. Elefanty, A. Strasser, and J.M. Adams. 1992. GATA-1 but not SCL induces megakaryocytic differentiation in an early myeloid line. *Embo J* 11:4557-4564.
28. Nerlov, C., K.M. McNagny, G. Doderlein, E. Kowenz-Leutz, and T. Graf. 1998. Distinct C/EBP functions are required for eosinophil lineage commitment and maturation. *Genes Dev* 12:2413-2423.
29. Zhang, D.E., P. Zhang, N.D. Wang, C.J. Hetherington, G.J. Darlington, and D.G. Tenen. 1997. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:569-574.
30. Traggiai, E., L. Chicha, L. Mazzucchelli, L. Bronz, J.C. Piffaretti, A. Lanzavecchia, and M.G. Manz. 2004. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304:104-107.
31. Matthias, P., and A.G. Rolink. 2005. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol* 5:497-508.
32. Nagai, Y., K.P. Garrett, S. Ohta, U. Bahrn, T. Kouro, S. Akira, K. Takatsu, and P.W. Kincade. 2006. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* 24:801-812.
33. Ivanova, N.B., J.T. Dimos, C. Schaniel, J.A. Hackney, K.A. Moore, and I.R. Lemischka. 2002. A stem cell molecular signature. *Science* 298:601-604.
34. Phillips, R.L., R.E. Ernst, B. Brunk, N. Ivanova, M.A. Mahan, J.K. Deanehan, K.A. Moore, G.C. Overton, and I.R. Lemischka. 2000. The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science* 288:1635-1640.
35. Xie, H., M. Ye, R. Feng, and T. Graf. 2004. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117:663-676.
36. Maitra, S., and M. Atchison. 2000. BSAP can repress enhancer activity by targeting PU.1 function. *Mol Cell Biol* 20:1911-1922.
37. Davidson, W.F., J.H. Pierce, S. Rudikoff, and H.C. Morse, 3rd. 1988. Relationships between B cell and myeloid differentiation. Studies with a B lymphocyte progenitor line, HAFTL-1. *J Exp Med* 168:389-407.

38. Montecino-Rodriguez, E., H. Leathers, and K. Dorshkind. 2001. Bipotential B-macrophage progenitors are present in adult bone marrow. *Nat Immunol* 2:83-88.

Legends

Figure 1. TLR expression profile of HSCs, hematopoietic progenitors, B cell precursors and mature B cells. HSCs (CD34⁺/CD38^{low}), progenitors (CD34⁺/CD38^{high}), B cell precursors (CD19⁺/CD21⁻) including pro-B, pre-B and immature B cells, and mature B cells (CD19⁺/CD27⁺) were isolated by cell sorting to a purity > 97%. Total RNA was extracted from each population and the relative mRNA levels for TLR expression were determined by real-time RT-PCR. The obtained values were normalized to the amount of two housekeeping genes: GAPDH and EEF1. One representative experiment out of three.

Figure 2. Impact of TLR agonists on the survival and proliferation of HSCs and progenitors. A, B. Whole CB CD34⁺ cells (HSCs + progenitors) were cultured in the presence or absence of the indicated TLR agonists used at optimal concentration. Proliferation (³HTdR incorporation) and apoptosis rates (annexin V staining) were estimated after 2 days of culture. C, D. Whole CB CD34⁺ cells were stimulated or not with PAM₃CSK₄ or G-CSF, both used at optimal concentrations. Proliferation (C) and apoptosis (D) were measured after 2, 4 or 6 days of culture. E. Sorted HSCs (CD34⁺/CD38^{low}) and progenitors (CD34⁺/CD38^{high}) were cultured with or without an optimal concentration of PAM₃CSK₄. Proliferation was assessed at day 2. PAM = PAM₃CSK₄, flag. = flagellin and CpG = CpG oligonucleotides. Representative of three experiments.

Figure 3. Impact of TLR agonists on the hematopoietic output of long-term cultures of CD34⁺ cells on the S17 cell line. Whole CB CD34⁺ cells were seeded on a confluent monolayer of S17 cells and cultured in the presence or absence of an optimal concentration of ligands for TLRs 1/2, 3, 4, 5, 2/6, 7/8 and 9. A. Illustration of the phenotype of cells emerging from cultures conducted with or without PAM₃CSK₄. Cells were collected 2 weeks after initiation of the cultures and stained with the indicated Abs or their isotype- and fluorochrome-matched control Ab. The forward/side light scatters were used to gate out dead cells and contaminating S17 stromal cells. All Abs used were of

the IgG1 isotype and coupled to PE. The fluorescence analysis gate was defined on the staining performed with the unrelated isotype-matched control Ab and applied for all subsequent stainings. The morphology of the cells recovered from control and PAM₃CSK₄-stimulated cultures is illustrated by the FSC/SSC dot plots (first two dot plots on the upper row). Similar results were obtained in four independent experiments. B. Absolute numbers of B lymphoid (CD19⁺) and myeloid (CD33⁺) cells recovered from long-term cultures conducted with or without the indicated TLR agonists. Data are presented as the mean ± SD numbers of cells expressing the indicated markers, calculated from duplicate cultures. Similar results were obtained in three independent experiments.

Figure 4. Impact of PAM₃CSK₄ on the hematopoietic potential of CD34⁺ cells. Sorted CB CD34⁺/Lin⁻ cells were cultured with or without an optimal concentration of PAM₃CSK₄. A. Illustration of the staining profiles for CD14, CD11b, CD11c and CD116. Cells were recovered after 6 days of culture and stained with the indicated PE-conjugated Abs or with their fluorochrome and isotype-matched unrelated control (ctrl). The fluorescence analysis gate was defined on the staining performed with the isotype-matched control Ab and applied for all subsequent stainings. The percentages of positive cells for a given marker are indicated on the dot plots. B. May Grunwald Giemsa coloration of CD34⁺/Lin⁻ cells at the onset of the culture (d0) or after 6 days of stimulation with PAM₃CSK₄ (d6/PAM). Magnification: x100.. Representative of 4 experiments.

Figure 5. Comparison of the impact of PAM₃CSK₄ on the hematopoietic potential of HSCs and progenitors. A. HSCs and hematopoietic progenitors were sorted from CB as CD34⁺/Lin⁻/CD38^{low} and CD34⁺/Lin⁻/CD38^{high} cells respectively. The upper two dot plots illustrate the Lin and CD38 sorting gates. The lower two dot plots illustrate the purity of the HSCs and progenitor populations after sort. B. Sorted HSCs and progenitors were cultured for 6 days with or without an

optimal concentration of PAM₃CSK₄ and stained with the indicated PE-conjugated Abs or with their fluorochrome and isotype-matched unrelated control. The fluorescence analysis gate was defined on the staining performed with the isotype-matched control Ab and applied for all subsequent stainings. The percentages of positive cells for a given marker are indicated on the dot plots. Representative of 2 experiments.

Figure 6. Modulation of the hematopoietic transcriptional programme of CD34 cells by PAM₃CSK₄. A. Pattern of expression of 4 hematopoietic transcription factors in HSCs, progenitors, B cell precursors and mature B cells. Total RNA was extracted from each sorted population and the relative mRNA levels for Pax5, GATA-1, C/EBP α and PU.1 were determined by real-time RT-PCR. The obtained values were normalized to the amount of two housekeeping genes: GAPDH and EEF1. One representative experiment out of two. B. Sorted CB CD34⁺/Lin⁻ cells were cultured for the indicated times with or without an optimal concentration of PAM₃CSK₄. RNA extracts were prepared from: i) cultures conducted for 6 days with or without PAM₃CSK₄ (upper panel), ii) cultures conducted with PAM₃CSK₄ for 2, 4 or 6 days (lower panel). They were next processed for quantitative RT-PCR analysis of the hematopoietic transcription factors as described above. The PU.1/Pax5 ratios (lower panel) were calculated as the ratio between the relative expression levels of Pax5 and PU.1. One representative experiment out of three. For all samples, the obtained values were normalized to the amount of two housekeeping genes: GAPDH and EEF1.

Figure 7. Impact of TLR agonists on the growth, phenotype and transcriptional programme of B cell precursors. A. B cell precursors (pro-B+pre-B+immature B) or mature B cells were sorted from human BM samples as CD19⁺/CD21⁻ and CD19⁺/CD21⁺ cells, respectively. Both populations were cultured in the presence or absence of the indicated TLR agonists used at optimal

concentration. Proliferation ($^3\text{HTdR}$ incorporation) and apoptosis rates (annexin V staining) were estimated after 2 days of culture. B. Human B cell precursors (pro-B+pre-B+immature B) were sorted as $\text{CD45}^+/\text{CD19}^+/\text{CD20}^-$ cells from the BM of “humanized mice” at 10 weeks post reconstitution. The upper dot plots illustrate the sorting gates, the lower dot plots show the purity of the population of B cell precursors after sort and its pro-B, pre-B and immature B cell content as revealed by the double $\text{CD34}/\kappa-\lambda$ staining. C. B cell precursors were cultured for 4 days with or without PAM_3CSK_4 . On the left: expression of CD45 and CD19 on B cell precursors after culture. The CD45 and CD19 staining histograms (solid lines) are overlapped with the control histogram (dotted lines) realized with an isotype-matched unrelated mAb. The numbers indicate the Δ MFI calculated as follows: MFI of the CD19 or CD45 histogram-MFI of the negative control histogram. On the right, quantitation by real time RT-PCR of the levels of expression of PU.1, Pax5, GATA-1 and C/EBP α transcripts in B cell precursors after culture. Representative of two experiments.

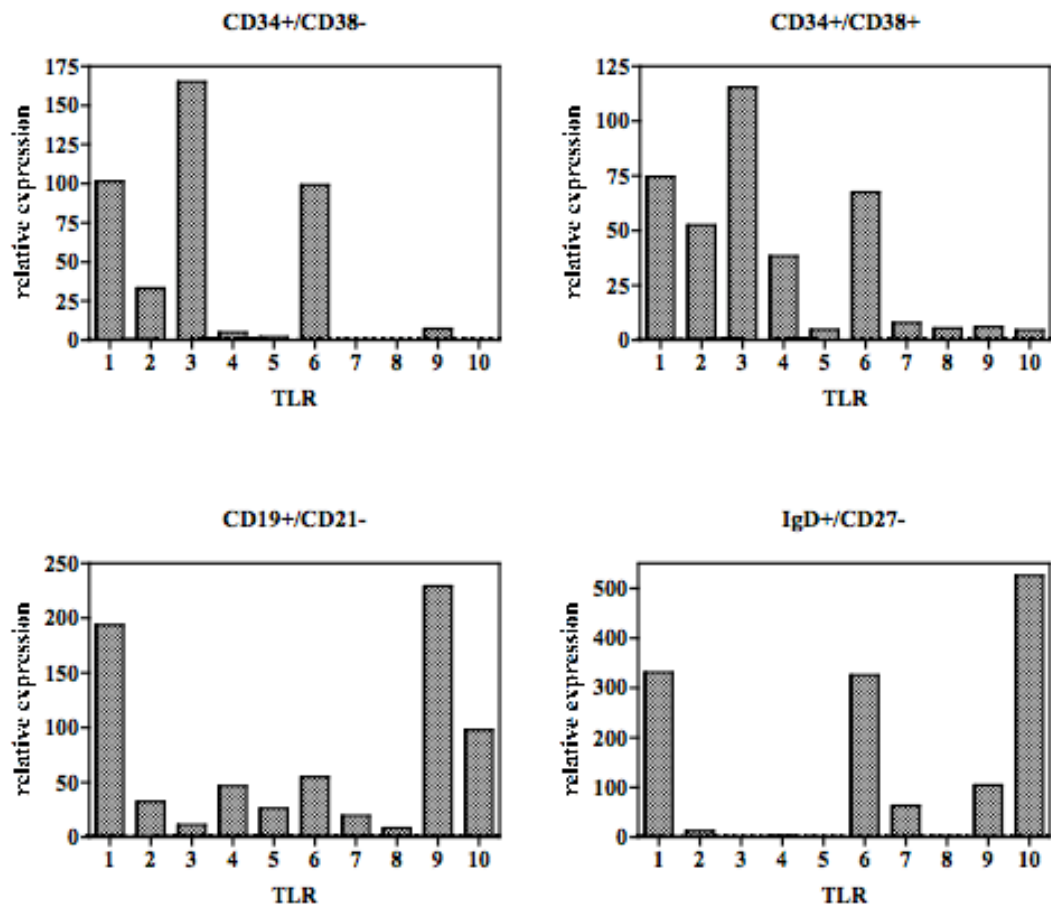


Figure 1, De Luca et al

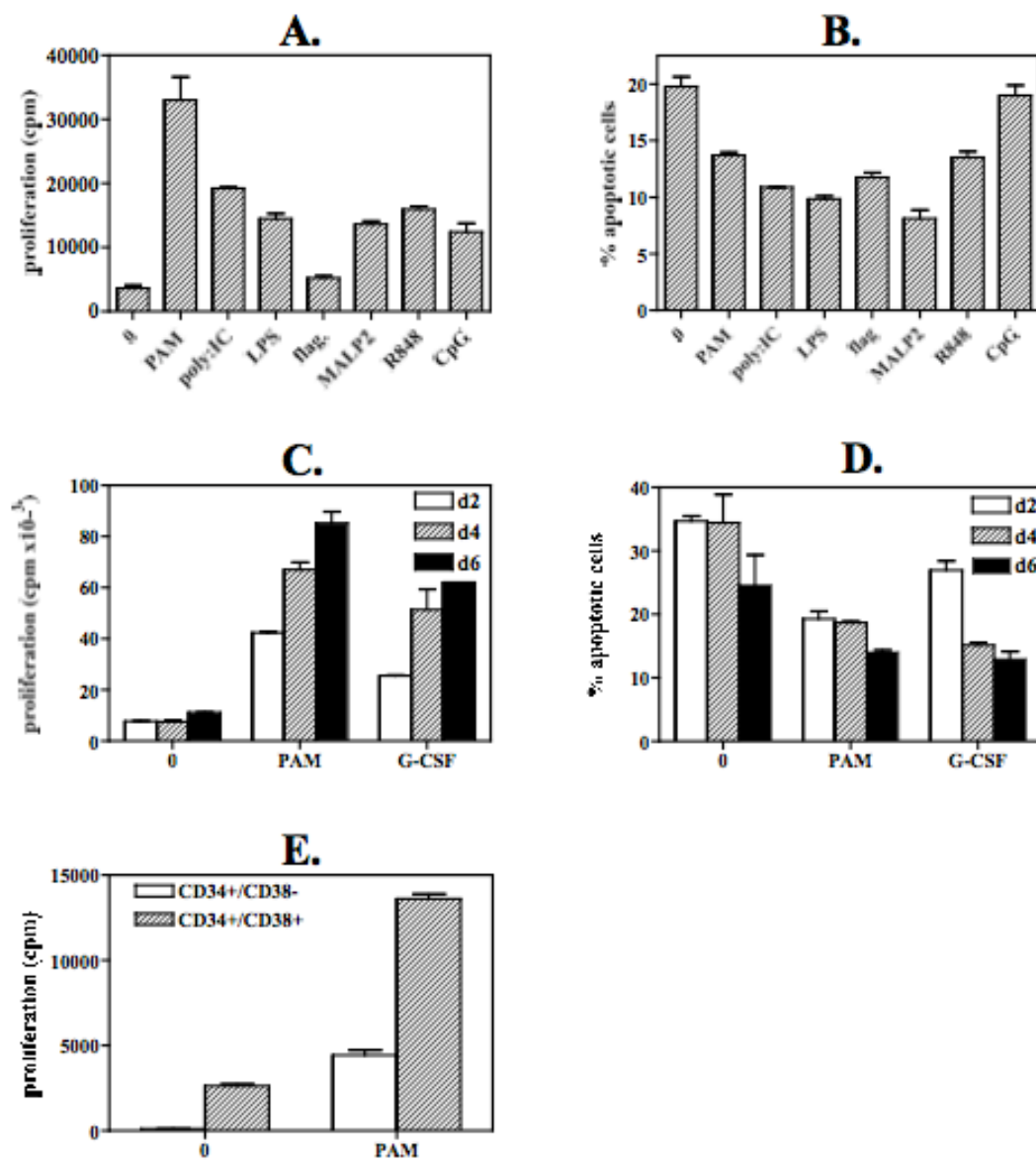


Figure 2, De Luca et al

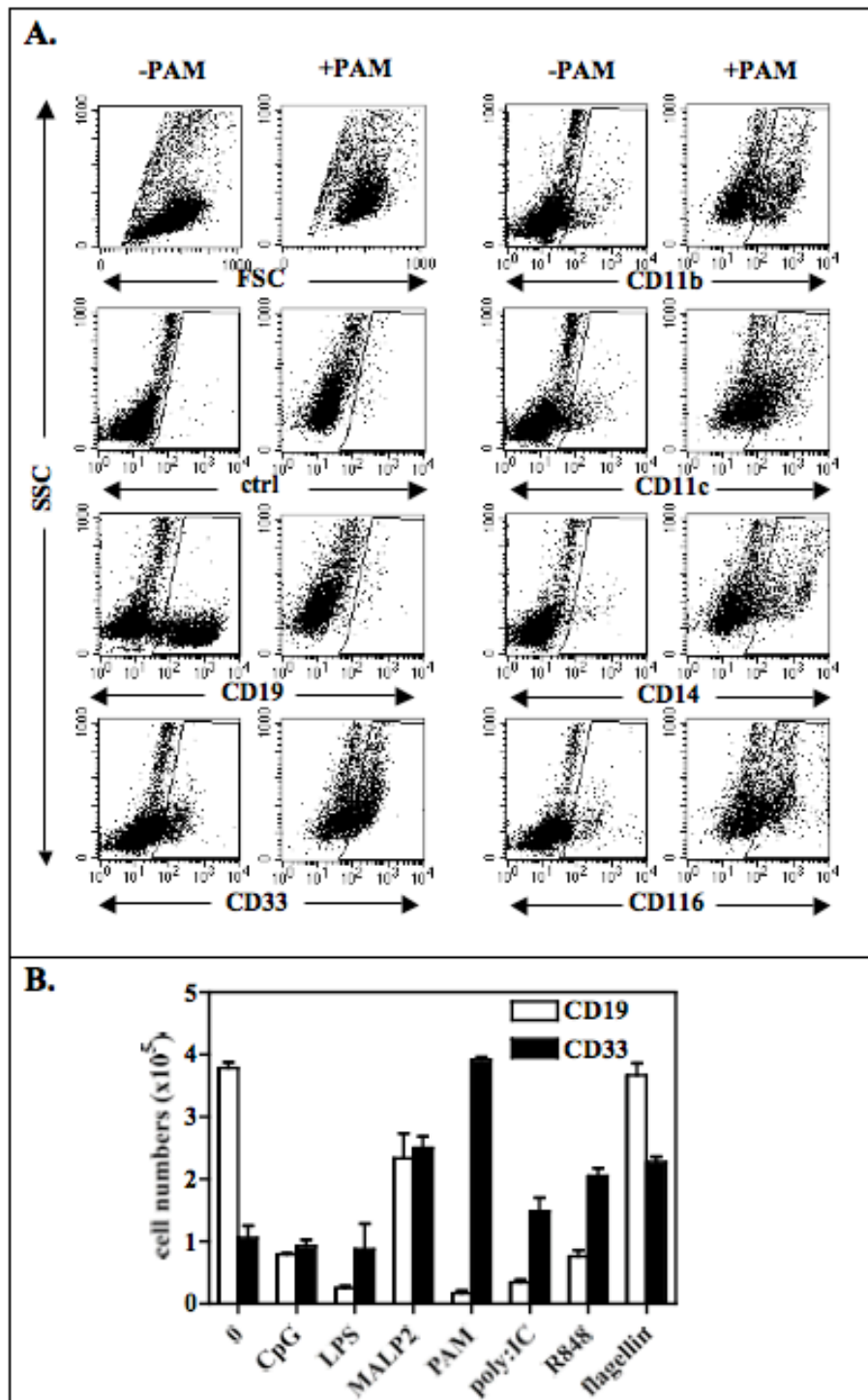


Figure 3, De Luca et al

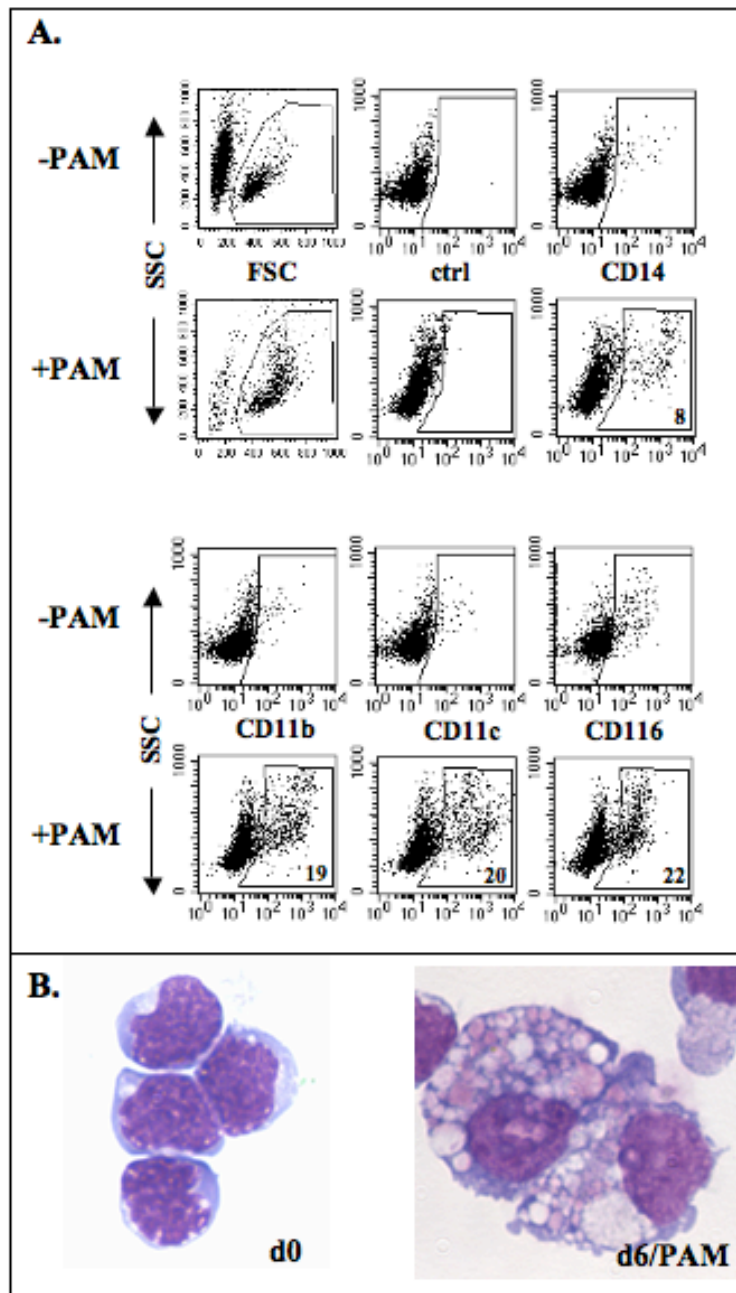


Figure 4, De Luca et al

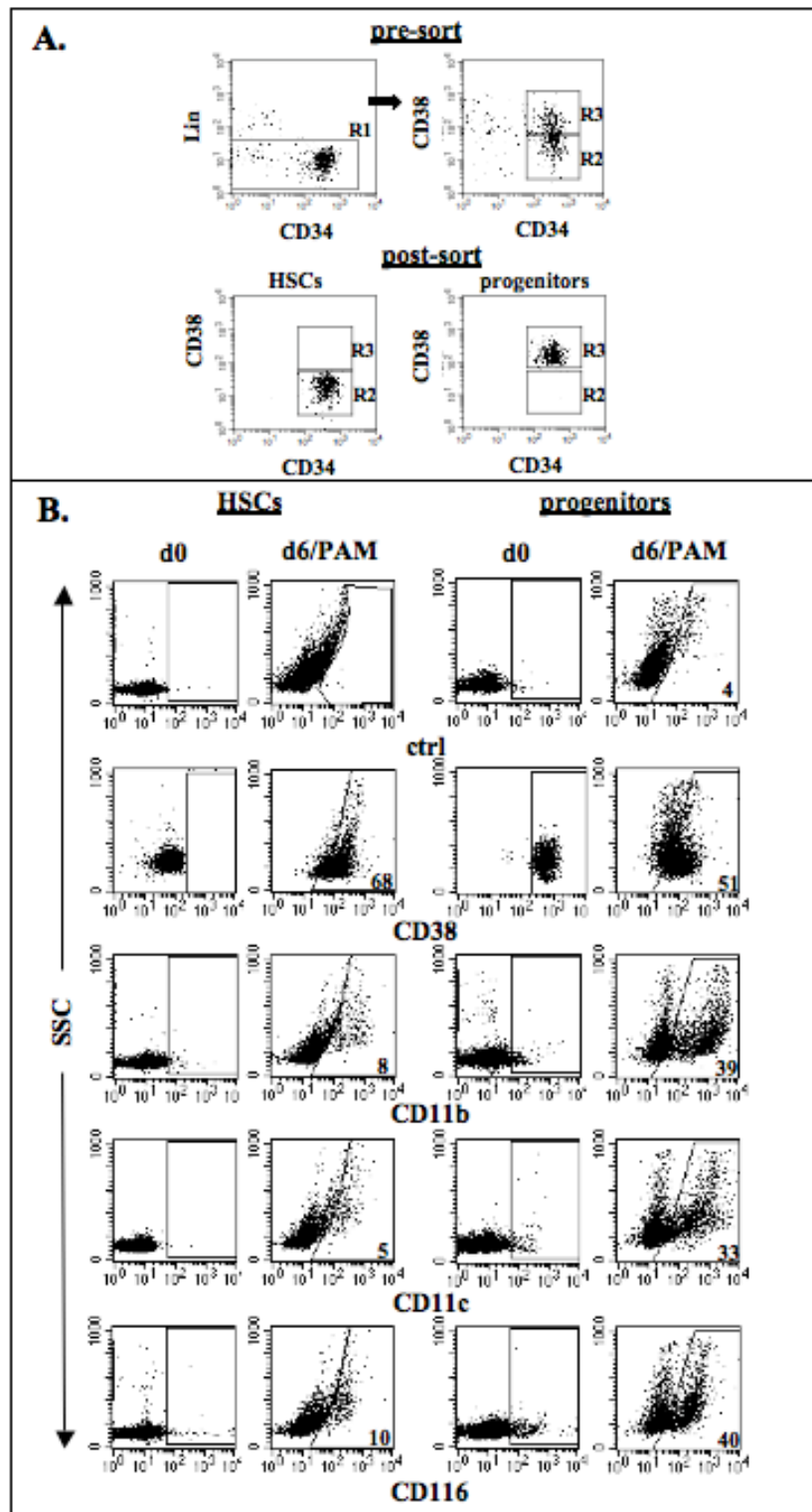


Figure 5, De Luca et al

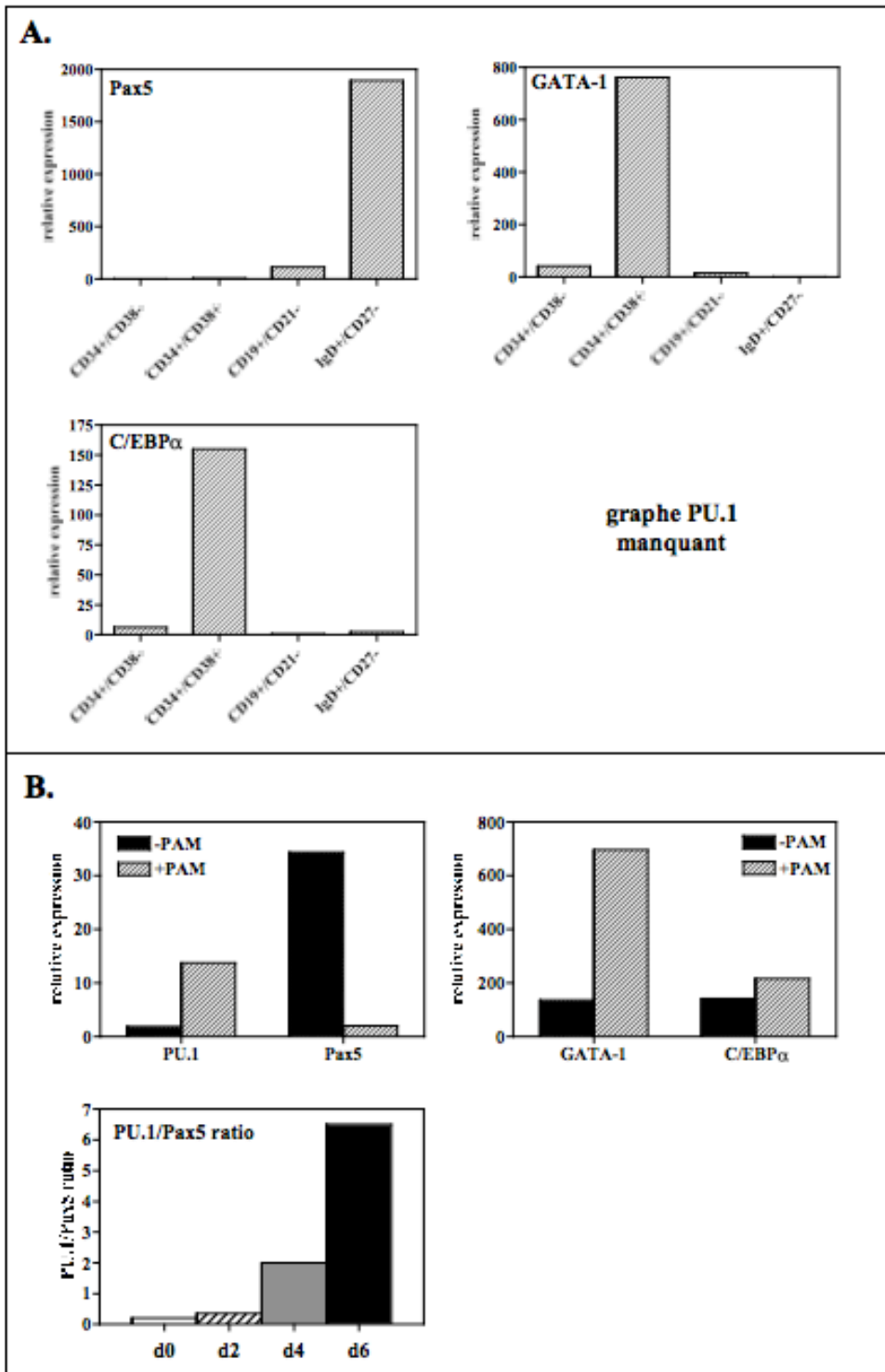


Figure 6, De Luca et al

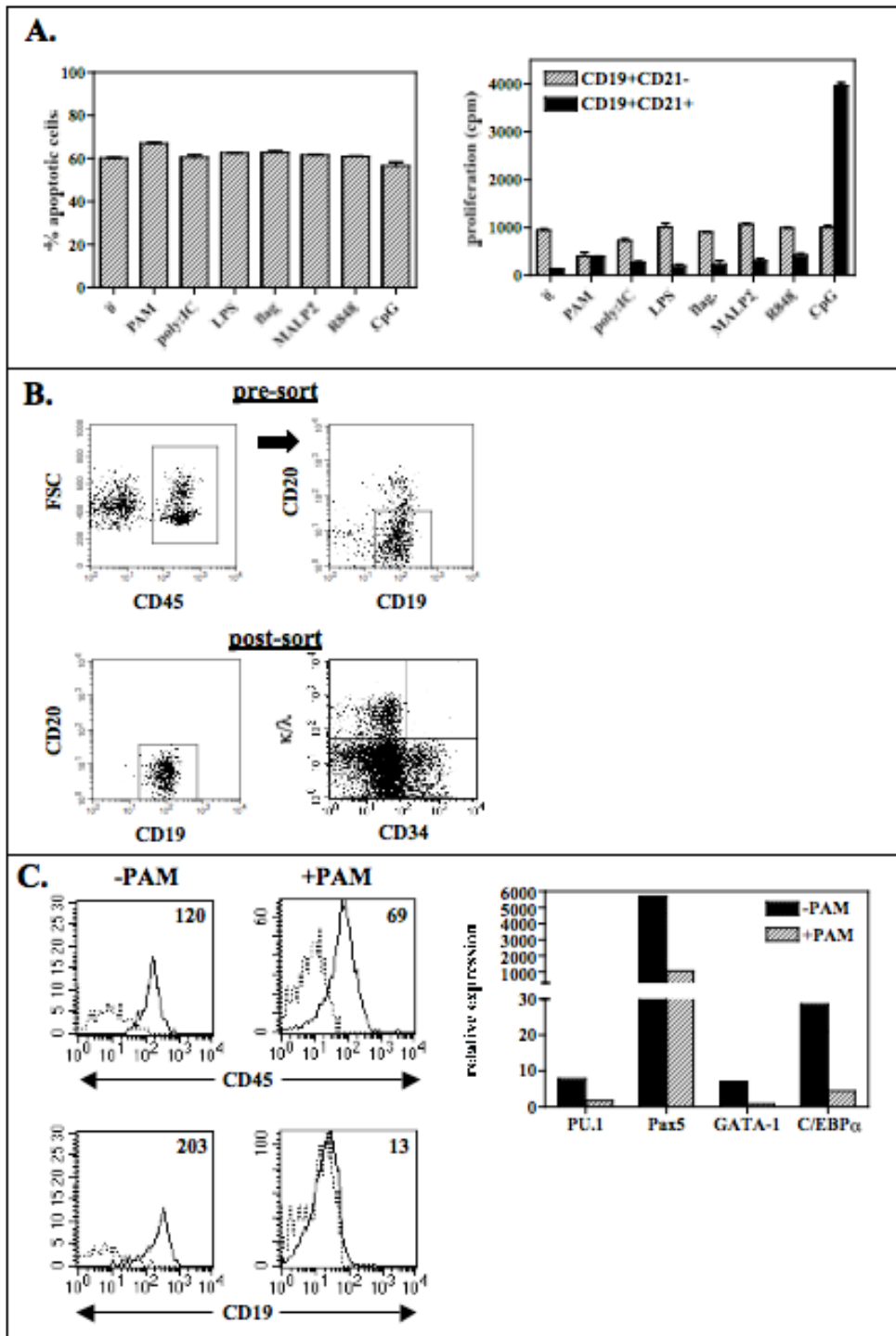


Figure 7, De Luca et al

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'hématopoïèse est un processus finement régulé permettant à la fois une production continue de cellules hématopoïétiques différenciées tout en préservant un compartiment de cellules souches totipotentes. Ce processus de différenciation est toutefois modulable afin de faire face à différentes situations susceptibles de compromettre l'intégrité de l'organisme. Ainsi la déplétion de certaines populations hématopoïétiques consécutive à une irradiation ou à un traitement par des drogues lymphoablatives par exemple, aura pour conséquence d'accélérer et d'amplifier la production puis la différenciation de progéniteurs capables de reconstituer la population mature affectée. Il existe donc des mécanismes capables de détecter des altérations des compartiments hématopoïétiques périphériques, de transmettre l'information aux tissus lymphoïdes primaires et de remodeler de manière transitoire l'hématopoïèse.

L'identité d'une cellule hématopoïétique d'un lignage donné se définit par la mise en place d'un programme transcriptionnel particulier et la répression partielle ou totale des programmes transcriptionnels des autres lignages. Cette « carte d'identité » transcriptionnelle s'établit vraisemblablement sous l'influence de facteurs extrinsèques : cytokines, molécules d'adhésion, contacts intercellulaires etc... Les données présentées dans ce mémoire suggèrent qu'elle peut également être sensible aux signaux microbiens. La notion que les microorganismes pathogènes puissent altérer le processus hématopoïétique n'est pas nouvelle mais les mécanismes par lesquels s'exerce leur influence sont demeurés curieusement peu étudiés jusqu'aux travaux récents du groupe de Kelsoe au début des années 2000 (Ueda et al., 2005; Ueda et al., 2004).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux fonctions exercées par la voie de signalisation de FADD et celle des TLR au cours de la différenciation hématopoïétique. La première intervient à l'état basal tandis que la seconde pourrait faire partie d'un processus d'urgence lors d'une agression de l'hôte par un pathogène. Le cheminement qui nous a conduit à explorer l'influence des motifs pathogènes conservés sur l'hématopoïèse a débuté par un questionnement sur les signaux conduisant à l'engagement des CSH et des progéniteurs dans le lignage B.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, notre décision d'explorer la contribution de FADD dans le développement des lymphocytes B humains a été initiée par les travaux du groupe de Winoto montrant que l'inactivation de cette molécule dans le lignage lymphoïde résultait en une disparition des lymphocytes B matures en périphérie (Zhang et al., 1998). L'objectif de notre projet était de déterminer quelle(s) étape(s) cruciale(s) du développement B était contrôlée par la voie

FADD. Nous n'avons pas encore pu apporter de réponse à cette question mais nos résultats et certaines données récentes de la littérature ouvrent de nouvelles pistes d'investigation comme nous le verrons plus loin. Au cours de ce travail s'est naturellement posée la question du signal à l'origine de l'activation de la voie FADD dans les CSH et les progéniteurs hématopoïétiques. Nous avons montré que les transcrits de tous les RDM sont exprimés, à des degrés divers, dans les CSH et les progéniteurs mais les données de la littérature montraient que l'inactivation individuelle des gènes codant pour ces récepteurs n'entraînait pas d'anomalie du développement lymphoïde B (Bryder et al., 2001; Schneider et al., 1999). Cette constatation nous a naturellement conduit à suspecter que la voie FADD pouvait être mobilisée par d'autres récepteurs que les RDM. Les TLR apparaissaient comme des candidats plausibles eu égard aux travaux d'Aliprantis et col. montrant que les agonistes de TLR2 induisaient l'apoptose d'une lignée monocyttaire humaine en se connectant à la voie FADD (Aliprantis et al., 2000). Il est intéressant de noter à ce propos que notre hypothèse de travail a été récemment confirmée par les travaux de Imtiyaz et al. (Imtiyaz et al., 2006). En effet, ces auteurs ont montré que l'inactivation sélective de FADD dans les cellules CD19⁺ n'affecte pas leur réponse aux signaux transmis par le BCR mais abroge complètement leur capacité à proliférer en réponse aux ligands de TLR3. Curieusement, seule l'activation cellulaire induite par les TLRs utilisant la voie TRIF et pas la voie MyD88 est affectée dans les lymphocytes B FADD^{-/-}. Il est donc vraisemblable que le recrutement de FADD par les TLR ne s'opère pas directement par liaison à l'adaptateur comme le laissait supposer l'existence d'un DM dans MyD88, mais fait intervenir une autre protéine adaptatrice permettant de faire le lien entre FADD et TRIF. La protéine RIP impliquée dans la voie de signalisation du TNF-RI est un candidat probable. En effet, le groupe de Tschopp a démontré que TRIF possède dans sa partie carboxy-terminale un motif homotypique capable d'interagir avec les molécules RIP1 et RIP3 (Meylan et al., 2004). Par ailleurs, RIP1 qui possède un DM en position c-terminale est capable de former un complexe avec TLR3 et TRIF permettant l'activation de NF-κB (Cusson-Hermance et al., 2005). Il a par la suite été démontré que RIP participe également à la signalisation par TLR4 (Cusson-Hermance et al., 2005; Youn et al., 2005). Quoiqu'il en soit, ces données apportent la confirmation que la voie FADD est versatile en ce sens qu'elle peut être activée par différents récepteurs et conduire des effets biologiques opposés.

FADD ET HEMATOPOIESE

L'approche expérimentale que nous avons choisi pour étudier le rôle de FADD dans le développement B a consisté à introduire un dominant négatif de FADD dans une population de cellules CD34⁺ comprenant à la fois des CSHs et des progéniteurs hématopoïétiques. Elle permet

donc d'invalider la fonction de FADD bien en amont des précurseurs B dans le processus de différenciation hématopoïétique. Par conséquent, nos expériences ne rendent pas seulement compte de la fonction de FADD dans le lignage B mais aussi de sa fonction au cours des étapes précoces de l'hématopoïèse : auto-renouvellement des CSHs, engagement vers les progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes, entre autres. Nos résultats *in vitro* et *in vivo* (souris humanisées) indiquent que FADD joue un rôle important dans la biologie des acteurs précoces de l'hématopoïèse (CSHs et progéniteurs). Ils ne nous permettent cependant pas de préciser les mécanismes contrôlés par FADD : expansion ? différenciation ? régulation de l'asymétrie de la division des CSHs ? Production de CLPs et de CMPs ? Les travaux du groupe de Strasser chez la souris utilisant eux aussi des constructions rétrovirales pour introduire un dominant négatif de FADD dans des CSH murines indiquent que FADD et la caspase-8 sont impliqués dans la réponse proliférative des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques (Pellegrini et al., 2005). Ce point pourrait être vérifié chez l'Homme dans notre système expérimental en utilisant par exemple un marquage avec un analogue du CFSE pour estimer l'impact du transgène FADD-DN sur la capacité proliférative des CSHs et des progéniteurs humains.

Il est cependant possible que l'effet anti-prolifératif du transgène FADD-DN dans ces cellules masque son implication lors de l'engagement dans le lignage B. Sur la base de l'observation que le développement B est apparemment normal au sein de la population FADD-DN/GFP+, nous avons tout d'abord postulé que FADD était essentiellement impliqué dans la réplication des précurseurs B. Toutefois, une expression suboptimale du transgène, insuffisante pour bloquer la voie FADD endogène, dans certains progéniteurs pourrait également expliquer le développement de quelques cellules B en dépit de l'intégration du transgène.

Dans un article paru en 2006 le groupe de Zhang a généré des souris chez lesquelles le gène FADD a été sélectivement supprimé dans le compartiment B en croisant des souris exprimant la recombinaison Cre sous le contrôle du promoteur CD19 avec des animaux chez lesquels le gène FADD endogène a été remplacé par un gène FADD flanqué de deux sites loxP (Imtiyaz et al., 2006). De manière assez surprenante, le développement B chez ces animaux est parfaitement normal. Au premier abord en effet, ces données semblent difficilement compatibles avec les profondes anomalies du développement B observées dans l'étude de Zhang et collaborateurs où l'inactivation de FADD dans le compartiment lymphoïde a été obtenue par injection de cellules ES FADD^{-/-} dans des blastocystes de souris Rag 1 KO. Chez ces souris chimères, le développement thymique est normal dans les 2 premières semaines de la vie mais les thymocytes FADD^{-/-} disparaissent ensuite rapidement. Par contre la population T périphérique FADD^{-/-} est normale en terme d'effectif et de phénotype. Nous en avons initialement conclu que FADD exerçait une fonction beaucoup plus cruciale pour le développement B que pour le développement T. En

conséquence, il semblait logique de suspecter que cette fonction de FADD ne pouvait s'exercer qu'au niveau d'un progéniteur déjà commis dans le lignage B. En asservissant l'invalidation de FADD à l'expression du CD19, Imtiyaz et coll. ont délété le gène FADD à partir des cellules preBI (Imtiyaz et al., 2006). L'absence d'anomalie du développement B dans ces expériences suggère donc que la fonction de FADD est requise en amont mais pas en aval de ce stade de développement. En particulier, les cellules proB, qui ont déjà commencé le réarrangement DJ des chaînes lourdes mais n'expriment pas CD19 chez la souris ne sont pas touchées dans ce modèle expérimental. Cette constatation associée à l'observation que le développement T n'est que faiblement affecté par l'invalidation de FADD nous conduit à penser que FADD est impliqué dans les phases précoces de l'engagement dans le lignage B, c'est-à-dire, soit la transition CLP/proB, soit la transition proB/preBI. Cette hypothèse est confortée par des données du groupe de Winoto (Hua et al., 2003). Ce groupe a créé un modèle de souris transgéniques dans lequel le gène FADD endogène a été remplacé par une construction codant pour une forme mutée de FADD dépourvue d'un important site de phosphorylation. Ces souris sont viables et présentent les mêmes défauts de prolifération des cellules T préalablement observés chez les souris chimères (KO FADD dans le compartiment lymphoïde) ou chez les animaux exprimant un transgène FADD-DN ciblé sur le compartiment T. Le nombre de lymphocytes B périphériques chez ces animaux est très diminué et le blocage du développement B dans la moelle est caractérisé par une accumulation de cellules CD43⁺ B220⁺ définissant les stades proB et preBI.

Les étapes précoces du développement B sont gouvernées par trois facteurs de transcription: E2A, EBF et Pax5. Les deux premiers sont responsables de l'expression de gènes tels que Iga, Igb, VpreB et Pax5, le troisième intervient en aval d'E2A et EBF et conditionne entre autres l'expression du CD19. L'invalidation de chacun de ces trois facteurs induit un blocage du développement B au stade proB. Il serait donc intéressant d'explorer l'influence du transgène FADD-DN sur l'induction de ces trois facteurs de transcription. Cette expérience pourrait être réalisée en introduisant le transgène FADD-DN dans des CSH (CD34⁺CD38⁻Lin⁻) puis en plaçant les CSH transduites (GFP⁺) et non transduites (GFP⁻) dans le modèle S17 permissif pour le développement B. Afin d'éliminer tout biais imputable à l'utilisation d'un dominant négatif, il sera également important de réaliser cette expérience en substituant au transgène FADD-DN une construction siRNA permettant une extinction du transcrit FADD.

Quelques commentaires s'imposent également sur le rôle de FADD dans l'expansion des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques mis en évidence par nos propres données chez l'Homme ainsi que par celles du groupe de Strasser chez la souris (Pellegrini et al., 2005). Il y a consensus dans la littérature pour affecter à FADD un rôle dans la prolifération des cellules T en réponse aux signaux

du TCR. Pour les cellules B, l'invalidation de FADD n'affecte pas leur réponse proliférative aux signaux transduits par le BCR ou par la voie CD40, mais réprime fortement la réponse aux agonistes de TLR3 et TLR4. Ceci signifie que FADD n'est pas un simple composant de la machinerie de réplication cellulaire. Il est impliqué lors de l'engagement de certains récepteurs cellulaires et conditionne donc la capacité de réponse des cellules à des signaux environnementaux. A ce titre, il serait intéressant de déterminer s'il existe une connexion entre la voie FADD et la voie de signalisation de Notch ou celles des récepteurs de Wnt ou des cytokines SCF, IL3, Flt3-L, toutes impliquées à des degrés divers dans la réplication et/ou l'autorenouvellement des CSH.

Enfin, le développement T survient malgré l'inhibition de la fonction de FADD, mais subit des altérations comme des défauts de prolifération suite à l'engagement du pré-TCR et du TCR (Newton et al., 1998; Newton et al., 2000). Nous n'avons pour l'instant pu vérifier l'implication de FADD dans le développement T humain, mais l'acquisition récente de la lignée stromale OP9-DL1 décrite par le groupe de Zuniga-Pflücker devrait nous permettre de répondre à cette question (La Motte-Mohs et al., 2005).

TLR ET HEMATOPOIESE

Pourquoi les TLR-L exercent-ils des effets opposés sur la lymphopoïèse et la myélopoïèse ?

Des éléments d'origine microbienne (LPS, Lipoprotéines, dsARN) sont à l'origine de la stimulation de nombreuses cellules de l'immunité innée. Or, leur contribution au développement hématopoïétique n'a été sérieusement envisagée que très tardivement, la moelle osseuse ayant longtemps été considérée (à tort) comme protégée vis à vis des expositions aux pathogènes. Il est intéressant de noter que d'anciennes données de la littérature confirment à posteriori notre observation que la voie de signalisation des TLR module l'hématopoïèse. En effet, en 1994 Hirayama et collaborateurs décrivaient que l'addition d'IL-1 (activant donc la voie MyD88) inhibait le développement B murin *in vitro* dans un système de culture en méthylcellulose (Hirayama et al., 1994). Les souris MyD88 KO et TRIF KO ne présentant aucune anomalie du développement hématopoïétique, il est vraisemblable que la voie de signalisation des TLR sur les cellules hématopoïétiques n'est engagée que dans le contexte d'infections microbiennes (Adachi et al., 1998; Hoebe et al., 2003). Encore faut-il qu'il s'agisse d'une situation d'urgence lorsque les microorganismes sont véhiculés par la voie sanguine. Nos données comme celles du groupe de Kincade chez la souris suggèrent que le remodelage de l'hématopoïèse induit par ligation des TLR a pour conséquence de stimuler la production de cellules de l'immunité innée (macrophages, DCs) capables d'assumer la phagocytose des pathogènes et l'amplification de leur présentation au système immunitaire adaptatif. En revanche, comme nous l'avons évoqué dans la discussion de

l'article #2, l'inhibition de la lymphopoïèse B par les agonistes des TLR est moins intuitivement compréhensible. Nous pensons que la répression de la lymphopoïèse B ne s'opère pas en réponse à une demande physiologique mais traduit plutôt la mise en place d'un programme myéloïde au sein d'une cellule possédant à la fois les potentialités lymphoïdes et myéloïdes. Dans le modèle d'hématopoïèse « binaire » de Weissmann, postulant une séparation précoce des lignages lymphocytaires et myéloïdes (Akashi et al., 2000; Christensen and Weissman, 2001; Kondo et al., 1997), seule la CSH possède ce double potentiel hématopoïétique. Ce modèle est toutefois remis en question par la description récente chez la souris d'un progéniteur bi-potentiel (B/macrophage) (Montecino-Rodriguez et al., 2001). De tels progéniteurs, dont l'existence n'est pas encore démontrée chez l'Homme, pourraient également constituer une cible potentielle des ligands de TLR. Au-delà de cette réflexion, il est permis de s'interroger sur les raisons pour lesquelles de tels progéniteurs ont été conservés au cours de l'évolution et amenés à coexister avec des progéniteurs à potentiel plus restreint type CMP ou CLP. A ce titre il est intéressant de noter que le potentiel lymphocytaire B de ces progéniteurs B/macrophages est restreint au lignage B-1 chez la souris. Certaines données produites par le groupe de Phipps en particulier ont fait état d'une filiation entre macrophages et cellules B-1, certaines leucémies B ayant par exemple une propension à acquérir spontanément des marqueurs et des fonctions macrophagiques (Borrello et al., 2001). Les lymphocytes B-1 représentent en fait la persistance chez les organismes évolués d'un système immunitaire ancien plus primitif. Ils sont à la frontière entre réponse immunitaire innée (production d'AcS naturels) et réponse immunitaire adaptative (réponse AcS aux polysaccharides bactériens par exemple). L'ensemble de ces observations évoque la possibilité que les LB-1 soient dotés d'une « plasticité » particulière leur permettant dans certaines circonstances de se différencier en cellules présentatrices professionnelles. La possibilité de reconstituer sélectivement le compartiment B-1 en transférant les progéniteurs bi-potentiels chez un receveur immunodéficient (SCID) permettra de tester cette hypothèse dans le contexte d'une infection microbienne par exemple.

En revanche, si l'on considère que des progéniteurs bi-potentiels constituent la cible des agonistes de TLR dans nos expériences, il faut également admettre que leur contribution au développement B *in vitro* dans le système S17 est majoritaire. Cette hypothèse semble assez peu vraisemblable. Nos données montrant que les agonistes de TLR modifient le programme transcriptionnel des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques nous conduisent à proposer une hypothèse alternative. Nous pensons que l'inhibition du développement lymphoïde induite par les agonistes de TLR résulte essentiellement des antagonismes réciproques existant entre facteurs de transcription myéloïdes et facteurs de transcription lymphoïdes. Ce scénario est illustré par le rétrocontrôle négatif exercé par les facteurs myéloïdes PU.1 et C/EBP α sur l'expression de Pax5, via leur interaction physique.

Notre observation que le ligand de l'hétérodimère TLR1/TLR2 peut réprimer l'expression de Pax5 dans des précurseurs B suggère que la reprogrammation transcriptionnelle induite par les agonistes de TLR peut s'exercer à différents stades du développement hématopoïétique.

Nous avons également exploré l'impact des ligands de TLR sur l'hématopoïèse *in vivo* dans le modèle des souris « humanisées » Rag^{-/-}γc^{-/-} reconstituées avec des cellules CD34⁺ de sang de cordon (données non présentées). Nous avons observé qu'une injection hebdomadaire de PAM₃CSK₄ pendant les 8 semaines post-reconstitution inhibe le développement B humain tout en préservant la reconstitution thymique. Nous n'avons toutefois pas observé d'expansion concomitante des cellules dendritiques et des macrophages comme c'est le cas chez la souris. Les causes de cette discordance sont à étudier. Par ailleurs, nous avons noté, chez les souris « humanisées » traitées avec PAM₃CSK₄, une altération du développement thymique caractérisée par un blocage au stade double positif et par l'absence de cellules simples positives CD4⁺ ou CD8⁺. Il est donc possible que les agonistes des TLR interfèrent également avec certaines étapes de sélection du répertoire T. Nous souhaitons également étudier le patron d'expression des transcrits des TLR et leur fonctionnalité dans différentes sous-populations de thymocytes humains isolées à partir des thymus de souris « humanisées ». Il n'existe en effet aucune étude à ce jour sur le rôle des TLR au cours de l'ontogénie T.

Mécanisme d'action des TLR sur l'hématopoïèse : effet instructeur ou permissif ?

Nos expériences suggèrent que les TLR fournissent un signal « instructeur » c'est-à-dire qu'ils initient des modifications de la balance transcriptionnelle sans toutefois permettre à ce nouveau programme hématopoïétique de s'exprimer. En effet, la culture de CSH en présence de PAM₃CSK₄ n'induit l'expression de marqueurs de lignage que sur une relativement faible proportion de cellules (20 % en moyenne). CD116, le récepteur du GM-CSF fait partie des marqueurs induits par PAM₃CSK₄. Nous postulons donc que les cytokines et les facteurs hématopoïétiques sont nécessaires pour révéler le potentiel hématopoïétique des CSH exposées aux agonistes des TLR. Des travaux relatant l'impact de la stimulation de TLR7/8 dans des cellules CD34⁺ humaines viennent d'être publiés (Sioud et al., 2006). Les auteurs ont mis en évidence la sécrétion de GM-CSF, IL-1β et TNF-α par les cellules CD34⁺ cultivées en présence d'un ligand de TLR7/8 (R848). On peut donc envisager que la sous-population de CSH induite par PAM₃CSK₄ à exprimer des marqueurs de DC/monocytes a reçu à la fois les signaux instructeurs fournis via TLR1/2 et les signaux permissifs fournis de manière endogène par une production autocrine ou paracrine de facteurs hématopoïétiques. D'autre part, il serait intéressant de vérifier si les résultats obtenus par Sioud *et coll.* peuvent être reproduits avec une population de CSH purifiées. En effet, cette étude a

été réalisée sur des cellules CD34⁺ isolées de moelle osseuse, sans déplétion stringente des progéniteurs commis. On peut donc supposer qu'une population contaminante de progéniteurs myéloïdes serait plus encline à sécréter ces cytokines. En effet, la culture de monocytes en présence de PAM₃CSK₄ induit l'expression des ARNm du GM-CSF qui s'associe à la différenciation des monocytes en macrophages (Krutzik et al., 2005).

Sur la base de l'observation que PAM₃CSK₄ induit l'expression du CD38 sur une majorité de CSH, nous avons postulé que les cellules Lin⁻, majoritaires au sortir de cette culture, ont néanmoins réalisé la transition du statut de cellules souches vers celui de progéniteur. Cette hypothèse implique que mises en présence de facteurs hématopoïétiques, ces cellules pourraient exprimer des marqueurs de lignage. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé une expérience préliminaire consistant à effectuer des cultures de CSH triées (CD34⁺/CD38⁻/Lin⁻) en deux temps. La première culture de 6 jours a été conduite en présence de PAM₃CSK₄. A l'issue de cette culture, un second tri a été réalisé pour purifier les cellules Lin⁻. Ces dernières ont ensuite été remises en culture pendant 3 jours en présence d'un cocktail de facteurs hématopoïétiques comprenant SCF, IL3, Flt3-L, G-CSF et GM-CSF et d'un stroma murin exprimant constitutivement un ligand de Notch (OP9-DL1). En contrôle, les CSH issues du premier tri ont été cultivées avec le cocktail de cytokines décrit ci-dessus. Les résultats de cette expérience (données non présentées) montrent qu'ex vivo, les CSH sont incapables d'exprimer des marqueurs de lignage lorsqu'elles sont cultivées sur OP9-DL1 en présence de cytokines. A l'inverse, plus de 80% des cellules Lin⁻ issues de la préculture avec PAM₃CSK₄ expriment les marqueurs CD11b, CD11c et CD116 après 3 jours de culture sur OP9-DL1 en présence de cytokines. Ces résultats confortent l'hypothèse d'un signal instructeur fourni aux CSH par PAM₃CSK₄ qui peut ensuite être révélé par un microenvironnement favorable.

L'approche décrite ci-dessous réduit mais n'exclut pas totalement la possibilité que PAM₃CSK₄ agisse en ciblant préférentiellement un contaminant cellulaire déjà engagé dans le lignage myéloïde. L'une des possibilités pour contourner cette difficulté pourrait consister à travailler sur une population de CSH homogène. Nous pourrions utiliser dans ce but des lignées de CSH murines dépendantes de l'IL-3 (FDCP-mix) décrites par Spooncer et collaborateurs en 1986 (Spooncer et al., 1986). Ces lignées ont été dérivées de cultures de moelle à long terme infectées par un vecteur viral modifié dérivant du Moloney murine leukemia virus contenant l'oncogène src. Parallèlement à cette approche, des expériences sont en cours au laboratoire pour déterminer l'impact de PAM₃CSK₄ sur l'expression des facteurs de transcription hématopoïétiques dans des CSH purifiées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Adachi, M., Watanabe-Fukunaga, R., and Nagata, S. (1993). Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 1756-1760.
- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* *9*, 143-150.
- Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Wang, L., Talanian, R. V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1997). CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* *57*, 615-619.
- Ahn, J. H., Park, S. M., Cho, H. S., Lee, M. S., Yoon, J. B., Vilcek, J., and Lee, T. H. (2001). Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J Biol Chem* *276*, 47100-47106.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* *404*, 193-197.
- Akerblad, P., Rosberg, M., Leanderson, T., and Sigvardsson, M. (1999). The B29 (immunoglobulin beta-chain) gene is a genetic target for early B-cell factor. *Mol Cell Biol* *19*, 392-401.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* *2*, 675-680.
- Alappat, E. C., Feig, C., Boyerinas, B., Volkland, J., Samuels, M., Murmann, A. E., Thorburn, A., Kidd, V. J., Slaughter, C. A., Osborn, S. L., *et al.* (2005). Phosphorylation of FADD at serine 194 by CK1alpha regulates its nonapoptotic activities. *Mol Cell* *19*, 321-332.
- Alderson, M. R., Armitage, R. J., Maraskovsky, E., Tough, T. W., Roux, E., Schooley, K., Ramsdell, F., and Lynch, D. H. (1993). Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* *178*, 2231-2235.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* *413*, 732-738.
- Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Weiss, D. S., Godowski, P., and Zychlinsky, A. (2000). The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *Embo J* *19*, 3325-3336.
- Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J. P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., and Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* *4*, 168-174.
- Andrews, R. G., Singer, J. W., and Bernstein, I. D. (1989). Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. *J Exp Med* *169*, 1721-1731.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* *281*, 1305-1308.
- Avecilla, S. T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D. K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T. E., *et al.* (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* *10*, 64-71.

B

- Bain, G., Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., Krop, I., Schlissel, M. S., Feeney, A. J., van Roon, M., and et al. (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* *79*, 885-892.
- Balachandran, S., Thomas, E., and Barber, G. N. (2004). A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature* *432*, 401-405.
- Balciunaite, G., Ceredig, R., Massa, S., and Rolink, A. G. (2005a). A B220+ CD117+ CD19- hematopoietic progenitor with potent lymphoid and myeloid developmental potential. *Eur J Immunol* *35*, 2019-2030.
- Balciunaite, G., Ceredig, R., and Rolink, A. G. (2005b). The earliest subpopulation of mouse thymocytes contains potent T, significant macrophage, and natural killer cell but no B-lymphocyte potential. *Blood* *105*, 1930-1936.
- Bannish, G., Fuentes-Panana, E. M., Cambier, J. C., Pear, W. S., and Monroe, J. G. (2001). Ligand-independent signaling functions for the B lymphocyte antigen receptor and their role in positive selection during B lymphopoiesis. *J Exp Med* *194*, 1583-1596.
- Basu, S., Hodgson, G., Katz, M., and Dunn, A. R. (2002). Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* *100*, 854-861.
- Becker, A. J., Mc, C. E., and Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* *197*, 452-454.
- Beisner, D. R., Ch'en, I. L., Kolla, R. V., Hoffmann, A., and Hedrick, S. M. (2005). Cutting edge: innate immunity conferred by B cells is regulated by caspase-8. *J Immunol* *175*, 3469-3473.
- Bennett, I. M., Zatsepin, O., Zamai, L., Azzoni, L., Mikheeva, T., and Perussia, B. (1996). Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12. *J Exp Med* *184*, 1845-1856.
- Benz, C., and Bleul, C. C. (2005). A multipotent precursor in the thymus maps to the branching point of the T versus B lineage decision. *J Exp Med* *202*, 21-31.
- Bertrand, F. E., 3rd, Billips, L. G., Burrows, P. D., Gartland, G. L., Kubagawa, H., and Schroeder, H. W., Jr. (1997). Ig D(H) gene segment transcription and rearrangement before surface expression of the pan-B-cell marker CD19 in normal human bone marrow. *Blood* *90*, 736-744.
- Blom, B., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J. (2000). Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* *192*, 1785-1796.
- Blom, B., Res, P., Noteboom, E., Weijer, K., and Spits, H. (1997). Prethymic CD34+ progenitors capable of developing into T cells are not committed to the T cell lineage. *J Immunol* *158*, 3571-3577.
- Blom, B., Verschuren, M. C., Heemskerk, M. H., Bakker, A. Q., van Gastel-Mol, E. J., Wolvers-Tettero, I. L., van Dongen, J. J., and Spits, H. (1999). TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood* *93*, 3033-3043.
- Bodine, D. M., Karlsson, S., and Nienhuis, A. W. (1989). Combination of interleukins 3 and 6 preserves stem cell function in culture and enhances retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 8897-8901.
- Bodmer, J. L., Burns, K., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Thome, M., Bornand, T., Hahne, M., Schroter, M., Becker, K., et al. (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity* *6*, 79-88.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* *85*, 803-815.
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Panczer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* *270*, 7795-7798.

Borregaard, N., and Cowland, J. B. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* *89*, 3503-3521.

Borrello, M. A., Palis, J., and Phipps, R. P. (2001). The relationship of CD5+ B lymphocytes to macrophages: insights from normal biphenotypic B/macrophage cells. *Int Rev Immunol* *20*, 137-155.

Borset, M., Hjorth-Hansen, H., Johnsen, A. C., Seidel, C., Waage, A., Espevik, T., and Sundan, A. (1999). Apoptosis, proliferation and NF-kappaB activation induced by agonistic Fas antibodies in the human myeloma cell line OH-2: amplification of Fas-mediated apoptosis by tumor necrosis factor. *Eur J Haematol* *63*, 345-353.

Bradl, H., Wittmann, J., Milius, D., Vettermann, C., and Jack, H. M. (2003). Interaction of murine precursor B cell receptor with stroma cells is controlled by the unique tail of lambda 5 and stroma cell-associated heparan sulfate. *J Immunol* *171*, 2338-2348.

Bryder, D., Ramsfjell, V., Dybedal, I., Theilgaard-Monch, K., Hogerkorp, C. M., Adolfsson, J., Borge, O. J., and Jacobsen, S. E. (2001). Self-renewal of multipotent long-term repopulating hematopoietic stem cells is negatively regulated by Fas and tumor necrosis factor receptor activation. *J Exp Med* *194*, 941-952.

C

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., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* *425*, 841-846.

Carlisle, G. W., Smith, D. H., and Wiedmann, M. (2004). Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* *103*, 4310-4316.

Carlsson, L., Candeias, S., Staerz, U., and Keller, G. (1995). Expression of Fc gamma RIII defines distinct subpopulations of fetal liver B cell and myeloid precursors. *Eur J Immunol* *25*, 2308-2317.

Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* *360*, 258-261.

Ceredig, R., Rauch, M., Balciunaite, G., and Rolink, A. G. (2006). Increasing Flt3L availability alters composition of a novel bone marrow lymphoid progenitor compartment. *Blood* *108*, 1216-1222.

Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* *288*, 2351-2354.

Chan, F. K., and Lenardo, M. J. (2000). A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur J Immunol* *30*, 652-660.

Chau, H., Wong, V., Chen, N. J., Huang, H. L., Lin, W. J., Mirtsos, C., Elford, A. R., Bonnard, M., Wakeham, A., You-Ten, A. L., *et al.* (2005). Cellular FLICE-inhibitory protein is required for T cell survival and cycling. *J Exp Med* *202*, 405-413.

Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., and Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* *7*, 821-830.

Chen, W., Antonenko, S., Sederstrom, J. M., Liang, X., Chan, A. S., Kanzler, H., Blom, B., Blazar, B. R., and Liu, Y. J. (2004). Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* *103*, 2547-2553.

Chicha, L., Jarrossay, D., and Manz, M. G. (2004). Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. *J Exp Med* *200*, 1519-1524.

Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., and Browning, J. L. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* *272*, 32401-32410.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Yu, G. L., Lyons, R. H., Garg, M., Duan, D. R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992.

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

Chun, H. J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C. K., Siegel, R. M., Dale, J. K., Puck, J., Davis, J., Hall, C. G., *et al.* (2002). Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419, 395-399.

Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F., and Shaper, J. H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133, 157-165.

Claessens, Y. E., Park, S., Dubart-Kupperschmitt, A., Mariot, V., Garrido, C., Chretien, S., Dreyfus, F., Lacombe, C., Mayeux, P., and Fontenay, M. (2005). Rescue of early-stage myelodysplastic syndrome-deriving erythroid precursors by the ectopic expression of a dominant-negative form of FADD. *Blood* 105, 4035-4042.

Collins, L. S., and Dorshkind, K. (1987). A stromal cell line from myeloid long-term bone marrow cultures can support myelopoiesis and B lymphopoiesis. *J Immunol* 138, 1082-1087.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaheri, B. A., Ghayur, T., Carson, W. E., and Caligiuri, M. A. (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97, 3146-3151.

Corcos, D., Dunda, O., Butor, C., Cesbron, J. Y., Lores, P., Bucchini, D., and Jami, J. (1995). Pre-B-cell development in the absence of lambda 5 in transgenic mice expressing a heavy-chain disease protein. *Curr Biol* 5, 1140-1148.

Covert, M. W., Leung, T. H., Gaston, J. E., and Baltimore, D. (2005). Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science* 309, 1854-1857.

Cusson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T. H., Fitzgerald, K. A., and Kelliher, M. A. (2005). Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- κ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem* 280, 36560-36566.

D

Dahl, R., Walsh, J. C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S. R., Singh, H., and Simon, M. C. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBP α ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* 4, 1029-1036.

De Smedt, M., Hoebeke, I., Reynvoet, K., Leclercq, G., and Plum, J. (2005). Different thresholds of Notch signaling bias human precursor cells toward B-, NK-, monocytic/dendritic-, or T-cell lineage in thymus microenvironment. *Blood* 106, 3498-3506.

De Smedt, M., Reynvoet, K., Kerre, T., Taghon, T., Verhasselt, B., Vandekerckhove, B., Leclercq, G., and Plum, J. (2002). Active form of Notch imposes T cell fate in human progenitor cells. *J Immunol* 169, 3021-3029.

Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., and Goodwin, R. G. (1997). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813-820.

DeKoter, R. P., and Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439-1441.

- DeKoter, R. P., Walsh, J. C., and Singh, H. (1998). PU.1 regulates both cytokine-dependent proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *Embo J* 17, 4456-4468.
- Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., and Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 193-209.
- Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y., and Wu, X. (2003). A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis. *Cell* 115, 61-70.
- Desbarats, J., and Newell, M. K. (2000). Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat Med* 6, 920-923.
- Dexter, T. M., Allen, T. D., and Lajtha, L. G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 91, 335-344.
- DiSanto, J. P., Keever, C. A., Small, T. N., Nicols, G. L., O'Reilly, R. J., and Flomenberg, N. (1990). Absence of interleukin 2 production in a severe combined immunodeficiency disease syndrome with T cells. *J Exp Med* 171, 1697-1704.
- Duan, H., and Dixit, V. M. (1997). RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 385, 86-89.
- Duncan, A. W., Rattis, F. M., DiMascio, L. N., Congdon, K. L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J. M., Willert, K., Gaiano, N., and Reya, T. (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 6, 314-322.
- Dworzak, M. N., Fritsch, G., Froschl, G., Printz, D., and Gadner, H. (1998). Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood* 92, 3203-3209.

E

- Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R. P., Ng, S. C., Zheng, L., Lenardo, M. J., and Fesik, S. W. (1998). NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature* 392, 941-945.
- Edry, E., and Melamed, D. (2004). Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol* 173, 4265-4271.
- Edvardsson, L., Dykes, J., and Olofsson, T. (2006). Isolation and characterization of human myeloid progenitor populations--TpoR as discriminator between common myeloid and megakaryocyte/erythroid progenitors. *Exp Hematol* 34, 599-609.
- Edvardsson, L., Dykes, J., Olsson, M. L., and Olofsson, T. (2004). Clonogenicity, gene expression and phenotype during neutrophil versus erythroid differentiation of cytokine-stimulated CD34⁺ human marrow cells in vitro. *Br J Haematol* 127, 451-463.
- Eisenbeis, C. F., Singh, H., and Storb, U. (1995). Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev* 9, 1377-1387.
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., *et al.* (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273, 14363-14367.

F

- Fischer, A., Le Deist, F., Hacein-Bey-Abina, S., Andre-Schmutz, I., Basile Gde, S., de Villartay, J. P., and Cavazzana-Calvo, M. (2005). Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunol Rev* 203, 98-109.

Fisher, G. H., Rosenberg, F. J., Straus, S. E., Dale, J. K., Middleton, L. A., Lin, A. Y., Strober, W., Lenardo, M. J., and Puck, J. M. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935-946.

Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S. M., and Maniatis, T. (2003a). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4, 491-496.

Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., *et al.* (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413, 78-83.

Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M., and Golenbock, D. T. (2003b). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198, 1043-1055.

Fohrer, H., Audit, I. M., Sainz, A., Schmitt, C., Dezutter-Dambuyant, C., and Dalloul, A. H. (2004). Analysis of transcription factors in thymic and CD34+ progenitor-derived plasmacytoid and myeloid dendritic cells: evidence for distinct expression profiles. *Exp Hematol* 32, 104-112.

Forsberg, E. C., Serwold, T., Kogan, S., Weissman, I. L., and Passegue, E. (2006). New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3(+) multipotent hematopoietic progenitors. *Cell* 126, 415-426.

Freiberg, R. A., Spencer, D. M., Choate, K. A., Duh, H. J., Schreiber, S. L., Crabtree, G. R., and Khavari, P. A. (1997). Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 108, 215-219.

Freud, A. G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H. C., Ferketich, A. K., Nuovo, G. J., Hughes, T. L., Marburger, T. B., Sung, J., Baiocchi, R. A., *et al.* (2005). A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 22, 295-304.

Friedman, A. D. (2002). Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 21, 3377-3390.

G

Gallacher, L., Murdoch, B., Wu, D. M., Karanu, F. N., Keeney, M., and Bhatia, M. (2000). Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 95, 2813-2820.

Galy, A., Christopherson, I., Ferlazzo, G., Liu, G., Spits, H., and Georgopoulos, K. (2000). Distinct signals control the hematopoiesis of lymphoid-related dendritic cells. *Blood* 95, 128-137.

Galy, A., Travis, M., Cen, D., and Chen, B. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3, 459-473.

Galy, A., Verma, S., Barcena, A., and Spits, H. (1993). Precursors of CD3+CD4+CD8+ cells in the human thymus are defined by expression of CD34. Delineation of early events in human thymic development. *J Exp Med* 178, 391-401.

Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E., and Schiff, C. (2002). Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13014-13019.

Georgopoulos, K. (2002). Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* 2, 162-174.

Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143-156.

Ghia, P., ten Boekel, E., Sanz, E., de la Hera, A., Rolink, A., and Melchers, F. (1996). Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J Exp Med* 184, 2217-2229.

Glodek, A. M., Honczarenko, M., Le, Y., Campbell, J. J., and Silberstein, L. E. (2003). Sustained activation of cell adhesion is a differentially regulated process in B lymphopoiesis. *J Exp Med* 197, 461-473.

Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., Arnold, E., Varfolomeev, E. E., Brodianskii, V. M., and Wallach, D. (1997). CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem* 272, 19641-19644.

Goodell, M. A., Rosenzweig, M., Kim, H., Marks, D. F., DeMaria, M., Paradis, G., Grupp, S. A., Sieff, C. A., Mulligan, R. C., and Johnson, R. P. (1997). Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 3, 1337-1345.

Goodnow, C. C., Cyster, J. G., Hartley, S. B., Bell, S. E., Cooke, M. P., Healy, J. I., Akkaraju, S., Rathmell, J. C., Pogue, S. L., and Shokat, K. P. (1995). Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv Immunol* 59, 279-368.

Grouard, G., Rissoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185, 1101-1111.

Guerriero, R., Testa, U., Gabbianelli, M., Mattia, G., Montesoro, E., Macioce, G., Pace, A., Ziegler, B., Hassan, H. J., and Peschle, C. (1995). Unilineage megakaryocytic proliferation and differentiation of purified hematopoietic progenitors in serum-free liquid culture. *Blood* 86, 3725-3736.

Guo, B., Kato, R. M., Garcia-Lloret, M., Wahl, M. I., and Rawlings, D. J. (2000). Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. *Immunity* 13, 243-253.

H

Haddad, R., Guardiola, P., Izac, B., Thibault, C., Radich, J., Delezoide, A. L., Baillou, C., Lemoine, F. M., Gluckman, J. C., Pflumio, F., and Canque, B. (2004). Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood* 104, 3918-3926.

Hagimoto, N., Kuwano, K., Kawasaki, M., Yoshimi, M., Kaneko, Y., Kunitake, R., Maeyama, T., Tanaka, T., and Hara, N. (1999). Induction of interleukin-8 secretion and apoptosis in bronchiolar epithelial cells by Fas ligation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21, 436-445.

Halverson, R., Torres, R. M., and Pelanda, R. (2004). Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat Immunol* 5, 645-650.

Han, D. K., Chaudhary, P. M., Wright, M. E., Friedman, C., Trask, B. J., Riedel, R. T., Baskin, D. G., Schwartz, S. M., and Hood, L. (1997). MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11333-11338.

Hao, Q. L., Shah, A. J., Thiemann, F. T., Smogorzewska, E. M., and Crooks, G. M. (1995). A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 86, 3745-3753.

Hao, Q. L., Smogorzewska, E. M., Barsky, L. W., and Crooks, G. M. (1998). In vitro identification of single CD34+CD38- cells with both lymphoid and myeloid potential. *Blood* 91, 4145-4151.

Hao, Q. L., Zhu, J., Price, M. A., Payne, K. J., Barsky, L. W., and Crooks, G. M. (2001). Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood* 97, 3683-3690.

Harper, N., Hughes, M., MacFarlane, M., and Cohen, G. M. (2003). Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278, 25534-25541.

- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099-1103.
- Heemskerk, M. H., Blom, B., Nolan, G., Stegmann, A. P., Bakker, A. Q., Weijer, K., Res, P. C., and Spits, H. (1997). Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3. *J Exp Med* *186*, 1597-1602.
- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., *et al.* (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* *33*, 2987-2997.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526-1529.
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M. A., *et al.* (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* *109*, 625-637.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* *3*, 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
- Hirai, H., Zhang, P., Dayaram, T., Hetherington, C. J., Mizuno, S., Imanishi, J., Akashi, K., and Tenen, D. G. (2006). C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol* *7*, 732-739.
- Hirayama, F., Clark, S. C., and Ogawa, M. (1994). Negative regulation of early B lymphopoiesis by interleukin 3 and interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 469-473.
- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., *et al.* (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* *424*, 743-748.
- Hori, T., Cupp, J., Wrighton, N., Lee, F., and Spits, H. (1991). Identification of a novel human thymocyte subset with a phenotype of CD3- CD4+ CD8 alpha + beta-1. Possible progeny of the CD3- CD4- CD8- subset. *J Immunol* *146*, 4078-4084.
- Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., and Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* *420*, 329-333.
- Horng, T., Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* *2*, 835-841.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* *162*, 3749-3752.
- Hou, Y. H., Srour, E. F., Ramsey, H., Dahl, R., Broxmeyer, H. E., and Hromas, R. (2005). Identification of a human B-cell/myeloid common progenitor by the absence of CXCR4. *Blood* *105*, 3488-3492.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., and Goeddel, D. V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* *84*, 299-308.
- Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* *81*, 495-504.
- Hu, S., Vincenz, C., Buller, M., and Dixit, V. M. (1997). A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J Biol Chem* *272*, 9621-9624.

Hua, Z. C., Sohn, S. J., Kang, C., Cado, D., and Winoto, A. (2003). A function of Fas-associated death domain protein in cell cycle progression localized to a single amino acid at its C-terminal region. *Immunity* *18*, 513-521.

Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. (1996). NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* *384*, 638-641.

I

Ikawa, T., Fujimoto, S., Kawamoto, H., Katsura, Y., and Yokota, Y. (2001). Commitment to natural killer cells requires the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 5164-5169.

Ikuta, K., and Weissman, I. L. (1992). Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 1502-1506.

Imamura, R., Konaka, K., Matsumoto, N., Hasegawa, M., Fukui, M., Mukaida, N., Kinoshita, T., and Suda, T. (2004). Fas ligand induces cell-autonomous NF-kappaB activation and interleukin-8 production by a mechanism distinct from that of tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* *279*, 46415-46423.

Imtiyaz, H. Z., Rosenberg, S., Zhang, Y., Rahman, Z. S., Hou, Y. J., Manser, T., and Zhang, J. (2006). The Fas-associated death domain protein is required in apoptosis and TLR-induced proliferative responses in B cells. *J Immunol* *176*, 6852-6861.

Inlay, M. A., Tian, H., Lin, T., and Xu, Y. (2004). Important roles for E protein binding sites within the immunoglobulin kappa chain intronic enhancer in activating V kappa J kappa rearrangement. *J Exp Med* *200*, 1205-1211.

Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., and Nunez, G. (1997). CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 10717-10722.

Irie, T., Muta, T., and Takeshige, K. (2000). TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett* *467*, 160-164.

Iritani, B. M., Alberola-Ila, J., Forbush, K. A., and Perimutter, R. M. (1999). Distinct signals mediate maturation and allelic exclusion in lymphocyte progenitors. *Immunity* *10*, 713-722.

Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* *388*, 190-195.

Itoh, N., and Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* *268*, 10932-10937.

J

Jaffredo, T., Nottingham, W., Liddiard, K., Bollerot, K., Pouget, C., and de Bruijn, M. (2005). From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection? *Exp Hematol* *33*, 1029-1040.

Jaleco, A. C., Neves, H., Hooijberg, E., Gameiro, P., Clode, N., Haury, M., Henrique, D., and Parreira, L. (2001). Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med* *194*, 991-1002.

Jaleco, A. C., Stegmann, A. P., Heemskerk, M. H., Couwenberg, F., Bakker, A. Q., Weijer, K., and Spits, H. (1999). Genetic modification of human B-cell development: B-cell development is inhibited by the dominant negative helix loop helix factor Id3. *Blood* *94*, 2637-2646.

Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* *3*, 499.

K

- Kabra, N. H., Kang, C., Hsing, L. C., Zhang, J., and Winoto, A. (2001). T cell-specific FADD-deficient mice: FADD is required for early T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 6307-6312.
- Kang, T. B., Ben-Moshe, T., Varfolomeev, E. E., Pewzner-Jung, Y., Yogeve, N., Jurewicz, A., Waisman, A., Brenner, O., Haffner, R., Gustafsson, E., *et al.* (2004). Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol* *173*, 2976-2984.
- Kapteina, A., Jansen, M., Dilaver, G., Kitson, J., Dash, L., Wang, E., Owen, M. J., Bodmer, J. L., Tschopp, J., and Farrow, S. N. (2000). Studies on the interaction between TWEAK and the death receptor WSL-1/TRAMP (DR3). *FEBS Lett* *485*, 135-141.
- Karanu, F. N., Murdoch, B., Gallacher, L., Wu, D. M., Koremoto, M., Sakano, S., and Bhatia, M. (2000). The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* *192*, 1365-1372.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* *18*, 621-663.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* *26*, 239-257.
- Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Yilmaz, O. H., Terhorst, C., and Morrison, S. J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* *121*, 1109-1121.
- Kiger, A. A., White-Cooper, H., and Fuller, M. T. (2000). Somatic support cells restrict germline stem cell self-renewal and promote differentiation. *Nature* *407*, 750-754.
- Kinashi, T., and Springer, T. A. (1994). Steel factor and c-kit regulate cell-matrix adhesion. *Blood* *83*, 1033-1038.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* *14*, 5579-5588.
- Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y. P., Goeddel, D. V., Giles, K. M., Pun, K. T., Grinham, C. J., Brown, R., and Farrow, S. N. (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* *384*, 372-375.
- Kollet, O., Dar, A., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., Lapid, K., Sztainberg, Y., Tesio, M., Samstein, R. M., Goichberg, P., Spiegel, A., *et al.* (2006). Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* *12*, 657-664.
- Kollet, O., Shivtiel, S., Chen, Y. Q., Suriawinata, J., Thung, S. N., Dabeva, M. D., Kahn, J., Spiegel, A., Dar, A., Samira, S., *et al.* (2003). HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* *112*, 160-169.
- Kondo, M., Scherer, D. C., King, A. G., Manz, M. G., and Weissman, I. L. (2001). Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev* *11*, 520-526.
- Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* *91*, 661-672.
- Kouro, T., Nagata, K., Takaki, S., Nisitani, S., Hirano, M., Wahl, M. I., Witte, O. N., Karasuyama, H., and Takatsu, K. (2001). Bruton's tyrosine kinase is required for signaling the CD79b-mediated pro-B to pre-B cell transition. *Int Immunol* *13*, 485-493.
- Krutzik, S. R., Tan, B., Li, H., Ochoa, M. T., Liu, P. T., Sharfstein, S. E., Graeber, T. G., Sieling, P. A., Liu, Y. J., Rea, T. H., *et al.* (2005). TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med* *11*, 653-660.

L

- La Motte-Mohs, R. N., Herer, E., and Zuniga-Pflucker, J. C. (2005). Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. *Blood* *105*, 1431-1439.
- Laiosa, C. V., Stadtfeld, M., and Graf, T. (2006). Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* *24*, 705-738.
- Laslo, P., Spooner, C. J., Warmflash, A., Lancki, D. W., Lee, H. J., Sciammas, R., Gantner, B. N., Dinner, A. R., and Singh, H. (2006). Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* *126*, 755-766.
- Lassoued, K., Nunez, C. A., Billips, L., Kubagawa, H., Monteiro, R. C., LeBlen, T. W., and Cooper, M. D. (1993). Expression of surrogate light chain receptors is restricted to a late stage in pre-B cell differentiation. *Cell* *73*, 73-86.
- Lin, H., and Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* *376*, 263-267.
- Liu, F., Wu, H. Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T., and Link, D. C. (1996). Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* *5*, 491-501.
- Loken, M. R., Shah, V. O., Dattilio, K. L., and Civin, C. I. (1987). Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* *70*, 1316-1324.
- Lopez, R. A., Schoetz, S., DeAngelis, K., O'Neill, D., and Bank, A. (2002). Multiple hematopoietic defects and delayed globin switching in Ikaros null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 602-607.
- Lu, L., and Osmond, D. G. (1997). Apoptosis during B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J Immunol* *158*, 5136-5145.
- Lu, M., Kawamoto, H., Katsube, Y., Ikawa, T., and Katsura, Y. (2002). The common myelolymphoid progenitor: a key intermediate stage in hemopoiesis generating T and B cells. *J Immunol* *169*, 3519-3525.
- Lu, R., Medina, K. L., Lancki, D. W., and Singh, H. (2003). IRF-4,8 orchestrate the pre-B-to-B transition in lymphocyte development. *Genes Dev* *17*, 1703-1708.
- Lynch, C. N., Wang, Y. C., Lund, J. K., Chen, Y. W., Leal, J. A., and Wiley, S. R. (1999). TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem* *274*, 8455-8459.

M

- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R. T., and Springer, T. A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 9448-9453.
- Ma, Y., Liu, H., Tu-Rapp, H., Thiesen, H. J., Ibrahim, S. M., Cole, S. M., and Pope, R. M. (2004). Fas ligation on macrophages enhances IL-1R1-Toll-like receptor 4 signaling and promotes chronic inflammation. *Nat Immunol* *5*, 380-387.
- Macchi, P., Villa, A., Giliani, S., Sacco, M. G., Frattini, A., Porta, F., Ugazio, A. G., Johnston, J. A., Candotti, F., O'Shea, J. J., and et al. (1995). Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature* *377*, 65-68.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., and Alnemri, E. S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* *272*, 25417-25420.
- Manz, M. G., Miyamoto, T., Akashi, K., and Weissman, I. L. (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 11872-11877.

- Mariani, S. M., and Krammer, P. H. (1998a). Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur J Immunol* 28, 973-982.
- Mariani, S. M., and Krammer, P. H. (1998b). Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur J Immunol* 28, 1492-1498.
- Mariani, S. M., Matiba, B., Armandola, E. A., and Krammer, P. H. (1994). The APO-1/Fas (CD95) receptor is expressed in homozygous MRL/lpr mice. *Eur J Immunol* 24, 3119-3123.
- Marquez, C., Trigueros, C., Franco, J. M., Ramiro, A. R., Carrasco, Y. R., Lopez-Botet, M., and Toribio, M. L. (1998). Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood* 91, 2760-2771.
- Marshall, A. J., Niuro, H., Yun, T. J., and Clark, E. A. (2000). Regulation of B-cell activation and differentiation by the phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase Cgamma pathway. *Immunol Rev* 176, 30-46.
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Donahue, C. J., Pitti, R. M., Gray, C. L., Goddard, A. D., Bauer, K. D., and Ashkenazi, A. (1996). Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr Biol* 6, 1669-1676.
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Brush, J., Goddard, A., and Ashkenazi, A. (1998). Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr Biol* 8, 525-528.
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A. D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7, 1003-1006.
- McDevit, D. C., Perkins, L., Atchison, M. L., and Nikolajczyk, B. S. (2005). The Ig kappa 3' enhancer is activated by gradients of chromatin accessibility and protein association. *J Immunol* 174, 2834-2842.
- 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., *et al.* (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95, 3489-3497.
- McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Maki, R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J* 15, 5647-5658.
- Mebius, R. E., Miyamoto, T., Christensen, J., Domen, J., Cupedo, T., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2001). The fetal liver counterpart of adult common lymphoid progenitors gives rise to all lymphoid lineages, CD45+CD4+CD3- cells, as well as macrophages. *J Immunol* 166, 6593-6601.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Meffre, E., Milili, M., Blanco-Betancourt, C., Antunes, H., Nussenzweig, M. C., and Schiff, C. (2001). Immunoglobulin heavy chain expression shapes the B cell receptor repertoire in human B cell development. *J Clin Invest* 108, 879-886.
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., and Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 5, 503-507.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181-190.
- Migone, T. S., Zhang, J., Luo, X., Zhuang, L., Chen, C., Hu, B., Hong, J. S., Perry, J. W., Chen, S. F., Zhou, J. X., *et al.* (2002). TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity* 16, 479-492.
- Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M., and Busslinger, M. (2002). Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science* 297, 110-113.

Miller, J. S., and McCullar, V. (2001). Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* 98, 705-713.

Miller, R. L., Gerster, J. F., Owens, M. L., Slade, H. B., and Tomai, M. A. (1999). Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol* 21, 1-14.

Milne, C. D., and Paige, C. J. (2006). IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin Immunol* 18, 20-30.

Minegishi, Y., Coustan-Smith, E., Wang, Y. H., Cooper, M. D., Campana, D., and Conley, M. E. (1998). Mutations in the human lambda5/14.1 gene result in B cell deficiency and agammaglobulinemia. *J Exp Med* 187, 71-77.

Miyazawa, K., Williams, D. A., Gotoh, A., Nishimaki, J., Broxmeyer, H. E., and Toyama, K. (1995). Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood* 85, 641-649.

Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., and Dorshkind, K. (2001). Bipotential B-macrophage progenitors are present in adult bone marrow. *Nat Immunol* 2, 83-88.

Muller-Sieburg, C. E., Whitlock, C. A., and Weissman, I. L. (1986). Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1-lo hematopoietic stem cell. *Cell* 44, 653-662.

Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., *et al.* (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.

N

Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., and Miyake, K. (2002). Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3, 667-672.

Nagaoka, H., Takahashi, Y., Hayashi, R., Nakamura, T., Ishii, K., Matsuda, J., Ogura, A., Shirakata, Y., Karasuyama, H., Sudo, T., *et al.* (2000). Ras mediates effector pathways responsible for pre-B cell survival, which is essential for the developmental progression to the late pre-B cell stage. *J Exp Med* 192, 171-182.

Nagler, A., Lanier, L. L., Cwirla, S., and Phillips, J. H. (1989). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 143, 3183-3191.

Namikawa, R., Muench, M. O., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1996). The FLK2/FLT3 ligand synergizes with interleukin-7 in promoting stromal-cell-independent expansion and differentiation of human fetal pro-B cells in vitro. *Blood* 87, 1881-1890.

Nemazee, D., and Buerki, K. (1989). Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8039-8043.

Newton, K., Harris, A. W., Bath, M. L., Smith, K. G., and Strasser, A. (1998). A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *Embo J* 17, 706-718.

Newton, K., Harris, A. W., and Strasser, A. (2000). FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor. *Embo J* 19, 931-941.

Nichogiannopoulou, A., Trevisan, M., Neben, S., Friedrich, C., and Georgopoulos, K. (1999). Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med* 190, 1201-1214.

Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252-256.

Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H. M., Filipovich, A. H., Adelstein, S., Modi, W. S., McBride, O. W., and Leonard, W. J. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 73, 147-157.

Norvell, A., Mandik, L., and Monroe, J. G. (1995). Engagement of the antigen-receptor on immature murine B lymphocytes results in death by apoptosis. *J Immunol* 154, 4404-4413.

Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556-562.

Nutt, S. L., Metcalf, D., D'Amico, A., Polli, M., and Wu, L. (2005). Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med* 201, 221-231.

Nutt, S. L., Morrison, A. M., Dorfler, P., Rolink, A., and Busslinger, M. (1998). Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *Embo J* 17, 2319-2333.

O

O'Riordan, M., and Grosschedl, R. (1999). Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* 11, 21-31.

Orlinick, J. R., Vaishnav, A., Elkon, K. B., and Chao, M. V. (1997). Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand. *J Biol Chem* 272, 28889-28894.

Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., and Seya, T. (2003a). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4, 161-167.

Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M., and Seya, T. (2003b). TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 278, 49751-49762.

Owen-Schaub, L. B., Meterissian, S., and Ford, R. J. (1993). Fas/APO-1 expression and function on malignant cells of hematologic and nonhematologic origin. *J Immunother* 14, 234-241.

Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13766-13771.

P

Pan, G., Bauer, J. H., Haridas, V., Wang, S., Liu, D., Yu, G., Vincenz, C., Aggarwal, B. B., Ni, J., and Dixit, V. M. (1998a). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett* 431, 351-356.

Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R., and Dixit, V. M. (1997a). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815-818.

Pan, G., Ni, J., Yu, G., Wei, Y. F., and Dixit, V. M. (1998b). TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett* 424, 41-45.

Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1997b). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111-113.

Papayannopoulou, T., Craddock, C., Nakamoto, B., Priestley, G. V., and Wolf, N. S. (1995). The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9647-9651.

Park, D. R., Thomsen, A. R., Frevert, C. W., Pham, U., Skerrett, S. J., Kiener, P. A., and Liles, W. C. (2003). Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* *170*, 6209-6216.

Passegue, E., Wagers, A. J., Giuriato, S., Anderson, W. C., and Weissman, I. L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med* *202*, 1599-1611.

Pelanda, R., and Torres, R. M. (2006). Receptor editing for better or for worse. *Curr Opin Immunol* *18*, 184-190.
Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., *et al.* (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* *283*, 845-848.

Pellegrini, M., Bath, S., Marsden, V. S., Huang, D. C., Metcalf, D., Harris, A. W., and Strasser, A. (2005). FADD and caspase-8 are required for cytokine-induced proliferation of hemopoietic progenitor cells. *Blood* *106*, 1581-1589.

Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R. S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., *et al.* (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* *3*, 687-694.

Petzer, A. L., Zandstra, P. W., Piret, J. M., and Eaves, C. J. (1996). Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *J Exp Med* *183*, 2551-2558.

Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* *271*, 12687-12690.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* *282*, 2085-2088.

Porritt, H. E., Rumpf, L. L., Tabrizifard, S., Schmitt, T. M., Zuniga-Pflucker, J. C., and Petrie, H. T. (2004). Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity* *20*, 735-745.

Puel, A., Ziegler, S. F., Buckley, R. H., and Leonard, W. J. (1998). Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet* *20*, 394-397.

Pulendran, B., Banchereau, J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C., Caron, D., Maliszewski, C., Davoust, J., Fay, J., and Palucka, K. (2000). Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* *165*, 566-572.

Q

Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., and Malo, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* *189*, 615-625.

R

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* *10*, 547-558.

Raff, M. C., Megson, M., Owen, J. J., and Cooper, M. D. (1976). Early production of intracellular IgM by B-lymphocyte precursors in mouse. *Nature* *259*, 224-226.

Rafii, S., Mohle, R., Shapiro, F., Frey, B. M., and Moore, M. A. (1997). Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. *Leuk Lymphoma* *27*, 375-386.

- Rawlings, D. J., Quan, S., Hao, Q. L., Thiemann, F. T., Smogorzewska, M., Witte, O. N., and Crooks, G. M. (1997). Differentiation of human CD34+CD38- cord blood stem cells into B cell progenitors in vitro. *Exp Hematol* 25, 66-72.
- Res, P., Martinez-Caceres, E., Cristina Jaleco, A., Staal, F., Noteboom, E., Weijer, K., and Spits, H. (1996). CD34+CD38dim cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* 87, 5196-5206.
- Res, P. C., Couwenberg, F., Vyth-Dreese, F. A., and Spits, H. (1999). Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood* 94, 2647-2657.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I. L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423, 409-414.
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I. A., Debatin, K. M., Fischer, A., and de Villartay, J. P. (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-1349.
- Rissoan, M. C., Duhon, T., Bridon, J. M., Bendriss-Vermare, N., Peronne, C., de Saint Vis, B., Briere, F., and Bates, E. E. (2002). Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 100, 3295-3303.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., and Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 588-593.
- Roifman, C. M. (2005). Studies of patients' thymic aid in the discovery and characterization of immunodeficiency in humans. *Immunol Rev* 203, 143-155.
- Rolink, A. G., Nutt, S. L., Melchers, F., and Busslinger, M. (1999). Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* 401, 603-606.
- Rossi, M. I., Yokota, T., Medina, K. L., Garrett, K. P., Comp, P. C., Schipul, A. H., Jr., and Kincade, P. W. (2003). B lymphopoiesis is active throughout human life, but there are developmental age-related changes. *Blood* 101, 576-584.
- Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., *et al.* (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3, 619-625.
- Russell, S. M., Tayebi, N., Nakajima, H., Riedy, M. C., Roberts, J. L., Aman, M. J., Migone, T. S., Noguchi, M., Markert, M. L., Buckley, R. H., *et al.* (1995). Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* 270, 797-800.

S

- Saas, P., Boucraut, J., Walker, P. R., Quiquerez, A. L., Billot, M., Desplat-Jego, S., Chicheportiche, Y., and Dietrich, P. Y. (2000). TWEAK stimulation of astrocytes and the proinflammatory consequences. *Glia* 32, 102-107.
- Sakamaki, K., Inoue, T., Asano, M., Sudo, K., Kazama, H., Sakagami, J., Sakata, S., Ozaki, M., Nakamura, S., Toyokuni, S., *et al.* (2002). Ex vivo whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart. *Cell Death Differ* 9, 1196-1206.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.
- Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P. Y., Berry, D. M., Tambllyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., *et al.* (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev* 17, 883-895.

- Sanchez, M. J., Muench, M. O., Roncarolo, M. G., Lanier, L. L., and Phillips, J. H. (1994). Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med* *180*, 569-576.
- Scaffidi, C., Volkland, J., Blomberg, I., Hoffmann, I., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (2000). Phosphorylation of FADD/ MORT1 at serine 194 and association with a 70-kDa cell cycle-regulated protein kinase. *J Immunol* *164*, 1236-1242.
- Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., Wong, G. H., Gatanaga, T., Granger, G. A., Lentz, R., Raab, H., and et al. (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* *61*, 361-370.
- Schaniel, C., Bruno, L., Melchers, F., and Rolink, A. G. (2002). Multiple hematopoietic cell lineages develop in vivo from transplanted Pax5-deficient pre-B I-cell clones. *Blood* *99*, 472-478.
- Schebesta, M., Pfeffer, P. L., and Busslinger, M. (2002). Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene. *Immunity* *17*, 473-485.
- Schneider, E., Moreau, G., Arnould, A., Vasseur, F., Khodabaccus, N., Dy, M., and Ezine, S. (1999). Increased fetal and extramedullary hematopoiesis in Fas-deficient C57BL/6-lpr/lpr mice. *Blood* *94*, 2613-2621.
- Schneider, P., Bodmer, J. L., Thome, M., Hofmann, K., Holler, N., and Tschopp, J. (1997). Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* *416*, 329-334.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* *4*, 7-25.
- Schotte, R., Nagasawa, M., Weijer, K., Spits, H., and Blom, B. (2004). The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J Exp Med* *200*, 1503-1509.
- Schotte, R., Rissoan, M. C., Bendriss-Vermare, N., Bridon, J. M., Duhon, T., Weijer, K., Briere, F., and Spits, H. (2003). The transcription factor Spi-B is expressed in plasmacytoid DC precursors and inhibits T-, B-, and NK-cell development. *Blood* *101*, 1015-1023.
- Schwarz, B. A., and Bhandoola, A. (2004). Circulating hematopoietic progenitors with T lineage potential. *Nat Immunol* *5*, 953-960.
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* *265*, 1573-1577.
- Screaton, G. R., Mongkolsapaya, J., Xu, X. N., Cowper, A. E., McMichael, A. J., and Bell, J. I. (1997a). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol* *7*, 693-696.
- Screaton, G. R., Xu, X. N., Olsen, A. L., Cowper, A. E., Tan, R., McMichael, A. J., and Bell, J. I. (1997b). LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 4615-4619.
- Shaffer, A. L., and Schlissel, M. S. (1997). A truncated heavy chain protein relieves the requirement for surrogate light chains in early B cell development. *J Immunol* *159*, 1265-1275.
- Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G. P., Lin, R., and Hiscott, J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* *300*, 1148-1151.
- Shaw, A. C., Swat, W., Davidson, L., and Alt, F. W. (1999). Induction of Ig light chain gene rearrangement in heavy chain-deficient B cells by activated Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2239-2243.
- Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. L., et al. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* *277*, 818-821.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* *189*, 1777-1782.

- Shinohara, H., Yagita, H., Ikawa, Y., and Oyaizu, N. (2000). Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res* 60, 1766-1772.
- Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., and Lenardo, M. J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357.
- Sigvardsson, M. (2000). Overlapping expression of early B-cell factor and basic helix-loop-helix proteins as a mechanism to dictate B-lineage-specific activity of the lambda5 promoter. *Mol Cell Biol* 20, 3640-3654.
- Sigvardsson, M., Clark, D. R., Fitzsimmons, D., Doyle, M., Akerblad, P., Breslin, T., Bilke, S., Li, R., Yeaman, C., Zhang, G., and Hagman, J. (2002). Early B-cell factor, E2A, and Pax-5 cooperate to activate the early B cell-specific mb-1 promoter. *Mol Cell Biol* 22, 8539-8551.
- Sigvardsson, M., O'Riordan, M., and Grosschedl, R. (1997). EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes. *Immunity* 7, 25-36.
- Singer, G. G., Carrera, A. C., Marshak-Rothstein, A., Martinez, C., and Abbas, A. K. (1994). Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. *Curr Opin Immunol* 6, 913-920.
- Sioud, M., Floisand, Y., Forfang, L., and Lund-Johansen, F. (2006). Signaling through Toll-like Receptor 7/8 Induces the Differentiation of Human Bone Marrow CD34+ Progenitor Cells along the Myeloid Lineage. *J Mol Biol*.
- Sivori, S., Falco, M., Marcenaro, E., Parolini, S., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (2002). Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4526-4531.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T., and Aderem, A. (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 4, 1247-1253.
- Solanilla, A., Grosset, C., Duchez, P., Legembre, P., Pitard, V., Dupouy, M., Belloc, F., Viallard, J. F., Reiffers, J., Boiron, J. M., *et al.* (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, 782-786.
- Sordet, O., Rebe, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E., and Dubrez-Daloz, L. (2002). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* 100, 4446-4453.
- Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M., and Busslinger, M. (2002). Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17, 781-793.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S., and Weissman, I. L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62.
- Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A. Q., Weijer, K., and Uittenbogaart, C. H. (2000). Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 192, 1775-1784.
- Sponcer, E., Heyworth, C. M., Dunn, A., and Dexter, T. M. (1986). Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation* 31, 111-118.
- Stanger, B. Z., Leder, P., Lee, T. H., Kim, E., and Seed, B. (1995). RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81, 513-523.
- Strunk, D., Egger, C., Leitner, G., Hanau, D., and Stingl, G. (1997). A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* 185, 1131-1136.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.

T

- Taichman, R. S. (2005). Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* *105*, 2631-2639.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* *13*, 933-940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* *169*, 10-14.
- Tamura, T., Mancini, A., Joos, H., Koch, A., Hakim, C., Dumanski, J., Weidner, K. M., and Niemann, H. (1999). FMIP, a novel Fms-interacting protein, affects granulocyte/macrophage differentiation. *Oncogene* *18*, 6488-6495.
- Tartaglia, L. A., Rothe, M., Hu, Y. F., and Goeddel, D. V. (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* *73*, 213-216.
- Taussig, D. C., Pearce, D. J., Simpson, C., Rohatiner, A. Z., Lister, T. A., Kelly, G., Luongo, J. L., Danet-Desnoyers, G. A., and Bonnet, D. (2005). Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood* *106*, 4086-4092.
- Terstappen, L. W., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P. M., and Loken, M. R. (1991). Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* *77*, 1218-1227.
- Terstappen, L. W., Safford, M., and Loken, M. R. (1990). Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia* *4*, 657-663.
- Till, J. E., and Mc, C. E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* *14*, 213-222.
- Ting, C. N., Olson, M. C., Barton, K. P., and Leiden, J. M. (1996). Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* *384*, 474-478.
- Tobias, P. S., Soldau, K., Gegner, J. A., Mintz, D., and Ulevitch, R. J. (1995). Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem* *270*, 10482-10488.
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B. I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* *20*, 707-718.
- Tokunaga, T., Yamamoto, T., and Yamamoto, S. (1999). How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn J Infect Dis* *52*, 1-11.
- Tsang, A. P., Fujiwara, Y., Hom, D. B., and Orkin, S. H. (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev* *12*, 1176-1188.

U

- Ueda, Y., Kondo, M., and Kelsoe, G. (2005). Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med* *201*, 1771-1780.
- Ueda, Y., Yang, K., Foster, S. J., Kondo, M., and Kelsoe, G. (2004). Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med* *199*, 47-58.
- Urbanek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F., and Busslinger, M. (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* *79*, 901-912.

V

Vandenabeele, P., Declercq, W., Vanhaesebroeck, B., Grooten, J., and Fiers, W. (1995). Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J Immunol* *154*, 2904-2913.

Varfolomeev, E. E., and Ashkenazi, A. (2004). Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* *116*, 491-497.

Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., *et al.* (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* *9*, 267-276.

Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W. S., and Bernstein, I. D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med* *6*, 1278-1281.

Verfaillie, C., Blakolmer, K., and McGlave, P. (1990). Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J Exp Med* *172*, 509-502.

Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D. W., Katavic, V., Lorenzo, J., and Aguila, H. L. (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* *103*, 3258-3264.

von Boehmer, H., and Fehling, H. J. (1997). Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol* *15*, 433-452.

W

Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., *et al.* (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J* *16*, 5386-5397.

Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C. R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D., and *et al.* (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* *78*, 343-352.

Walsh, C. M., Wen, B. G., Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Dixit, V. M., and Hedrick, S. M. (1998). A role for FADD in T cell activation and development. *Immunity* *8*, 439-449.

Wang, J., Chun, H. J., Wong, W., Spencer, D. M., and Lenardo, M. J. (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 13884-13888.

Wang, Y. H., Nomura, J., Faye-Petersen, O. M., and Cooper, M. D. (1998). Surrogate light chain production during B cell differentiation: differential intracellular versus cell surface expression. *J Immunol* *161*, 1132-1139.

Weerkamp, F., Baert, M. R., Brugman, M. H., Dik, W. A., de Haas, E. F., Visser, T. P., de Groot, C. J., Wagemaker, G., van Dongen, J. J., and Staal, F. J. (2006). Human thymus contains multipotent progenitors with T/B lymphoid, myeloid, and erythroid lineage potential. *Blood* *107*, 3131-3137.

Weijer, K., Uittenbogaart, C. H., Voordouw, A., Couwenberg, F., Seppen, J., Blom, B., Vyth-Dreese, F. A., and Spits, H. (2002). Intrathymic and extrathymic development of human plasmacytoid dendritic cell precursors in vivo. *Blood* *99*, 2752-2759.

Werner, S. L., Barken, D., and Hoffmann, A. (2005). Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. *Science* *309*, 1857-1861.

Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., and Cao, Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* *7*, 837-847.

Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., and et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.

Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, J. R., 3rd, and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.

Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431-1433.

Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., et al. (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* 17, 141-143.

X

Xie, T., and Spradling, A. C. (2000). A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* 290, 328-330.

Y

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., et al. (2002a). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324-329.

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2002b). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169, 6668-6672.

Yamanaka, R., Kim, G. D., Radomska, H. S., Lekstrom-Himes, J., Smith, L. T., Antonson, P., Tenen, D. G., and Xanthopoulos, K. G. (1997). CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6462-6467.

Yeh, W. C., Itie, A., Elia, A. J., Ng, M., Shu, H. B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D. V., and Mak, T. W. (2000). Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 12, 633-642.

Yeh, W. C., Pompa, J. L., McCurrach, M. E., Shu, H. B., Elia, A. J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., et al. (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279, 1954-1958.

Yel, L., Minegishi, Y., Coustan-Smith, E., Buckley, R. H., Trubel, H., Pachman, L. M., Kitchingman, G. R., Campana, D., Rohrer, J., and Conley, M. E. (1996). Mutations in the mu heavy-chain gene in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med* 335, 1486-1493.

Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E., and Fujita, T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *Embo J* 17, 1087-1095.

Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R., and Golenbock, D. (1999). Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163, 1-5.

Youn, H. S., Lee, J. Y., Fitzgerald, K. A., Young, H. A., Akira, S., and Hwang, D. H. (2005). Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J Immunol* *175*, 3339-3346.

Z

Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E., and Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med* *193*, 247-254.

Zhang, D. E., Zhang, P., Wang, N. D., Hetherington, C. J., Darlington, G. J., and Tenen, D. G. (1997). Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 569-574.

Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H., and Winoto, A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* *392*, 296-300.

Zhang, J., Grindley, J. C., Yin, T., Jayasinghe, S., He, X. C., Ross, J. T., Haug, J. S., Rupp, D., Porter-Westpfahl, K. S., Wiedemann, L. M., *et al.* (2006a). PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* *441*, 518-522.

Zhang, J., Kabra, N. H., Cado, D., Kang, C., and Winoto, A. (2001). FADD-deficient T cells exhibit a disaccord in regulation of the cell cycle machinery. *J Biol Chem* *276*, 29815-29818.

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., *et al.* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* *425*, 836-841.

Zhang, J., and Winoto, A. (1996). A mouse Fas-associated protein with homology to the human Mort1/FADD protein is essential for Fas-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* *16*, 2756-2763.

Zhang, N., and He, Y. W. (2005). An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes. *J Exp Med* *202*, 395-404.

Zhang, Z., Espinoza, C. R., Yu, Z., Stephan, R., He, T., Williams, G. S., Burrows, P. D., Hagman, J., Feeney, A. J., and Cooper, M. D. (2006b). Transcription factor Pax5 (BSAP) transactivates the RAG-mediated V(H)-to-DJ(H) rearrangement of immunoglobulin genes. *Nat Immunol* *7*, 616-624.

Zhuang, Y., Cheng, P., and Weintraub, H. (1996). B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol Cell Biol* *16*, 2898-2905.

Zornig, M., Hueber, A. O., and Evan, G. (1998). p53-dependent impairment of T-cell proliferation in FADD dominant-negative transgenic mice. *Curr Biol* *8*, 467-470.

The Endoplasmic Reticulum Is a Key Component of the Plasma Cell Death Pathway¹

Nadège Pelletier,* Montserrat Casamayor-Pallejà,* Karelle De Luca,* Paul Mondière,* Frédéric Saltel,† Pierre Jurdic,† Chantal Bella,‡ Laurent Genestier,* and Thierry DeFrance^{2*}

Plasma cells (PC) are the effector cells of the humoral Ab response. Unlike other dedicated secretory cells, they exist as two populations with opposite cell fates: short-lived and long-lived PC. Upon transformation they lead to an incurable neoplasia called multiple myeloma. In this study we have explored the molecular mechanism of PC death. Our data show that their apoptotic pathway is unique among other hemopoietic cells inasmuch as neither the death receptors nor the mitochondria play the central role. PC apoptosis is initiated by activation of Bax at the endoplasmic reticulum membrane and subsequent activation of the endoplasmic reticulum-associated caspase-4 before the release of mitochondrial apoptogenic factors. Together, our observations indicate that the cardinal function of PC (i.e., Ig secretion) is also the cause of their death. *The Journal of Immunology*, 2006, 176: 1340–1347.

To fulfill their function of effectors of the humoral Ab response, plasma cells (PC)³ are equipped for the production of massive quantities of Igs. Accordingly, they share the morphological and functional attributes of dedicated secretory cells, including expansion of their endoplasmic reticulum (ER) and Golgi networks. However, PC are unique among other professional secretory cells inasmuch as the ER is also instrumental in their differentiation. As recently demonstrated by the groups of Glimcher and Brewer (1, 2), production of the spliced active form of the XBP-1 mRNA, a transcription factor essential for PC commitment, requires a multimolecular system called the unfolded protein response (UPR) that operates in the ER. The UPR is activated when correct folding of proteins is compromised. It elicits several biological responses that concur in restoring the equilibrium between the rate of protein synthesis and the folding capacity of the ER (3). It was long believed that PC, unlike most other professional secretory cells, are short-lived. However, this dogma has been challenged by two seminal studies demonstrating that some PC escape deletion and form a compartment of long-lived

PC in the bone marrow (BM) that constitutes one of the cellular components of B cell memory (4, 5). The possibility of manipulating PC survival is thus an important issue for therapeutic purposes. The present study was undertaken to dissect the apoptotic pathway used by PC.

There are two main routes to cellular apoptosis, designated the intrinsic and the extrinsic pathway (see Ref. 6 for a review). The intrinsic pathway is initiated by internal or external stress signals that lead to the translocation and/or activation of proapoptotic members of the Bcl-2 family (Bax and Bak) to the mitochondria. Their insertion in the outer mitochondrial membrane promotes its permeabilization and ultimately induces the release of mitochondrial apoptogenic factors such as cytochrome *c* (cyt *c*) or apoptosis-inducing factor (AIF), in the cytosol. Cyt *c* together with the adaptor protein Apaf-1 and the initiator caspase-9 form a multimolecular signaling platform called the apoptosome, which initiates caspase activation downstream of the mitochondria (7). Work over the past 5 years has revealed that, in fact, many cellular organelles can sense stress signals and trigger apoptotic mediators (8). The ER, for example, can activate its own initiator caspase (caspase-4 in humans, caspase-12 in the mice) (9, 10). Cell death induced by the intrinsic pathway is prevented by overexpression of the antiapoptotic members of the Bcl-2 family. The extrinsic pathway involves the death receptor (DR) family, whose prototypic member is the CD95 (Fas, APO-1) molecule. Upon oligomerization, these receptors bind an adaptor molecule (Fas-associated death domain protein) that, in turn, recruits the proenzymatic form of an initiator caspase (caspase-8 or -10). The oligomerized receptors, Fas-associated death domain protein, and procaspase-8/10 form a multimolecular signaling complex called death-inducing signaling complex that promotes autolytic cleavage of caspase-8/10 and initiation of the apoptotic cascade (11). Alterations of the mitochondrial functions also occur during the extrinsic pathway, but they play an ancillary role in execution of the death program.

In this study we show that spontaneous PC apoptosis is initiated by signals that emanate from the ER. This conclusion is based upon three lines of evidence. First, Bax is primarily activated at the ER, not at the mitochondria membrane, during PC apoptosis. Second, PC death relies neither on caspase-8 nor caspase-9, but involves the ER-associated initiator caspase-4. Third, activation of

*IFR128, Biosciences Lyon-Gerland, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 404 Lyon, France; †Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 5161 Centre National de la Recherche Scientifique-Ecole Normale Supérieure Lyon-Institut National de la Recherche Agronomique, Lyon, France; and ‡Service Commun de Cytométrie en Flux, Lyon, France

Received for publication August 9, 2005. Accepted for publication November 2, 2005.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer (Grant 5641), the National and Regional (Drôme, Ardèche, Rhône) Committees of La Ligue Contre le Cancer, and La Fondation de France. N.P. was the recipient of doctoral fellowships from the French Ministry of National Education and Research and La Ligue Nationale Contre le Cancer.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Thierry DeFrance, IFR128, Biosciences Lyon-Gerland, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 404, 21 avenue Tony Garnier, 69365 Lyon, France. E-mail address: defrance@cervi-lyon.inserm.fr

³ Abbreviations used in this paper: PC, plasma cell; BM, bone marrow; AIF, apoptosis-inducing factor; Cox, cytochrome oxidase; Cy5, cyanine 5; cyt *c*, cytochrome *c*; DiOC₆, 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide; DR, death receptor; $\Delta\psi_m$, mitochondrial transmembrane potential; ER, endoplasmic reticulum; fmk, fluoromethylketone; GC, germinal center; PDI, protein disulfide isomerase; UPR, unfolded protein response.

caspace-4 is an early event that precedes the release of cyt *c* and AIF in the cytosol. Together, our findings suggest that spontaneous PC death involves a unique apoptotic program in which intrinsic ER stress, possibly caused by the accumulation of misfolded Ig proteins, plays the primary role. Thus, the ER governs not only the differentiation and secretory potential of PC, but also their survival.

Materials and Methods

Antibodies

Abs for phenotyping studies. PE-coupled anti-human CD38 and CD27 mAbs, FITC-coupled anti-human CD20 mAb, allophycocyanin-coupled rat anti-mouse B220, and PE-coupled rat anti-mouse CD138 mAbs were purchased from BD Pharmingen. The biotinylated anti-human CD38 mAb used for the phenotypical analysis of tonsillar PC by triple immunofluorescence stainings was obtained from The Binding Site. It was revealed with PE-cyanine 5 (Cy5)-conjugated streptavidin from Caltag Laboratories. The PE-coupled anti-human CD138, CD79a, and CD79b mAbs were purchased from Immunotech. The FITC-coupled goat anti-human Ig- κ and donkey anti-human Ig- λ L chain Abs were obtained from Kallestad. The uncoupled anti-CD95 mAb APO-1 (12) was provided by Dr. P. Kramer (German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany). CD95 labeling was revealed with PE-conjugated goat anti-mouse IgG3 Abs from Southern Biotechnology Associates. The anti-TRAIL-R1/DR4 (M270) and TRAIL-R2/DR5 (M412) mAbs were provided by Dr. R. Armitage (Amgen, Seattle, WA) and were biotinylated before use. They were revealed with PE-Cy5-coupled streptavidin. The PE-coupled anti-human TNFRI mAb was purchased from R&D Systems. A rabbit anti-Bax polyclonal Ab raised against aa 1–21 of human Bax (Bax-NT) was purchased from Upstate Biotechnology. This Ab was used to reveal the activated form of Bax by photonic, confocal, and electron microscopies, as described previously (13). A non-immune rabbit serum from Vector Laboratories was used as a negative staining control. Bax and its control Ab were revealed with 1) a biotinylated goat anti-rabbit Ab (Immunotech), followed by sequential incubation with HRP-coupled extravidin (Sigma-Aldrich) and 3-amino-9-ethylcarbazole, for immunoenzymatic stainings; 2) FITC-coupled goat anti-rabbit Abs (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for immunofluorescence stainings; and 3) goat anti-rabbit IgG conjugated to gold particles (TEBU) for immunoelectron microscopy. The anti-human cytochrome oxidase (Cox) mAb was purchased from BD Pharmingen and was revealed with Cy5-coupled anti-mouse Abs from Jackson ImmunoResearch Laboratories. The anti-human protein disulfide isomerase (PDI) mAb used for confocal microscopy and the goat anti-mouse Abs conjugated to AlexaFluor 488 used for its revelation were both purchased from Molecular Probes.

Abs for B cell and PC purification. The anti-human CD2, CD20, and CD44 mAbs were purchased from Immunotech. The anti-human HLA-DQ mAb was obtained from BD Pharmingen. The anti-human CD16 and CD56 mAbs were purchased from DakoCytomation. The anti-CD3 and CD8 (OKT3 and OKT8) mAbs were obtained from American Type Culture Collection (ATCC). The anti-human IgD mAb was purchased from The Binding Site.

Abs for Western blotting. Revelation of the zymogen form and the cleavage products of caspases was performed with the following Abs: mouse anti-human caspase-8 C15 mAb (provided by Dr. P. Kramer), goat anti-human caspase-3 Abs (R&D Systems), and mouse anti-human caspase-4 mAb (MBL). Rabbit anti-human DR3 and DR6 Abs were purchased from Upstate Biotechnology and ProSci, respectively. Mouse anti- β -actin mAb was obtained from Sigma-Aldrich. Rat anti-grp94 was from StressGen Biotechnologies. A biotinylated goat anti-rat Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories) was used as the secondary Ab for the anti-Grp 94 mAb. Rabbit anti-human AIF and mouse anti-human cyt *c* Abs were obtained from BD Pharmingen. The immunoblots were revealed with the following HRP conjugates: 1) streptavidin, donkey anti-rabbit or sheep anti-mouse Abs (Amersham Biosciences), and 2) donkey anti-goat Abs (Santa Cruz Biotechnology).

Abs for functional studies. A PE-coupled rabbit anti-caspase-3 Ab (BD Pharmingen) specifically recognizing the active cleavage product of caspase-3 was used for revelation of the enzymatically active form of caspase-3 by flow cytometry. The agonistic anti-CD95 IgM mAb 7C11 used to induce apoptosis in cultures was purchased from Immunotech. Purified mouse IgM myeloma proteins used as negative controls were obtained from Sigma-Aldrich. Both Abs were used at 1 μ g/ml.

Reagents

The soluble recombinant human FLAG-CD95-ligand (CD178; Alexis) was used at 50 ng/ml together with the anti-FLAG mAb M2 (Sigma-Aldrich) at 1 μ g/ml. The soluble trimerized form of TL1A (R&D Systems) was used at 0.5 μ g/ml. Soluble chimeric forms of CD95, DR3, and TNFRI in which the extracellular domain of each receptor has been fused with the Fc portion of human IgG1 were used to prevent binding of the corresponding death ligands to their cellular receptors. CD95-Fc and DR3-Fc were purchased from Alexis and were used at 10 and 5 μ g/ml, respectively. TNFRI-Fc was provided by Dr. H. Waldmann (University of Oxford, Oxford, U.K.) and was used at 20 μ g/ml. The caspase inhibitors were purchased from the following manufacturers: Bachem for z-VAD-fluoromethylketone (fmk); Calbiochem for z-IETD-fmk, z-LEHD-fmk, and z-DEVD-fmk; and MBL for z-LEVD-fmk. They were used at the concentrations indicated in the text. To estimate the efficiency and specificity of the caspase-8 and caspase-9 inhibitors, both antagonistic peptides were tested at optimal concentration for their capacity to inhibit DNA fragmentation in PHA-activated PBL recultured with staurosporine (inducer of the intrinsic mitochondrial pathway) or the anti-CD95 mAb 7C11 (inducer of the extrinsic pathway). z-LEHD-fmk was found to be effective on staurosporine-induced apoptosis, but not on anti-CD95-induced apoptosis, whereas z-IETD-fmk displayed the opposite pattern of inhibitory effect (data not shown). IL-2 was purchased from PeproTech, and IL-10 was provided by Dr. F. Brière (Schering-Plough, Dardilly, France). They were used at 10 U/ml and 50 ng/ml, respectively, throughout the study. Staurosporine (1 μ M), used as an inducer of the mitochondrial intrinsic apoptotic pathway, was purchased from Sigma-Aldrich.

Cells

Tonsillar germinal center (GC) B cells were isolated as described previously (14). PC were generated in vitro from purified GC B cells using a modification of the two-step culture system initially described by Arpin et al. (15). In the first culture, GC B cells are stimulated for 3 days with mouse Ltk⁻ cells stably transfected with CD154 in the presence of IL-2 and IL-10. Viable B cell blasts are next recultured for 3 additional days in the presence of IL-2, IL-10, and the anti-CD154 mAb LL2 (provided by Dr. P. Garonne, Schering-Plough, Dardilly, France) to block residual CD154 activity. At the end of the secondary culture, PC were purified by immunomagnetic negative selection using an Ab mixture including anti-CD2, CD20, DQ, CD16, CD56, CD3, and CD8 mAbs. To generate polyclonal mouse PC, C57BL/6 mice were immunized i.p. with SRBC (5×10^8 SRBC/mouse). Splenocytes recovered 6 days after immunization were double stained with PE-conjugated anti-CD138 and allophycocyanin-conjugated anti-B220 rat mAbs. Splenic PC were sorted by gating the CD138^{high}B220^{low} cells. The purity of the sorted murine PC was 99% on the average. Protein extracts prepared from human myeloma cell lines IM9 and U266 (ATCC) and PBL activated for 4 days with PHA and IL-2 were used as controls for Western blotting.

Cultures

All human cell cultures were performed in Iscove's medium enriched with 50 μ g/ml human transferrin, 5 μ g/ml bovine insulin (all from Sigma-Aldrich), 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ M streptomycin, and 2% HEPES (all from Invitrogen Life Technologies). All mouse cell cultures were performed in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ M streptomycin, 2% HEPES, and freshly added β -ME (50 mM). For measurement of apoptosis parameters, PC were dispensed at 1×10^5 cells/well in round-bottom, 96-well microtiter plates at a final culture volume of 0.1 ml.

Measurement of apoptosis

The potential sensitive fluorescent dye 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆; Molecular Probes) was used to reveal disruption of the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi$ m). Phosphatidylserine exposure was quantified by surface binding of annexin V according to the instructions of the manufacturer (Bender MedSystems). DNA fragmentation was assessed by TUNEL assay, using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche). The CaspACE assay system (Promega) was used to determine the global status of cellular caspases activation by flow cytometry.

Microscopy

For the immunoenzymatic and immunofluorescence stainings of Bax, cyt *c*, Cox, or PDI, PC were fixed in paraformaldehyde 4% for 15 min at room temperature, permeabilized with 0.2% Triton X-100, then processed for immunostaining. Immunofluorescence stainings were observed under an

LSM 510 laser scanning confocal microscope (Zeiss), and images were processed with Adobe Photoshop software 6.0. Preparation of the cell samples and their analysis by transmission and immunoelectron microscopies were conducted as described previously (16).

RNA and protein analysis

Expression of the DR family transcripts was measured by multiprobe RNase protection assay using the RiboQuant kit (BD Pharmingen) following the instructions of the manufacturer. The quantity of protected RNAs was determined using a PhosphorImager and ImageQuant software (both from Molecular Dynamics). For Western blot analysis, total protein extracts were prepared as described previously (14). Cytosolic fractions of PC were generated using a digitonin-based subcellular fractionation technique as described previously (17).

Results

Spontaneous death of PC can be assimilated to apoptosis

To circumvent the difficulty caused by the poor representation of PC in lymphoid tissues, we generated PC *in vitro* from human tonsillar B lymphocytes using a previously described two-step culture system (15). *In vitro*-generated PC display the major phenotypical features of *ex vivo* PC, as revealed by their strong expression of CD38, CD27, and CD138 (syndecan-1) and down-regulation of CD20, surface Igs, and the CD79a/CD79b heterodimer (Fig. 1A). They also exhibit the expected morphology and cardinal function of PC, i.e., the capacity to spontaneously secrete large amounts of Igs as determined by dual ELISA/ELISPOT assays (data not shown).

As shown in Fig. 1B, spontaneous PC death is accompanied by membrane, mitochondrial, and nuclear damage as well as caspase activation. By 48 h of culture, >90% of PC are dead according to any of these four criteria. By electron microscopy (Fig. 1C), *in vitro*-generated PC display the classical morphological features of bona fide PC: abundant cytoplasm and enlarged reticulum cisternae. Some of them even present the morphological characteristics of Mott cells, with multiple vesicles (Russel bodies) filled with stored Igs. PC undergoing spontaneous cell death present some of the typical features of apoptosis, such as condensation of chromatin to the periphery of the nucleus, piknotic nuclear fragmentation, and cell shrinkage, but preservation of plasma membrane integrity. They also exhibit a dramatic microvesiculation and reorganization of the ER/Golgi network. Together, these findings suggest that spontaneous PC death can be regarded as apoptosis.

DRs are not involved in spontaneous PC apoptosis

To explore the contribution of the extrinsic apoptosis pathway to PC death, we first compared tonsillar B cells with *in vitro*-generated PC for the expression of several transcripts encoding receptors, ligands, or signaling molecules associated with the DR pathway. As illustrated in Fig. 2A, three transcripts are up-regulated in PC: caspase-8, CD178 (CD95 ligand), and DR3 mRNAs. Expression of the CD178 transcript was also found in sorted *ex vivo* tonsillar PC by RT-PCR (data not shown). Expression of TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNFRI, and CD95 proteins was next analyzed by flow cytometry on *ex vivo* tonsillar PC and *in vitro*-generated PC. Both PC populations display a similar staining pattern, characterized by a high density of CD95 expression and virtually no expression of the other three DR (Fig. 2B). Due to the unavailability of Abs suitable for immunofluorescence staining, immunoblotting was used to compare the expression of DR3 and DR6 in tonsillar B lymphocytes and *in vitro*-generated PC (Fig. 2C). DR6 is expressed in neither of these populations, but DR3 protein is clearly up-regulated (~9-fold according to densitometry scanning of the bands) in PC compared with tonsillar B lymphocytes. Together, these findings indicate that PC express two of the six known DR: CD95 and DR3.

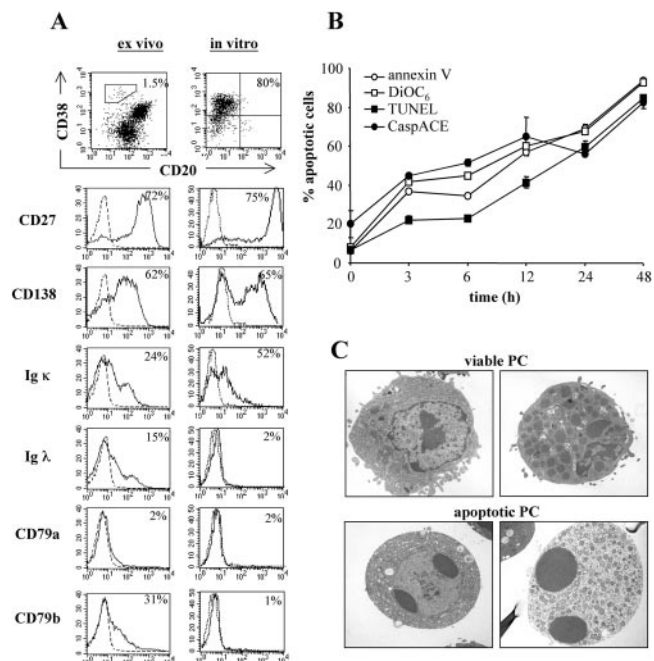


FIGURE 1. *In vitro*-generated PC exhibit the phenotypical features of *ex vivo* PC and die by apoptosis. **A**, Phenotypic analysis. Triple immunofluorescence stainings were used to examine the phenotype of *ex vivo* tonsillar PC after gating on the CD20^{low}CD38^{high} cells (upper left dot plot). The dotted histogram lines correspond to the stainings performed with irrelevant isotype-matched Abs. Numbers besides the staining profiles indicate the average percentages of positive cells for the marker considered (histograms) and the percentages of CD20^{low}CD38^{high} PC (upper two panels). **B**, Time kinetics of PC spontaneous apoptosis. Four apoptosis parameters were estimated in cultured human PC at the indicated time points. The mitochondrial, membrane, and nuclear alterations were revealed by the DiOC₆ dye, annexin V staining, and TUNEL assay, respectively. Caspase activation was monitored by the CaspACE assay. Results are presented as the mean ± SD percentages of apoptotic cells calculated from duplicate determinations. **C**, Morphological analysis by electron transmission microscopy. Upper left panel, Freshly isolated PC with its enlarged reticulum cisternae. Upper right panel, Mott cell-like PC. Lower left panel, Early apoptotic PC characterized by its rounded morphology, condensation, and margination of chromatin apoptotic PC. Lower right panel, Late apoptotic PC characterized by disappearance of the nuclear membrane, nuclear fragmentation, and extensive reorganization of the ER cisternae in microvesicles.

To address the possible contribution of endogenously produced CD95 or DR3 ligands to PC death, we tested the impact of soluble DR3 and CD95-Fc fusion proteins on spontaneous apoptosis of PC *in vitro*. The TNFRI-Fc fusion protein was used as a negative control in these experiments. As shown in Fig. 2D, none of the three DR-Fc fusion proteins tested was able to prevent spontaneous disruption of the mitochondrial transmembrane potential in cultured PC. The combination of DR3-Fc and CD95-Fc equally failed to protect PC from spontaneous apoptosis (data not shown). To check the functionality of the soluble chimeric CD95 and DR3-Fc proteins, we also analyzed their capacity to inhibit PC apoptosis induced by their respective soluble trimeric ligands. Fig. 2D shows that both CD178 and TL1A, the ligand of DR3 (18), raised the proportion of apoptotic PC above the level of spontaneous apoptosis. PC death promoted by CD178 and TL1A was selectively blocked upon addition of their corresponding DR-Fc fusion protein, whereas the TNFRI-Fc repressed neither spontaneous nor death ligand-induced PC apoptosis. This demonstrates that 1) both DR3-Fc and CD95-Fc efficiently prevent binding of

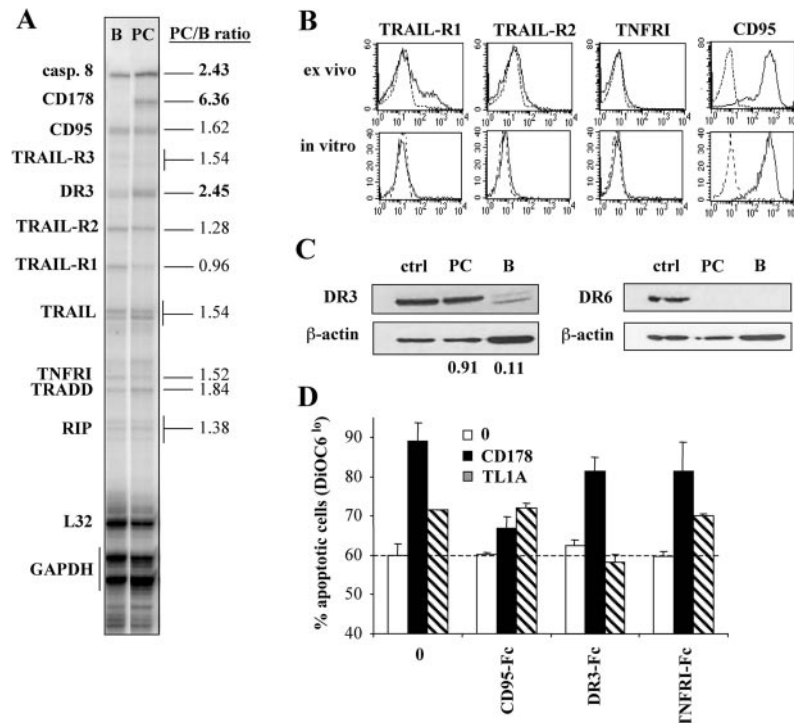


FIGURE 2. CD95 and DR3 are expressed and are functional on PC. *A*, Comparative analysis in tonsillar B cells and in vitro-generated PC of the transcripts encoding DR and DR signaling molecules by RNase protection assay. The relative quantity of protected RNA (Q) was calculated as the ratio between the signal intensity of the transcript of interest and that of the housekeeping gene transcript L32. The differential expression of a given transcript in PC and B cells was estimated by the ratio Q_{PC}/Q_B (values indicated on the right of the figure). *B*, Comparison of the surface expression of TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNFRI, and CD95 on ex vivo tonsillar PC (upper panel) and in vitro-generated PC (lower panel). The distribution of the four DR on ex vivo PC was analyzed by triple immunofluorescence staining as described in Fig. 1. The dotted histogram lines correspond to the stainings performed with irrelevant isotype-matched Abs. *C*, Comparative expression of DR3 and DR6 in ex vivo tonsillar B cells and in vitro-generated PC by immunoblotting. The relative expression of DR3 was estimated by the ratio between the intensity of the DR3 and β -actin bands as determined by densitometry scanning analysis (values indicated below the DR3 blots). *D*, Impact of soluble DR on spontaneous PC death. Cultures of in vitro-generated PC were performed for 12 h in the presence or the absence of DR3, CD95, or TNFRI-Fc chimeric proteins and supplemented, or not, with either CD178 or TL1A. Mitochondrial alterations were measured using the DiOC₆ dye. Results are expressed as the mean \pm SD percentages of cells with low $\Delta\Psi_m$ calculated from triplicate determinations. The data shown are representative of three independent experiments.

CD178 and TL1A to their cellular receptor; and 2) the use of chimeric receptor-Fc fusion proteins does not introduce artifactual modulation of apoptosis in our experimental system. These results testify that PC death is not driven by endogenous production of the DR3 or CD95 ligands.

Caspase requirements for spontaneous PC apoptosis

The results presented above rule out the participation of endogenously produced death ligands in PC suicide. They do not exclude the possibility that PC death could be driven by ligand-independent self-aggregation of DR, as previously described (19). To address this question, we determined the kinetics of activation of caspase-8 and caspase-3 in cultured PC by immunoblotting. If caspase-8 activation occurs within a DR signaling complex, its active cleavage product should be released early on and should precede appearance of the cleaved form of caspase-3. As illustrated in Fig. 3, the kinetics of activation of caspase-8 in apoptotic PC do not fit with this scenario. Its p18 active cleavage product appeared only after 3 h of culture, whereas the p17 active cleavage product of caspase-3 was already detectable by 30 min of culture and peaked by 3 and 6 h of culture. Caspase-8 is thus unlikely to initiate PC apoptosis because its activation is subsequent to that of caspase-3.

Finally, to definitely rule out contribution of the extrinsic pathway to spontaneous PC death, we investigated whether caspases

intervene upstream or downstream of the mitochondria during this process. Mitochondrial perturbations are expected to be caspase dependent in the extrinsic pathway and caspase independent in the intrinsic pathway. In PC generated in vitro, the pan-caspase inhibitor z-VAD prevents DNA degradation in a dose-dependent fashion, but fails to block phosphatidylserine exposure and the $\Delta\Psi_m$ drop (Fig. 4A). The same holds true for in vivo-generated mouse polyclonal PC (Fig. 4B). These findings demonstrate that caspase activation during spontaneous PC apoptosis contributes to the nuclear damage and exclusively takes place downstream of the mitochondria.

To confirm the identities of the caspases involved, in vitro-generated human PC were cultured in the presence or the absence of 1) the broad-range caspase inhibitor z-VAD-fmk, 2) the caspase-8-specific inhibitor z-IETD-fmk, 3) the caspase-9-specific inhibitor z-LEHD-fmk, and 4) the caspase-3-specific inhibitor z-DEVD-fmk. As shown in Fig. 4C, only the pan-caspase inhibitor z-VAD and the caspase-3-specific inhibitor significantly prevented DNA fragmentation in PC. The inability of both the caspase-8 and caspase-9 antagonistic peptides to block nuclear apoptosis in PC is compatible with the hypothesis that neither of these initiator caspases is a key player in the PC apoptotic process. Together, these findings argue against implication of DR in spontaneous apoptosis of PC.

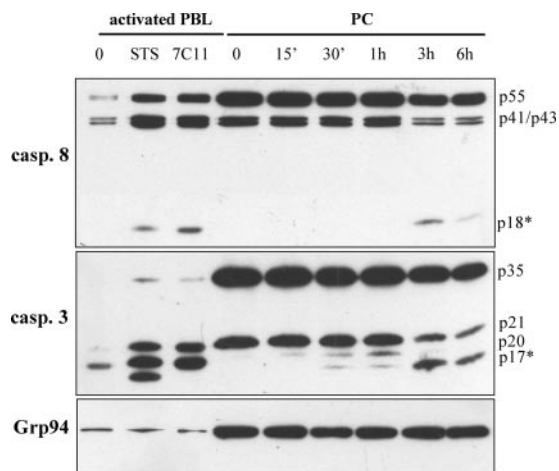


FIGURE 3. Caspase-8 and -3 are cleaved during PC apoptosis. Whole-cell extracts were prepared from in vitro-generated PC before and after various periods of culture. Activation of caspase-8 and -3 was assessed by immunoblot analysis. The anti-grp94 Ab was used as a loading control. Control extracts were prepared from activated PBL recultured for 3 h with medium (0), staurosporine (STS), or an agonistic anti-CD95 Ab (7C11). The proenzymatic forms of caspase-8 and -3 are visualized as 55- and 35-kDa bands, respectively. Their intermediate cleavage forms migrate as a 41/43-kDa doublet for caspase-8 and a 20/21-kDa doublet for caspase-3. The enzymatically active forms of caspase-8 and -3 are identified as bands with apparent M_r of 18 and 17 kDa, respectively (indicated by *). The data shown are representative of four independent experiments.

Mitochondria contribute to, but do not initiate, PC apoptosis

As shown above, the caspase-9 inhibitory peptide is unable to prevent nuclear PC death. Moreover, although intermediate cleavage products of caspase-9 were found in apoptotic PC, its active p17/p18 cleavage product remained undetectable whatever the time point considered (data not shown). Nevertheless, these findings do not formally exclude a role for caspase-9 in initiating the caspase cascade in apoptotic PC, because this initiator caspase does not necessarily require proteolytic processing to be enzymatically active (20). To decipher the role of the mitochondria in the PC death pathway, we next examined the activation of Bax with an Ab recognizing an epitope that is exposed in the activated (i.e., membrane-inserted) form of the molecule. As illustrated by Fig. 5, *A* and *B*, apoptotic PC express the activated form of Bax. The pan-caspase inhibitor z-VAD does not reduce the proportion of PC with active Bax in unstimulated cultures, whereas it prevents the rise of Bax⁺ cells induced by the agonistic anti-CD95 Ab (Fig. 5*C*). This finding is coherent with our previous observation that the $\Delta\psi_m$ drop in apoptotic PC is caspase independent. We next explored the subcellular location of Bax during PC apoptosis. In vitro-generated PC were double stained with the Ab recognizing the activated form of Bax (green fluorescence) and with an Ab directed against the mitochondrial marker Cox (red fluorescence). PC were stained before (Fig. 5*D*) and after a 6-h culture period conducted in the absence (Fig. 5*E*) or the presence (Fig. 5*F*) of an agonistic anti-CD95 Ab. As expected, freshly isolated PC displayed punctate staining with the Cox Ab, but did not express the active form of Bax. After 6 h of culture in the absence of exogenous stimulus, apoptotic PC expressed activated Bax, but, unexpectedly, no colocalization was found between the active form of Bax and Cox. This finding is not imputable to a technical flaw, because the Cox and activated Bax stainings colocalized (yellow staining) when PC were stimulated with an agonistic anti-CD95 Ab known to promote translocation of Bax to the mitochondria.

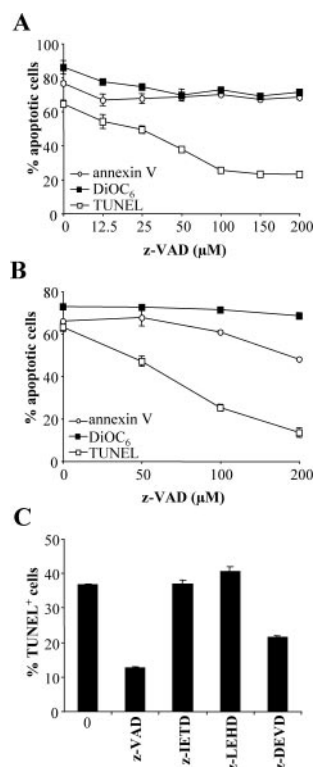


FIGURE 4. Mitochondrial alterations during PC apoptosis are caspase independent. *A* and *B*, Impact of z-VAD-fmk on three parameters of PC apoptosis. In vitro-generated human PC (*A*) or in vivo-generated murine PC (*B*) were cultured for 12 h in the presence or the absence of the indicated concentrations of z-VAD-fmk. The DiOC₆, annexin V, and TUNEL assays were used to monitor the mitochondrial, membrane, and nuclear alterations, respectively, in apoptotic PC. Results are presented as the mean \pm SD percentages of apoptotic cells calculated from duplicate determinations. *C*, Impact of caspase-specific inhibitors on nuclear apoptosis of PC. In vitro-generated human PC were cultured for 12 h with or without (0) a 150- μ M concentration of the following caspase inhibitory peptides: z-VAD-fmk (pan-caspases), z-IETD-fmk (caspase-8), z-LEHD-fmk (caspase-9), and z-DEVD-fmk (caspase-3). DNA fragmentation was used as a read-out. Results are expressed as the mean \pm SD percentages of TUNEL⁺ cells as calculated from duplicate determinations. The data shown are representative of three independent experiments.

Together, these results suggest that Bax activation takes place in an organelle other than the mitochondrion during PC apoptosis.

ER stress is primarily responsible for PC apoptosis

We next examined the subcellular localization of Bax during PC apoptosis by immunoelectron microscopy. As shown in Fig. 6, *A* and *B*, gold particles bound to the Ab recognizing the activated form of Bax were predominantly associated with the ER and were rarely found in the mitochondria or nucleus of apoptotic PC. These data were confirmed by confocal microscopy using the same anti-Bax Ab (red staining) and the ER marker PDI/protein disulfide isomerase (green staining). The activated form of Bax was not detectable in freshly produced PC (Fig. 6*C*), but was expressed in most PC after 6 h of culture (Fig. 6*F*). PDI showed a perinuclear distribution typical of the ER-Golgi network in both viable (Fig. 6*D*) and apoptotic (Fig. 6*G*) PC. In most cases, the fluorescent signal from the anti-Bax Ab overlapped with that from PDI in cultured PC (Fig. 6*H*). On the average, 60 and 30% of the Bax-expressing cells after 6 h of culture displayed complete or partial overlap of PDI and Bax stainings, respectively (data not shown).

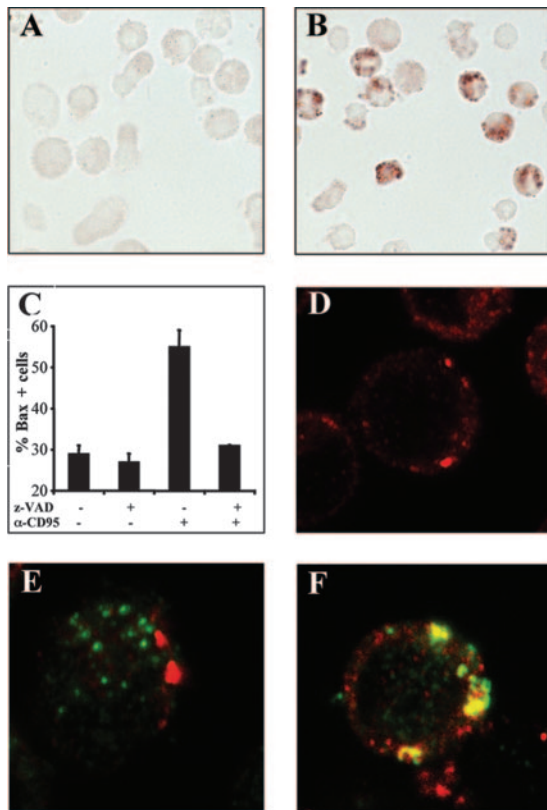


FIGURE 5. Bax is not activated at the mitochondrion membrane during PC apoptosis. *A–C*, Immunoenzymatic staining of apoptotic PC with an anti-Bax Ab. In vitro-generated human PC were cultured for 3 h before being stained with a nonimmune rabbit control serum (*A*) or a rabbit Ab revealing the conformational change associated with the membrane insertion of Bax (*B*). *C*, In vitro-generated human PC were cultured for 3 h in the presence or the absence of z-VAD-fmk (150 μ M) with or without the agonistic anti-CD95 Ab 7C11 before immunoenzymatic staining with the anti-activated Bax Ab. Bax⁺ cells were scored by photon microscopy. Results are expressed as the percentages of cells with activated Bax, calculated as the mean \pm SD of duplicate determinations. *D–F*, Subcellular localization of activated Bax in apoptotic PC. In vitro-generated PC were stained with the rabbit Ab recognizing the active conformation of Bax (in green) and with an mAb directed against the mitochondrial marker Cox (in red). Stainings were analyzed by α confocal microscopy. PC were stained immediately after isolation from secondary cultures (*D*) or after a 6-h culture in complete medium with (*F*) or without (*E*) the agonistic anti-CD95 Ab 7C11. Note that there is no overlapping (yellow staining) in PC cultured for 6 h in complete medium, whereas there is a significant proportion of yellow patches in PC treated with the agonistic anti-CD95 when the two fluorescence stainings are merged. The data shown are representative of three separate experiments.

This indicates that Bax either relocates to the ER or is activated at the ER during PC apoptosis.

To further document the participation of the ER in PC apoptosis, we monitored the activation of caspase-4 during apoptosis of human PC. Human caspase-4 has recently been demonstrated to be localized to the ER membrane and is likely to fulfill the same function as murine caspase-12 inasmuch as it mediates apoptosis induced by ER stress and amyloid β treatment in human cells (9). As shown in Fig. 7*A*, the cleaved form of caspase-4 appears by 1 h of culture in apoptotic PC. We also analyzed the kinetics of the cytosolic release of cyt *c* and AIF in cultured PC. As shown in Fig. 7*B*, cyt *c* was undetectable in the cytosol after 1 h of culture, but appeared at later time points (4 h). By contrast, AIF, although present in the total cellular extracts, was not released by the mi-

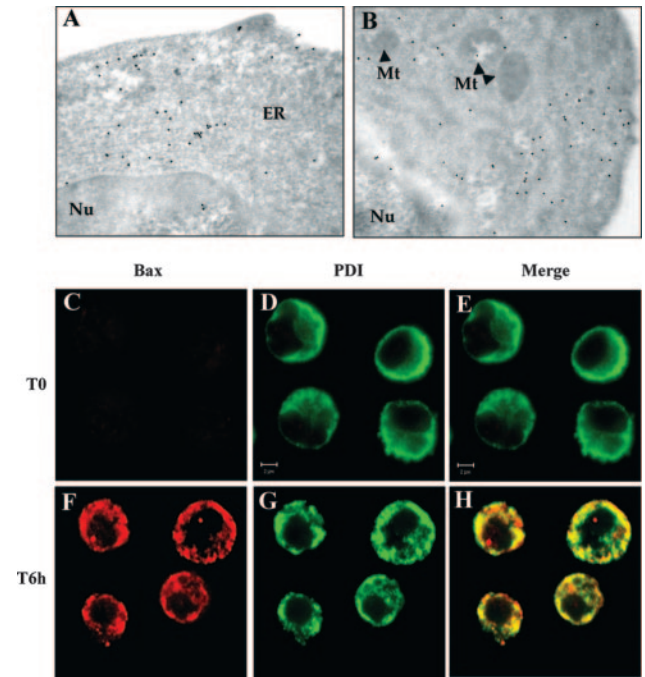


FIGURE 6. Bax is activated at the ER membrane during PC apoptosis. *A* and *B*, Two photographs showing the subcellular localization of Bax in apoptotic PC by immunoelectron microscopy. In vitro-generated PC were cultured for 6 h, stained with the same anti-Bax Ab as that described in Fig. 5, and revealed with a secondary Ab coupled to gold particles. The nucleus (*v*) ER and mitochondria (Mt) are indicated. *C–H*, The subcellular localization of Bax in apoptotic PC by confocal microscopy. In vitro-generated PC were stained with the rabbit Ab recognizing the active conformation of Bax and with an mAb directed against the ER marker PDI. *Upper panel*, Freshly isolated PC; *lower panel*, PC after 6 h of culture. *C* and *F*, Red fluorescence, Bax stainings; *D* and *G*, green fluorescence, PDI stainings; *E* and *H*, green and red fluorescence merged. The data are representative of three independent experiments.

tochondria into the cytosol during the first 6 h of culture. Taken together, these data indicate that the first sign of ER stress (i.e., caspase-4 activation) precedes the release of apoptogenic factors by the mitochondria.

Moreover, the processing of the effector caspase-3 in apoptotic PC was strictly under the control of caspase-4, because addition of the caspase-4 inhibitory tetrapeptide z-LEVD in PC cultures completely prevented proteolytic cleavage of caspase-3 (Fig. 7*C*). In agreement with this observation, z-LEVD, as the pan caspase antagonist z-VAD and the caspase-3 antagonist z-DEVD, inhibited DNA fragmentation in dying PC (Fig. 7*D*). Together, these results indicate that the ER-associated caspase-4 connects ER to effector caspases during PC apoptosis.

Discussion

Spontaneous PC apoptosis does not involve the extrinsic DR pathway

In the present work we have gathered several pieces of evidence indicating that the extrinsic apoptosis pathway does not contribute to PC death. First, caspase-8 activation in apoptotic PC is a late event, posterior to caspase-3 cleavage. Second, neither the caspase-8 inhibitory peptide z-IETD nor the soluble forms of DR3 and CD95 DR were able to prevent PC death. Third, both the mitochondrial $\Delta\psi_m$ loss and the conformational change in Bax occur independently of caspase activation during PC apoptosis. Our findings are in contradiction with those of Ursini-Siegel et al.

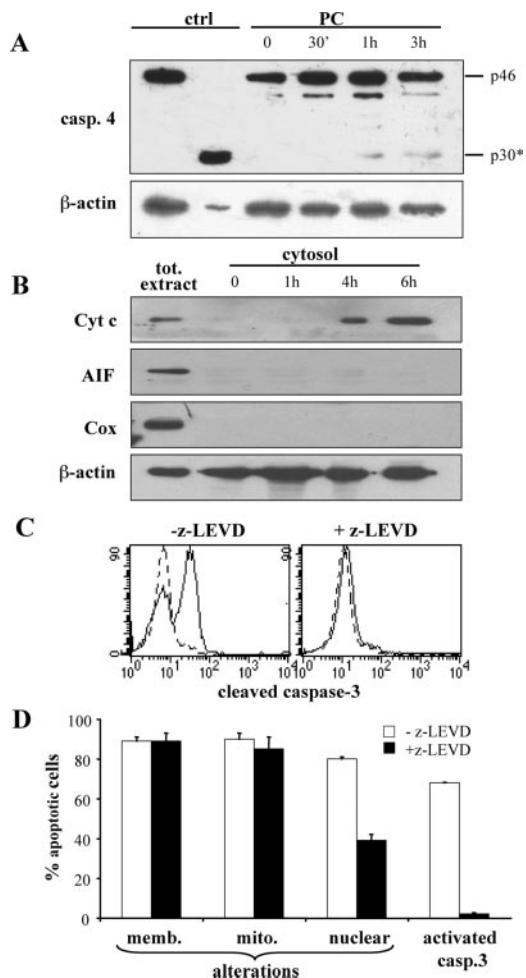


FIGURE 7. Caspase-4 activation precedes caspase-3 activation and cytosolic release of cyt *c*. *A*, Kinetics of caspase-4 activation in apoptotic PC. Total protein extracts prepared from in vitro-generated PC after 30 min, 1 h, and 3 h of culture were immunoblotted with an anti-caspase-4 Ab. The myeloma cell lines IM9 and U266, which exclusively exhibit the proform and the p30 cleaved form of caspase-4, respectively, were used as positive controls (*first left two lanes*). *B*, Kinetics of production of mitochondrial apoptogenic factors in apoptotic PC. Cytosolic extracts prepared from in vitro-generated PC after 1, 4, and 6 h of culture were immunoblotted with Abs recognizing cyt *c*, AIF, Cox, and β -actin. Total cell extracts prepared from freshly isolated PC (*first lane on left*) were used as controls. The absence of Cox in the cytosolic fractions guarantees that there has been no accidental release of inner mitochondrial material during preparation of the cytosolic extract. *C*, Influence of a caspase-4 antagonist on the activation of caspase-3. In vitro-generated PC were cultured for 6 h in the presence or the absence of the caspase-4 antagonist z-LEVD (150 μ M) and stained with an mAb recognizing specifically the cleaved active form of caspase-3 (plain lines) or with an isotype-matched unrelated mAb (dotted lines). *D*, Impact of the caspase-4 antagonistic peptide on different apoptosis parameters of PC. In vitro-generated PC were cultured for 12 h with or without z-LEVD before being assessed by flow cytometry for membrane, mitochondrial, and nuclear alterations and for expression of the active form of caspase-3.

(21), who documented that PC death implies an autocrine or paracrine loop involving the death ligand TRAIL. It is doubtful that this discrepancy could merely be imputable to our in vitro model of PC production. We have confirmed in in vivo-generated mouse PC (Fig. 4*B*) that the mitochondrial alterations accompanying spontaneous PC death are caspase independent, which argues against the contribution of DRs. Beyond the differences pertaining

to the experimental models used in our study and that by Ursini-Siegel et al. (21), the possibility that PC attrition operates through different mechanisms depending on their maturational stage is worthwhile considering. It is noteworthy that a minor population of TRAIL-R1⁺ cells is found within ex vivo tonsillar PC, whereas in vitro-generated PC completely lack expression of this receptor. Similarly, some ex vivo tonsillar PC have retained expression of CD79b, whereas this marker is lost in in vitro-generated PC. This suggests that PC that develop in vivo exhibit a higher degree of heterogeneity than the PC population we generated in our in vitro culture system. TRAIL-sensitive PC could thus be more represented within the postimmunization splenic CD138⁺ population studied by Ursini-Siegel et al. (21) than within our in vitro-generated human PC population. This raises the question of the in vivo counterpart of the PC population produced in our culture system. Three considerations lead us to propose that our in vitro-generated PC population is essentially constituted of fully mature PC. First, a large proportion of these cells express high levels of CD138. In humans, CD138 is one of most reliable markers that allows discrimination between plasmablasts and mature PC (22, 23). Second, our culture system generates occasional cells with prominent Russell bodies, which represent the ultimate PC differentiation stage (Fig. 1*C*). Third, our use of anti-CD20 and DQ Abs for PC enrichment at the end of the secondary culture favors elimination of early PC that still express these markers at low density. Autocrine or paracrine DR-mediated apoptosis could thus be associated with plasmablasts rather than mature PC. This point deserves investigation. Nonetheless, in vitro-generated human PC are prepared for autonomous triggering of the extrinsic apoptosis pathway. They express two functional DRs as well as the transcript for the CD95 death ligand (CD178), as previously observed by Strater et al. (24). Nevertheless, the function of CD178 in PC physiology remains elusive. If the death pathway responsible for the demise of PC in the periphery is repressed in the BM, an alternate apoptosis mechanism could be required to maintain homeostasis of the BM memory PC compartment confronted with the constant feeding with newly produced PC. The CD95/CD178 couple could then be instrumental in promoting contraction of the resident BM PC pool to accommodate establishment of the incomers.

The ER initiates PC apoptosis

Although both mitochondria and the ER are obviously involved in PC apoptosis, our experimental results support the idea that mitochondria are minor contributors. First, immunoelectron and confocal microscopies show that the active form of Bax is almost exclusively found at the ER and not at the mitochondria membrane during PC apoptosis. Second, the ER-associated caspase-4 is proteolytically cleaved during PC apoptosis before apoptogenic factors are released from the mitochondria. Third, the caspase-4, but not the caspase-9, antagonist completely blocks the cleavage of the effector caspase-3, which strongly suggests that initiation of the caspase cascade is subordinated to the ER rather than to the apoptosome. Nevertheless, more than one apoptotic pathway can be elicited in response to ER stress. This is suggested by the observation that caspase-12^{-/-} mouse embryonic fibroblasts are only partially resistant to ER stress-induced apoptosis (10). At face value, our finding that caspase inhibitors do not fully prevent DNA fragmentation in PC points to the possibility that both a caspase-dependent and a caspase-independent mechanism cooperate to promote PC apoptosis. The mitochondrial apoptogenic factor AIF could be a key mediator of the caspase-independent pathway, because it possesses an intrinsic DNA fragmentation activity that does not require caspase activation (25). Although we found no evidence for the cytosolic release of AIF in apoptotic PC during

the first 6 h of culture, this does not exclude that this factor could intervene at later stages of the process. The nature of the signaling mediator that connects ER to the mitochondria in PC is unknown, but Ca^{2+} stands as a plausible candidate. The respective contributions of the ER and mitochondria to ER stress-induced apoptosis may vary depending on the volume these organelles occupy within the cell. It is conceivable that the massive surface area of the ER in PC allows it to elicit a strong caspase-12/4 signal in response to ER stress, thus rendering the contribution of the mitochondria dispensable. This situation could be compared with that described for CD95-induced apoptosis, in which the mitochondria only contribute to execution of the death program when the initiator caspase signal provided by the CD95 death-inducing signaling complex is too weak (26).

Is PC longevity subordinated to efficiency of the UPR?

By analogy with the neuronal cell loss driven by the accumulation of misfolded proteins in Alzheimer's (10) and Parkinson's (27) diseases, it can be envisaged that an ER stress signal is generated in PC when their Ig secretion rate exceeds the folding capacity of the ER. The UPR, which is responsible for homeostasis of the ER function, attenuates general protein translation, specifically up-regulates the expression of ER chaperones, and eventually contributes to promote cell death (28). The existence of long-lived PC demonstrates that apoptosis is not necessarily an inescapable issue for fully differentiated PC. Thus, under certain conditions, PC can behave as pancreatic β islet cells, which can survive the ER stress associated with their secretory function. It follows that the UPR could be more efficient in long-lived PC than in short-lived PC. Because BM stromal cells (29) or the factors they produce (30) are required to support the survival of isolated BM PC, it is unlikely that their exceptional longevity is determined by an intrinsic genetic differentiation program. This points to the possibility that the factors produced in the BM environment could modulate the UPR in PC.

In conclusion, our present results suggest that the ER is a crucial regulator of PC survival. Additional experiments will determine whether targeting certain components of the UPR system or ER-associated antiapoptotic proteins, such as Bax inhibitor-1 (31), can sensitize PC for apoptosis. These studies might later be exploited for therapeutic purposes to promote cell death in diseases such as multiple myeloma or Ab-mediated autoimmune diseases that involve aberrant survival of PC.

Acknowledgments

We thank Dr. S. Peyrol (Centre Commun Imagerie Laennec, Faculté de Médecine, Lyon, France) and Dr. J.-P. Vendrell (Laboratoire de Virologie, Hôpital Lapeyronie, Montpellier, France) for sharing with us their expertise in the fields of electron microscopy and ELISPOT, respectively.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Iwakoshi, N. N., A. H. Lee, P. Vallabhajosyula, K. L. Otipoby, K. Rajewsky, and L. H. Glimcher. 2003. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat. Immunol.* 4: 321–329.
- Gass, J. N., N. M. Gifford, and J. W. Brewer. 2002. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J. Biol. Chem.* 277: 49047–49054.
- Zhang, K., and R. J. Kaufman. 2004. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 279: 25935–25938.
- Slifka, M. K., R. Antia, J. K. Whitmire, and R. Ahmed. 1998. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8: 363–372.
- Manz, R. A., A. Thiel, and A. Radbruch. 1997. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* 388: 133–134.
- Green, D. R. 2003. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunol. Rev.* 193: 5–9.
- Green, D. R., and G. Kroemer. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626–629.
- Ferri, K. F., and G. Kroemer. 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell. Biol.* 3: E255–E263.
- Hitomi, J., T. Katayama, Y. Eguchi, T. Kudo, M. Taniguchi, Y. Koyama, T. Manabe, S. Yamagishi, Y. Bando, K. Imaizumi, et al. 2004. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A β -induced cell death. *J. Cell Biol.* 165: 347–356.
- Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner, and J. Yuan. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature* 403: 98–103.
- Peter, M. E., and P. H. Krammer. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10: 26–35.
- Trauth, B. C., C. Klas, A. M. Peters, S. Matzku, P. Moller, W. Falk, K. M. Debatin, and P. H. Krammer. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245: 301–305.
- Bidere, N., H. K. Lorenzo, S. Carmona, M. Laforge, F. Harper, C. Dumont, and A. Senik. 2003. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278: 31401–31411.
- Hennino, A., M. Berard, P. H. Krammer, and T. Defrance. 2001. FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 193: 447–458.
- Arpin, C., J. Dechanet, C. Van Kooten, P. Merville, G. Grouard, F. Briere, J. Banchereau, and Y. J. Liu. 1995. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 268: 720–722.
- Noblesse, E., V. Cénizo, C. Bouez, A. Borel, C. Gleyzal, S. Peyrol, M. P. Jacob, P. Sommer, and O. Damour. 2004. Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J. Invest. Dermatol.* 122: 621–630.
- Murphy, B. M., A. J. O'Neill, C. Adrain, R. W. Watson, and S. J. Martin. 2003. The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome c. *J. Exp. Med.* 197: 625–632.
- Migone, T. S., J. Zhang, X. Luo, L. Zhuang, C. Chen, B. Hu, J. S. Hong, J. W. Perry, S. F. Chen, J. X. Zhou, et al. 2002. TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity* 16: 479–492.
- Sheikh, M. S., M. J. Antinore, Y. Huang, and A. J. Fornace, Jr. 1998. Ultraviolet-irradiation-induced apoptosis is mediated via ligand independent activation of tumor necrosis factor receptor 1. *Oncogene* 17: 2555–2563.
- Stennicke, H. R., Q. L. Deveraux, E. W. Humke, J. C. Reed, V. M. Dixit, and G. S. Salvesen. 1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 274: 8359–8362.
- Ursini-Siegel, J., W. Zhang, A. Altmeyer, E. N. Hatada, R. K. Do, H. Yagita, and S. Chen-Kiang. 2002. TRAIL/Apo-2 ligand induces primary plasma cell apoptosis. *J. Immunol.* 169: 5505–5513.
- Jego, G., N. Robillard, D. Puthier, M. Amiot, F. Accard, D. Pineau, J. L. Harousseau, R. Bataille, and C. Pellat-Deceunynck. 1999. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 94: 701–712.
- Tarte, K., F. Zhan, J. De Vos, B. Klein, and J. Shaughnessy, Jr. 2003. Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood* 102: 592–600.
- Strater, J., S. M. Mariani, H. Walczak, F. G. Rucker, F. Leithauser, P. H. Krammer, and P. Moller. 1999. CD95 ligand (CD95L) in normal human lymphoid tissues: a subset of plasma cells are prominent producers of CD95L. *Am J Pathol* 154: 193–201.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, et al. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441–446.
- Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Krammer, and M. E. Peter. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17: 1675–1687.
- Imai, Y., M. Soda, H. Inoue, N. Hattori, Y. Mizuno, and R. Takahashi. 2001. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105: 891–902.
- Breckenridge, D. G., M. Germain, J. P. Mathai, M. Nguyen, and G. C. Shore. 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22: 8608–8618.
- Minges Wols, H. A., G. H. Underhill, G. S. Kansas, and P. L. Witte. 2002. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J. Immunol.* 169: 4213–4221.
- Cassese, G., S. Arce, A. E. Hauser, K. Lehnert, B. Moewes, M. Mostarac, G. Muehlinghaus, M. Szyska, A. Radbruch, and R. A. Manz. 2003. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J. Immunol.* 171: 1684–1690.
- Chae, H. J., H. R. Kim, C. Xu, B. Bailly-Maitre, M. Krajewski, S. Krajewski, S. Banares, J. Cui, M. Digicaylioglu, N. Ke, et al. 2004. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell* 15: 355–366.