

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

RÔLE DE LA PROTÉINE VANGL2 DANS LE MAINTIEN DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

Par
Sarah Bouali

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Alain Lamarre
Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

Examineur externe

Sonia Cellot
Division d'hématologie et oncologie
CHU Sainte-Justine

Directeur de recherche

Krista Heinonen
Centre Armand-Frappier Santé
Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Il est important pour moi de remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue, de près ou de loin, tout au long de mon projet de recherche dans le cadre de ma maîtrise en immunologie et virologie.

Je remercie ma directrice de recherche, Krista Heinonen, professeure d'immunologie à l'INRS, pour son mentorat précieux, ses judicieux conseils, sa grande disponibilité ainsi que pour nos multiples conversations enrichissantes tout au long de mon parcours qui ont guidé mes réflexions et qui ont fait de ce projet de recherche une réussite. Je remercie également toute l'équipe de laboratoire avec qui j'ai beaucoup collaboré et appris, notamment Roxann pour son aide précieuse, que ce soit durant les expériences ou par ses nombreux conseils.

Je remercie du fond du cœur ma famille pour leurs encouragements constants et pour avoir toujours cru en moi. Merci à mes parents qui ont tout donné pour mon succès, qui m'ont toujours encouragée et soutenue avec amour et fierté de la meilleure des façons durant mon parcours et dans tout ce que j'entreprends, et ma sœur et mon frère, pour tout leur soutien indispensable et leurs encouragements précieux. Je remercie mon fiancé qui m'a toujours encouragée et motivée à donner le meilleur de moi-même durant ces dernières années.

Je remercie mes collègues et amies du cours d'immunologie et virologie, Sarra, Anaïs et Léna, qui ont rendu ces années inoubliables et avec qui nous avons passé de précieux moments de bonheur. Je remercie également toutes mes chères amies qui m'ont encouragée à accomplir mon projet.

Enfin, je remercie grandement les membres du jury d'évaluation pour leur disponibilité dans l'encadrement de la révision et correction de ce mémoire.

RÉSUMÉ

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) assurent le renouvellement continu des cellules sanguines tout au long de la vie par un processus appelé hématopoïèse. L'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH, maintenu par les différents signaux reçus dans la moelle osseuse (MO), est essentiel à la préservation de leur fonction. Parmi ces signaux, la voie de signalisation *Wnt/Planar Cell Polarity* (PCP) est connue pour réguler le maintien des CSH. *Vangl2* est un élément clé de la voie *Wnt/PCP* et est exprimé par les CSH fœtales et adultes, mais son rôle dans l'hématopoïèse et dans les CSH demeure inconnu. Dans cette étude, nous démontrons que *Vangl2* est essentiel au maintien des CSH à long terme. En effet, nous avons observé des altérations dans le réservoir de cellules progénitrices hématopoïétiques chez les vieilles souris *Vangl2*-déficientes. De plus, les CSH *Vangl2*-déficientes présentaient des défauts fonctionnels d'expansion et d'auto-renouvellement, puisqu'elles ne pouvaient reconstituer efficacement les receveurs lors des greffes de MO en série. Enfin, les vieilles CSH *Vangl2*-déficientes avaient des niveaux plus élevés du marqueur de sénescence p16^{INK4a} et de β -caténine, contribuant donc à cette perte de fonction. Ainsi, notre étude identifie *Vangl2* comme un nouveau régulateur du maintien des CSH à long terme.

Mots-clés : Cellules souches hématopoïétiques ; *Vangl2* ; voie de signalisation *Wnt/Planar Cell Polarity* ; greffes de moelle osseuse ; récupération hématopoïétique

ABSTRACT

Hematopoietic stem cells (HSC) ensure the continuous renewal of blood cells throughout life through a process called hematopoiesis. The balance between HSC self-renewal and differentiation, maintained by the different signals received in the bone marrow (BM), is essential for the preservation of their function. Among these signals, the Wnt/Planar Cell Polarity (PCP) signaling pathway is known to regulate HSC maintenance. Vangl2 is a key component of the Wnt/PCP pathway and is expressed by fetal and adult HSCs, but its role in hematopoiesis and HSCs remains unknown. Here, we show that Vangl2 is essential for HSC long-term maintenance. Indeed, we observed alterations in the hematopoietic progenitor cells pool in old *Vangl2*-deficient mice. Moreover, *Vangl2*-deficient HSCs exhibited functional expansion and self-renewal defects, since they could not efficiently reconstitute recipients during serial BM transplants. Finally, old *Vangl2*-deficient HSCs had higher levels of the senescence marker p16^{INK4a} and β -catenin, thus contributing to this loss of function. Overall, our study identifies Vangl2 as a novel regulator of long-term HSC maintenance.

Keywords : Hematopoietic stem cells ; Vangl2 ; Wnt/Planar cell polarity pathway ; bone marrow transplants ; hematopoietic recovery

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES TABLEAUX	XVII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XX
1 INTRODUCTION	1
1.1 DECOUVERTE DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES	1
1.2 UTILISATION CLINIQUE DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES	2
1.3 ORIGINE DES CSH : HEMATOPOÏÈSE FŒTALE	4
1.4 HEMATOPOÏÈSE ADULTE.....	5
1.4.1 <i>Niche périvasculaire</i>	5
1.4.2 <i>Niche endostéale</i>	7
1.5 FACTEURS IMPORTANTS DANS LE MAINTIEN DES CSH.....	8
1.6 DIFFERENCIATION DES CSH DANS LA MO.....	9
1.7 ACTIVITE PROLIFÉRATIVE DES CSH	13
1.7.1 <i>Cycle cellulaire des CSH fœtales</i>	14
1.7.2 <i>Cycle cellulaire des CSH adultes</i>	14
1.7.3 <i>Cycle cellulaire des CSH âgées</i>	16
1.8 VOIES DE SIGNALISATION WNT DANS LE MAINTIEN DES CSH	17
1.8.1 <i>Découverte des protéines Wnt</i>	17
1.8.2 <i>Voie canonique Wnt/β-caténine</i>	18
1.8.3 <i>Voie non-canonique Wnt/Ca²⁺</i>	21
1.8.4 <i>Voie non-canonique Wnt/Polarité ou Wnt/PCP</i>	23
1.9 LES PROTEINES CLES DE LA VOIE WNT/PCP	26
1.9.1 <i>Protéines transmembranaires de la voie Wnt/PCP</i>	26
1.9.1 <i>Protéines cytoplasmiques de la voie Wnt/PCP</i>	26
1.9.2 <i>Interactions et relocalisation des complexes Frizzled-Dsh et Vangl-Prickle</i>	27
1.9.3 <i>Complexe Fat/Dachsous</i>	27
1.10 LA VOIE PCP DANS LES CSH	28
1.11 LA PROTEINE MEMBRANAIRE VANGL2	29

1.12	HYPOTHESE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	32
2	EXPERIMENTAL COMPETITIVE BONE MARROW TRANSPLANT ASSAYS	35
2.1	RUNNING HEAD	36
2.2	ABSTRACT.....	36
2.3	KEY WORDS.....	36
2.4	INTRODUCTION	37
2.5	MATERIALS	39
2.5.1	<i>Preparation of Recipient Mice</i>	39
2.5.2	<i>Preparation of Donor/Competitor BM cells</i>	39
2.5.3	<i>Flow Cytometry for HSC equivalents</i>	40
2.5.4	<i>Preparation of Bone Marrow Cells for Transplant</i>	40
2.5.5	<i>Bone Marrow Transplants</i>	40
2.5.6	<i>Peripheral Blood Analysis</i>	40
2.5.7	<i>Analysis of BM Reconstitution</i>	41
2.6	METHODS	41
2.6.1	<i>Preparation of Recipient Mice</i>	41
2.6.2	<i>Preparation of Donor and Competitor Bone Marrow (BM) Cell Samples</i>	41
2.6.3	<i>Flow Cytometry Staining to Establish Donor Cells HSC Equivalents</i>	42
2.6.4	<i>Preparation of the Bone Marrow Cells for Transplant</i>	45
2.6.5	<i>Bone Marrow Transplants</i>	45
2.6.6	<i>Peripheral Blood Analysis</i>	45
2.6.7	<i>Analysis of BM Reconstitution</i>	47
2.6.8	<i>Secondary and Tertiary Grafts</i>	48
2.7	NOTES	49
2.8	ACKNOWLEDGEMENTS	56
3	VANGL2 REGULATES LONG-TERM HSC MAINTENANCE	57
3.1	HIGHLIGHTS	58
3.2	SUMMARY	58
3.3	INTRODUCTION	59
3.4	RESULTS.....	61
3.5	DISCUSSION	73
3.6	EXPERIMENTAL PROCEDURES	76
3.6.1	<i>Experimental animals</i>	76
3.6.2	<i>Flow Cytometry and Imaging</i>	76
3.6.3	<i>Colony assays</i>	79
3.6.4	<i>Transplantation assays</i>	79
3.7	STATISTICAL ANALYSIS.....	80

3.8	ACKNOWLEDGEMENTS	80
3.9	AUTHOR CONTRIBUTIONS	80
3.10	DECLARATION OF INTERESTS	80
3.11	SUPPLEMENTAL INFORMATION	81
4	DISCUSSION.....	87
5	CONCLUSION	105
6	ANNEXE I	107
7	ANNEXE II	108
8	ANNEXE III	109
9	RÉFÉRENCES.....	111

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1	HEMATOPOÏÈSE DANS LA MOELLE OSSEUSE	11
FIGURE 1.2	IDENTIFICATION DES CELLULES SOUCHES ET PROGENITRICES HEMATOPOÏÉTIQUES PAR CYTOMETRIE EN FLUX	13
FIGURE 1.3	VOIE CANONIQUE WNT/B-CATENINE.....	19
FIGURE 1.4	VOIE WNT/CA ²⁺	22
FIGURE 1.5	VOIE WNT/ <i>PLANAR CELL POLARITY</i> (PCP).....	24
FIGURE 1.6	EXPRESSION DE <i>VANGL2</i> DANS LES CELLULES HEMATOPOÏÉTIQUES CHEZ LA SOURIS	31
FIGURE 2.1	EXPERIMENTAL DESIGN.....	38
FIGURE 2.2	PRE-TRANSPLANT BONE MARROW HSC ANALYSIS TEMPLATE.....	44
FIGURE 2.3	POST-TRANSPLANT PERIPHERAL BLOOD ANALYSIS TEMPLATE.	47
FIGURE 2.4	POST-TRANSPLANT BONE MARROW HSC ANALYSIS TEMPLATE.....	48
FIGURE 2.5	EXAMPLES OF NON-SUCCESSFUL BM TRANSPLANT.	50
FIGURE 2.6	CALCULATIONS FROM POST-TRANSPLANT PERIPHERAL BLOOD ANALYSIS.	54
FIGURE 3.1	<i>VANGL2</i> LOSS IN HEMATOPOIETIC CELLS INCREASES MYELOID-BIASED MULTIPOTENT PROGENITOR CELL NUMBERS IN OLD MICE.	62
FIGURE 3.2	<i>VANGL2</i> IS DISPENSABLE FOR STEADY-STATE LYMPHO-MYELOPOIESIS, BUT ITS ABSENCE INCREASES THE SPLEEN INDEX IN OLD MICE.....	64
FIGURE 3.3	<i>VANGL2</i> LOSS IMPAIRS OLD MYELOID PROGENITOR CELL EXPANSION IN VITRO.....	66
FIGURE 3.4	<i>VANGL2</i> IS REQUIRED FOR HEMATOPOIETIC RECONSTITUTION IN ADULT DONORS.....	68
FIGURE 3.5	<i>VANGL2</i> DEFICIENCY SEVERELY IMPAIRS HSC SELF-RENEWAL IN SERIAL TRANSPLANTS LEADING TO BM FAILURE.	70
FIGURE 3.6	<i>VANGL2</i> LOSS INCREASES B-CATENIN ACTIVATION AND SENESCENCE MARKER P16 EXPRESSION IN OLD HSCs.	72
FIGURE S 3.7	SEX-RELATED ANALYSIS OF <i>VANGL2</i> LOSS IN HSCs, PROGENITOR CELLS AND MATURE BM/SPLEEN CELLS IN FEMALE AND MALE MICE, RELATED TO FIGURES 3.1 AND 3.2.	81
FIGURE S 3.8	FLOW CYTOMETRY GATING STRATEGIES, RELATED TO FIGURES 3.2, 3.4 AND 3.5.	82
FIGURE S 3.9	<i>VANGL2</i> LOSS IMPAIRS MYELOID CELLS RECONSTITUTION IN SECONDARY FEMALE RECIPIENTS, AND BOTH MYELOID/LYMPHOID CELLS RECONSTITUTION IN TERTIARY FEMALE RECIPIENTS. RELATED TO FIGURES 3.4 AND 3.5.	83
FIGURE S 3.10	<i>VANGL2</i> LOSS ALTERS LONG-TERM POST-TRANSPLANT PERIPHERAL BLOOD RECONSTITUTION IN SECONDARY MALE RECIPIENTS, RELATED TO FIGURES 3.4 AND 3.5.....	84
FIGURE S 3.11	<i>VANGL2</i> LOSS DOES NOT IMPAIR <i>Cdc42</i> LOCALIZATION AND B-CATENIN ACTIVATION IN YOUNG AND ADULT MICE, RELATED TO FIGURE 3.6.	85
FIGURE 4.1.	LA PERTE DE <i>VANGL2</i> DANS LES CELLULES THYMIQUES.	96
FIGURE 8.1.	LES SOURIS <i>VANGL2</i> ^{Δ/Δ} ONT UNE SENSIBILITE ACCRUE A L'IRRADIATION SOUS-LETALE	109

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1	IDENTIFICATION DES CELLULES SOUCHES ET PROGENITRICES HEMATOPOÏETIQUES	13
TABLE 3.1	LIST OF ANTIBODIES USED FOR FLOW CYTOMETRY.....	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AGM. : *aorte-gonades-mésonéphros*

Ang-1. : *angiopoïétine 1*

APC. : *adenomatous polyposis coli*

AXIN1. : *axine 1 ou axis inhibition protein 1*

Ca²⁺. : *ion calcium*

CAMKII. : *calmoduline kinase II*

CD135. : *cluster de différenciation 135*

CD150. : *cluster de différenciation 150*

CD48. : *cluster de différenciation 48*

Cdc42. : *cell-division cycle 42*

CDK. *kinase dépendante des cyclines*

CFC-HPP. : *cellules à haut potentiel prolifératif formant des colonies ou high proliferative potential colony-forming cells*

CK1. : *caséine kinase 1*

c-Kit/CD117. : *le proto-oncogène c-Kit ou le cluster de différenciation 117*

CLP. : *progéniteurs lymphoïdes communs*

CREB. : *C-AMP Response Element-binding protein*

CXCL12. : *ligand de chimiokine CXC 12*

CXCL4, PF4. *facteur plaquettaire 4*

DAAM. : *Dishevelled associated activator of morphogenesis*

DAG. : *diacylglycérol*

DC. : *cellules dendritiques*

Dsh. : *Dishevelled*

DVL. : *homologue mammifère de Dishevelled*

EoBP. : *progéniteurs éosinophiles-basophiles*

ER α . *récepteur alpha des œstrogènes*

Flt3. : *fms like tyrosine kinase 3*

Fmi. : *Flamingo*

Fzd. : *Frizzled*

Fzd3. : *Frizzled-3*

Fzd6. : *Frizzled-6*

Fzd8. : *Frizzled-8*

G-CSF. : *facteur de stimulation des colonies granulocytes ou granulocyte-clony stimulating factor*

GFP. : *protéine verte fluorescente ou green-fluorescent protein*

GMP. : *progéniteurs granulocytes-monocytes*

GSK3 β . : *glycogène synthase kinase 3 β*

GvHD. : *réaction greffon-contre-hôte ou graft-versus host disease*

HSPC. : *cellules souches et progénitrices hématopoïétiques ou hematopoietic stem and progenitors cells*

IL-6. : *interleukine-6*

IP3. : *inositol triphosphate*

JNK. : *c-Jun N-terminal kinases*

jour E(X). : *jour embryonnaire (X)*

Lin⁻. : *linéage négatif*

LMPP. : *lymphoid-primed multipotent progenitors*

LRP5/6. : *LDL- receptor-related protein 5 ou 6*

LSK. : *Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺*

LT-HSC. : *CSH à long-terme ou long-term HSC*

MEP. : *progéniteurs mégacaryocytes-érythrocytes*

MKC. : *mégacaryocyte*

MO. : *moelle osseuse*

MPP. *progéniteurs multipotents ou multipotent progenitors*

MSC. : *cellules stromales/souches mésenchymateuses ou mesenchymal stem/stromal cells*

NFAT. : *nuclear factor of activated T cells*

NFκB. : *nuclear factor-κB*

NK. : *natural killers*

PCP. *Planar Cell Polarity ou polarité cellulaire planaire*

PIP2. : *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*

PKC. : *protéine kinase C*

PLC. : *phospholipase C*

PLT. : *plaquettes*

pRB. : *protéine du rétinoblastome*

RBC. : *globules rouges ou red blood cells*

ROCK. : *Rho-associated protein kinase*

ROS. : *espèces réactives de l'oxygène ou reactive oxygen species*

SCA-1/LY6A. : *stem-cell antigen 1*

Scf. : *le kit-ligand ou stem-cell factor*

SLAM. : *signaling lymphocytic activation molecule*

ST-HSC. : *CSH à court-terme ou short-term HSC*

TCF/LEF. : *T-cell factor/Lymphoid-enhancer-binding factor*

TGF-β. : *facteur de croissance transformant bêta ou transforming growth factor beta*

Tie2. : *récepteur tyrosine-kinase de type 2*

Tpm. : *transcripts per million*

TPO. : *thrombopoïétine*

Vang. : *Strabismus/Van Gogh*

Vangl. : *Vang-like protein*

Wg. : *Wingless*

Wnt. : *combinaison de Wingless et Int-1*

1 INTRODUCTION

1.1 Découverte des cellules souches hématopoïétiques

Toutes les cellules sanguines retrouvées dans l'organisme dérivent d'une même cellule mère : **la cellule souche hématopoïétique (CSH)**. Les CSH ont une fonction très importante qui est d'assurer le processus d'**hématopoïèse**, défini par la production continue des cellules sanguines matures, tels que les globules blancs, les globules rouges et les plaquettes. Le processus d'hématopoïèse est maintenu de façon remarquable de la vie foetale et tout au long de la vie adulte par une petite quantité de CSH présentes en nombre limité dans la moelle osseuse (MO). En effet, les CSH représentent seulement 0,01% des cellules de la MO de souris, où l'on y retrouve environ 1 CSH parmi 10 000 autres cellules (Szilvassy *et al.*, 1990). Bien qu'elles soient rares, les CSH ont la capacité d'assurer cette fonction essentielle grâce à deux caractéristiques distinctives : leur capacité d'auto-renouvellement et leur capacité de différenciation. En d'autres mots, elles peuvent maintenir la réserve de CSH stable dans l'organisme par auto-renouvellement en générant une cellule fille identique à elle-même, tout en ayant la capacité de se différencier pour générer une cellule fille distincte qui s'engagera vers une lignée spécifique de différenciation afin de générer les différentes cellules sanguines composant le système immunitaire. La lignée myéloïde mène à la production des mégacaryocytes et plaquettes, des érythrocytes, des monocytes-macrophages et des granulocytes. La lignée lymphoïde quant à elle mène à la production des lymphocytes T, des lymphocytes B et des cellules *natural killer*. Les cellules dendritiques, quant à elles, peuvent être générées à partir des deux lignées.

Le processus d'hématopoïèse fut mis de l'avant pour la première fois en 1909 par Alexander A. Maximow qui présente la théorie selon laquelle une seule cellule est à l'origine de la formation de toutes les cellules sanguines (Maximow, 1909). Puis, le principe de greffe de cellules hématopoïétiques fut identifié suite aux drames des bombardements atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki durant la Seconde Guerre mondiale (1939-1945). Les chercheurs constatèrent les conséquences mortelles de l'irradiation à long terme sur les survivants, qui, exposés aux fortes doses d'irradiation, développaient le syndrome d'irradiation aiguë, caractérisé par une perte totale de reconstitution hématopoïétique et une absence de renouvellement des cellules immunitaires (Shao *et al.*, 2014), et avaient également une incidence plus élevée de cancers dont les leucémies (Folley *et al.*, 1952). Durant cette période, plusieurs études se concentrent

alors sur les conséquences de l'irradiation sur l'hématopoïèse et les effets protecteurs des transplantations de MO de donneurs non exposés à l'irradiation sont alors découverts (Jacobson *et al.*, 1951; Lorenz *et al.*, 1951). Les CSH sont identifiées pour la première fois au début des années 1960 par les chercheurs Tim et McCulloch lorsqu'ils observent que la transplantation de cellules de MO dans des souris létalement irradiées mène à l'apparition de nouvelles colonies dans la rate de celles-ci (Till & McCulloch, 1961). Aujourd'hui, les modèles animaux comme la souris sont grandement utilisés pour la recherche fondamentale et clinique sur les CSH et le processus d'hématopoïèse qui demeure un processus conservé à travers l'évolution. Les conséquences de l'irradiation, comme l'activation des voies de signalisation entraînant la mort cellulaire par apoptose, la sénescence ainsi que la perte des cellules par différenciation menant à des conséquences sévères sur le système hématopoïétique sont désormais connues (Shao *et al.*, 2014).

1.2 Utilisation clinique des cellules souches hématopoïétiques

Aujourd'hui, l'utilisation clinique des CSH lors des greffes de MO est bien établie. En effet, les greffes de MO représentent une thérapie cellulaire efficace contre les maladies hématopoïétiques. Environ 50 000 à 60 000 greffes de MO sont effectuées chaque année pour guérir les patients atteints de troubles hématopoïétiques, dont les hémopathies malignes, dits cancers du sang (leucémies, lymphomes et myélomes multiples), ou encore des maladies génétiques ou auto-immunes (Gyurkocza *et al.*, 2010; Li & Sykes, 2012). Cette thérapie cellulaire repose sur la destruction complète du système hématopoïétique défectueux du patient pour le remplacer par un système hématopoïétique sain. La destruction du système hématopoïétique défectueux peut se faire par radiothérapie ou chimiothérapie qui, en causant des dommages irréversibles aux CSH, mènent ultimement à leur perte par mort cellulaire. Ceci permet la transplantation de nouvelles CSH saines, provenant de l'hôte lui-même ou d'un hôte histocompatible, dans la MO nouvellement libérée, permettant ainsi la reprise d'une hématopoïèse normale chez le patient.

Les recherches actuelles se concentrent entre autres sur l'étude phénotypique des CSH et leur régulation fonctionnelle en étudiant les facteurs influençant leur maintien, auto-renouvellement et différenciation, entre autre en vue d'améliorer la réussite des greffes de CSH en y réduisant les risques associés, dont la réaction greffon-contre-hôte ou *graft-versus host disease* (GvHD).

La GvHD est une complication dangereuse dans laquelle les cellules immunitaires présentes dans le greffon, soient les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, s'activent et attaquent les cellules saines de l'hôte (Kernan *et al.*, 1986). Le GvHD aiguë, survenant dans les trois premiers mois suivant la greffe, mène à la destruction de tissus sains, en affectant majoritairement la peau, le tractus gastro-intestinal et le foie (Ferrara *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 1990). Au-delà de cette période, le GvHD est dit chronique et sa sévérité demeure la cause majeure de mortalité associés aux complications des greffes de CSH (Blazar *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2002). Bien que plusieurs techniques soient utilisées pour réduire les risques de GvHD, comme la déplétion des lymphocytes T du donneur *ex-vivo* ou l'administration de médicaments immunosuppresseurs pour empêcher leur activation, d'autres études sont toujours requises pour limiter davantage les risques associés aux GvHD (Ferrara *et al.*, 2009). Par exemple, l'utilisation de sang de cordon ombilical permet de réduire les risques de GvHD, mais la quantité de CSH présentes dans celui-ci est trop faible et nécessite donc plusieurs donneurs ou une expansion des CSH *ex-vivo* qui présente encore des difficultés aujourd'hui (Li & Sykes, 2012).

Une importante découverte en 2014 par l'équipe du Dr. Sauvageau a permis de contrer les défis associés aux greffes de sang de cordon. En effet, Dr. Sauvageau et son équipe ont découvert la molécule UM171 qui augmente l'expansion des CSH humaines *ex-vivo* provenant du sang de cordon (Chagraoui *et al.*, 2021; Fares *et al.*, 2014) et son utilisation est actuellement en études cliniques (Cohen *et al.*, 2020). Ceci souligne donc bien l'importance constante de la recherche fondamentale et clinique dans le but de comprendre les CSH et de découvrir de nouveaux facteurs régulant leur maintien et auto-renouvellement, notamment en vue d'améliorer l'utilisation des thérapies cellulaires comme les greffes de MO, mais également d'y réduire les risques associés. Ainsi, les prochaines sections se concentreront d'abord sur une revue littéraire des études passées et actuelles ayant permis la caractérisation des CSH.

1.3 Origine des CSH : hématoïèse foétale

L'hématoïèse, définie par la production des cellules sanguines, est un processus qui émerge durant les premiers jours embryonnaires et qui se maintient tout au long de la vie adulte. Ceci étant dit, plusieurs différences distinguent l'hématoïèse foétale, ayant lieu avant la naissance, et l'hématoïèse adulte ou post-natale, ayant lieu après la naissance et tout au long de la vie adulte. D'abord, chez les mammifères, deux vagues d'hématoïèses foétales ont lieu : l'hématoïèse primitive et l'hématoïèse définitive. Chez la souris, à partir du 7^e jour embryonnaire (jour E7), on retrouve les hémangioblastes, également appelées CSH primitives, dans le sac vitellin (Choi *et al.*, 1998; Dzierzak & Speck, 2008). Ces hémangioblastes se différencient pour générer les premières cellules sanguines matures : les globules rouges et les cellules endothéliales (Choi *et al.*, 1998; Dzierzak & Speck, 2008; Sabin, 1920). Les hémangioblastes ne génèrent toutefois pas les CSH adultes. En effet, une transplantation chimérique d'un embryon de caille de deux jours sur un sac vitellin de poussin n'entraîne pas d'hématoïèse complète (Dieterlen-Lievre, 1975; Dzierzak & Speck, 2008). L'étude en question démontre que suite à l'incubation d'une greffe de caille sur un sac vitellin de poussin pendant 13 jours, les organes hématoïétiques secondaires, qui sont la rate et le thymus, ne contenaient aucune cellule sanguine provenant du sac vitellin de poussin. Les cellules sanguines retrouvées dans la rate et le thymus provenaient uniquement de l'embryon caille, suggérant la présence de CSH indépendantes du sac vitellin capables de repeupler les organes hématoïétiques secondaires (Dieterlen-Lievre, 1975).

Ainsi, la deuxième source de CSH, qui constitueront les CSH définitives adultes capables d'auto-renouvellement et de différenciation, est la région embryonnaire aorte-gonades-mésonephros (AGM) au jour E10 et est indépendante du sac vitellin (Medvinsky & Dzierzak, 1996). Contrairement aux CSH primitives qui ne peuvent pas reconstituer un hôte adulte létalement irradié, les CSH définitives en sont capables quatre mois après la transplantation (Medvinsky & Dzierzak, 1996). Les CSH adultes générées dans la région AGM migrent vers le foie foetal dans lequel elles s'auto-renouvellent rapidement et se différencient jusqu'à la naissance, d'abord pour générer le réservoir de CSH adultes qui seront requises tout au long de la vie, ensuite pour générer les cellules sanguines immunitaires nécessaires à l'établissement d'un système immunitaire sain (Dzierzak & Speck, 2008; Johnson & Moore, 1975). Les CSH définitives migrent dans les organes lymphoïdes secondaires, comme le thymus au jour E11 et la rate au jour E12.5 et colonisent enfin la MO au jour E15 où elles y demeureront tout au long

de la vie adulte (Dzierzak & Speck, 2008). D'autres études plus récentes chez la souris et l'humain ont toutefois confirmé également la présence de CSH avec fonctions d'auto-renouvellement et de différenciation dans le placenta au jour E11 et E12 (Ottersbach & Dzierzak, 2005; Robin *et al.*, 2009).

1.4 Hématopoïèse adulte

Le site d'hématopoïèse adulte est la moelle osseuse (MO) retrouvée dans la cavité médullaire à l'intérieur des os composant le système squelettique. Agissant comme un organe lymphoïde primaire à part entière, la MO assure la production et la maturation des cellules myéloïdes et des lymphocytes B, ainsi que la production des progéniteurs des lymphocytes T qui migrent ensuite dans le thymus pour maturation. L'hématopoïèse est principalement active dans les os longs comme le fémur, l'humérus, le sternum et l'ilion situé dans la crête iliaque où on y retrouve davantage de CSH (Owen *et al.*, 2013). En cas d'atteinte pathologique de la MO, comme lors d'une infection ou lors de la présence de tumeurs malignes, il peut cependant y avoir une hématopoïèse extra-médullaire (en dehors de la MO) dans d'autres organes comme la rate, le foie et les ganglions lymphatiques (Yang *et al.*, 2020).

Bien au-delà d'être simplement un espace d'entreposage des CSH, la MO agit aussi en tant que niche hématopoïétique riche et complexe et constitue un microenvironnement dans lequel les CSH y reçoivent divers signaux régulant leur fonction et maintien (Morrison & Scadden, 2014). La littérature relève deux potentielles niches hématopoïétiques distinctes à l'intérieur de l'os : **la niche périvasculaire**, entourant les sinusoides principalement retrouvés au centre de l'os, et **la niche endostéale**, se retrouvant près de l'endostéum, un tissu conjonctif recouvrant la partie interne de l'os (Morrison & Scadden, 2014). Ces deux niches hématopoïétiques seront décrites dans les paragraphes suivants.

1.4.1 Niche périvasculaire

La niche périvasculaire est située principalement au centre de l'os. L'identification de nouveaux marqueurs permettant de différencier les CSH des progéniteurs engagés et cellules matures ont permis de déterminer la localisation des CSH dans les tissus de MO *in vivo* (Kiel *et al.*, 2005; Morrison & Scadden, 2014). Les chercheurs démontrent que les CSH se retrouvent le plus souvent en contact avec les sinusoides vascularisant celle-ci et révèlent donc l'importance de la niche endothéliale ou périvasculaire (Kiel *et al.*, 2005). Les cellules endothéliales formant les

sinusoïdes sont donc très importantes, sachant que les CSH sont majoritairement retrouvées en contact avec celles-ci (Kiel *et al.*, 2005). De plus, les CSH sont également retrouvées en contact avec les cellules stromales/souches mésenchymateuses ou *mesenchymal stem/stromal cells* (MSC) près des vaisseaux sinusoïdaux (Méndez-Ferrer *et al.*, 2010; Morrison & Scadden, 2014). Les MSC sont des cellules souches indifférenciées qui peuvent également s'auto-renouveler et se différencier pour générer les cellules formant les tissus mésenchymateux comme les os, le cartilage, les muscles et les tissus graisseux. Les MSC peuvent donc se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes (Pittenger *et al.*, 1999) et peuvent sous certaines conditions se différencier en myocytes et en cellules endothéliales *in vitro* (Oswald *et al.*, 2004; Wakitani *et al.*, 1995).

Les cellules endothéliales et les MSC de la niche périvasculaire assurent le maintien des CSH de plusieurs façons. D'abord, ces cellules sécrètent un facteur de croissance essentiel aux CSH : le kit-ligand ou *stem-cell factor* (Scf) (Ding *et al.*, 2012; Morrison & Scadden, 2014). Le Scf se lie au récepteur proto-oncogène c-kit ou cluster de différenciation 117 (c-kit/CD117) de type tyrosine kinase à la surface des CSH et permet l'activation des voies de signalisation permettant la croissance et le maintien des CSH (Ogawa *et al.*, 1993). Une étude dans laquelle la protéine verte fluorescente ou *green-fluorescent protein* (GFP) fut introduite dans le locus Scf a permis d'identifier l'expression de Scf principalement concentrée au tour des sinusoïdes de la MO et dont la perte réduit drastiquement la fréquence des CSH dans la MO (Ding *et al.*, 2012). En utilisant des modèles *knock-out* conditionnels, cette étude démontre que la perte d'expression du ligand Scf dans les ostéoblastes, qui tapissent la cavité endostéale et ont pour rôle de former l'os, ainsi que la perte de sécrétion de Scf par les CSH n'ont eu aucune conséquence sur le réservoir de CSH (Ding *et al.*, 2012). Toutefois, la déplétion de Scf dans les MSC exprimant le récepteur leptine, permettant d'identifier les MSC responsables de la formation de l'os dans la MO, et la déplétion de Scf dans les cellules endothéliales altèrent complètement le réservoir de CSH en entraînant la perte de celles-ci (Zhou *et al.*, 2014). Le facteur de croissance Scf est donc essentiel au maintien des CSH dans la MO adulte, particulièrement sous sa forme membranaire, et agit donc de façon extrinsèque aux CSH via les MSC et cellules endothéliales qui expriment fortement la forme Scf membranaire et permet leur liaison au récepteur c-kit sur les CSH et l'activation des divers voies de signalisation cibles (Morrison & Scadden, 2014).

Le ligand de chimiokine CXCL12 (CXCL12) est également un facteur essentiel au maintien des CSH (Ding & Morrison, 2013). La CXCL12, sécrétée majoritairement par les MSC, par les cellules endothéliales et par les ostéoblastes, assure la rétention des CSH à l'intérieur de la MO (Ding & Morrison, 2013; Morrison & Scadden, 2014). En effet, la perte de CXCL12 dans les MSC entraîne l'augmentation significative des CSH dans la rate et le sang, puisqu'elles ne sont plus attirées vers la MO (Ding & Morrison, 2013). L'expression de CXCL12 par les cellules endothéliales contribue également au maintien du réservoir de CSH, car ce dernier diminue lorsque CXCL12 est retiré des cellules endothéliales, mais n'entraîne quant à lui pas la sortie des CSH dans le sang ou la rate (Ding & Morrison, 2013). Les ostéoblastes, qui tapissent l'endostéum, peuvent également sécréter le CXCL12, toutefois cette expression n'est pas essentielle au maintien des CSH, mais plutôt aux cellules s'engageant vers la lignée lymphoïde (Ding & Morrison, 2013). La CXCL12 agit en se liant au récepteur CXCR4 sur les CSH. La signalisation CXCL12-CXCR4 est cruciale au maintien du réservoir de CSH dans la MO, puisque la délétion de CXCR4 chez les CSH altère de la même façon la fréquence des CSH et le processus d'hématopoïèse en plus d'augmenter la sensibilité des CSH aux stress myélotoxiques (Sugiyama *et al.*, 2006). Ainsi, la délétion du récepteur CXCR4 entraîne la même perte de fonction des CSH que la délétion de CXCL12 (Zou *et al.*, 1998). De plus, des facteurs indirects comme l'innervation de l'os par le système nerveux sympathique ou l'élimination des neutrophiles âgés dans la MO par les macrophages sont des éléments extrinsèques pouvant augmenter l'expression de CXCL12 dans la MO (Casanova-Acebes *et al.*, 2013; Morrison & Scadden, 2014). En somme, la niche périvasculaire et les facteurs retrouvés dans celle-ci sont essentiels au maintien des CSH.

1.4.2 Niche endostéale

La niche endostéale se retrouve près de l'endostéum tapissant l'intérieur des os. Près de l'endostéum se retrouvent les ostéoclastes et les ostéoblastes interagissant de près et ayant pour rôles respectifs la résorption et la formation du tissu osseux. Les ostéoblastes possèdent un rôle crucial dans l'hématopoïèse en assurant le maintien du réservoir de cellules progénitrices. En effet, la MO est un organe lymphoïde primaire dans lesquels les lymphocytes B sont générés et portés à maturation avant de quitter celle-ci pour rejoindre la circulation. Les études démontrent que les ostéoblastes sont essentiels au développement des progéniteurs lymphoïdes communs et des lymphocytes B à partir des CSH (Ding & Morrison, 2013; Zhu *et al.*, 2007). Donc, bien que cette niche ne régule pas directement le réservoir de CSH, elle pourrait influencer leur maintien indirectement et est essentielle pour les progéniteurs plus

différenciés (Morrison & Scadden, 2014). En bref, autant la niche périvasculaire que la niche endostéale ont l'habileté de réguler la fonction et le devenir des CSH et constituent tous deux des microenvironnements complets et complexes capables d'interagir avec celles-ci.

1.5 Facteurs importants dans le maintien des CSH

Outre les facteurs essentiels discutés plus-haut, soient le Scf et CXCL12, il existe beaucoup d'autres facteurs également importants dans le maintien des CSH. Par exemple, la thrombopoïétine (TPO), sécrétée par le foie et les reins, est une cytokine essentielle au maintien des CSH dans la MO (Morrison & Scadden, 2014; Qian *et al.*, 2007) et à la différenciation des CSH en mégacaryocytes qui sont les précurseurs des plaquettes responsables de la coagulation (Kaushansky, 1997). De plus, les cellules de Schwann non-myélinisantes, responsables du maintien des nerfs sympathiques dans la MO, permettent la quiescence des CSH (Morrison & Scadden, 2014; Yamazaki *et al.*, 2011). En effet, pour maintenir leur fonction et leur capacité d'auto-renouvellement, les CSH doivent être maintenues en état de quiescence jusqu'à ce qu'un stress hématopoïétique survienne et nécessite la sortie de la période de quiescence pour entamer la prolifération (l'activité proliférative des CSH sera discuté plus tard dans la **section 1.7**). Les cellules de Schwann non-myélinisantes assurent la quiescence des CSH par l'activation du facteur de croissance transformant bêta, ou *transforming growth factor beta* (TGF- β) exprimé dans la MO sous forme latente (Yamazaki *et al.*, 2011). Le TGF- β se lie aux récepteurs du TGF- β sur les CSH, inhibe les voies prolifératives et active les inhibiteurs de cycle cellulaire (Yamazaki *et al.*, 2006). Ensuite, un autre facteur soluble, l'angiopoïétine 1 (Ang-1), important dans l'angiogenèse et le développement vasculaire, permet également le maintien de la quiescence chez les CSH et augmente leur capacité de reconstitution à long terme dans des souris létalement irradiées (Arai *et al.*, 2004). L'Ang-1 se lie au récepteur tyrosine-kinase de type 2 (Tie2), présents sur les cellules endothéliales et CSH ce qui active une voie de signalisation favorisant la quiescence (Arai *et al.*, 2004). Enfin, la chimiokine CXCL4, ou le facteur plaquettaire 4 (CXCL4, PF4), sécrétée par les mégacaryocytes dans la MO, assure le maintien et la quiescence des CSH en régulant leur entrée en cycle cellulaire (Bruns *et al.*, 2014).

D'autres facteurs permettant la mobilisation des CSH en dehors de la MO dans la circulation périphérique sanguine, comme le facteur de stimulation des colonies granulocytes ou *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF), permettent le prélèvement moins invasif des

CSH notamment avant une greffe de MO (Greenbaum & Link, 2011). Finalement, des signaux inflammatoires peuvent aussi réguler la différenciation des CSH. Par exemple, l'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine pro-inflammatoire qui n'est pas essentielle en conditions homéostatiques, mais qui permet la réponse d'urgence des CSH en réponse à une infection ou à une atteinte hématopoïétique en favorisant la différenciation myéloïde et en inhibant la différenciation lymphoïde (Mirantes *et al.*, 2014).

1.6 Différenciation des CSH dans la MO

L'hématopoïèse est un processus dans lequel les CSH se différencient en progéniteurs multipotents qui se différencient à leur tour pour générer les différentes cellules sanguines matures. Il est actuellement compris que les divisions cellulaires des jeunes CSH sont principalement asymétriques (Congdon & Reya, 2008; Florian *et al.*, 2018), dans lesquelles une CSH permettrait la génération, à partir d'une CSH mère, d'une cellule fille identique à elle-même, permettant de maintenir le réservoir de CSH stable dans la MO, ainsi que d'une cellule fille progénitrice, permettant le renouvellement quotidien des cellules sanguines. Toutefois, selon les différents signaux reçus, des divisions symétriques des CSH pourraient aussi avoir lieu en deux occasions : d'une part pour générer deux CSH et assurer le renouvellement du réservoir de cellules souches, d'autre part pour générer deux cellules filles différenciées en progéniteurs engagés (Congdon & Reya, 2008). Le choix du type de division favorisé diffère grandement en fonction de l'âge des CSH. En effet, les jeunes CSH polaires favorisent la division asymétrique tandis que les CSH âgées apolaires se divisent plutôt symétriquement favorisant l'auto-renouvellement, conférant un rôle important au contrôle de la polarité dans la symétrie de division des CSH (Florian *et al.*, 2018).

Les CSH se différencient d'abord en cellules progénitrices et contrairement aux CSH qui sont multipotentes et peuvent s'auto-renouveler tout au long de la vie, les cellules progénitrices quant à elles, toujours immatures mais engagées, ont un pouvoir d'auto-renouvellement de degré moindre. En effet, suite à une greffe de MO, le réservoir de cellules progénitrices disparaît habituellement 2 à 3 semaines post-transplantation (Doulatov *et al.*, 2010; Laurenti & Göttgens, 2018). Ainsi, les CSH sont les seules cellules capables d'assurer à long terme la reconstitution hématopoïétique. Lors de l'analyse fonctionnelle des CSH par transplantation de MO et suivi de la reconstitution hématopoïétique, il est important d'évaluer la reconstitution hématopoïétique au-delà de 16 à 20 semaines post-transplantation afin de s'assurer de la

contribution unique des CSH et même d'effectuer des transplantations en séries pour évaluer la fonctionnalité des CSH à plus long terme (ces méthodes sont discutées en détail dans le chapitre ***Experimental Competitive Bone Marrow Transplant Assays***).

Ainsi, le réservoir de CSH, perçu comme homogène avant les années 2000, est désormais plutôt considéré comme une population complexe et hétérogène où l'on retrouve plusieurs types de progéniteurs (Laurenti & Göttgens, 2018). Tel qu'illustré à la **Figure 1.1**, nous retrouvons d'abord dans ce réservoir les CSH à long-terme ou *long-term HSC* (LT-HSC), qui ont la capacité de reconstituer le système hématopoïétique complet d'un hôte irradié à long terme (c'est-à-dire au-delà de 16 semaines). Les LT-HSC se différencient ensuite pour générer les CSH à court-terme ou *short-term HSC* (ST-HSC), qui ont quant à eux une capacité de reconstitution plus courte que les LT-HSC (Cheng *et al.*, 2020). Puis, les CSH se différencient ensuite en progéniteurs multipotents ou *multipotent progenitors* (MPP) de façon irréversible. Les MPP forment également une population hétérogène où l'on retrouve plusieurs types de cellules progénitrices multipotentes, les MPP2, MPP3 et MPP4, dans lesquels chaque sous-population possède un certain biais de différenciation. En effet, les MPP2 sont biaisés pour la lignée myéloïde, favorisant principalement la production des mégacaryocytes et érythrocytes (Pietras *et al.*, 2015). Les MPP3 sont également biaisés vers la lignée myéloïde, mais favorisent plutôt la production des monocytes, macrophages et granulocytes (Pietras *et al.*, 2015). Enfin, les MPP4, également appelés *lymphoid-primed multipotent progenitors* (LMPP), sont biaisés vers la lignée lymphoïde et génèrent principalement des lymphocytes, mais peuvent également contribuer à la lignée myéloïde (Pietras *et al.*, 2015).

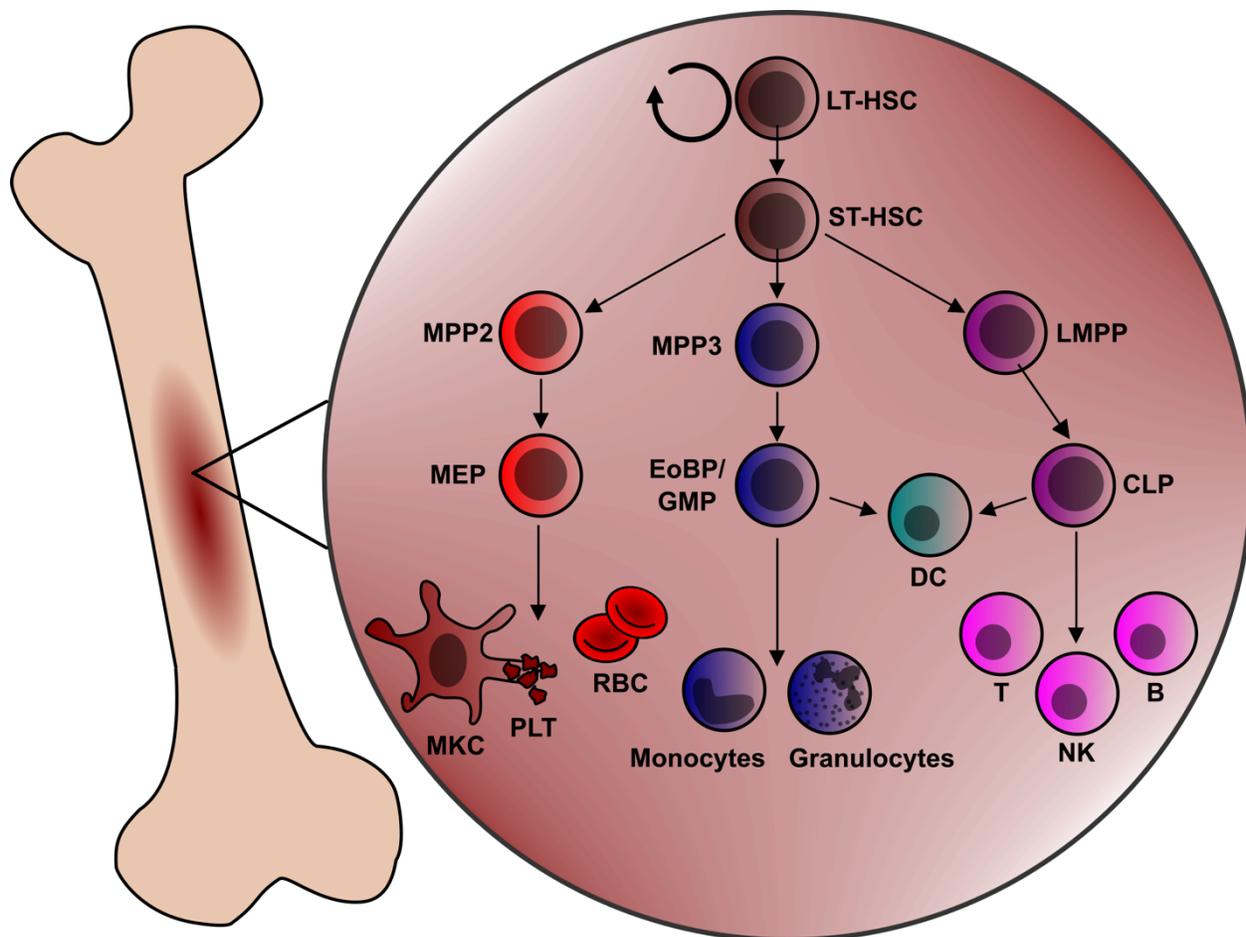


Figure 1.1 Hématopoïèse dans la moelle osseuse

Schéma simplifié de l'hématopoïèse adulte. Au haut de la pyramide se retrouvent les cellules souches hématopoïétiques à long-terme (LT-HSC) et à court-terme (ST-HSC) qui peuvent d'une part s'auto-renouveler et d'autre part se différencier en progéniteurs multipotents (MPP2, MPP3 et LMPP). Les progéniteurs multipotents se différencieront à leur tour en progéniteurs engagés myéloïdes ou lymphoïdes, qui généreront à leur tour les cellules sanguines matures. CLP : progéniteurs lymphoïdes communs, DC : cellules dendritiques, EoBP : progéniteurs éosinophiles-basophiles, GMP : progéniteurs granulocytes-monocytes, LMPP : progéniteurs multipotents à biais lymphoïde, MEP : progéniteurs mégacaryocytes-érythrocytes, MKC : mégacaryocytes, MPP : progéniteurs multipotents, NK : *natural killers*, PLT : plaquettes, RBC : globules rouges ou *red blood cells*, T et B : lymphocytes T et B.

Aujourd'hui, différents marqueurs de surface cellulaire ont été identifiés pour caractériser phénotypiquement le réservoir de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC), entre autres dans l'objectif de faciliter leur analyse par cytométrie en flux et autres techniques d'imagerie cellulaire. Chez la souris, les LT-HSC, les ST-HSC et les MPP ne possèdent aucun marqueur de surface cellulaire mature et ne sont pas définitivement engagé dans une lignée spécifique, ils sont donc tous linéage négatif (Lin⁻). De plus, les HSPC expriment tous le *stem-cell antigen 1* (SCA-1/LY6A), dont la fonction reste toujours à élucider (Morcos *et al.*, 2017), et le c-kit/CD117 qui est le récepteur du Scf. Par conséquent, les LT-HSC, ST-HSC et les MPP se retrouvent tous dans une population phénotypique commune : les cellules Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK) (Okada *et al.*, 1992).

Par la suite, l'identification des récepteurs de type SLAM (*signaling lymphocytic activation molecule*), importants dans l'adhésion cellulaire lors de la présentation antigénique, ont permis une meilleure distinction phénotypique des différentes populations constituant le réservoir de HSPC. En effet, les récepteurs *cluster de différenciation 150* (CD150) et *cluster de différenciation 48* (CD48) sont différenciellement exprimés par les CSH et MPP (Kiel *et al.*, 2005). À partir d'une pré-sélection sur les cellules LSK, l'utilisation d'anticorps ciblant les marqueurs différenciellement exprimés par les CSH et MPP permet donc leur séparation en sous-populations. Par exemple, les progéniteurs MPP2 et MPP3 expriment tous deux CD48 alors que les ST-HSC et LT-HSC ne l'expriment pas (Kiel *et al.*, 2005). De plus, les MPP4/LMPP expriment fortement le récepteur *fms like tyrosine kinase 3* (Flt3) également appelé *cluster de différenciation 135* (CD135), contrairement aux MPP2, MPP3 et aux CSH, et n'expriment pas le CD150 (Mooney *et al.*, 2017). De cette façon, tel que décrit dans le **Tableau 1.1** et tel qu'illustré à la **Figure 1.2**, il est possible de distinguer les MPP2 (LSK⁺CD135⁻CD48⁺CD150⁺), les MPP3 (LSK⁺CD135⁻CD48⁺CD150⁻), les MPP4/LMPP (LSK⁺CD135⁺CD150⁻), les ST-HSC (LSK⁺CD135⁻CD48⁻CD150⁻) et enfin les LT-HSC (LSK⁺CD135⁻CD48⁻CD150⁺) en ciblant ces différents marqueurs. En bref, la caractérisation phénotypique des CSH et cellules progénitrices permet aujourd'hui leur caractérisation et facilite grandement leur analyse à travers des techniques comme la cytométrie en flux permettant de cibler ces différents marqueurs de surface cellulaire à l'aide d'anticorps spécifiques.

Tableau 1.1 Identification des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques

HSPC murines	Marqueurs de cellules matures	Sca-1	CD117/c-kit	CD135	CD150	CD48
LSK	-	+	+	+	+	+
LT-HSC	-	+	+	-	+	-
ST-HSC	-	+	+	-	-	-
MPP2	-	+	+	-	+	+
MPP3	-	+	+	-	-	+
MPP4/LMPP	-	+	+	+	-	+

Présentation des différents marqueurs phénotypiques utilisés pour l'identification des cellules souches hématopoïétiques à long-terme (LT-HSC) et à court-terme (ST-HSC) et les progéniteurs multipotents (MPP2, MPP3 et MPP4/LMPP) pouvant être ciblés par cytométrie en flux.

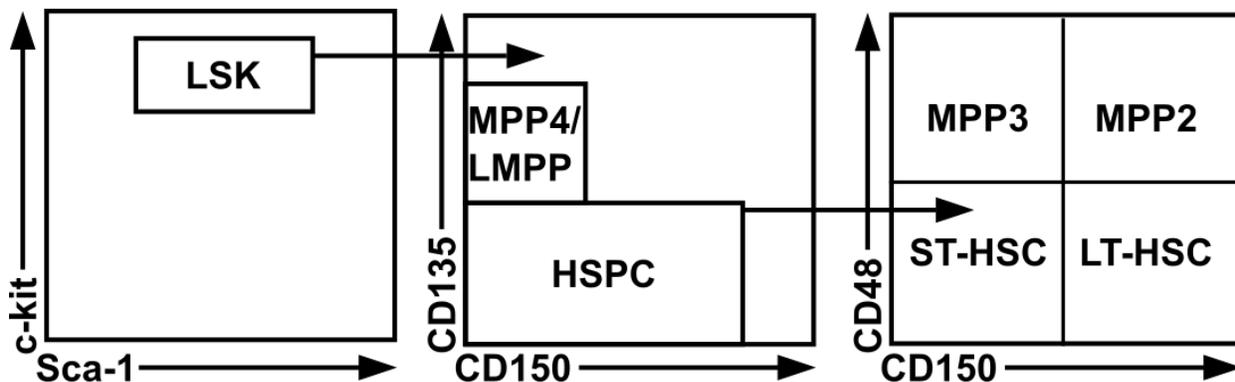


Figure 1.2 Identification des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques par cytométrie en flux

À partir de la population des LSK, il est possible d'identifier les cellules souches hématopoïétiques à long-terme (LT-HSC) et à court-terme (ST-HSC) ainsi que les progéniteurs multipotents (MPP2, MPP3 et MPP4/LMPP) par cytométrie en flux (voir Tableau 1.1 pour les différents marqueurs utilisés).

1.7 Activité proliférative des CSH

L'activité proliférative des CSH est hautement régulée en fonction du temps et des besoins de l'organisme. Par exemple, les caractéristiques prolifératives d'une CSH foétale, adulte ou âgée ne sont pas les mêmes. Tel que décrit dans la littérature, il est possible d'étudier le cycle cellulaire des CSH par cytométrie en flux en distinguant les cellules ne possédant qu'une seule copie d'ADN (CSH quiescentes en G₀ et en phase de préparation à la duplication en G₁) des cellules qui possèdent deux copies d'ADN (CSH en phases prolifératives S-G₂-M) par une coloration au DAPI, une molécule fluorescente liant les bases adénines et thymines de l'ADN (Szade *et al.*, 2016). Ensuite, il est possible de distinguer les cellules quiescentes en sortie du cycle cellulaire (G₀) des cellules en prolifération (G₁ et S-G₂-M) en ciblant la protéine nucléaire

chromosomique Ki-67 qui est exprimée uniquement par les cellules en prolifération (Szade *et al.*, 2016). Les sections suivantes présenteront les principales caractéristiques prolifératives des CSH fœtales, adultes et enfin, âgées.

1.7.1 Cycle cellulaire des CSH fœtales

Les CSH fœtales sont activement en prolifération cellulaire avant la naissance. En effet, celles-ci doivent rapidement constituer le réservoir de CSH qui perdurera tout au long de la vie adulte en plus de générer les cellules sanguines matures requises pour la construction d'un système immunitaire complet (Pietras *et al.*, 2011). Pour ces raisons, pratiquement toutes les CSH sont en phase active de prolifération durant la période embryonnaire et, à l'inverse, seulement 0,02% des CSH fœtales sont quiescentes (Pietras *et al.*, 2011). Cette principale caractéristique des CSH fœtales, qui est leur grande activité proliférative, changera drastiquement après la naissance tel qu'il sera décrit ci-dessous.

1.7.2 Cycle cellulaire des CSH adultes

Contrairement à la période fœtale, la principale caractéristique des CSH adultes est plutôt leur état de quiescence. La quiescence, ou la phase G₀, est un état réversible et essentiel à la préservation de l'intégrité et du bon fonctionnement des CSH tout au long de la vie adulte. Une perte de quiescence des CSH entraîne une perte de fonction par épuisement, notamment en conséquence à une perte d'auto-renouvellement causant la diminution du nombre de CSH dans la MO (Orford & Scadden, 2008; Pietras *et al.*, 2011). Les CSH sont toutefois capables de sortir transitoirement de leur état de quiescence pour proliférer et répondre à un stress quelconque comme une infection, puis retournent ensuite à leur état de quiescence (Wilson *et al.*, 2008). Chez la souris, une CSH se divise environ une fois tous les 145 jours, soit environ cinq fois au total pour une souris ayant une espérance de vie de deux ans (Wilson *et al.*, 2008). Chez l'humain, une CSH se diviserait une fois tous les trois mois à trois ans (Catlin *et al.*, 2011). De plus, des études chez la souris démontrent que près de 90 à 95% des CSH adultes sont quiescentes et ne se divisent pas ou très peu, c'est-à-dire que près de 1% de ces cellules dormantes sont en cycle cellulaire sur une période de 24 heures (Pietras *et al.*, 2011). Les CSH dites actives représentent 5 à 10% du réservoir de CSH et parmi celles-ci, près de 5 à 10% entrent en prolifération sur une période de 24 heures (Pietras *et al.*, 2011). Ces CSH actives s'occupent notamment d'assurer le renouvellement homéostatique et équilibré des cellules sanguines quotidiennement. Ceci différencie les CSH des MPP et progéniteurs engagés qui

sont beaucoup plus actifs dans le cycle cellulaire. En effet, plus les cellules sont différenciées dans la pyramide d'hématopoïèse et plus elles se divisent, impliquant donc un effet amplificateur de division cellulaire au fur et à mesure de la différenciation hématopoïétique (Laurenti & Göttgens, 2018).

L'état de quiescence des CSH, entre autres caractérisé par une faible synthèse protéique et un métabolisme glycolytique, est hautement régulé par des processus cellulaires extrinsèques et intrinsèques (Johnson *et al.*, 2020). Plusieurs facteurs extrinsèques aux CSH capables de réguler leur quiescence ont déjà été discutés précédemment dans les **sections 1.4 et 1.5**. Quant aux facteurs intrinsèques, ceux-ci régulent la quiescence des CSH en agissant directement sur le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Parmi les régulateurs intrinsèques du cycle cellulaire, les kinases dépendantes des cyclines (CDK) 4 et 6 régulent négativement la quiescence et peuvent agir comme des marqueurs d'état de quiescence chez les CSH (Johnson *et al.*, 2020). En effet, en temps normal, à la sortie de la quiescence ou phase G₀, la protéine du rétinoblastome (pRB) est phosphorylée par les complexes cyclines D/CDK6 et les complexes cycline E/CDK2 ce qui induit un changement de conformation et entraîne la dissociation du facteur de transcription E2F, permettant ainsi la transcription des gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire (Johnson *et al.*, 2020). L'activation du complexe CDK4/6 permet de soutenir l'hyperphosphorylation de la pRB en l'entrée en phase G₁, ce qui permet le passage du point de restriction et la progression du cycle cellulaire indépendamment de signaux prolifératifs externes (Johnson *et al.*, 2020). Les niveaux d'expression de CDK6 sont donc un important marqueur de quiescence. En effet, les LT-HSC ont des niveaux indétectables de CDK6 à l'inverse des ST-HSC qui ont de niveaux élevés de CDK6, ce qui permet à ces-dernières de raccourcir le temps requis pour sortir de la phase G₀ et entrer en phase G₁ (Johnson *et al.*, 2020; Laurenti *et al.*, 2015). Ainsi, malgré que ces deux sous-populations de CSH soient toutes deux quiescentes, elles possèdent différentes capacités à entrer en cycle cellulaire par la régulation de CDK6 (Johnson *et al.*, 2020; Laurenti *et al.*, 2015). À l'opposé, les inhibiteurs de CDK comme p21 et p57 sont quant à eux connus pour induire l'arrêt du cycle cellulaire et réguler positivement la quiescence des CSH (Li, 2011). Plusieurs facteurs de transcriptions peuvent également réguler positivement la quiescence des CSH comme Gfi-1 (Hock *et al.*, 2004), Pbx1 (Ficara *et al.*, 2008), p53 (Liu *et al.*, 2009), Scl (Lacombe *et al.*, 2010) et plusieurs autres (Li, 2011).

1.7.3 Cycle cellulaire des CSH âgées

Enfin, les CSH âgées possèdent tout autant des différences quant à leur activité proliférative. De nombreuses conséquences du vieillissement de l'organisme altèrent le bon fonctionnement des CSH. La majorité des CSH âgées, soit environ 95% de celles-ci, sont toujours quiescentes, néanmoins leur équilibre est fortement altéré (Pietras *et al.*, 2011). En effet, avec le vieillissement, il y a une expansion du réservoir de CSH par auto-renouvellement accru de CSH ayant un biais myéloïde (Beerman *et al.*, 2010b), ayant pour conséquence directe la favorisation de la génération des cellules de la lignée myéloïde par rapport à la lignée lymphoïde. Ce déséquilibre peut causer l'apparition de plusieurs maladies hématopoïétiques, dont les leucémies myéloïdes. De plus, ce biais a également pour conséquences une diminution de la production des lymphocytes, entraînant par le fait même une diminution de l'efficacité du système immunitaire adaptatif, et une diminution de la production des globules rouges pouvant mener à une anémie (Beerman *et al.*, 2010b).

Ceci dit, le vieillissement des CSH peut être de causes intrinsèques ou extrinsèques. Des exemples de causes intrinsèques sont l'accumulation de dommages à l'ADN, la sénescence, la perte de polarité cellulaire ou les changements épigénétiques et métaboliques (de Haan & Lazare, 2018). Le vieillissement des CSH est également influencé par des facteurs extrinsèques, comme le vieillissement de l'environnement médullaire dans la MO qui a aussi un grand rôle à jouer dans celui-ci (Mendelson & Frenette, 2014). Par exemple, la diminution de la présence des MSC à la surface endostéale de la MO affecte la quiescence des CSH (Siclari *et al.*, 2013) et l'augmentation des adipocytes dans la MO régule négativement l'hématopoïèse (Naveiras *et al.*, 2009).

1.8 Voies de signalisation Wnt dans le maintien des CSH

De nombreux facteurs influençant l'activité proliférative et le maintien des CSH ont été discutés dans les sections précédentes. Dans cette section seront présentés d'autres régulateurs des voies prolifératives des CSH : **les protéines Wnt**. Ces protéines sont retrouvées dans la MO et régulent le devenir des CSH via trois différentes voies de signalisation connues : la voie Wnt/ β -caténine, la voie Wnt/Calcium (Ca^{2+}) et la voie Wnt/*Planar Cell Polarity* (PCP).

1.8.1 Découverte des protéines Wnt

Les protéines Wnt font partie d'une famille de glycoprotéines hautement conservées à travers l'évolution. Elles furent d'abord découvertes en 1973 chez la drosophile *Drosophila melanogaster* sous le nom de *Wingless* (*wg*), où une mutation à l'allèle *wg* menait à l'altération de la morphogénèse et du développement embryonnaire, causant l'apparition de mutants *wg* aux ailes manquantes (Sharma, 1973). Puis, d'autres études décèlent ensuite que les mutations ne s'arrêtent pas qu'à la formation des ailes, mais s'étendent également à l'organisation de plusieurs tissus, comme la formation du mésothorax, ainsi que l'orientation des poils chez la drosophile (Sharma & Chopra, 1976), et le développement de la tête et des antennes, du système génital, des yeux, etc. (Klingensmith & Nusse, 1994). *Wg* a donc été identifié comme régulateur très important de l'embryogénèse et du développement tissulaire fœtal et adulte. Dans les années 1980 et 1990, la protéine Int-1, un oncogène d'abord identifié pour son rôle dans la formation de carcinomes chez la souris, a été découvert comme étant l'homologue de *wg* chez la drosophile (Nusse & Varmus, 1982; Rijsewijk *et al.*, 1987). Ces protéines ont donc été renommées sous le nom de Wnt (une combinaison de *Wingless* et Int-1) chez les mammifères (van Amerongen & Nusse, 2009). Aujourd'hui, 19 protéines Wnt homologues sont répertoriées chez les mammifères (van Amerongen & Nusse, 2009). Elles sont impliquées dans de nombreux processus durant la morphogénèse et le développement, ainsi que dans le maintien de la polarité des cellules et des tissus, la prolifération, la motilité et la migration cellulaire. Des altérations des protéines Wnt ou de leurs voies de signalisation ont été rapportées dans plusieurs cancers humains, comme les cancers gastro-intestinaux, les mélanomes, les cancers du sein et certaines maladies hématopoïétiques (Zhan *et al.*, 2017).

Les protéines Wnt sont sécrétées par les CSH et par les cellules entourant les CSH dans la MO, leur conférant ainsi une action autocrine et paracrine (Staal *et al.*, 2008). Les protéines Wnt agissent comme ligand des récepteurs à sept passages transmembranaires de la famille

Frizzled (Fzd) également découverts chez la drosophile (Bhanot *et al.*, 1996). Les récepteurs Fzd sont conservés à travers l'évolution et on rapporte aujourd'hui 10 protéines Fzd chez l'homme et la souris (van Amerongen & Nusse, 2009). Les récepteurs Fzd possèdent un domaine riche en cystéine permettant la liaison du ligand et l'activation des diverses voies de signalisation Wnt (Bhanot *et al.*, 1996). Comme mentionné précédemment, les voies de signalisations Wnt/Fzd sont **la voie canonique Wnt/ β -caténine**, la voie **Wnt/ Ca^{2+}** et la voie **Wnt/PCP**.

1.8.2 Voie canonique Wnt/ β -caténine

La voie Wnt/ β -caténine, également appelée voie dépendante de la β -caténine ou la voie canonique, est la plus vastement étudiée et comprise parmi les trois voies de signalisation Wnt. La voie canonique, telle qu'illustrée dans la **Figure 1.3**, est principalement connue pour contrôler la prolifération et différenciation des cellules. En l'absence du ligand Wnt, la β -caténine est séquestrée par un complexe de dégradation qui mène à sa phosphorylation et ultimement à sa destruction par le protéasome. Le complexe de dégradation est formé de plusieurs protéines, dont l'axine 1 ou *axis inhibition protein 1* (AXIN1) et la protéine *adenomatous polyposis coli* (APC) ainsi que les protéines kinases caséine kinase 1 (CK1) et glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β). AXIN1 et APC servent de protéines d'échafaudage en recrutant la β -caténine, menant à sa phosphorylation par CK1 et GSK3 β . Une fois phosphorylée, une ubiquitine ligase au nom de β -Trcp reconnaît les régions phosphorylées de la β -caténine et mène à son ubiquitination qui signalera la dégradation de la protéine par le protéasome. Ainsi, les niveaux cytoplasmiques de β -caténine sont maintenus en faible concentration dans la cellule, ce qui empêche son accumulation et sa translocation nucléaire pour activer les gènes cibles de prolifération (Staal *et al.*, 2008).

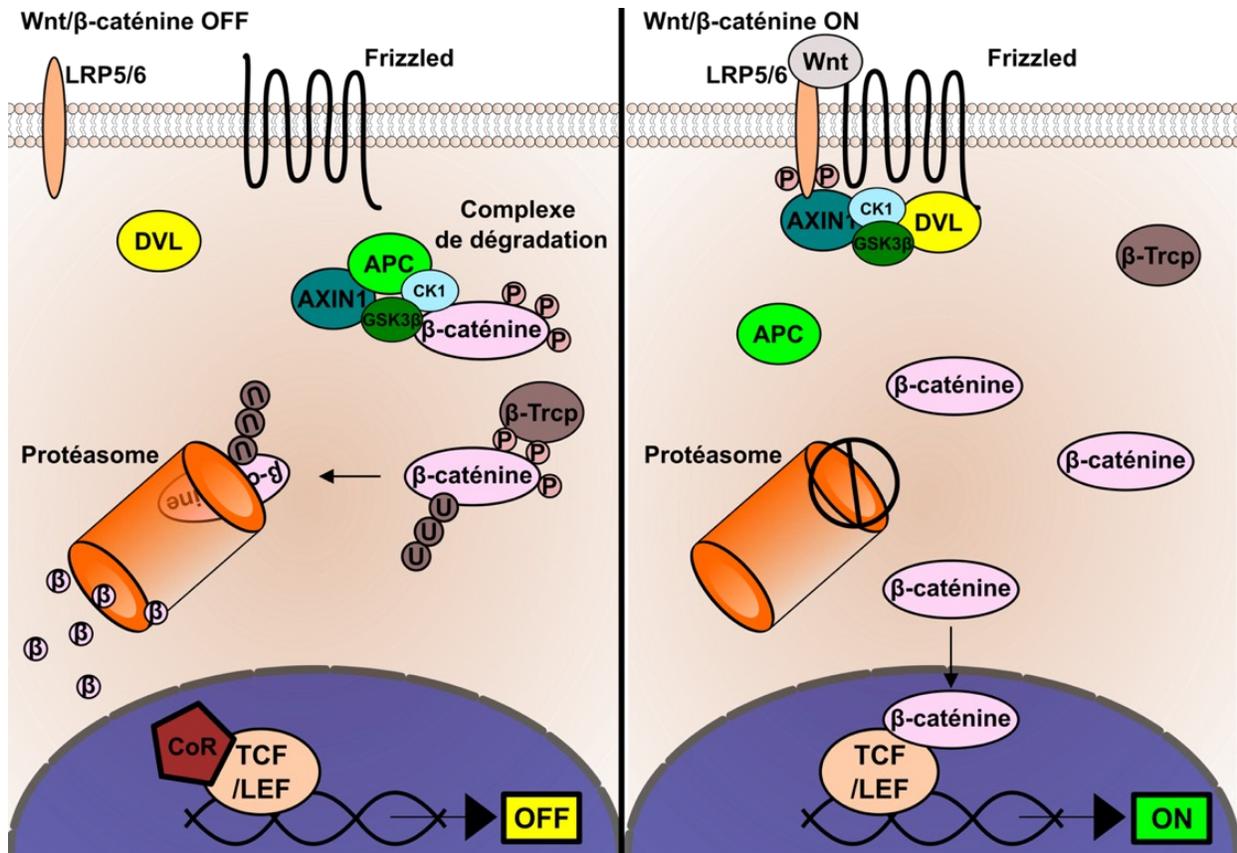


Figure 1.3 Voie canonique Wnt/β-caténine

La voie Wnt canonique inactive (OFF, à gauche) mène à la formation du complexe de dégradation et ultimement à la dégradation de la β-caténine dans le cytoplasme. La voie Wnt canonique activée par la liaison de Wnt à Frizzled (ON, à droite) mène au recrutement des composants du complexe de dégradation à la membrane, inhibant ainsi la dégradation de la β-caténine et permettant son accumulation cytoplasmique, puis sa translocation nucléaire pour la transcription des gènes cibles. Figure inspirée de Staal *et al.*, 2008. APC : *adenomatous polyposis coli*, AXIN1 : axine 1 ou *axis inhibition protein 1*, CK1 : caséine kinase 1, CoR : co-represseurs, DVL : homologue mammifère de Dishevelled, GSK3β : glycogène synthase kinase 3β, LRP5/6 : *LDL-receptor-related protein 5/6*, (P) : phosphorylé, TCF/LEF : *T-cell factor/Lymphoid-enhancer-binding factor*, (U) : ubiquitiné.

Lorsque la voie Wnt/ β -caténine est activée par la liaison de Wnt à son récepteur Fzd et ses corécepteurs LDL-receptor-related protein 5 ou 6 (LRP5/6), le complexe de dégradation est recruté à la membrane empêchant la liaison et la séquestration de la β -caténine. En effet, l'activation des récepteurs Fzd et LRP par la liaison de Wnt mène au recrutement de la protéine cytoplasmique Dishevelled (Dsh) à la membrane. Dsh, chez la drosophile, ou son homologue DVL chez les mammifères, permet ensuite la formation du complexe et le recrutement de CK1 et GSK3 β qui phosphorylent la portion intra-cytoplasmique de LRP. La protéine d'échafaudage AXIN1 peut se lier aux portions phosphorylées de LRP, ce qui inhibe la formation du complexe de dégradation dans le cytoplasme. Ainsi, la β -caténine n'est pas séquestrée, phosphorylée et ubiquitinée et n'est pas ciblée vers le protéasome pour dégradation. De ce fait, l'activation de la voie canonique mène ultimement à l'accumulation des niveaux cytoplasmiques de β -caténine. Ceci permet la translocation nucléaire de la β -caténine, où cette dernière se lie aux facteurs de transcriptions *T-cell factor*/Lymphoid-enhancer-binding factor (TCF/LEF) sur l'ADN et interagit avec d'autres cofacteurs pour entamer la transcription des gènes de prolifération cibles de Wnt (Staal *et al.*, 2008).

La signalisation Wnt/ β -caténine a largement été étudiée dans les CSH et est principalement réputée pour réguler leur l'auto-renouvellement. La voie canonique inhibe la perte des CSH par différenciation et son altération mène à la perte de fonction et de reconstitution des CSH (Luis *et al.*, 2012; Scheller *et al.*, 2006). De plus, la régulation du niveau d'activation de la voie canonique est essentielle, car une suractivation la voie Wnt/ β -caténine mène à la perte du réservoir de CSH, tandis qu'une légère augmentation de cette voie pourrait améliorer l'efficacité de reconstitution des CSH *in vivo* (Luis *et al.*, 2011). La signalisation Wnt est donc dose-dépendante et doit être régulée en fonction du type cellulaire. Elle joue aussi un rôle dans la différenciation des CSH et des progéniteurs durant l'hématopoïèse, autant pour la lignée lymphoïde que myéloïde (Luis *et al.*, 2012; Luis *et al.*, 2011). La signalisation Wnt/ β -caténine est également régulée en fonction du temps. Par exemple, la voie Wnt/ β -caténine est plus active durant l'hématopoïèse fœtale qu'adulte, logiquement par le besoin accru de prolifération fœtale discuté plus haut (Kwarteng *et al.*, 2018). La β -caténine favorise la reconstitution à court terme des CSH fœtales et sa perte perturbe leur quiescence (Kwarteng *et al.*, 2018). De plus, des altérations dans la voie Wnt canonique ont été identifiées dans de nombreux types de leucémies (Luis *et al.*, 2012). Par exemple, dans le modèle murin de la leucémie myéloïde chronique (CML), il a été démontré que l'activation de la β -caténine est cruciale à la survie des

cellules leucémiques résistantes au traitement à l'imatinib utilisé pour traiter les CML chez l'humain (Hu *et al.*, 2009). À l'inverse, la délétion de la β -caténine pouvait retarder la progression de la maladie en empêchant l'auto-renouvellement des cellules cancéreuses et normales (Zhao *et al.*, 2007).

1.8.3 Voie non-canonique Wnt/Ca²⁺

La voie Wnt/Ca²⁺ contrôle l'influx calcique dans la cellule menant à l'activation de facteurs de transcription cibles. Tel qu'illustré à la **Figure 1.4**, lorsque Wnt se lie à son récepteur Fzd, le complexe Wnt-Fzd, couplé à une protéine G, mène au recrutement et à l'activation de DVL à la membrane ce qui mène à l'activation de l'enzyme membranaire phospholipase C (PLC). La PLC clive le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) présent dans la membrane en inositol triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). La DAG mène ensuite à l'activation de la protéine kinase C (PKC), qui à son tour active la calcineurine. L'IP₃ se diffuse par la suite dans le cytoplasme, puis lie ses récepteurs intracellulaires sur le réticulum endoplasmique, tel qu'illustré à la **Figure 1.4**, permettant alors le relargage du calcium dans le cytoplasme et menant à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire. La forte concentration calcique initiée par la sortie des réserves calciques mène à l'activation de la phosphatase calcineurine et autres protéines kinases dépendantes au calcium comme la calmoduline kinase II (CAMKII). Enfin, la calcineurine, la CAMKII et la PKC activent divers facteurs de transcription : le *nuclear factor of activated T cells* (NFAT), le *nuclear factor- κ B* (NF κ B) et le *C-AMP Response Element-binding protein* (CREB), ce qui mène à leur translocation dans le noyau et à l'initiation de la transcription des gènes cibles (De, 2011). La voie calcique, bien que moins connue que la voie canonique, est connue pour avoir un rôle dans le développement embryonnaire, dans le maintien des cellules souches et neuronales et dans certaines réponses inflammatoires (De, 2011). Enfin, cette voie, souvent inhibée dans un contexte malin, contrairement à la voie canonique, pourrait avoir un rôle dans la suppression tumorale (De, 2011).

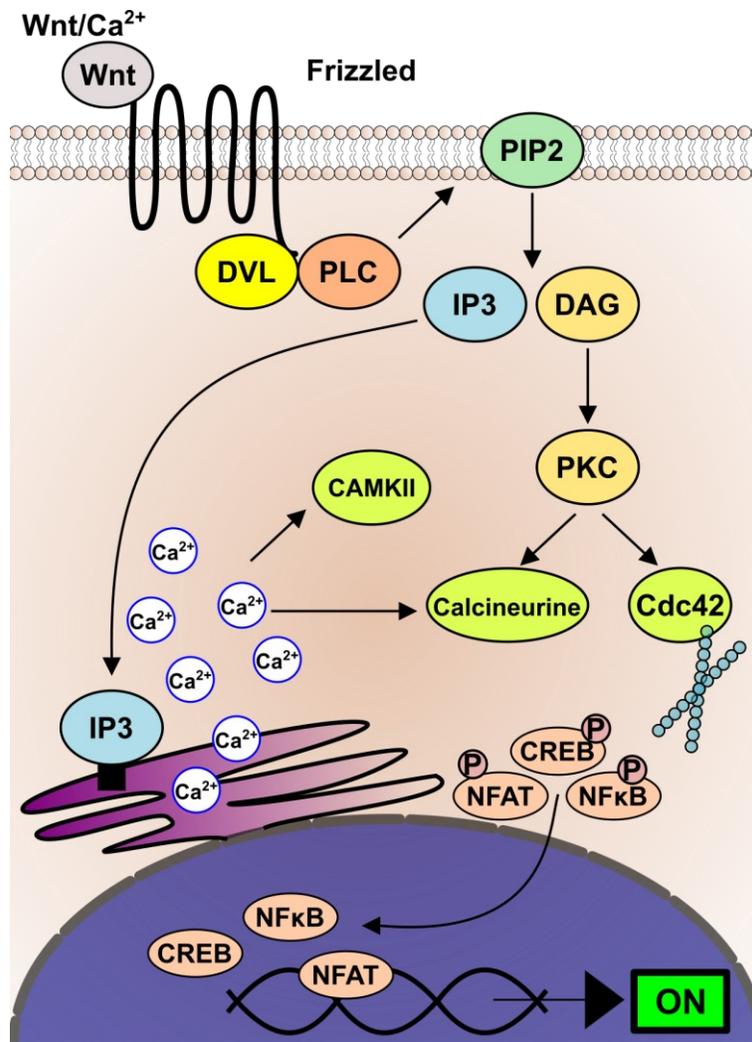


Figure 1.4 Voie Wnt/Ca²⁺

L'activation de la voie calcique par la liaison de Wnt à Frizzled recrute DVL et active l'enzyme phospholipase C (PLC) qui mène à la dégradation du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). DAG mène à l'activation de la protéine kinase C (PKC) qui active les protéines calcineurine et Cdc42, et l'IP₃ permet le relargage de calcium (Ca²⁺) du réticulum endoplasmique au cytoplasme, menant à l'activation de la calcineurine et des protéines kinases dépendantes au calcium dont la calmoduline kinase II (CAMKII). Les facteurs de transcriptions CREB, NFAT et NFκB sont activés, ce qui permet leur translocation dans le noyau et la transcription des gènes cibles. Figure inspirée de Staal *et al.*, 2008.

La protéine Cdc42 ou *cell division cycle 42* est une protéine de type Rho-GTPases activée par la PKC dans la voie Wnt/Ca²⁺. Cdc42 est principalement reconnue pour son rôle dans la modélisation du cytosquelette et il a également été démontré qu'elle joue un rôle important dans le vieillissement des CSH (Florian *et al.*, 2012). En effet, la surexpression de Cdc42 accélère le vieillissement de jeunes CSH par perte de polarité et de quiescence (Florian *et al.*, 2012). À

l'inverse, la diminution de Cdc42 permet le rétablissement de la polarité et de la fonction des CSH âgées (Florian *et al.*, 2012). De plus, Frizzled-6 (Fzd6), reconnu comme étant un récepteur principal de la voie non-canonique Wnt/PCP (Chang *et al.*, 2016), régule négativement l'activation de la voie Cdc42 (Abidin *et al.*, 2015), ce qui confère un rôle important de Fzd6 dans le maintien et le renouvellement des CSH à long terme. Il a été aussi démontré qu'une déficience en Cdc42 entraîne la perte de polarité des CSH et un défaut de division asymétrique qui est essentiel à leur auto-renouvellement (Mizukawa *et al.*, 2017). Ceci dit, Cdc42 est actuellement utilisé comme marqueur de polarité des CSH.

1.8.4 Voie non-canonique Wnt/Polarité ou Wnt/PCP

La voie Wnt/Polarité, ou Wnt/PCP (*Planar Cell Polarity* ou polarité cellulaire planaire) est une des voies les moins étudiées dans les CSH. Comme son nom l'indique, cette voie est responsable de l'organisation des cellules sur un axe donné en contrôlant leur polarité par rapport à un plan (Seifert & Mlodzik, 2007). La voie Wnt/PCP est indépendante de la β -caténine. Chez la drosophile, la présence des protéines Wnt ne semble pas essentielle à l'activation de la voie PCP, contrairement aux vertébrés (Seifert & Mlodzik, 2007). Chez les vertébrés, des ligands appartenant à la famille Wnt, comme Wnt5b et Wnt11, se lient au récepteur Fzd de la voie PCP (Staal *et al.*, 2008). Tel qu'illustré à la **Figure 1.5**, Fzd permet ensuite le recrutement de Dsh (ou DVL chez les vertébrés) et du *Dishevelled associated activator of morphogenesis* (DAAM), une protéine associée à Dsh dans la voie PCP permettant la modélisation d'actine (Staal *et al.*, 2008). DVL et DAAM permettent l'activation de petites protéines G de types GTPases comme RhoA et Rac1. RhoA permet ensuite l'activation de la *Rho-associated protein kinase* (ROCK) qui agit directement sur le cytosquelette d'actine et son arrangement, contrôlant ainsi la migration, la motilité et les changements de formes cellulaires (Endo *et al.*, 2005; Staal *et al.*, 2008; Winter *et al.*, 2001). RhoA et Rac1 permettent également l'activation des c-Jun N-terminal kinases (JNK) (Boutros *et al.*, 1998). La voie de signalisation JNK est principalement reconnue pour réguler l'apoptose cellulaire en présence d'un stress quelconque. Toutefois, JNK possède également un rôle important dans la morphogénèse et dans le développement embryonnaire (Kockel *et al.*, 2001). Dans la voie PCP, JNK activé se rend dans le noyau et s'associe aux facteurs de transcriptions cibles pour contrôler l'adhésion cellulaire, la motilité cellulaire et la modélisation du cytosquelette (Staal *et al.*, 2008).

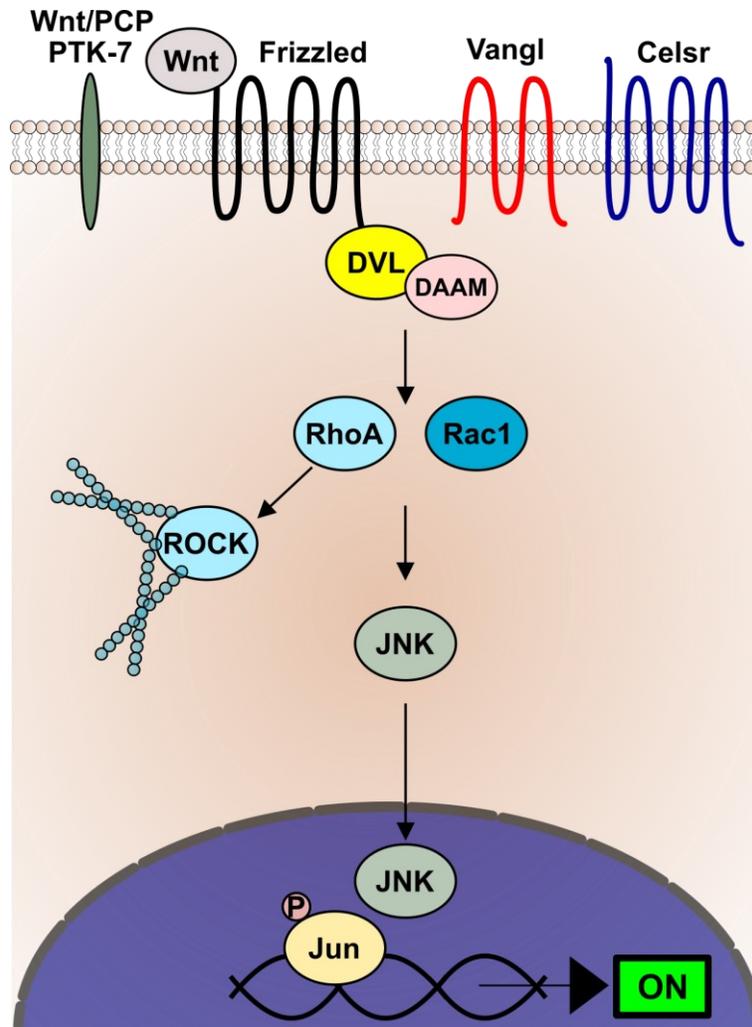


Figure 1.5 Voie Wnt/*Planar Cell Polarity* (PCP)

L'activation de la voie de signalisation Wnt/PCP par la liaison de Wnt à Frizzled mène au recrutement de DVL et du *Dishevelled associated activator of morphogenesis* (DAAM) à la membrane cellulaire. Celles-ci entraînent l'activation de petites protéines G de types GTPases, RhoA et Rac1, qui entraînent l'activation de la *Rho-associated protein kinase* (ROCK), agissant sur le cytosquelette d'actine, et des c-Jun N-terminal kinases (JNK), ce qui permet la translocation de JNK au noyau pour s'associer aux facteurs de transcriptions cibles et entamer la transcription des gènes cibles. Figure inspirée de Staal *et al.*, 2008.

La voie PCP est principalement reconnue pour avoir un rôle crucial dans le développement embryonnaire, comme pour le processus de l'extension convergente, dans lequel les cellules embryonnaires migrent et se forment pour assurer l'élongation des tissus et la morphogénèse (Wallingford *et al.*, 2002). Les gènes de la voie PCP, découverts d'abord chez *D. melanogaster*, s'avèrent cruciaux pour le développement embryonnaire chez les vertébrés (Seifert & Mlodzik, 2007). En effet, des mutations de la voie PCP altèrent l'extension convergente et le

développement embryonnaire des grenouilles de type *Xenopus* et des poissons-zèbres empêchant le développement normal des larves (Heisenberg *et al.*, 2000; Wallingford *et al.*, 2000). Des mutations de la voie PCP sont également associées à de sévères anomalies du tube neural. En effet, des souris mutantes de la voie PCP ne peuvent pas assurer la fermeture du tube neural complet durant le développement embryonnaire (Murdoch *et al.*, 2003). D'autres études d'anomalies du tube neural chez l'humain suggèrent l'altération de protéines de la voie PCP comme le gène VANGL2 (Kibar *et al.*, 2011). Outre le rôle important de la voie PCP dans la morphogénèse, les mutations de cette voie altèrent également l'organisation des cellules sur un tissu. Par exemple, une mutation des gènes PCP chez *D. melanogaster* altère entre autres l'orientation distale des filaments d'actine constituant les poils des ailes. Chez la drosophile mutante, les poils ne sont plus organisés de façon distale mais forment plutôt des vagues (Seifert & Mlodzik, 2007; Vinson & Adler, 1987). D'autres mutations de la voie PCP affectent l'organisation des photorécepteurs altérant la vision de la drosophile (Seifert & Mlodzik, 2007; Zeidler *et al.*, 1999). La voie PCP est donc cruciale à la polarisation et organisation des cellules formant les tissus. Chez la souris, la mutation du récepteur Fzd, plus précisément Fzd6, un des récepteurs clé de la voie PCP (Chang *et al.*, 2016), mène à une désorganisation de l'orientation parallèle des poils formant la fourrure (Guo *et al.*, 2004). Les poils des souris mutantes pour le récepteur Fzd6 forment des vagues et tourbillons comme vu précédemment chez la drosophile mutante (Guo *et al.*, 2004). Une autre mutation de la voie PCP chez la souris, affectant la protéine Vangl2, empêche la polarisation et orientation apicale des cellules ciliées tapissant la cochlée de l'oreille interne (Montcouquiol *et al.*, 2003). Les stéréocils, à défaut d'être conformément orientés vers le haut de façon apicale, ne suivent pas d'organisation chez la souris Vangl2 mutante (Montcouquiol *et al.*, 2003). En somme, la voie Wnt/PCP est cruciale au développement embryonnaire, à la morphogénèse, à la fermeture du tube neural et à l'organisation et l'orientation des cellules sur une surface plane (Seifert & Mlodzik, 2007). Étant centrale à la compréhension de la problématique de recherche de ce projet, les sections suivantes présenteront une revue littéraire détaillée de la voie Wnt/PCP et de son rôle dans les CSH.

1.9 Les protéines clés de la voie Wnt/PCP

La voie de signalisation Wnt/PCP est constituée d'une famille de protéines clés assurant la polarisation des cellules. Lors de l'activation de la voie PCP, ces protéines clés se relocalisent de façon asymétrique et organisée dans la cellule activée – ou polarisée, tel qu'il sera discuté dans les prochaines sections.

1.9.1 Protéines transmembranaires de la voie Wnt/PCP

Les protéines clés transmembranaires de la voie PCP sont Fzd, Flamingo (Fmi) ou son homologue Celsr chez les vertébrés, Ptk7 chez les vertébrés et finalement Strabismus/Van Gogh (Vang) ou son homologue Vangl (*Vang-like protein*) chez les vertébrés (Seifert & Mlodzik, 2007).

Fzd est le récepteur principal de la voie PCP. Il possède sept passages transmembranaires, est activé suite à la liaison des protéines Wnt et peut interagir avec la protéine effectrice Dsh. Chez les vertébrés, Frizzled-3 (Fzd3) et Fzd6 semblent avoir un rôle prévalent dans la voie PCP (Seifert & Mlodzik, 2007). Fmi ou Celsr est une cadhérine à sept passages transmembranaires et permet l'adhésion cellulaire, mais son interaction avec les autres protéines PCP reste à élucider (Seifert & Mlodzik, 2007). Ptk7, uniquement retrouvé chez les vertébrés, est une protéine de type tyrosine kinase à un passage transmembranaire dont le rôle n'est pas bien connu (Seifert & Mlodzik, 2007). Enfin, Strabismus ou Vangl chez les vertébrés est une protéine à quatre passages transmembranaires qui peut se lier à la protéine effectrice Dsh ainsi que d'autres protéines cytoplasmiques (Seifert & Mlodzik, 2007).

1.9.1 Protéines cytoplasmiques de la voie Wnt/PCP

Les protéines effectrices cytoplasmiques de la voie Wnt/PCP sont Dishevelled (Dsh chez *Drosophila*, DVL chez les vertébrés), Prickle et Diego (Diversin chez les vertébrés). Dsh est activée et recrutée à la membrane via son domaine PDZ par Fzd. Le complexe Fzd-Dsh permet l'activation à son tour des GTPases et de la cascade de signalisation PCP. Prickle est une protéine cytoplasmique recrutée par Vangl lors de l'activation de la voie PCP. Les complexes Vangl-Prickle se distribuent à des pôles opposés des complexes Fzd-Dsh (Seifert & Mlodzik, 2007). Prickle interagit également avec Dsh et inhibe son recrutement à la membrane plasmique, ce qui pourrait conférer au complexe Vangl-Prickle une activité inhibitrice sur la voie

PCP (Jenny *et al.*, 2005). Enfin, la protéine cytoplasmique Diego peut interagir avec les deux complexes Fzd-Dsh et Vangl-Prickle. Diego peut aussi interagir avec Dsh et est en compétition pour le même site de liaison que Prickle, pouvant ainsi contrecarrer l'effet inhibiteur de Prickle et est donc potentiellement un régulateur positif de la voie PCP (Jenny *et al.*, 2005).

1.9.2 Interactions et relocalisation des complexes Frizzled-Dsh et Vangl-Prickle

Lors de l'activation de la voie PCP, les protéines clés PCP se relocalisent de façon asymétrique et organisée dans la cellule activée. En effet, des études dans les cellules épithéliales de l'aile de *D. melanogaster* démontrent que, lors de l'activation de la voie PCP, les complexes Fzd-Dsh-Diego se localisent à la surface distale de la cellule, tandis que les complexes Vangl-Prickle se localisent à la partie proximale de la cellule polarisée (Seifert & Mlodzik, 2007). Fmi ne semble pas être enrichi dans une partie distale ou proximale de la cellule mais est distribué de façon homogène sur la surface membranaire et son rôle avec les autres protéines demeure à l'étude (Seifert & Mlodzik, 2007). Dans l'oreille interne de la souris, on retrouve également cette distribution asymétrique des protéines PCP. Toutefois, des études chez la souris ont démontrés que Vangl2 pouvait aussi être localisé avec Fzd3 et Fzd6 sur la surface apicale des cellules ciliées (Montcouquiol *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

1.9.3 Complexe Fat/Dachsous

Chez *D. melanogaster*, il existe un autre complexe formant la voie Fat/Dachsous dont le rôle n'est pas aussi bien étudié que les autres complexes de la voie PCP. Comme son nom l'indique, ce complexe comprend les cadhérines Fat et Dachsous et la protéine transmembranaire Four-jointed. Les études relèvent l'interaction et possible régulation entre le complexe Fat/Dachsous et la voie Fzd-PCP, considérant donc cette voie comme un signal important régulant la voie PCP, mais son rôle demeure inconnu chez les vertébrés (Seifert & Mlodzik, 2007; Yang *et al.*, 2002).

1.10 La voie PCP dans les CSH

Comme mentionné précédemment, la polarité semble être une caractéristique cruciale au bon fonctionnement des CSH. Ainsi, naturellement, on se demande si la voie Wnt/Polarité (PCP) interagit dans les voies signalétiques régulant le devenir des CSH. De plus, la majorité des gènes de la voie PCP sont exprimés par les CSH fœtales et adultes (Heinonen *et al.*, 2011; Kwarteng *et al.*, 2018) et plusieurs études suggèrent un rôle important dans le maintien des CSH par les protéines clés de la voie PCP.

Fzd6, par exemple, est nécessaire au maintien et à l'expansion clonale des CSH fœtales *in vitro* en présence du ligand Wnt4 via l'activation de JNK, suggérant le rôle de la voie PCP dans leur maintien et auto-renouvellement (Heinonen *et al.*, 2011). Toutefois, Fzd6 pourrait avoir une activité dépendante de l'âge des CSH, puisqu'il régule négativement l'expression de JNK activé dans les CSH adultes (Abidin *et al.*, 2015). De plus, Fzd6 régule négativement Cdc42 et pourrait avoir un rôle dans le maintien des CSH puisqu'une surexpression de Cdc42 accélère leur vieillissement tel que discuté plus haut (Abidin *et al.*, 2015; Florian *et al.*, 2012). Fzd6 a aussi un rôle fonctionnel crucial dans la reconstitution hématopoïétique à court et long terme. En effet, une déficience de Fzd6 dans les CSH altère drastiquement leur capacité de reconstitution des granulocytes après une greffe de MO. Ceci s'explique par la mort par apoptose des CSH *Fzd6*^{-/-} ne pouvant alors assumer leur fonction (Abidin *et al.*, 2015). Le nombre de cellules matures générées sont significativement diminuées dans la rate de la souris hôte recevant une greffe de CSH *Fzd6*^{-/-}, suggérant un rôle essentiel dans leur différenciation (Abidin *et al.*, 2015). De plus, comme mentionné précédemment, les CSH sont capables de sortir de leur état de quiescence pour proliférer en réponse à un stress hématopoïétique. Fzd6 joue un rôle important dans l'activation de cette réponse d'urgence lors d'une stimulation inflammatoire au lipopolysaccharides (LPS) (Abidin *et al.*, 2015). De plus, notre laboratoire à récemment démontré que la protéine Wnt4, actuellement reconnue comme étant le ligand de Fzd6 (Heinonen *et al.*, 2011), est essentielle à l'auto-renouvellement des CSH adultes et que la déficience de la protéine Wnt4 accélère la perte de fonction des CSH et cellules progénitrices (Hétu-Arbour *et al.*, 2021b).

Le rôle de **Ptk7** dans le maintien des CSH adultes reste à élucider. Toutefois, une délétion de Ptk7 dans les CSH fœtales entraîne la diminution du réservoir de CSH en nombre en

conséquence à une augmentation de la quiescence et une perte de prolifération des CSH *Ptk7*^{-/-} fœtales, bien qu'elles puissent tout de même reconstituer un hôte létalement irradié (Lhoumeau *et al.*, 2016). De plus, la perte de *Ptk7* altère également la capacité de migration et le recrutement des CSH *Ptk7*^{-/-} fœtales vers la MO (Lhoumeau *et al.*, 2016).

Enfin, **Fmi/Celsr** est d'autant plus nécessaire au maintien des CSH. D'abord, Fmi/Celsr est crucial pour la distribution ordonnée à la surface cellulaire de **Frizzled-8** (*Fzd8*) chez la souris (Sugimura *et al.*, 2012). Fmi et *Fzd8* maintiennent la quiescence des LT-HSC en inhibant la voie Wnt/ Ca^{2+} et la voie canonique en conditions homéostatiques (Sugimura *et al.*, 2012). Ainsi, la voie PCP permettrait le maintien des CSH dans la niche en conditions homéostatiques en inhibant les voies prolifératives (Sugimura *et al.*, 2012). Au contraire, en présence d'un stress hématopoïétique quelconque, la voie PCP arrête l'inhibition de la voie canonique dépendante de la β -caténine qui prend le dessus et permet l'activation et la prolifération des CSH pour répondre à la demande (Sugimura *et al.*, 2012).

En somme, trois des quatre protéines clés transmembranaires de la voie PCP, *Fzd*, *Ptk7* et *Fmi/Celsr*, ont un rôle connu dans le maintien des CSH fœtales ou adultes. Toutefois, **la protéine Vangl2**, jouant un rôle crucial dans l'établissement de la voie PCP, n'a toujours pas de rôle connu dans la fonction des CSH.

1.11 La protéine membranaire Vangl2

Le récepteur Strabismus/*Vang* chez la drosophile a deux homologues chez les mammifères : **Vangl1** et **Vangl2**. *Vangl1*, découverte après *Vangl2*, présente 70% de similarité avec cette dernière et possède la même structure secondaire protéique que *Vangl2* (Torban *et al.*, 2008). Elle semble avoir un rôle redondant à *Vangl2* mais son rôle dans l'embryogénèse est peu connu et reste à élucider (Torban *et al.*, 2008). En effet, il semble qu'une expression de *Vangl1* puisse partiellement sauver les défauts embryogéniques de *Vangl2* chez le poisson-zèbre (Jessen & Solnica-Krezel, 2004). Toutefois, une perte de fonction de *Vangl1* n'entraîne pas de défauts sévères phénotypiques ou une altération marquée la voie PCP contrairement à *Vangl2* (Hatakeyama *et al.*, 2014).

La protéine **Vangl2** fut le premier homologue de Strabismus/Vang découvert chez les mammifères et est quant à elle davantage étudiée. La protéine Vangl2 fut identifiée avec l'apparition de souris naissant avec des queues en boucles et des souris ayant des défauts sévères de fermeture du tube neural et de perforation vaginale (Strong & Hollander, 1949). En effet, ces défauts embryogéniques découverts chez les souris *Looptail* sont causés par des mutations au gène *Vangl2* également appelé *Ltap* (Kibar *et al.*, 2001; Murdoch *et al.*, 2001). Les souris homozygotes dont la mutation apparaît sur les deux allèles du gène *Vangl2* meurent avant la naissance due à une anomalie sévère de la fermeture du tube neural, le craniorachischisis, menant à une anencéphalie, soit une absence du cerveau, cervelet et tronc cérébral, ainsi qu'une malformation de la colonne vertébrale (Kibar *et al.*, 2001; Murdoch *et al.*, 2001). Ainsi, les souris *Vangl2*^{-/-} sont des modèles murins pour l'étude des malformations du tube neural. Les souris *Looptail* hétérozygotes, quant à elles, possédant la mutation que sur l'un des deux allèles, sont caractérisées par la présence d'une queue en boucle (*loop*), mais ont un développement foetal et adulte normal (Strong & Hollander, 1949).

Comme mentionné précédemment, Vangl2 a un rôle important dans l'organisation des cellules sensorielles ciliées de l'oreille interne chez les souris (Montcouquiol *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). En effet, dans la cochlée interne et l'organe de Corti, constituant l'ensemble des stéréocils tapissant la cochlée et permettant l'ouïe, Vangl2 est distribué asymétriquement (Montcouquiol *et al.*, 2006). Chez les souris *Looptail*, les stéréocils sont tout de même formés, mais ne sont plus orientés vers la surface apicale des cellules. Elles sont au contraire orientées aléatoirement dû à un défaut de polarisation des cellules (Wang *et al.*, 2006). Fzd3 et Fzd6, ayant aussi un rôle dans la fermeture du tube neural et dans l'orientation des poils de la fourrure, sont également distribués asymétriquement dans l'oreille interne de la souris en conditions homéostatiques (Montcouquiol *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Chez les souris Vangl2 mutantes, la voie PCP ainsi que la localisation de Fzd3 et Fzd6 est altérée, puisque ces récepteurs sont exprimés et s'accumulent dans la cellule, mais ne peuvent être exprimés sur la surface membranaire (Wang *et al.*, 2006). Ceci suggère un rôle majeur de Vangl2 dans l'établissement de la polarisation cellulaire via la voie PCP. Contrairement à Vangl1, **Vangl2** est fortement exprimé par les CSH et par les progéniteurs multipotents engagés, soit dans les cellules immatures, et moins exprimé dans les cellules hématopoïétiques matures (à l'exception des cellules dendritiques), tel qu'illustré dans la **Figure 1.6**.

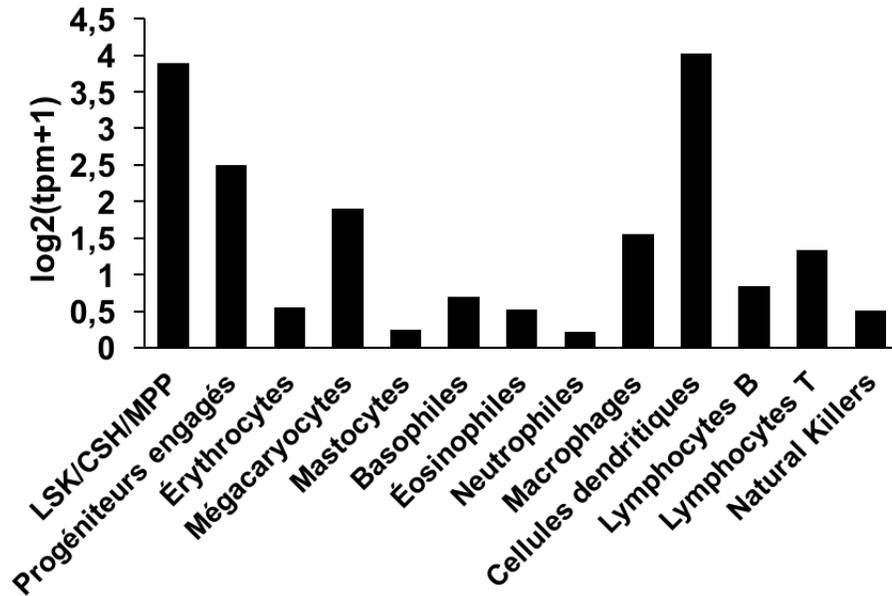


Figure 1.6 Expression de Vangl2 dans les cellules hématopoïétiques chez la souris

Figure adaptée d'une base de données en ligne de Choi *et al.*, 2019 : [Haemopedia RNA-seq: a database of gene expression during haematopoiesis in mice and human](#) (Choi *et al.*, 2019). Tpm : transcripts per million.

En conclusion, ces informations nous ont mené à établir l'hypothèse selon laquelle **Vangl2** joue un rôle essentiel dans le maintien des CSH. Notre hypothèse de recherche ainsi que nos objectifs de recherches seront expliqués en détail dans la section suivante.

1.12 Hypothèse et objectifs de recherche

Les travaux antérieurs de notre laboratoire suggèrent que les voies signalétiques Wnt/PCP protègent les CSH en permettant leur maintien lors d'une situation de stress hématopoïétique (Abidin *et al.*, 2015; Heinonen *et al.*, 2011). Ce projet de recherche vise, dans cette optique, à élucider le rôle de Vangl2, une protéine clé de la voie Wnt/PCP, dans le maintien des CSH et sa fonction dans l'hématopoïèse. Tel qu'illustré dans la **Figure 1.6**, Vangl2 est fortement exprimé par les CSH et cellules progénitrices. Cependant, il l'est moins dans la grande majorité des cellules hématopoïétiques matures, à l'exception des cellules dendritiques, suggérant un rôle important dans le maintien et la différenciation régulée des CSH comparativement aux cellules matures. De plus, tel que mentionné dans la **section 1.10**, plusieurs études récentes démontrent un rôle important des différentes protéines constituant la voie PCP dans la régulation des CSH (Abidin *et al.*, 2015; Lhoumeau *et al.*, 2016; Sugimura *et al.*, 2012). Puisque la protéine Vangl2 possède un rôle crucial dans l'établissement de la voie PCP, nous suggérons qu'elle joue d'autant plus un rôle essentiel dans le maintien des CSH, notamment en régulant leur auto-renouvellement et leur différenciation, régulant ainsi ultimement leur fonction. Pour valider cette hypothèse, en utilisant un modèle murin dans lequel le gène *Vangl2* est tronqué de la lignée hématopoïétique par le système *Vav-iCre-LoxP*, nous avons étudié la contribution de la protéine Vangl2 dans la régulation de l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH et leur fonction à long terme, tout en évaluant la contribution de Vangl2 dans l'hématopoïèse selon les objectifs de recherche présentés ci-dessous :

1. Étudier le rôle de Vangl2 dans l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH en conditions homéostatiques
2. Étudier le rôle de Vangl2 dans la reconstitution hématopoïétique lors des greffes de moelle osseuse
3. Étudier le rôle de Vangl2 dans la régulation de la polarité et du cycle cellulaire des CSH
4. Identifier les mécanismes impliqués par Vangl2 dans le maintien des CSH

De ce fait, nous avons d'une part évalué la contribution de Vangl2 en conditions homéostatiques en analysant son rôle dans le processus d'hématopoïèse, dans les cellules souches et progénitrices, ainsi que dans les cellules matures. Nous avons d'autre part évalué le rôle de Vangl2 dans la fonction des CSH en conditions de stress hématopoïétique par un essai fonctionnel crucial, soit par analyse de la reconstitution hématopoïétique suite à une greffe de MO d'un hôte létalement irradié tel que nous l'avons décrit précédemment (Hétu-Arbour *et al.*,

2021a; Kwarteng & Heinonen, 2016). Suite à l'établissement du rôle phénotypique et fonctionnel de Vangl2 dans les CSH, nous avons par la suite évalué divers mécanismes et étudié la contribution de cette protéine dans le maintien des caractéristiques clés des CSH, soient la polarité, l'activité proliférative, puis sa contribution dans la régulation d'autres voies signalétiques, dont la voie Wnt canonique.

Enfin, ce projet de recherche vise à apporter une meilleure compréhension des facteurs régulant le maintien et devenir des CSH, notamment en élucidant le rôle de la protéine Vangl2 dans l'hématopoïèse jusqu'à aujourd'hui inconnu. Ceci permettra d'identifier de nouveaux régulateurs des CSH et pourrait faciliter leur utilisation en thérapie cellulaire, mais également leur utilisation et expansion *in vitro* qui présente actuellement encore plusieurs défis techniques. Une meilleure connaissance des différents facteurs retrouvés dans la niche hématopoïétique régulant le maintien des CSH peut en effet contribuer à des avancées cliniques importantes, notamment la réduction des risques associées aux greffes de MO.

Les prochains chapitres présenteront mon projet de recherche sous forme de deux articles scientifiques. D'abord, le premier article, intitulé ***Experimental Competitive Bone Marrow Transplant Assays***, est un article de type protocole dans lequel nous expliquons en détails les essais fonctionnels de greffe de MO utilisés pour étudier les caractéristiques fonctionnelles des CSH. Puis, le second article scientifique, intitulé ***Vangl2 Regulates Long-term HSC Maintenance***, présente les résultats de mon projet de recherche.

2 EXPERIMENTAL COMPETITIVE BONE MARROW TRANSPLANT ASSAYS

Titre en français : Essais expérimentaux compétitifs de greffe de moelle osseuse

Auteurs :

Roxann Hétu-Arbour*¹, **Sarah Bouali***¹ and Krista M. Heinonen²

* Co-auteurs

¹ Institut National de la Recherche Scientifique, Laval, QC, Canada.

² Institut National de la Recherche Scientifique, Laval, QC, Canada. krista.heinonen@iaf.inrs.ca

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Dans la série de livres *Methods in Molecular Biology* (MIMB, volume 2185) ; *Leukemia Stem Cells* p. 195-214, voir référence (Hétu-Arbour *et al.*, 2021a)

Première publication en ligne : 10 Novembre 2020

PMID: 33165850 DOI: [10.1007/978-1-0716-0810-4_12](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0810-4_12)

Contribution des auteurs :

Sarah Bouali : Co-auteure ayant contribué de manière équivalente à la préparation, rédaction et révision du manuscrit. Analyse des données, rédaction des sections introduction, matériel et méthodes et notes.

Roxann Hétu-Arbour : Co-auteure ayant contribué de manière équivalente à la préparation, rédaction et révision du manuscrit. Analyse des données, préparation des figures et légendes, rédaction des sections matériel et méthodes et notes.

2.1 Running Head

Competitive BMT assays

2.2 Abstract

Hematopoietic stem cells have the ability to produce all blood cells. When hematological malignancies occur, transplant of compatible blood or bone marrow cells from a healthy donor to the patient is an efficient solution to restore normal hematopoiesis. Bone marrow transplant in a mouse model is often used to study HSC function and capacity to repopulate an irradiated recipient. This protocol details the different steps of a competitive bone marrow transplant experiment, beginning with total body irradiation of the recipient mice; preparation and administration of the donor and competitor bone marrow samples; peripheral blood analysis to follow reconstitution post-transplant; and finally, the analysis of recipient bone marrow and secondary transplants to evaluate long term HSC function. Different formulas used to establish transplant efficiency are explained. All the steps are discussed in detail, including tips, variations and alternative procedures with their advantages and disadvantages.

2.3 Key Words

Hematopoietic stem cells, bone marrow transplantation, total body irradiation, flow cytometry, blood collection, mouse model, competitive reconstitution unit

2.4 Introduction

Hematopoiesis is the process by which all blood cells are formed from a small population of hematopoietic stem cells (HSCs). From birth and throughout adult life, the site of hematopoiesis is in the bone marrow (BM), a microenvironment supporting and regulating the maintenance and fate of HSCs. HSCs are rare as they represent only 0.01-0.02% of human and murine bone marrow cells (Mayle *et al.*, 2013). Although this population is rare, it amazingly manages to maintain blood homeostasis throughout adult life due to their unique characteristics for self-renewal and differentiation into lymphoid and myeloid progenitors.

Hematopoietic cell transplant, in which HSCs obtained from bone marrow, cytokine-mobilized peripheral blood or umbilical cord blood are injected into a patient, is the most commonly used form of cell therapy. Every year, 55,000 to 60,000 bone marrow transplants are performed internationally (Gyurkocza *et al.*, 2010). This cell therapy enables the substitution of the patient's deficient hematopoietic system with a healthy one, and can be used for the treatment of genetic hematological disorders such as immunodeficiencies, hemoglobinopathies or autoimmune diseases (Li & Sykes, 2012). However, the majority of hematopoietic transplants today are used to treat hematological malignancies, such as leukemia, lymphoma and multiple myeloma (Li & Sykes, 2012). Radiotherapy and chemotherapy used to treat hematopoietic malignancies cause bone marrow hematopoietic failure. This leaves room for new healthy HSCs, coming from the host itself or from a compatible donor, to reconstitute the patient's hematopoietic system (Li & Sykes, 2012). These therapies however carry some risks, such as graft rejection or graft-versus-host-disease (GvHD), in which the donor's immune cells attack the host's healthy tissues (Blazar *et al.*, 2012). Studying and understanding HSCs, their regulation and maintenance would help to reduce these risks, for example, by improving engraftment efficiency, thus allowing for a more widespread use of cord blood HSCs that are associated with a reduced risk of GvHD.

Over the last years, various groups have identified a multitude of markers to isolate and purify human and murine HSCs. Distinction between HSCs and multipotent progenitors (MPPs) is possible, for example, by determining the cell-surface expression of SLAM receptors, such as CD150 and CD48 (Kiel *et al.*, 2005; Mayle *et al.*, 2013). Progress in identifying HSCs allows their quantification and isolation by flow cytometry and fluorescence activated cell sorting

(FACS). However, identification of HSCs based on surface markers alone does not inform the functionality of these cells. The gold-standard measure of HSCs' function remains an *in vivo* repopulating assay, initially developed by Till and McCulloch and since refined (Till & McCulloch, 1961). HSC function in this assay is determined by their ability to reconstitute an irradiated recipient and give rise to blood cells from all lineages (lymphoid and myeloid). This assay can be allogeneic or syngeneic, where mouse cells are injected into a mouse recipient, or xenogeneic, where human cells are injected into an immunodeficient mouse recipient (Majeti *et al.*, 2007). In long-term repopulating assays, engraftment and long-term reconstitution is determined by the donor chimerism, or contribution of donor HSCs in several peripheral blood lines, such as T cells, B cells and granulocytes by flow cytometry 20 weeks after transplant (Rossi *et al.*, 2012). In order to distinguish donor cells from host cells, we use cell surface markers such as the two alleles for the gene *Ptprc* or CD45 leukocyte antigen as described in this protocol (Shen *et al.*, 1985). In order to study the self-renewal capacity of these HSCs, serial transplantations are made from primary recipients (Rossi *et al.*, 2012). The *in vivo* repopulating assay is useful to compare the functionality of two different populations of HSCs, either treated under different conditions or from two mice of different genotypes to study the role of a particular gene product.

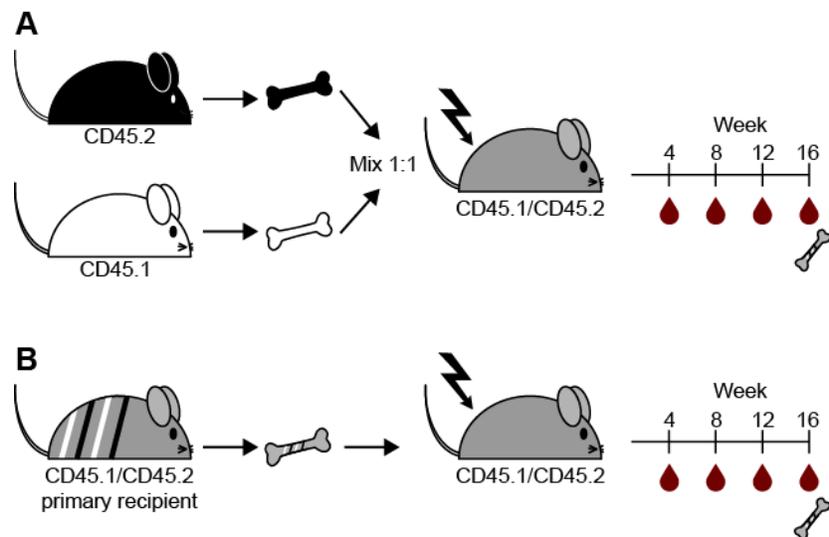


Figure 2.1 Experimental design.

(A) In a competitive transplant, donor (CD45.2⁺) BM cells are mixed with BM cells of a congenic competitor mouse (CD45.1⁺) in a 1:1 HSC equivalent ratio, based on pre-transplant flow cytometry results. The cells are then injected into total body irradiated recipient mice (CD45.1⁺ CD45.2⁺) by intravenous route. Post-transplant reconstitution is monitored every 4 weeks (at 4, 8, 12 and 16 weeks) with peripheral blood analysis. After 16 or 20 weeks, the BM and other organs of interest are harvested and analysed by flow cytometry. The BM from primary recipients can also be used as donor cells for secondary transplants **(B)** to evaluate the long-term self-renewal of transplanted HSCs. The cells are injected intravenously into new irradiated CD45.1⁺ CD45.2⁺ recipient mice and analysed as explained in **A** and in the main text.

The in vivo repopulating assay can be either non-competitive or competitive. In a non-competitive setting, only donor HSCs are injected into a lethally irradiated recipient mouse. The protocol described here uses a competitive setting, as shown in [Fig. 2.1](#), where donor HSCs are injected in a 1:1 ratio with control HSCs from a competitor mouse, which evaluates the relative fitness of functional donor HSCs. The advantages and limitations of these two methods are discussed later in the Notes section. In this protocol, we discuss and explain how to perform bone marrow cell isolation, primary bone marrow transplants and serial transplantations and how to analyze long-term reconstitution.

2.5 Materials

2.5.1 Preparation of Recipient Mice

1. Mice: Donor mice (CD45.2⁺; C57Bl6 background for control and test), competitor mice (CD45.1⁺; B6.SJL-PtprcaPep3b/BoyJ) and recipient mice (CD45.1⁺CD45.2⁺; F1 progeny of C57Bl6 x B6.SJL breeding pairs).
2. Mouse Ear-Punch
3. Biological irradiator (see **Note 3**)

2.5.2 Preparation of Donor/Competitor BM cells

1. CO₂ chamber
2. 70% EtOH (v/v) or chlorhexidine
3. Two dissecting forceps (straight)
4. Dissecting scissors 4.5" (straight)
5. Sterile phosphate buffered saline (PBS)
6. Sterile 6-well tissue culture plate
7. Sterile 25 G needle on 1 mL syringes (or 22 G, see **Note 6**)
8. 15 mL conical tubes
9. 70 μm nylon strainer
10. Cell counts: Trypan blue, Eppendorfs or a 96-well round bottom plate, hemocytometer

2.5.3 Flow Cytometry for HSC equivalents

1. 5 mL round bottom polystyrene FACS tubes
2. Staining buffer (FACS buffer): PBS, 1 mM EDTA, 0.1% bovine serum albumin (BSA)
3. Mouse antibodies: Fc Block (anti-CD16/32), anti-CD48 eFluor 450, anti-cKit (anti-CD117) PE, anti-Sca1 (anti Ly6A/Ly6E) PE-Cy7, anti-CD150 (clone TC15-12F12.2) Alexa Fluor 647, anti-Flt3 (anti-CD135) PerCP-eFluor 710, biotinylated antibodies (anti-B220, anti-CD3e, anti-CD11b, anti-GR1 (anti-Ly6C/Ly6G, clone RB6-8C5), anti-Ter119), V500-conjugated streptavidin, viability dye (see **Note 8 and 9**)

2.5.4 Preparation of Bone Marrow Cells for Transplant

1. Sterile 5 mL round bottom tubes (see **Note 14**)
2. Sterile 1X PBS

2.5.5 Bone Marrow Transplants

1. Red heat lamp
2. Mouse restrainer
3. 1 mL Tuberculin syringes with a 27 G needle
4. Sterile gauze

2.5.6 Peripheral Blood Analysis

1. K₂-EDTA tubes
2. Tube rotator
3. 21 G needles or lancets
4. Red blood cells lysis buffer (RBC lysis buffer): 1 part of 0.17 M Tris-HCl (pH 7.65) with 9 parts of 0.16 M NH₄Cl (prepare fresh each time)
5. Cold-ice PBS
6. Mouse antibodies: Fc Block (anti-CD16/32), anti-CD45.1 APC, anti-CD45.2 FITC, anti-CD19 PE, anti-CD3e PE-Cy7, anti-GR1 (anti-Ly6C/Ly6G, clone RB6-8C5) APC-Cy7 (see **Note 8**)
7. Staining buffer (see Materials 2.5.3.2)

2.5.7 Analysis of BM Reconstitution

1. See Materials 2.5.2
2. Mouse antibodies: Fc Block (anti-CD16/32), anti-CD45.1 APC-Cy7, anti-CD45.2 FITC, anti-CD48 eFluor 450, anti-cKit (anti-CD117) PE, anti-Sca1 (anti-Ly6A/Ly6E) PE-Cy7, anti-CD150 (clone TC15-12F12.2) Alexa Fluor 647, anti-Flt3 (anti-CD135) PerCP-eFluor 710, biotinylated antibodies (anti-B220, anti-CD3e, anti-CD11b, anti-GR1 (anti Ly6C/Ly6G, clone RB6-8C5) and anti-Ter119), V500-conjugated streptavidin, viability dye (see **Note 8 and 9**)
3. Staining buffer (see Materials 2.5.3.2)

2.6 Methods

All the steps are executed under sterile conditions.

2.6.1 Preparation of Recipient Mice

1. Weigh recipient mice (CD45.1⁺ CD45.2⁺) (see **Note 1**) and identify them with ear notches or any other approved method, based on the recommendations of your local animal ethics committee (see **Note 2**).
2. Irradiate the mice with two doses of 450 rad. The first dose is given the day before transplantation and the second dose is given 1-2 hours before transplantation (see **Note 3**).

2.6.2 Preparation of Donor and Competitor Bone Marrow (BM) Cell Samples

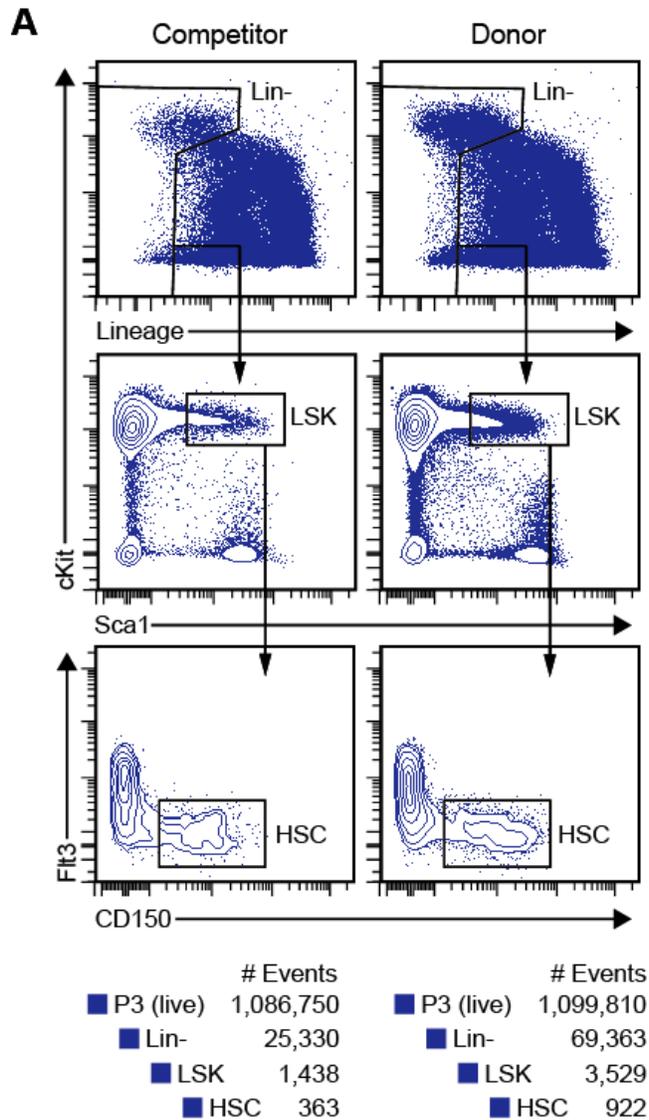
1. Euthanize donor (CD45.2⁺) and competitor (CD45.1⁺) mice in a CO₂ chamber followed by cervical dislocation or any other method approved by the local animal ethics committee (see **Note 4**).
2. In a biological safety cabinet or a laminar flow hood, place the mice on the back, forelimbs and hind limbs wide open.
3. Spray mice with 70% EtOH in water or other disinfectant, such as chlorhexidine, to disinfect fur and skin and reduce cell contamination.
4. Using sterile instruments, cut the skin at the ankle and then cut open along the hind limb.

5. Pull away fur and skin using serrated forceps. Cut away excess muscle around the leg bones.
6. Dislocate the femur by putting pressure against the pelvic bones with scissor blades and by pulling on the leg bone with forceps. Be careful not to break bones at this step.
7. Using forceps, dislocate both femur and tibia from the kneecap by pressing against the normal extension of the knee. Remove excess muscle. Place femur and tibia in 2-3 mL sterile phosphate buffered saline (PBS) in a sterile 6-well tissue culture plate. Repeat with the second leg if necessary (see **Note 5**).
8. To harvest BM cells, fill a sterile 25G needle syringe with 3 mL PBS.
9. Using forceps, hold the bone vertically on top of a 15 mL conical tube and flush the BM cells by gently inserting the needle and injecting PBS inside the bone. Repeat this step using the PBS inside the tube until the bone is completely white.
10. Gently mix the cell suspension by aspirating with the syringe (see **Note 6**).
11. Pass the cells through a 70 μm nylon strainer to remove debris.
12. To count cells, aliquot 10 μL from the cell suspension and dilute 1:5 with 40 μL of trypan blue in an Eppendorf or a 96-well round bottom plate.
13. Aliquot 10 μL from the diluted cells and count using a hemocytometer.
14. After counting, centrifuge the cell suspension at 200 g, 5 mins at 4 $^{\circ}\text{C}$.
15. Decant supernatant and resuspend to 10^8 cells/mL with sterile PBS.
16. Keep cells on ice.

2.6.3 Flow Cytometry Staining to Establish Donor Cells HSC Equivalents

1. Aliquot 3×10^6 (30 μL) cell suspension from each mouse into a separate 5 mL round bottom polystyrene FACS tube (donor and competitor) (see **Note 7**).
2. Add an equal volume (30 μL) of diluted Mouse Fc Block (1:1 v/v with cell suspension volume used in step 2.6.3.1) (anti-CD16/32, 1/100 in staining buffer). Vortex and incubate for 5 mins at room temperature.
3. Prepare a master mix of antibodies in staining buffer to select hematopoietic stem cells using anti-CD48, anti-cKit (anti-CD117), anti-Sca1, anti-CD150, anti-Flt3 (anti-CD135) and the biotinylated Lineage cocktail (B220, CD3e, CD11b, GR1, Ter119) (see **Note 8 and 9**).

4. Add 90 μL of the master mix in each tube, vortex and incubate for 30 mins on ice protected from light.
5. Add 3 mL of staining buffer onto the cells and centrifuge at 200 g for 5 mins at 4 °C to remove unbound antibody.
6. Decant supernatant and add 10 μL of fluorochrome-conjugated streptavidin diluted in staining buffer (determine appropriate concentration beforehand). Vortex and incubate on ice for 20 mins, protected from light.
7. Wash as in step 2.6.3.5 to remove unbound streptavidin.
8. Acquire samples using a flow cytometer with at least six detectors (Rundberg Nilsson *et al.*, 2013) (see **Note 10**). Select and determine frequency of Lin⁻ Sca1⁺ cKit⁺ Flt3⁻ CD150⁺ (estimated HSCs) for each mouse as shown in [Fig. 2.2](#) (see **Note 11**)(Kwarteng *et al.*, 2018).
9. Establish HSCs equivalents for all samples by using the competitor CD45.1⁺ mouse as a baseline. You should inject between 500 000 and 1 million total competitor BM cells (Kwarteng & Heinonen, 2016) (see **Note 12** and [Fig. 2.2](#)).



B

$$500,000 \text{ Competitor BM cells} : \frac{500\,000 \times 363}{1\,086\,750} = 167 \text{ HSCs}$$

C

$$\text{HSC equivalent \# for Donor} : \frac{167 \times 1\,099\,810}{922} = 199\,206 \text{ total Donor BM cells}$$

Figure 2.2 Pre-transplant bone marrow HSC analysis template.

(A) HSCs are first selected from the lineage negative (Lin⁻) compartment of live single cells. Within this population, cKit^{hi} and Sca1⁺ form the LSK population, where the CD150⁺ cells are enriched for HSCs. (B) To obtain the number of competitor (CD45.1⁺) HSCs within 5x10⁵ BM cells, divide the number of HSC events obtained by flow cytometry by the number of live cells and multiply the result by 500 000, which is the number of total BM cells from the competitor to be injected. (C) To have the number of total donor (CD45.2⁺) BM cells equivalent to the number of competitor HSCs, multiply the number of competitor HSCs by the number of donor live cells, and divide the result by the number of donor HSC events obtained by flow cytometry.

2.6.4 Preparation of the Bone Marrow Cells for Transplant

1. Prepare the cells to be injected (see **Note 13**) on ice in a sterile 5 mL round bottom tube (see **Note 14**).
2. Calculate the total number of cells needed to engraft all recipients. To do so, multiply the numbers found in 2.6.3.9 by the number of recipient mice. You should prepare at least 20% in excess to compensate for the volume lost in the syringe (dead space).
3. Mix competitor CD45.1⁺ cells and donor CD45.2⁺ cells (control or test) in a 1:1 ratio as calculated above.
4. Adjust final volume to 200 μ L per mouse using sterile PBS.
5. Keep on ice until injection.

2.6.5 Bone Marrow Transplants

1. Warm the tail of the recipient mice under a red heat lamp to dilate the veins (see **Note 15**). The veins will then be more visible for the injection (see **Note 16**).
2. While waiting, aspirate up to 600 μ L of BM cells prepared in section 2.6.4 in a 1 mL tuberculin syringe with a 27G needle. Make sure there are no air bubbles in the syringe. With 600 μ L, you can inject three mice with 200 μ L of cells each.
3. Put the mouse in a restraining device. Verify if the veins are visible and choose one that you will be comfortable to inject. Disinfect the tail with ethanol or chlorhexidine. Place the needle bevel up and parallel to the skin, insert the needle in the vein and press gently the plunger (see **Note 17**).
4. Remove the needle from the vein. Press the site of injection with a piece of sterile gauze to stop bleeding. Put the mouse in a clean cage.
5. Repeat for all the mice (see **Note 18**).

2.6.6 Peripheral Blood Analysis

1. Collect a drop (50-100 μ L) of blood in an EDTA tube from the mandibular vein (see **Note 19**). Using a 21G needle or a lancet, pierce the skin with a 90 degrees angle near the light-coloured hair spot, between the spot and the ear.

2. Prepare 1 mL of Red Blood Cells (RBC) lysis buffer per mouse by mixing 9 parts of 0.16M NH₄Cl with 1 part of 0.17M Tris-HCl (pH 7.65).
3. Mix one drop of blood with 1 mL of RBC lysis buffer and transfer to a 5 mL round bottom tube (FACS tube) (see **Note 20**).
4. Incubate for 4 minutes at room temperature. Mix by shaking the tube during the incubation (see **Note 21**).
5. Add 3 mL of cold-ice PBS to each tube to stop the lysis reaction and centrifuge at 200 g for 10 minutes at 4 °C.
6. Decant the supernatant. If the lysis process is completed, continue to step 7 (see **Note 22**). If the lysis is incomplete, repeat the lysis (add 1 mL of RBC lysis buffer then steps 2.6.6.4 and 2.6.6.5).
7. Add 1 µL of concentrated Fc Block (anti CD16/32).
8. Add 10 µL of antibody mastermix (CD45.1, CD45.2, CD19, CD3e and GR1 (Ly6C/Ly6G) in staining buffer).
9. Vortex and incubate 30 minutes on ice protected from light.
10. Add 2 mL of staining buffer and centrifuge at 200 g for 5 minutes at 4 °C.
11. Decant the supernatant and add 200 µL of staining buffer.
12. Keep on ice and analyze samples by flow cytometry (see [Fig. 2.3](#) and **Note 23**), acquiring 20 000 events after exclusion of doublets, dead cells and debris is enough for the peripheral blood analysis.

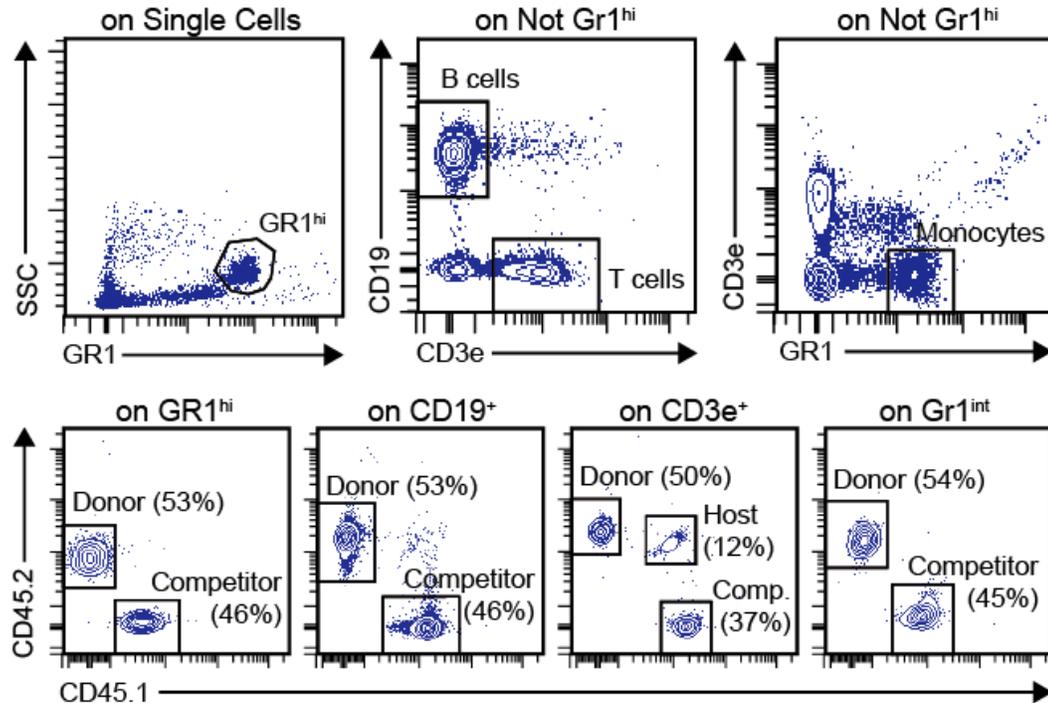


Figure 2.3 Post-transplant peripheral blood analysis template.

Within live single cells, select SSC^{hi} $GR1^{hi}$ cells to form the granulocyte population. On the rest of the cells, $CD3e^{+}$ cells are T cells, $CD19^{+}$ cells are B cells and $GR1^{int}$ $CD3e^{-}$ cells are monocytes. From these four populations, draw a $CD45.1$ and $CD45.2$ graph to identify the donor ($CD45.2^{+}$), competitor ($CD45.1^{+}$) and host ($CD45.1^{+} CD45.2^{+}$) cells.

2.6.7 Analysis of BM Reconstitution

1. Collect BM cells and any other organ of interest (e.g. thymus and spleen) from recipient mice 20 weeks post-transplant as detailed in section 2.6.2 (see **Note 24**).
2. Stain the cells for flow cytometry as explained in section 2.6.3. To distinguish donor cells from competitor cells, add fluorochrome-conjugated antibodies $CD45.1$ and $CD45.2$ to the master mix.
3. Acquire cell samples using a flow cytometer with at least eight detectors (Rundberg Nilsson *et al.*, 2013). Analyze the proportions of $Lin^{-} Sca1^{+} cKit^{+} Flt3^{-} CD48^{-} CD150^{+}$ cells (estimated HSCs) for the control or test donor ($CD45.2^{+}$) and for the competitor ($CD45.1^{+}$) as showed in [Fig. 2.4](#) and as already published (Abidin *et al.*, 2015) (see **Note 25**).

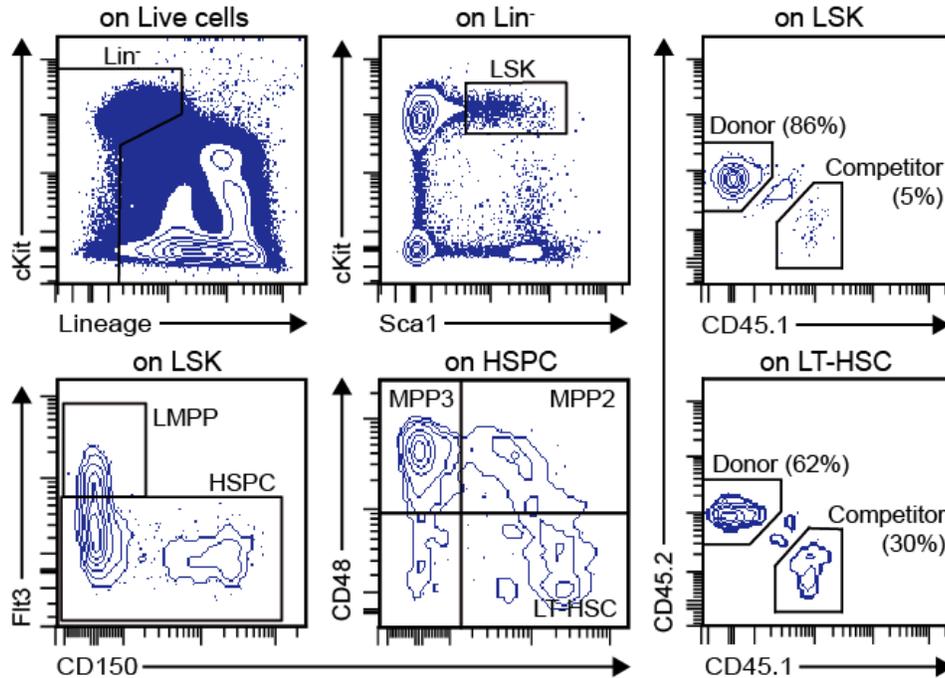


Figure 2.4 Post-transplant bone marrow HSC analysis template.

Within live single cells, select the LSK population as shown in Figure 2.2. Within LSKs, CD135⁺ CD150⁻ cells are lymphoid-primed multipotent progenitors (LMPP). Within the CD135⁻ subset of the LSK, CD48⁺ CD150⁻ cells are multipotent progenitor 3 (MPP3), CD48⁺ CD150⁺ cells are MPP2, and CD48⁻ CD150⁺ include long-term HSCs (LT-HSC; CD34⁻; not shown) and MPP1 (CD34⁺) (Wilson *et al.*, 2008). Donor and competitor gates can be drawn for all these populations.

2.6.8 Secondary and Tertiary Grafts

1. To study the function of HSC in the longer term, it is possible to perform secondary and even tertiary grafts using recipients of primary grafts. To do so, collect and prepare BM cells from primary recipients 20 weeks post-transplant as detailed in section 2.6.2 (Kwarteng & Heinonen, 2016).
2. Inject between 5-10 million BM cells per secondary recipient. It is not absolutely necessary to establish HSC equivalents in advance for secondary and tertiary grafts (Heinonen *et al.*, 2011) (see **Note 26**).

2.7 Notes

1. The recipient mice used here are CD45.1⁺ CD45.2⁺ mice and they were generated by crossing C57Bl/6 mice with congenic B6.SJL mice. These mice are used as recipients to better separate donor (CD45.2⁺) and competitor (CD45.1⁺) and host cells by flow cytometry. If necessary, CD45.1⁺ mice can be used as recipients. In this case, the competitor should be a CD45.1⁺ CD45.2⁺ mouse to distinguish competitor from host, and the separation with the donor (CD45.2⁺) may be less clear when analyzed by flow cytometry. Recipient mice are usually between 7 and 12 weeks old and weigh less than 25 grams. Older mice tend to tolerate irradiation less well than younger mice, despite their higher body weight.
2. Identifying the mice at the beginning will be helpful to follow them individually for the bodyweight follow up after transplant and peripheral blood and BM reconstitution over time. It is important to follow the bodyweight and clinical signs for 3 weeks after transplant to make sure the mice are recovering well. If a mouse loses a lot of weight and clinical signs appear (hunching posture, decreased activity, dehydration), a tighter follow up is recommended and if the conditions become severe, it could be necessary to euthanize the mouse based on the recommendations of your local animal ethics committee. For example, if a mouse does not receive BM, it will develop a fatal disease within 7-14 days after irradiation.
3. X rays or γ rays can be used depending on the available devices. It may be necessary to adjust the dosage based on your specific device and mouse strain. With the proper dosage, remaining host cells should be less than 5% of total cells in peripheral blood and T cells of the recipient mouse should be reduced to 20% or less (see [Fig. 2.5](#)). Split doses are less toxic and more efficient with myeloablation than single dose irradiation (Cui *et al.*, 2002). Time between doses should be no longer than 16 hours, but it can be as short as 4 hours to improve the efficiency of irradiation. Less than 4 hours of recovery leads to increased toxicity.

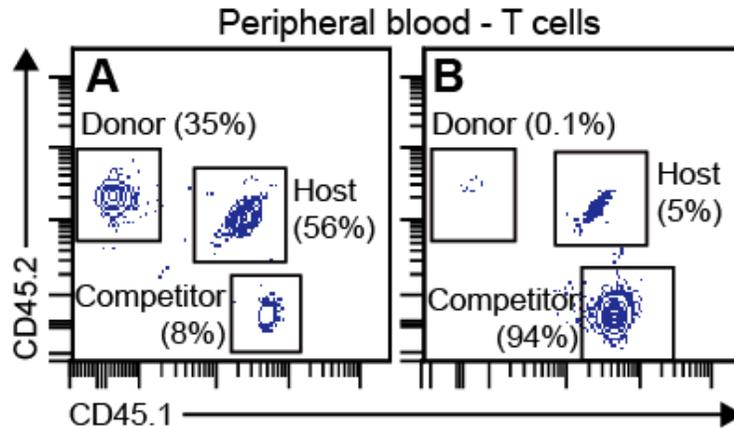


Figure 2.5 Examples of non-successful BM transplant.

In peripheral blood analysis, T cells can give clues on non-successful BMT. (A) In this example, host mouse T cells represent more than 50% of total T cells. It is representative of an incomplete or inefficient irradiation because host T cells should represent less than 20% of total T cells in a lethally irradiated mouse. (B) In this example, the mouse is well irradiated, but the donor (CD45.2⁺) BM cells did not reconstitute the recipient mouse, suggesting that the HSCs did not migrate to the bone marrow or were not able to differentiate.

4. The protocol for the clonal repopulation assay described here is a competitive one, which means it evaluates the relative fitness of functional donor HSCs against known control competitor HSCs. There are both advantages and limitations to this approach. First, the competitive assay reduces the possible mortality of recipient mice in the event of lack of blood repopulation by test donor HSCs. In this case, HSCs of the competitor mouse will repopulate the hematopoietic system of the irradiated recipient and it will be possible to see the functional defect of test HSCs by flow cytometry. Furthermore, the competition context increases the relative sensitivity of the assay since both populations, control and test HSCs, must compete for the same limited microenvironment in the BM. Hence, smaller differences in stem cell fitness can be detected. The competitor HSCs also provide an internal and technical control for the experiment (irradiation, injection and efficacy of engraftment). Competitive assay is a good start to detect differences in HSCs functionality. However, confirming results in a non-competitive assay will solidify conclusions as the outcome of control and test HSCs will be independent of the other (Eaves, 2015).
5. We expect to collect about 25-30 million BM cells with one hindlimb (one femur and one tibia). Depending on the number of recipient mice, it may be necessary to harvest both legs (two femora and two tibiae). If even more cells are needed to make sure to have enough,

the iliac crests (around 10 million cells per bone) and the forelimbs (around 5 million cells per humerus) are additional accessible sources.

6. When dissociating the cells, try to avoid bubbles and excess force as it will increase cell death. You can use a larger needle (22 G) to improve viability.
7. The protocol described above involves total BM cells transplantation instead of a pure HSC population obtained by flow-cytometry cell sorting. Thus, it is crucial to establish HSC equivalents between the competitor and different donors. This reduces any phenotypic variability between different donors that would be misinterpreted as a lack of HSCs functionality (Santaguida *et al.*, 2009). It must be considered that, unlike cell sorting, this approach allows other BM populations to influence the outcome of the transplant. Short-lived progenitor cells present in the BM may differentiate into mature cells, particularly during early time points. However, a major advantage of the approach used in this protocol compared to cell sorting is better cell viability since the time between bone marrow harvesting and injection is shortened and the cells are not subjected to shear stress during the sorting process. In addition, HSCs from unmanipulated BM have an improved homing capacity since the presence of antibodies on the surface of cell-sorted HSCs may interfere in this process (Czechowicz *et al.*, 2007).
8. This combination of fluorochromes is suggested because it has a good separation between populations (as shown in figures) and it is easy to compensate. It is used in our laboratory with a 4-laser and 18-parameter cytometer. The fluorochromes may need to be changed depending on your facility/laboratory resources.
9. We recommend you add a viability dye prior or after incubating cells with the master mix to select only viable cells when acquiring cells in flow cytometry. Note that the viability dye can be in the same channel as the fluorochrome-conjugated streptavidin as the dead cells will be excluded with all the other mature cells (lineage positive) as shown in [Fig. 2.2](#).
10. It is necessary to acquire at least 1 million events after exclusion of doublets, dead cells and debris to obtain “easy to draw” populations for HSPC analysis. Otherwise there will not be enough cells for reliable identification of donor versus competitor populations because HSCs are rare cells and their frequency in post-transplant BM is even lower than in naïve mice. For pre-transplant flow cytometry analysis we recommend acquiring at least 750 000 live singlet events.
11. To improve the purity of the HSC population, add an anti-CD48 antibody to the cocktail and select the Lin⁻Sca1⁺cKit⁺Flt3⁻CD48⁻CD150⁺ cells (Kiel *et al.*, 2005). By selecting the HSCs with only CD150, MPP2 can be included in the population, influencing your HSC counts for

the injection. To improve the purity of the population without adding CD48, restrain the LSK population by selection of Sca1^{hi} cells instead of all Sca1⁺ cells (Kwarteng *et al.*, 2018).

12. The first step is to calculate the number of HSCs in 500 000 BM cells of the competitor mouse. As shown in [Fig. 2.2](#), it is the number of cells to inject multiplied by the number of events in the HSC gate divided by the number of total live/P3 BM events (after exclusion of doublets, dead cells and debris). The second step is to calculate the number of BM cells to inject for other donors (test and control) to obtain a number of HSCs that is equal to the competitor sample, based on flow cytometry results. Basically, it is the product of the number of competitor HSCs (the previous result) and the number of donor BM cell events (live/P3), divided by the number of donor HSC events given by flow cytometry (see examples in [Fig. 2.2](#)).
13. Bone marrow contains memory T cells that can influence the transplant results due to their long half-life as their progeny can be detected in the periphery for a long time post-transplant. They can also cause graft versus host disease. To reduce these potential problems, T cells can be depleted from the total BM cells before injection.
14. If you have the choice, use polypropylene (PP) instead of polystyrene (PS) tubes. Cells tend to bind to polystyrene and using polypropylene minimizes that binding. It can be important especially when working with low cell numbers.
15. Do not use the red heat lamp for more than 4 minutes: it should be enough to dilate the veins. Using the lamp is uncomfortable for the mice and it can cause different problems to the mice if it is used for a longer period. Instead of using a red heat lamp, any other device or strategy approved by the animal care committee can be used to dilate the veins (for example, warm the tail with hot water as suggested by the Canadian Council on Animal Care (CCAC guideline: mice)).
16. Bone marrow transplants are traditionally performed via intravenous (iv) injection. An alternative to this technique is to inject the cells directly in the bone by intrafemoral (if) injection. This route bypasses the homing process, which makes it a good alternative to study cells that have difficulty to migrate to the bone marrow (Wang *et al.*, 2003) or when the cells are limited in number (Gao *et al.*, 2009; Mazurier *et al.*, 2003). It is widely used for transplanting human cells into immunodeficient mice (xenograft). The intrafemoral transplant is also more efficient with allogeneic donor cells (Kushida *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007). However, studies have shown that intrafemoral injection of syngeneic BM cells is not more efficient than iv injection (van Os *et al.*, 2010).

17. The injection should be easy. If the needle is not in the vein, you will feel resistance when entering the needle in the tail. Furthermore, injecting the cells will be impossible because the plunger will be blocked. If force is needed, the needle is not in the vein: remove the needle and repeat. Start the injection around the middle of the tail. If the first try failed, you will have space to try again proximal to the previous injection site.
18. The same syringe can be used for up to 3 mice. After that, the needle can be too dull. Furthermore, BM cells are in limited number. Using a new syringe for every mouse will increase the total volume of cells needed because the standard syringe has approximately 100 μ L of dead volume.
19. Peripheral blood is analyzed every 4-6 weeks to follow reconstitution (see [Fig. 2.1](#)). The mice need 3 to 4 weeks to recover before taking a new blood sample (Morton D.B. & J., 1993). The EDTA tube should be open before proceeding to be as fast as possible to collect the blood and stop the bleed. The collected blood in EDTA tubes must be waiting in a shaking/rotating device while collecting other blood samples to prevent coagulation. Another common option is to collect blood from saphenous vein. This technique takes more time per mouse and requires other devices compared to the mandibular vein (Golde *et al.*, 2005). However, it may be easier to perform.
20. Around 20 to 30 μ L of blood is enough for the experiment. This volume can be transferred to a FACS tube before adding the RBC lysis buffer. Using a small volume of blood will help to have a more efficient lysis. It is necessary to lyse RBCs before sample acquisition to increase the proportion of white blood cells in the sample. Commercial products combining sample fixation and RBC lysis after staining can also be used if preferred.
21. After 4 minutes of incubation, the blood should be translucent. If not, the lysis is probably not complete or efficient. If it is almost translucent, you can wait a couple of seconds to avoid repeating the lysis process after the centrifugation (see **Note 22**).
22. If the lysis did not work, the supernatant will be colorless and the pellet will be large and red. Repeat the lysis process if it happened (steps 2.6.6.3 to 2.6.6.7). If the red blood cells were lysed, the supernatant will be red and the pellet, smaller and mostly white.
23. Long-term reconstitution is determined by the expression of CD45.2 alone in several peripheral blood lines (T cells (CD3e⁺), B cells (CD19⁺), granulocytes (SSC^{hi} GR1^{hi}) and monocytes (CD3e⁻ GR1^{lo}))(Abidin *et al.*, 2015). It is possible to determine if HSCs are lymphoid or myeloid-biased using this formula:

$$HSC\ bias = \frac{\frac{(\#Donor\ GR1^{hi} + \#Donor\ GR1^{lo})}{(\#Total\ GR1^{hi} + \#Total\ GR1^{lo})}}{(\%Donor\ B\ cells + \%Donor\ T\ cells)} \quad (\text{Dykstra } et\ al., 2007)$$

A result smaller or equal than 0.25 indicates a lymphoid bias, a result between 0.25-2 indicates a balanced differentiation while a result larger or equal than 2 indicates a myeloid bias (Dykstra *et al.*, 2007). Note that this calculation works best on sorted HSCs, as the presence of progenitor cells in total BM transplants will influence the results. Examples are shown in Fig. 2.6.

A

	Sample 1		Sample 2	
	# Events	% Parent	# Events	% Parent
■ GR1	2,388	7.8	3,035	9.9
D Gr1	1,493	62.5	697	23.0
C Gr1	770	32.2	2,224	73.3
■ Not GR1	28,136	92.2	27,544	90.1
■ T cells (CD3e ⁺)	7,013	24.9	5,662	20.6
D CD3e	785	11.2	2,236	39.5
C CD3e	4,792	68.3	2,374	41.9
■ B cells (CD19 ⁺)	15,118	53.7	17,327	62.9
D CD19	4,583	30.3	9,549	55.1
C CD19	10,291	68.1	7,575	43.7
■ Monocytes	897	3.2	962	3.5
D Mono	578	64.4	209	21.7
C Mono	257	28.7	681	70.8

B

$$\text{HSC bias} = \frac{\frac{\# \text{ D GR1} + \# \text{ D Mono}}{\# \text{ Gr1} + \# \text{ Mono}}}{\% \text{ D CD19} + \% \text{ D CD3e}} = \frac{\frac{1493 + 578}{2388 + 897}}{0.303 + 0.112} = 1.519$$

C

$$\text{HSC bias} = \frac{\frac{\# \text{ D GR1} + \# \text{ D Mono}}{\# \text{ Gr1} + \# \text{ Mono}}}{\% \text{ D CD19} + \% \text{ D CD3e}} = \frac{\frac{697 + 209}{3035 + 962}}{0.395 + 0.551} = 0.239$$

D

$$\text{RU}_D = \text{RU}_C \frac{\% \text{ Donor GR1}}{\% \text{ Competitor Gr1}} = 5 \text{ RU} \frac{0.625}{0.322} = 9.70 \text{ RU}$$

E

$$\text{RU}_D = \text{RU}_C \frac{\% \text{ Donor GR1}}{\% \text{ Competitor Gr1}} = 5 \text{ RU} \frac{0.230}{0.733} = 1.57 \text{ RU}$$

Figure 2.6 Calculations from post-transplant peripheral blood analysis.

(A) Example of flow cytometry results for 2 samples, in numbers of events and in percentages. (B) Example of a balanced reconstitution between lymphoid and myeloid cells with sample 1. (C) Example of a lymphoid bias and/or ineffective long-term reconstitution with sample 2. (D-E) Sample calculations for donor repopulating units (RUD) using the data from (D) sample 1 with efficient granulocyte reconstitution and (E) sample 2 with much less efficient donor reconstitution.

24. If you wish to analyze the hematopoietic reconstitution in other organs, such as the thymus and spleen, you must homogenize the tissue first in a 6-well plate containing 3 mL PBS in each well. For this, we find it easier to use the plunger of a 10 mL needle-free syringe to crush the organ. Harvest cell suspension without the tissue membrane into a 15 mL canonical tube. Wash the well two times with 2 mL PBS and add to the sample. Cell count and adjust cell concentration as detailed in section 2.6.2 and proceed with staining using antibodies of interest.
25. Rather than looking at total percentage of donor chimerism versus competitor chimerism in the BM, it is more appropriate to establish a donor:competitor ratio as there could be remaining quiescent but non-functional HSCs from the recipient in the graft. Another way to compare different donors is the concept of competitive repopulating units (CRU). In a competitive assay as described in this protocol, competitive repopulating units allow us to compare the relative functionality of a donor against that of a competitor that serves as a standard. For this calculation, it is established that one repopulating unit (RU) is equivalent to the repopulation function of 100 000 bone marrow cells from the standard competitor. For example, if you injected one million total BM cells from the competitor mice in the recipient mice, it would be equivalent to 10 RU. The donor RU (RU_D) value is equivalent to the multiplication of the competitor RU (RU_C) multiplied by the percentage of donor-type cells divided by the percentage of the competitor type-cells in the same recipient, as shown below:

$$\frac{RU_D}{RU_C} = \frac{\% \text{ Donor cell - type}}{\% \text{ Competitor cell - type}} \rightarrow RU_D = RU_C \frac{\% \text{ Donor cell - type}}{\% \text{ Competitor cell - type}}$$

That way, you can compare the effectiveness of different donors (control and test) as they were all mixed with the same standard competitor (Harrison *et al.*, 1993). See [Fig. 2.6D,E](#) for examples of RU_D calculations with peripheral blood data.

26. It is possible to study the hematopoietic reconstitution past the 20 week time point by doing secondary transplants in which BM cells recovered from the primary recipients are injected into lethally irradiated secondary recipients. Note that secondary recipients should match the primary recipients for easier interpretation of the results. As mentioned in **Note 7**, you can

use sorted HSCs or total BM cells from the first transplant. If you inject total BM cells, it is still possible to estimate the ratio donor:competitor HSCs from the primary BM based on flow cytometry results and compare it to the one recovered from secondary transplants. You should pool BM cells from at least two primary recipients for each group (test and control) and inject a total of 5-10 million cells per secondary recipient as there are fewer functional HSCs in irradiated and reconstituted mice than in non-irradiated mice (Abidin *et al.*, 2015). If injecting sorted HSCs, it is crucial to add new competition. You can also add new competition to total BM cell transplants if necessary (for example, if the original competitor cell contribution is very low). The new competitor population should ideally match with the recipient or be otherwise distinguishable from the remaining competitor cells from the primary transplant.

2.8 Acknowledgements

Research in the lab was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC Discovery grant RGPIN-2018-05258), Canadian Institutes of Health Research (CIHR operating grant PJT-148614) and the Canada Foundation for Innovation (CFI Leaders Fund grant 31377). KMH is a Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) Research Scholar. SB is supported by a CIHR Canada Graduate Scholarship.

3 VANGL2 REGULATES LONG-TERM HSC MAINTENANCE

Titre en français : Vangl2 régule le maintien à long terme des CSH

Auteurs : Sarah Bouali¹, Roxann Héту-Arbour¹, Célia Gardet^{1,2}, and Krista M. Heinonen¹

¹ Institut National de la Recherche Scientifique, Laval, QC, Canada.

² Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement - AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Paris, France.

Titre de la revue ou de l'ouvrage :

Journal : Soumis à *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (voir **ANNEXE I**)

Publié : -

DOI : -

Contribution des auteurs :

S.B. : Premier auteur, conception et design, collecte de données, analyse de données, conception des figures et rédaction du manuscrit.

R.H.A. : Collecte et analyse des données, aide dans les essais de transplantations.

C.G. : Collecte et analyse des données.

K.M.H. : Supervision et financement, conception et design, analyse des données, édition et approbation finale du manuscrit.

Collecte et analyse des données :

S.B. : Figure 1 (A-F), 2 (A-E), 3 (A-H), 4 (A-F), 5 (A-G), 6 (A-H), S1 (A-F), S2 (A-C), S3 (A-F), S4 (A-C).

R.H.A. : Figure 6 (A-H), S4 (A-C).

C.G. : Figure S5 (A-E).

3.1 Highlights

- Vangl2 loss leads to increased numbers of multipotent progenitor cells in old mice
- Vangl2-deficient HSCs show an age-dependent impairment in post-transplant recovery in primary recipients
- Vangl2 is essential for HSC self-renewal and hematopoietic recovery in secondary and tertiary recipients
- Vangl2-deficient HSCs show an increase in senescence-associated cell cycle inhibitor p16^{INK4a} expression and enhanced β -catenin activity

3.2 Summary

Regulation of hematopoietic stem cell (HSC) self-renewal and differentiation is essential for their maintenance, and HSC polarity has been shown to play an important role in this regulation. Vangl2, a key component of the Wnt/polarity pathway, is expressed by fetal and adult HSCs, but its role in hematopoiesis and HSC function is unknown. Here we show the deletion of Vangl2 in mouse hematopoietic cells impairs HSC long-term maintenance and self-renewal. Old *Vangl2*-deficient mice showed increased expansion of myeloid-biased multipotent progenitor cells concomitant with splenomegaly. Moreover, Vangl2-deficient HSCs were not able to effectively reconstitute the recipient bone marrow in serial transplants, or when coming from slightly older donors, demonstrating impaired self-renewal and expansion. Aged *Vangl2*-deficient HSCs have increased levels of senescence-associated p16^{INK4a} and active β -catenin, which could contribute to long-term HSC loss of function. Overall, our findings identify Vangl2 as a new regulator of hematopoiesis and HSC long-term maintenance.

Keywords : Hematopoietic stem cells, Vangl2, Wnt/Planar cell polarity pathway, bone marrow transplants, hematopoietic recovery

3.3 Introduction

Hematopoiesis serves to generate trillions of new blood cells every day from a small number of hematopoietic stem cells (HSC). HSCs possess the ability to self-renew and differentiate into erythroid, myeloid and lymphoid cells. This is clinically used in bone marrow transplantation (BMT), in which non-functional HSCs are replaced with healthy ones. BMT is the most effective cell therapy used to treat hematopoietic malignancies, especially blood cancers. Healthy HSCs from compatible donors are traditionally obtained from bone marrow (BM), but can also be obtained from cytokine-mobilized peripheral blood or umbilical cord blood. Understanding HSC regulators could help studying HSCs *ex vivo* which remains a prominent challenge today and improve BMT success by expanding the use of cord blood HSCs which are associated with fewer risks of graft-versus-host-disease (Li & Sykes, 2012).

HSCs reside in the BM niche, where they receive different cues regulating their survival and quiescence vs proliferation. Among these, Wnt proteins (Staal *et al.*, 2008) regulate the balance between HSC proliferation and maintenance through three interconnected pathways: the canonical Wnt/ β -catenin pathway, extensively studied and known to control HSC self-renewal (Luis *et al.*, 2012), and non-canonical Wnt/ Ca^{2+} (Florian *et al.*, 2012; Florian *et al.*, 2013) and Wnt/Planar Cell Polarity (PCP) (Abidin *et al.*, 2015; Le Grand *et al.*, 2009; Lhoumeau *et al.*, 2016; Sugimura *et al.*, 2012) pathways, mostly known for cell maintenance. Wnt/PCP pathway was originally identified as a means to control epithelial cell polarity (Seifert & Mlodzik, 2007), but its role in HSC regulation has been more recently discovered. Previous work in our laboratory suggests a protective role for Wnt/PCP signaling in HSCs, particularly under hematopoietic stress (Abidin *et al.*, 2015; Heinonen *et al.*, 2011). Frizzled-6, a receptor which has a prevalent role in non-canonical Wnt/PCP signalling (Chang *et al.*, 2016), regulates HSC self-renewal and progenitor cell survival post-transplant and is crucial for emergency hematopoietic response during inflammation (Abidin *et al.*, 2015) and infections (Abidin *et al.*, 2017). Others have demonstrated that mice deficient in the Wnt/PCP component Ptk-7 exhibited deregulated HSC proliferation and migration (Lhoumeau *et al.*, 2016), while Frizzled-8 and Celsr2/Fmi maintained HSC long-term quiescence in the BM (Sugimura *et al.*, 2012). In sum, various Wnt/PCP pathway components have been implicated in regulating HSC proliferation and maintenance.

Vangl2 is another key regulator of the Wnt/PCP signalling pathway, and fetal and adult HSCs express the Vangl2 gene (Kwarteng *et al.*, 2018). Moreover, Vangl2 is expressed more strongly by HSCs and progenitor cells compared to mature blood cells (Choi *et al.*, 2019). Vangl2 is known for its crucial role in neural plate development and mutations in this gene are associated with neural tube defects in mice (Murdoch *et al.*, 2001) and human (Kibar *et al.*, 2011). In mouse epithelial cells, Vangl2 is known to control hair bundle orientation and plays a role in Frizzled-3 and Frizzled-6 cell surface localisation in the inner ear (Montcouquiol *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006). Despite being highly expressed by HSCs and progenitor cells and having a crucial role in the PCP pathway, nothing is known yet about the role of Vangl2 in HSC regulation and maintenance.

In this paper, we show that Vangl2 loss in HSCs impairs post-transplant recovery and leads to BM failure following serial transplantation. There are also alterations in the multipotent progenitor cell (MPP) pool of old Vangl2-deficient mice, and old Vangl2-deficient HSCs show increased expression of the senescence-associated cell cycle inhibitor p16^{INK4a} concomitant with increased β -catenin stabilization. These results put forward the important role of Wnt/PCP Vangl2 protein in HSC self-renewal and maintenance and opens the door for further research on Vangl2 as a regulator of hematopoiesis and HSC function.

3.4 Results

Vangl2 regulates BM multipotent progenitor cell numbers and spleen size in old mice

To investigate the functional role of Vangl2 in homeostatic conditions, we first analyzed BM hematopoiesis using a mouse model in which the polarity gene *Vangl2* is inactivated in all hematopoietic lineages using the *Vav-iCre-LoxP* system (*Vangl2^{Δ/Δ}* mice). We analyzed mice from both sexes and different age groups by flow cytometry (Figure 3.1A). When evaluating BM, we found a tendency toward an increased total BM cellularity ($2.4 \times 10^7 \pm 2.1 \times 10^6$ for controls vs $2.7 \times 10^7 \pm 2.3 \times 10^6$ for *Vangl2^{Δ/Δ}*), which became significant when normalized to bodyweight in old (18-month-old) *Vangl2^{Δ/Δ}* mice (Figure 3.1B). Old *Vangl2^{Δ/Δ}* mice presented a significant increase in total Lin⁻Sca-1⁺cKit⁺ (LSK) cell numbers driven by the expansion of myeloid-biased multipotent progenitor cell populations (MPP2 and MPP3) compared to their littermate controls (Figure 3.1C, 3.1F). Most of these changes were not seen in young (2-month-old) and adult (6-month-old) *Vangl2^{Δ/Δ}* groups, although an increase in MPP3 frequency was already detectable in adult mice (Figure 3.1D, E). Similar tendencies were observed in both sexes (Figure S3.7 A, B, C); there was a significant decrease in the number of CD150⁺ CD48⁻ LT-HSCs in *Vangl2^{Δ/Δ}* males compared to *Vangl2^{Δ/Δ}* females, but the difference was not significant when compared to their sex-matched controls (Figure S3.7 C). Taken together, these results indicate that Vangl2 is dispensable for HSC emergence and their steady-state maintenance, but it may play a functional role in their long-term self-renewal and age-dependent skewing toward myeloid differentiation.

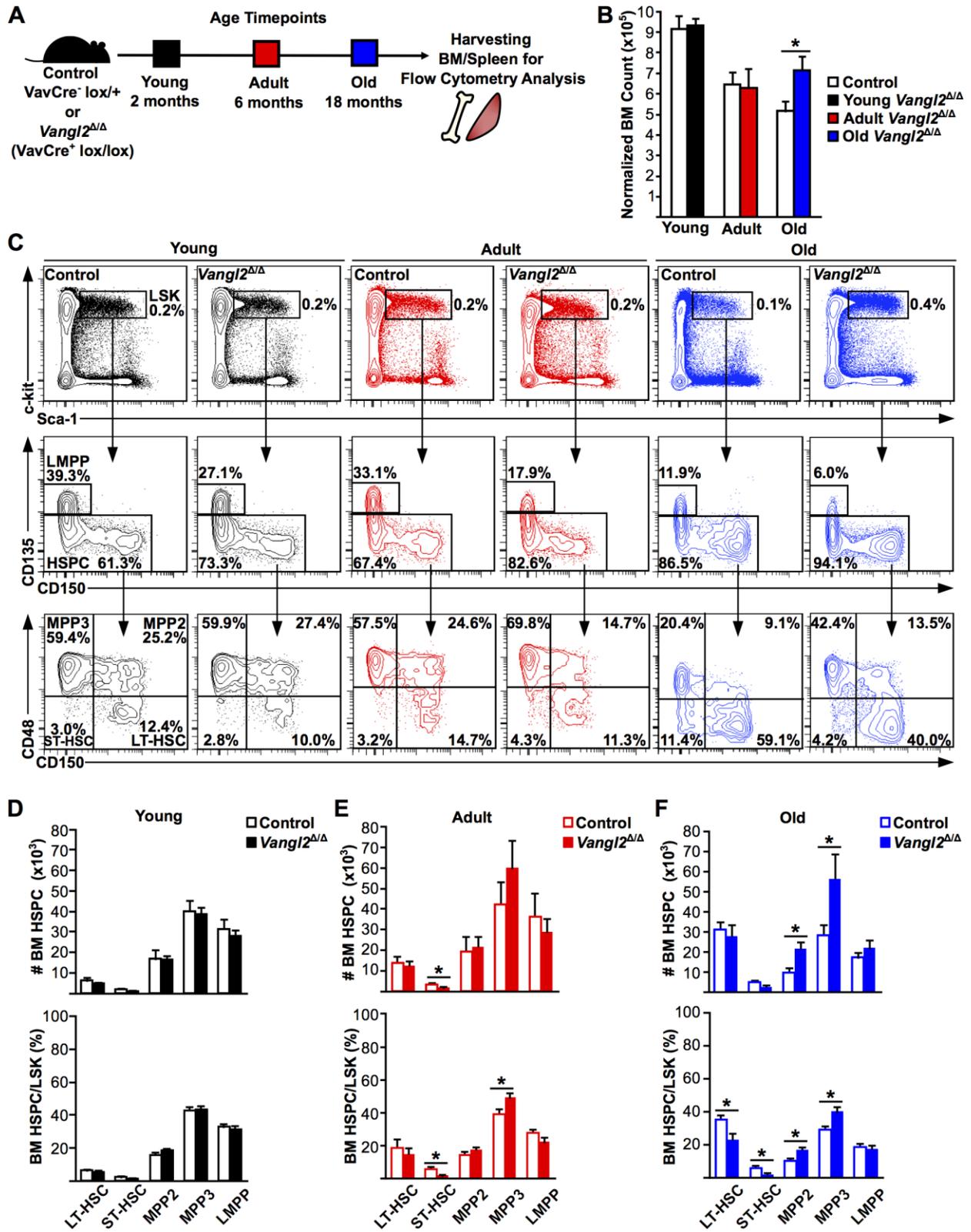


Figure 3.1 *Vangl2* loss in hematopoietic cells increases myeloid-biased multipotent progenitor cell numbers in old mice.

(A) Experimental design for flow cytometry analysis of young (2-month-old, in black), adult (6-month-old, in red) and old (18-month-old, in blue) *VavCre⁺Vangl2^{lox/lox}* mice in which *Vangl2* is ablated in all hematopoietic lineages (*Vangl2^{Δ/Δ}*) and littermate controls. (B) Histogram represents absolute numbers of BM cells per leg (tibia + femur) per bodyweight (g) for young, adult and old mice (mean + SEM). (C) Representative flow cytometry data are shown for young, adult and old mice. Populations were defined as follows: Lin⁻Sca1⁺c-Kit⁺ (LSK), CD135⁺CD48⁺CD150⁻ (LMPP), CD135⁻CD48⁺CD150⁻ (MPP3), CD135⁻CD48⁺CD150⁺ (MPP2), CD135⁻CD48⁻CD150⁻ (ST-HSC) and CD135⁻CD48⁻CD150⁺ (LT-HSC). Numbers within panels represent cell percentage for the panel shown. (D-F) Quantitative results of HSCs and progenitor cells flow cytometry analysis are represented in (D) for young, (E) adult, and (F) old mice. Histograms represent absolute numbers of BM cells in top panels and stem/progenitor cell percentage within the LSK pool in bottom panels (mean + SEM). See also Figure S3.7. Young (n=17 control, 18 *Vangl2^{Δ/Δ}*), adult (n=10 control, 11 *Vangl2^{Δ/Δ}*), old (n=13 control, 13 *Vangl2^{Δ/Δ}*), **p*≤0.05.

Vangl2 is highly expressed by HSCs compared to mature blood cells (Choi *et al.*, 2019). Hence, to evaluate the role of *Vangl2* in differentiation, we next analyzed mature lymphoid and myeloid cells in the BM and spleen (Figure S3.8A-B). We found no differences in total spleen cellularity between control and *Vangl2^{Δ/Δ}* mice (Figure 3.2A). However, we noted a significant increase in spleen size and spleen/bodyweight ratio in old *Vangl2^{Δ/Δ}* mice (Figure 3.2B). Although the proportion of myeloid cells increased with age, as expected, there was no significant difference in the number of myeloid cells in the BM or spleen between *Vangl2^{Δ/Δ}* mice and age-matched controls (Figure 3.2C-E), irrespective of sex (Figure S3.7D-F). However, there was a tendency toward an increased accumulation of myeloid cells in the spleen of old *Vangl2^{Δ/Δ}* mice (Figure 3.2E) that appeared mostly restricted to females (Figure S3.7F), in line with the stronger MPP expansion in the BM of *Vangl2^{Δ/Δ}* females (Figure S3.7C).

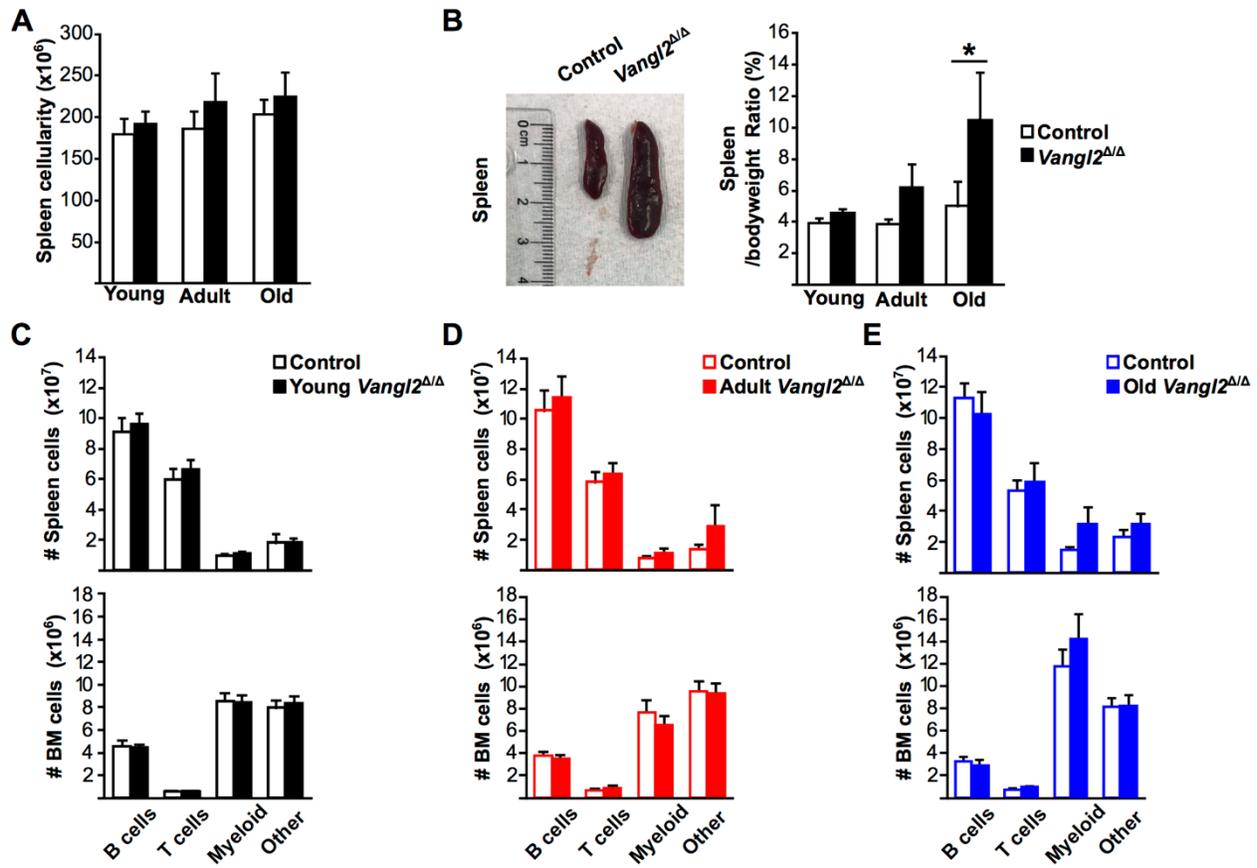


Figure 3.2 Vangl2 is dispensable for steady-state lympho-myelopoiesis, but its absence increases the spleen index in old mice.

(A) Spleen cellularity for young, adult and old mice (mean + SEM). (B) Spleen index as determined by the spleen weight (g)/bodyweight (g) ratio. (C-E) Histograms represent absolute spleen (top panels) and BM (bottom panels) B lymphocyte (CD19⁺), T lymphocyte (CD3 ϵ ⁺), and myeloid (CD11b^{hi}) cell numbers for (C) young mice, (D) adult mice, and (E) old mice (mean + SEM). CD19⁻ CD3 ϵ ⁻ CD11b^{lo} cells are represented as “Other”. See also Figure S3.7 and S3.8. Young (n=17 control, 19 Vangl2^{Δ/Δ}), adult (n=10 control, 11 Vangl2^{Δ/Δ}), old (n=13 control, 13 Vangl2^{Δ/Δ}), *p \leq 0.05.

Vangl2-deficient progenitor cells show impaired expansion in culture

The increase in BM multipotent progenitors in older Vangl2^{Δ/Δ} mice led us to investigate the proliferative activity of Vangl2^{Δ/Δ} HSCs. To evaluate HSC cell cycle, we performed a Ki-67 and DAPI intracellular staining and analyzed different cell cycle phases by flow cytometry (Szade *et al.*, 2016). As expected, we found no differences between controls and Vangl2^{Δ/Δ} mice in young and adult groups (Figure 3.3A, top and middle panel). However, we did find differences in the old group in which Vangl2^{Δ/Δ} mice had fewer quiescent LSKs and more LSKs in G₁ phase (Figure 3.3B). This was mostly due to the changes in the relative frequency of cycling MPPs as

compared to more quiescent HSCs (Figure 3.1C, F), though, as there were no differences seen in most sub-populations, except for an increase in the proportion of *Vangl2*^{ΔΔ} ST-HSCs in G₀ phase (Figure 3.3C). To evaluate whether differentiation *in vitro* was affected, we evaluated BM myeloid colony-forming units after 10-14 days of culture. As expected, we did not see any differences in young and adult mice (Figure 3.3D,E), but there was a slight increase in the total number of colonies from old *Vangl2*^{ΔΔ} BM (Figure 3.3F). Flow cytometry analysis revealed that although more colonies were generated by old *Vangl2*^{ΔΔ} mice, they consisted on average of fewer cells (Figure 3.3G, H). This was consistent with a decreased frequency of CD117⁺ cells that are normally found in colonies with high proliferative potential (Figure 3.3G, H). These results suggest *Vangl2*-deficient old HSCs and progenitor cells have a decreased proliferative capacity *in vitro*, which reinforces the hypothesis that *Vangl2* is essential for HSC self-renewal.

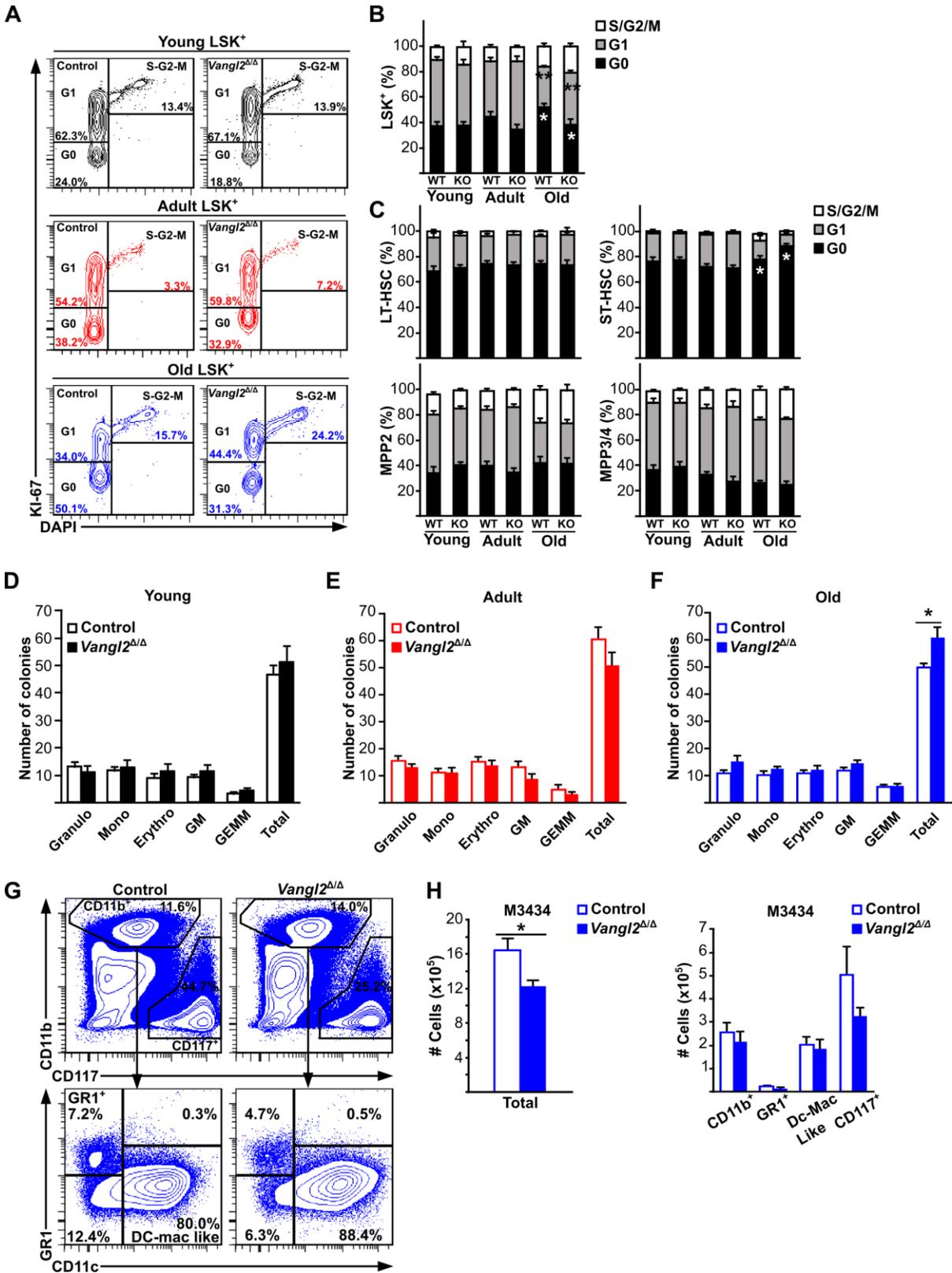


Figure 3.3 *Vangl2* loss impairs old myeloid progenitor cell expansion in vitro.

(A) Representative flow cytometry data are shown for young, adult and old LSK⁺ cells. Numbers within panels represent G0, G1 and S-G2-M cell percentage for the panel shown. (B and C) Quantitative results of flow cytometry cell cycle analysis are represented for young, adult and old (B) LSK⁺ cells and (C) LT-HSC, ST-HSC, MPP2 and MPP3/4 cells (mean + SEM). Young (n= 10 control, 12 *Vangl2*^{ΔΔ}), adult (n= 8 control, 10 *Vangl2*^{ΔΔ}), old (n= 8 control, 10 *Vangl2*^{ΔΔ}). (D-F) Number of colonies counted after 10-14 days in vitro are represented for (D) young (n=8), (E) adult (n=5) and (F) old (n=5) BM cells. Granulo: granulocytes, Mono: monocyte, Erythro: erythroid, GM: granulocyte/macrophage, GEMM: granulocyte/erythroid/macrophage/megakaryocyte. (G) Representative flow cytometry data of harvested colony-forming units. (H) Histograms represent cell numbers recovered per pooled duplicate petri dishes seeded with BM cells from old mice (mean + SEM). **p*≤0.05, ***p*≤0.005.

Vangl2 is required for post-transplant peripheral blood and BM reconstitution in adult donors

Considering differences seen in homeostatic conditions in *Vangl2*^{ΔΔ} mice, we next evaluated HSC functionality under hematopoietic pressure. The gold-standard assay for HSC function is to evaluate their ability to reconstitute a lethally irradiated host so we conducted competitive bone marrow transplant assays as described (Hétu-Arbour *et al.*, 2021a; Kwarteng & Heinonen, 2016) and followed post-transplant recovery by analyzing peripheral blood reconstitution for 16 weeks and BM recovery at 20 weeks by flow cytometry (Figure 3.4A). To evaluate the possible age-related role of *Vangl2*, we performed BM transplants with young and adult donors. We found no differences in recovery in primary recipient mice transplanted with young *Vangl2*^{ΔΔ} BM cells. However, we observed a significant decrease in overall peripheral blood chimerism after 16 weeks in mice transplanted with adult *Vangl2*^{ΔΔ} BM cells compared to their controls (Figure 3.4B, C; Figure S3.8C). Furthermore, mice transplanted with adult *Vangl2*^{ΔΔ} BM cells showed a significant decrease in donor-derived GR1^{hi} granulocytes (12-16 weeks post-transplant), GR1^{lo} monocytes (8-16 weeks post-transplant), CD19⁺ B cells (16 weeks post-transplant) and CD3ε⁺ T cells (16 weeks post-transplant) in peripheral blood (Figure 3.4C, D). We next evaluated BM HSC and progenitor cell recovery 20 weeks post-transplant. As expected following peripheral blood analysis, no differences were seen in mice transplanted with young *Vangl2*^{ΔΔ} vs control BM cells. However, mice transplanted with adult *Vangl2*^{ΔΔ} BM cells had a significant decrease in donor-derived BM LT-HSCs as compared to controls (Figure 3.4E, F). No differences were observed in BM and spleen mature cell numbers at 20 weeks in primary transplants (Figure S3.9A, B).

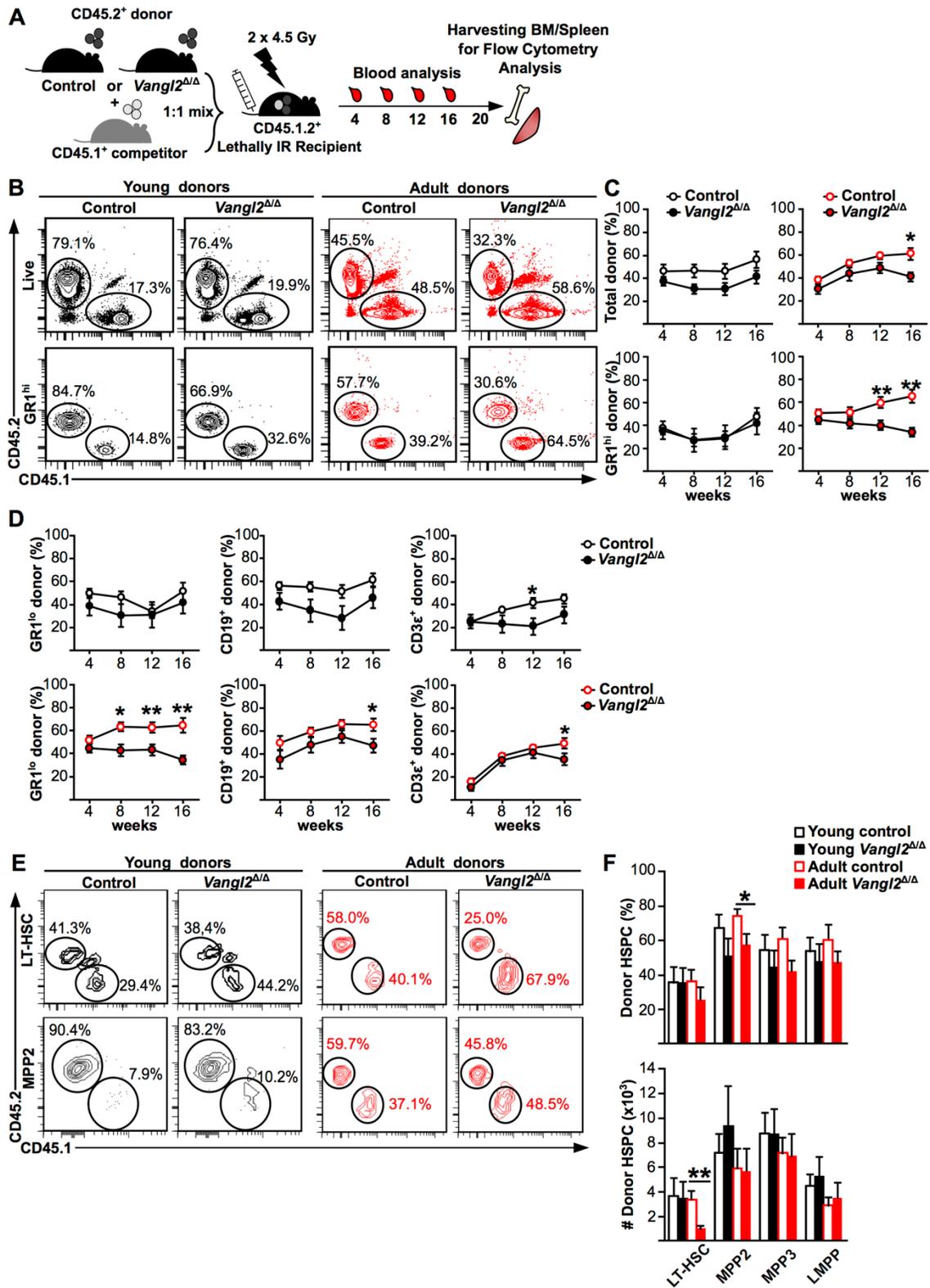


Figure 3.4 *Vangl2* is required for hematopoietic reconstitution in adult donors.

(A) Experimental design for primary transplants. (B) Representative flow cytometry data showing the percentage of donor-derived total and GR1^{hi} cells in recipient peripheral blood post-

transplant for young (16 weeks) and adult (12 weeks) donors. (C) Graphs represent pooled results of donor-derived total and GR1^{hi} cells in recipient peripheral blood for young and adult donors (mean+SEM). (D) Graphs represent pooled results of donor-derived GR1^{lo} cells, CD19⁺ B cells and CD3 ϵ ⁺ T cells in recipient peripheral blood for young and adult donors (mean+SEM). (E) Representative flow cytometry data showing the percentage of CD45.2⁺ donor-derived or CD45.1⁺ competitor LT-HSCs (top panels) and MPP2s (bottom panels) in recipient BM 20 weeks post-transplant for young and adult donors. (F) Histograms represent mean of young or adult donor-derived HSPCs percentage or absolute cell numbers in BM 20 weeks post-transplant (mean+SEM). See also Figure S3.8, S3.9 and S3.10. Young female transplants represent three independent experiments (n=14-16 control, 13-15 *Vangl2* $\Delta\Delta$) and adult female transplants represent two independent experiments (n=10 control, 11 *Vangl2* $\Delta\Delta$). * $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.005$.

***Vangl2* $\Delta\Delta$ HSCs fail in serial transplants, leading to complete hematopoietic failure**

To evaluate *Vangl2* $\Delta\Delta$ HSCs long-term self-renewal capacity, we then performed serial BM transplantation assays by using primary control or *Vangl2* $\Delta\Delta$ recipients as BM donors (Figure 3.5A). Secondary transplants from primary *Vangl2* $\Delta\Delta$ donors showed a significant decrease in myeloid GR1^{hi} and GR1^{lo} long-term peripheral blood reconstitution as compared to controls (Figure 3.5B-D in black). Tertiary transplants showed a complete failure of peripheral blood reconstitution as little to no *Vangl2* $\Delta\Delta$ donor-derived cells were observed from 4-16 weeks in both myeloid and lymphoid lineages (Figure 3.5B-D in red), while control donor-derived cells represented up to 80% total peripheral blood. We also observed a significant decrease in *Vangl2* $\Delta\Delta$ donor-derived LT-HSC, MPP2, MPP3 and LMPP numbers in secondary transplants that was further exacerbated in tertiary transplants where *Vangl2* $\Delta\Delta$ donor contribution was mostly non-existent (Figure 3.5E, F). *Vangl2* $\Delta\Delta$ donor-derived mature B and T cell numbers were not altered in spleen or BM of secondary recipients, but short-lived GR1^{hi} granulocytes dependent on constant replacement showed a significant decrease (Figure S3.9C, D) that on average was at least as strong as that observed in peripheral blood (approximately two-fold). Furthermore, *Vangl2* $\Delta\Delta$ cells were essentially absent in tertiary recipients (Figure S3.9E, F). To evaluate HSC expansion relatively to primary or secondary transplants, we compared donor LT-HSC numbers from the graft to those recovered 20 weeks post-transplant. We found no expansion of *Vangl2* $\Delta\Delta$ LT-HSCs in secondary or tertiary transplants, resulting in net loss of cells and the absence of *Vangl2* $\Delta\Delta$ LT-HSCs in tertiary transplants (Figure 3.5G). In comparison, control LT-HSCs retained their capacity to expand (approximately 2.5-fold in both cases). Similar results were obtained with male mice with the exception of slightly improved *Vangl2* $\Delta\Delta$ GR1^{hi} granulocyte reconstitution in peripheral blood following primary transplants; however, donor contribution was significantly decreased in all lineages following secondary transplants (Figure S3.10 A, B).

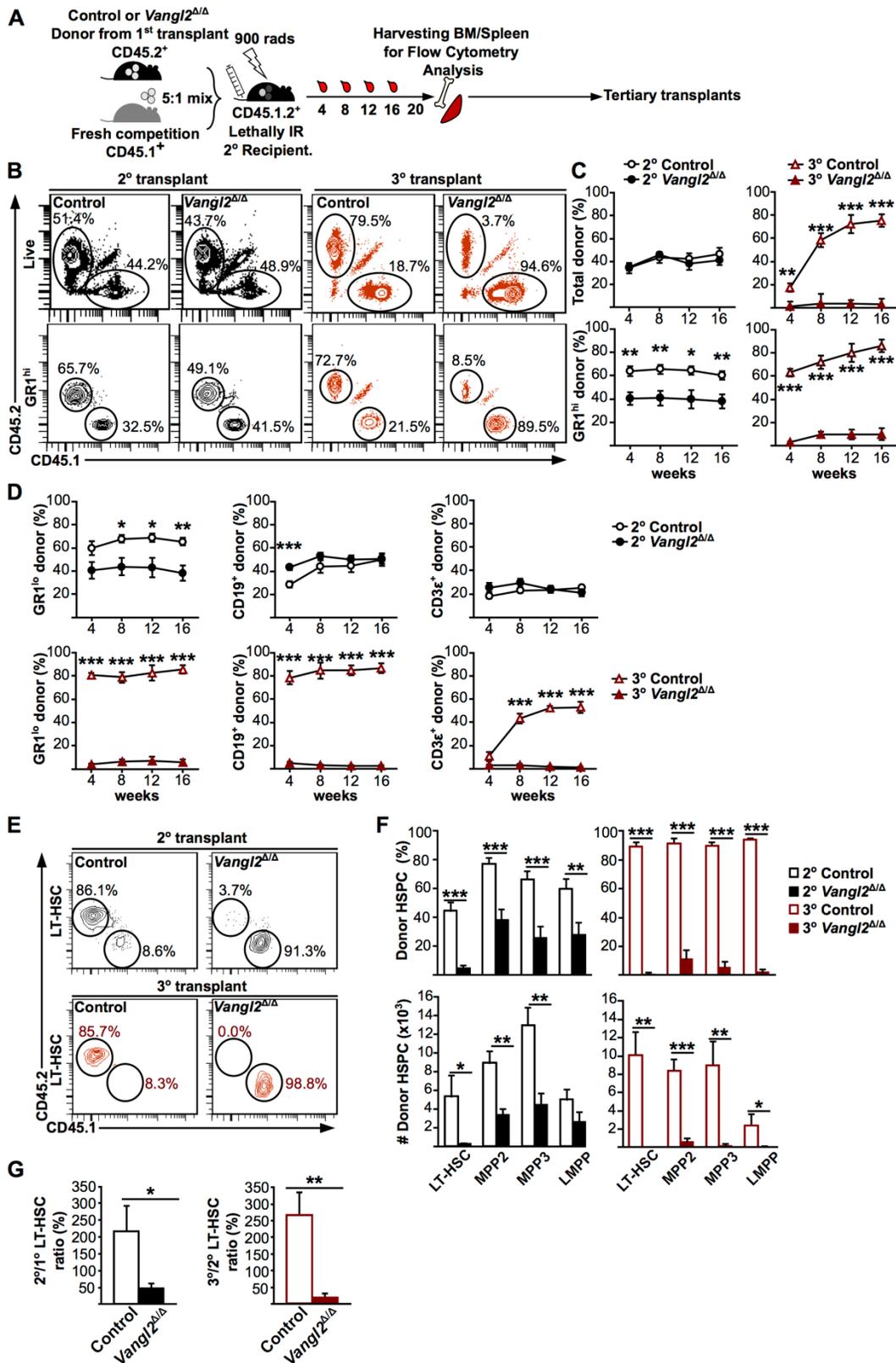


Figure 3.5 *Vangl2* deficiency severely impairs HSC self-renewal in serial transplants leading to BM failure.

(A) Experimental design for long-term secondary and tertiary transplants. (B) Representative flow cytometry data showing the percentage of donor-derived total and GR1^{hi} cells in secondary/tertiary recipients peripheral blood 16 weeks post-transplant. (C) Graphs represent pooled results of donor-derived total and GR1^{hi} cells in secondary/tertiary recipients peripheral blood (mean + SEM). (D) Graphs represent pooled results of donor-derived GR1^{lo} monocytes, CD19⁺ B cells and CD3ε⁺ T cells in secondary/tertiary recipients peripheral blood (mean + SEM). (E) Representative flow cytometry data showing the percentage of CD45.2⁺ donor-derived or CD45.1⁺ competitor LT-HSCs in BM of secondary (top panels) and tertiary recipients (bottom panels) 20 weeks post-transplant. (F) Histograms represent mean of donor-derived HSPCs percentage or absolute cell numbers in secondary/tertiary recipient BM 20 weeks post-transplant (mean + SEM). (G) Donor-derived LT-HSC ratios 20 weeks post-transplant. See also Figure S3.8, S3.9 and S3.10. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$. Secondary transplants represent two independent transplant groups (n=9 control, 10 *Vangl2*^{Δ/Δ}), while tertiary transplants represent one single group (n=4 control, 6 *Vangl2*^{Δ/Δ}).

Vangl2-deficiency increases senescence-associated p16 expression in LT-HSCs and promotes β-catenin stabilization

Since Wnt/PCP and Vangl2 signalling is known to control polarity in other cell types and because establishment of polarity is important for HSC self-renewal (Florian *et al.*, 2018), we next investigated if Vangl2 loss impaired HSC polarity. To do so, we analyzed Cdc42 distribution, a small GTPase and polarity marker in HSCs, with imaging flow cytometry (Figure 3.6A) (Florian *et al.*, 2012). We found no significant differences in polar and apolar CD150⁺ LSKs or Cdc42 intensity in old *Vangl2*^{Δ/Δ} mice (Figure 3.6B, C). Similarly, no differences were found in young and adult mice, suggesting Vangl2 does not play a role in Cdc42 activation or localisation (Figure S3.11A, B). However, as previously shown by others (Florian *et al.*, 2012), cells from old mice were more frequently apolar. Non-canonical Wnt signalling can inhibit canonical Wnt/β-catenin canonical pathway (Nemeth *et al.*, 2007), so we next evaluated β-catenin stabilization and localization (Figure 3.6D). Nuclear *versus* cytoplasmic β-catenin ratios were not altered in old *Vangl2*^{Δ/Δ} mice (Figure 3.6E). Similar results were found with young and adult mice (Figure S3.11C, D). However, we observed a significant increase in β-catenin mean fluorescent intensity within old *Vangl2*^{Δ/Δ} HSCs compared to controls, suggesting a potentially higher β-catenin activity in old *Vangl2*^{Δ/Δ} cells (Figure 3.6F, Figure S3.11E). Prolonged Wnt/β-catenin signalling is thought to induce senescence in other cell types (Gu *et al.*, 2014), and it has been linked to HSC exhaustion and hematopoietic failure (Scheller *et al.*, 2006). Therefore, we used p16^{INK4a} to evaluate old *Vangl2*^{Δ/Δ} HSC senescence. There was a significant increase in p16^{INK4a} expression among LSKs as well as LT-HSCs in old *Vangl2*^{Δ/Δ} BM, suggesting p16 activation within the BM progenitor cell pool in old *Vangl2*^{Δ/Δ} mice (Figure 3.6G, H).

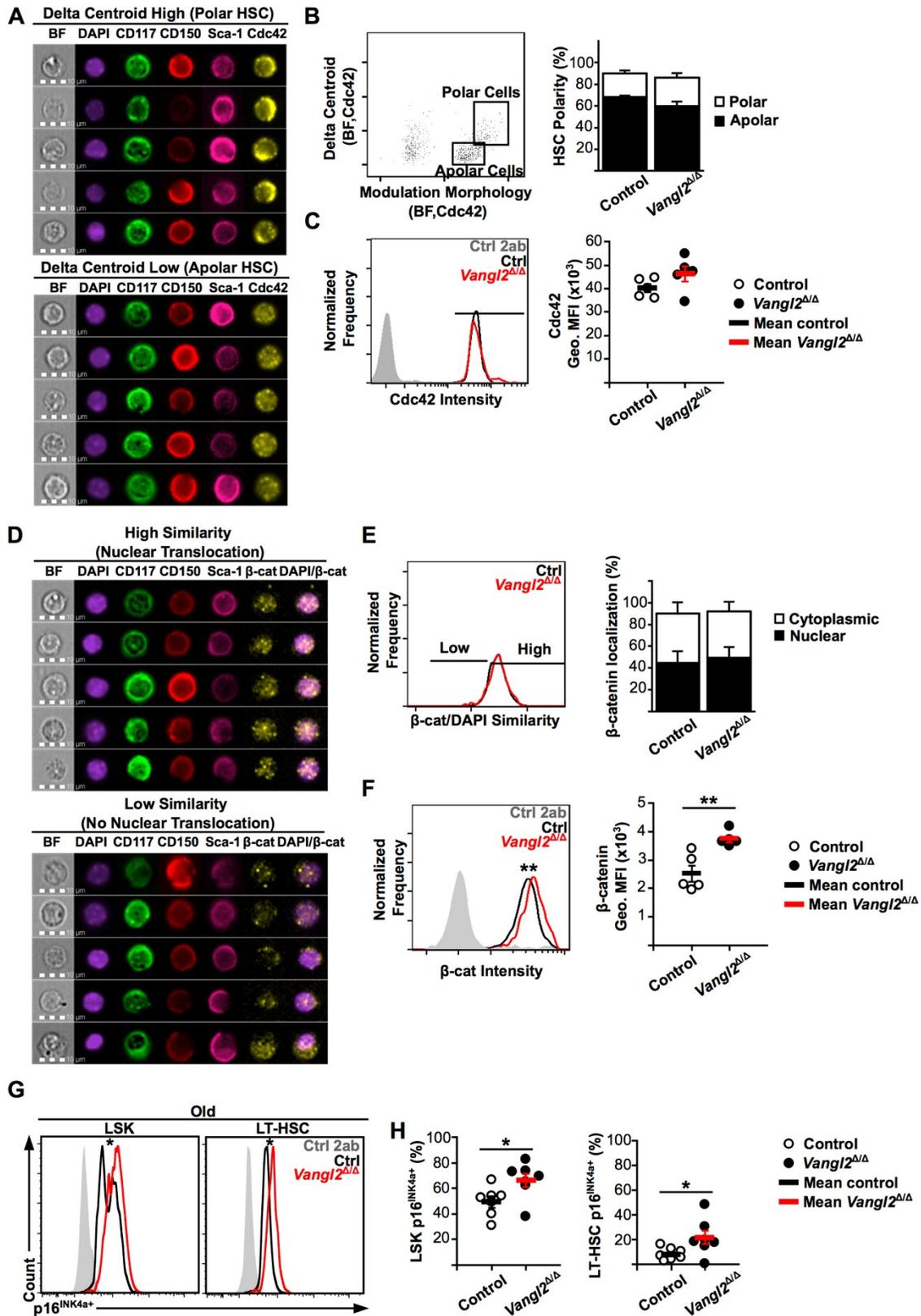


Figure 3.6 Vangl2 loss increases β -catenin activation and senescence marker p16 expression in old HSCs.

(A) Representative images of polar and apolar CD150⁺ LSK⁺ cells. (B) Gating strategy based on Cdc42 delta centroid and morphology modulation features. Histogram represents the frequency of polar and apolar CD150⁺ LSK⁺ cells from old mice (mean + SEM). (C) Representative overlay of Cdc42 staining intensity (left) and quantification of Cdc42 geometric mean of fluorescence intensity (Geo. MFI). (D) Representative images of β -catenin (β -cat) nuclear translocation based on β -catenin/DAPI similarity analysis. (E) Gating strategy based on β -cat/DAPI similarity dilate analysis. Histogram represents cytoplasmic and nuclear β -catenin localization in old CD150⁺ LSK⁺ cells (mean + SEM). (F) Representative overlay of β -catenin staining intensity (left) and quantification of β -catenin geometric mean of fluorescence intensity (Geo. MFI) in old CD150⁺ LSK⁺ cells. (G) Representative overlay of p16^{INK4a} expression in old LSK⁺ and LT-HSCs. (H) Graphs represent the frequencies of p16⁺ cells within LSK⁺ and LT-HSC compartments (mean + SEM). See also Figure S3.11. * $p \leq 0.05$. (n=5-6, three independent experiments).

3.5 Discussion

The importance of Wnt signalling in HSC self-renewal and hematopoiesis has been widely studied and debated, and while an equilibrium between the various intracellular pathways promotes the most optimal conditions, how this equilibrium is actually maintained remains still largely undefined. Although inhibition of Wnt binding to its receptors impairs HSC self-renewal and differentiation (Fleming *et al.*, 2008; Renström *et al.*, 2009; Schaniel *et al.*, 2011), Wnt glycosylation and secretion is reportedly dispensable for adult hematopoiesis (Kabiri *et al.*, 2015). Given the large number and potential promiscuity of Wnt ligands combined with the variety of hematopoietic and non-hematopoietic BM cells producing them, we chose to focus our study on the Wnt/PCP coreceptor Vangl2. Wnt/PCP components have been recently shown to be important in HSC maintenance (Abidin *et al.*, 2015; Lhoumeau *et al.*, 2016; Sugimura *et al.*, 2012). Despite being highly expressed by HSCs and progenitor cells (Choi *et al.*, 2019), Vangl2 is best known for its crucial role in neural tube development and cell polarity (Kibar *et al.*, 2001; Montcouquiol *et al.*, 2003; Murdoch *et al.*, 2001). Our results demonstrate an essential role for Vangl2 in HSC self-renewal and long-term maintenance and suggest it could play a role in regulating age-associated hematopoietic alterations.

Hematopoietic aging is associated with the accumulation of cells expressing HSC markers but having more limited self-renewal capacity on individual basis and presenting with a bias toward myeloid differentiation (Beerman *et al.*, 2010a; de Haan & Lazare, 2018; Dykstra *et al.*, 2011). While Vangl2 was not required for normal hematopoiesis in young mice, aging 18-month-old *Vangl2* ^{Δ/Δ} mouse BM contained more myeloid-biased multipotent progenitor cells, and a similar trend could be observed in 6-month-old adults as well, suggesting a gradual effect of Vangl2 deletion in HSC maintenance that increases with age. This was not associated with an overall

loss of HSC quiescence, in contrast to what was reported for *Fzd8*^{-/-} or *Celsr2/Fmi*^{-/-} HSCs (Sugimura *et al.*, 2012), as we observed no significant increase Ki-67⁺ cycling cells in any age group. To the contrary, there was a slight but significant increase in the proportion of quiescent *Vangl2*^{Δ/Δ} ST-HSCs, and *Vangl2*^{Δ/Δ} HSCs and MPPs expressed increased levels of the senescence-associated cell cycle inhibitor p16^{INK4a}. Although p16^{INK4a}-mediated senescence may not play a major role in normal HSC aging, its enhanced expression impairs HSC self-renewal (Attema *et al.*, 2009; Oguro *et al.*, 2006). The absence of Vangl2 might thus exacerbate the effects of HSC aging by upregulating p16^{INK4a}. Indeed, although there was a slight increase in the frequency of myeloid colony-forming cells in *Vangl2*^{Δ/Δ} BM, in line with the accrued number of myeloid-biased MPPs, these colonies consisted of fewer cells, indicative of an attenuated proliferative potential. Moreover, while young *Vangl2*^{Δ/Δ} BM remained functional in primary transplants, HSCs from 6-month-old *Vangl2*^{Δ/Δ} donors showed decreased expansion and long-term myeloid reconstitution, demonstrating the impact of age on *Vangl2*^{Δ/Δ} HSC function. Serial transplants further confirmed the decreased repopulating capacity of *Vangl2*^{Δ/Δ} BM cells, indicating that cell-intrinsic Vangl2 is required for HSC expansion and self-renewal.

HSC self-renewal is dependent not only on the frequency of cell division but also on the type of division that takes place. Young adult BM HSCs would preferentially undergo asymmetric self-renewal divisions, thus generating daughter cells ready for differentiation while at the same time maintaining the size of the stem cell pool (Florian & Geiger, 2010; Florian *et al.*, 2013; Ting *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2007). Increased Wnt5a/Cdc42 signaling has been shown to promote functional aging via loss of HSC polarity (Florian *et al.*, 2012; Florian *et al.*, 2018; Florian *et al.*, 2013), whereas Wnt/PCP receptors appear to favor HSC self-renewal (Abidin *et al.*, 2015; Lhoumeau *et al.*, 2016; Sugimura *et al.*, 2012), similar to what we found here for Vangl2. It must be noted that the role of PCP signaling in establishing HSC polarity remains unclear, and we detected no striking differences in Cdc42 distribution between *Vangl2*^{Δ/Δ} and control CD150⁺ LSKs *ex vivo*, although we observed an age-dependent decrease in Cdc42 polarization in both genotypes. Nevertheless, it remains possible that Vangl2-dependent differences do exist in a more restricted subset of HSCs, or that their detection requires contact with niche cells or extracellular matrix. It is also possible that the impact of Vangl2 on cell division symmetry is Cdc42-independent. Wnt/PCP signaling has been shown to promote symmetric self-renewal divisions in satellite cells by establishing an asymmetrical distribution of Vangl2 that was

essential for stem cell expansion (Le Grand *et al.*, 2009). Unfortunately we haven't been able to find a good commercially available antibody to investigate Vangl2 localization in HSCs.

HSC aging has also been linked to a decrease in canonical β -catenin-dependent Wnt signaling (Florian *et al.*, 2013), even though the functional link between the two remains to be confirmed. Although β -catenin stabilization is necessary for BM recovery after myeloablation (Lento *et al.*, 2014), it is generally considered dispensable for HSC maintenance at steady state (Cobas *et al.*, 2004; Luis *et al.*, 2011). Non-canonical Wnt signalling can inhibit the Wnt/ β -catenin canonical pathway, either by preventing β -catenin stabilization or by interfering with its translocation to the nucleus (Nemeth *et al.*, 2007). Nuclear vs cytoplasmic distribution of β -catenin was not altered in *Vangl2 Δ/Δ* CD150⁺ LSKs. However, the intensity of β -catenin staining in old *Vangl2 Δ/Δ* cells was significantly increased, suggesting an increased activation of the canonical pathway. Although the vast majority of CD150⁺ LSKs are CD48⁻, they do not represent a homogenous population of functional HSCs, especially in older mice. Moreover, given that the increase in β -catenin was only seen in aged *Vangl2 Δ/Δ* mice, it could also be the result of adaptative changes in the BM environment in the absence of Vangl2, rather than the lack of direct Vangl2-mediated negative signaling in HSCs. However, chronic Wnt/ β -catenin signalling has been shown to lead to cell senescence in other cell types (Gu *et al.*, 2014), consistent with the increased p16^{INK4a} expression in our *Vangl2 Δ/Δ* HSCs, and lead to loss of function and exhaustion in HSCs (Luis *et al.*, 2011; Scheller *et al.*, 2006). The increased stabilization of β -catenin would thus contribute to the loss of *Vangl2 Δ/Δ* HSC self-renewal.

Taken together, we have shown in this study the functional importance of the key Wnt/PCP component Vangl2 in HSC self-renewal and long-term maintenance. This loss of repopulating ability corresponds to increased β -catenin and p16^{INK4a} levels in Vangl2-deficient HSCs from aged mice, revealing new mechanisms by which Vangl2 regulates hematopoiesis and HSC function in an age-dependent manner.

3.6 Experimental Procedures

3.6.1 Experimental animals

C57BL/6, B6.SJL (B6.SJL-*Ptprc^aPepc^b*/BoyJ), B6.Cg-*Commd10^{Tg(Vav1-icre)A2Kio}*/J (Vav-Cre), and B6;129-*Vangl2^{tm2.1Mdea}*/J (*Vangl2^{lox/lox}*) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Male Vav-Cre⁺ *Vangl2^{lox/lox}* or Vav-Cre⁺ *Vangl2^{lox/+}* mice were crossed with *Vangl2^{lox/+}* or *Vangl2^{lox/lox}* females to obtain offspring in which the *Vangl2* gene is deleted from the HSPC pool (Vav-Cre⁺ *Vangl2^{lox/lox}*) and their littermate controls (Vav-Cre⁻ *Vangl2^{lox/+}* or Vav-Cre⁻ *Vangl2^{lox/lox}*). For BM transplants, donor mice (CD45.2⁺; C57BL/6 background, control and test), competitive mice (CD45.1⁺; B6.SJL background) and recipient mice (CD45.1⁺ CD45.2⁺; F1 offspring of the C57BL/6 x B6.SJL intercrosses) were used unless otherwise indicated. All mice were reared and housed in pathogen-free conditions in sterile ventilated supports at the animal facility of l'Institut national de la recherche scientifique (INRS) - Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie (*Laboratoire national de biologie expérimentale*). All the procedures were carried out in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by INRS Institutional Animal Care Committee (CIPA).

3.6.2 Flow Cytometry and Imaging

BM cells were harvested by flushing mice tibiae and femora with PBS/0.1% BSA/0.5 mmol EDTA using a 25-gauge syringe needle. Cells were blocked with anti-CD16/CD32 prior to extracellular staining with antibodies (see Table 3.1 for details). For cell cycle analysis, cells were stained with surface antibodies, then fixed and permeabilized using the Foxp3 labeling kit (eBioscience, San Diego, CA) and blocked with 2% rat serum before intracellular staining with anti-Ki-67 for 1h, followed by DAPI (0.25 µg/mL) for 30 mins (see Table 3.1). For blood analysis, erythrocytes were lysed (9 parts NH₄Cl/1 part Tris-HCl, pH 7.4) for 4-6 minutes, or until sample was translucent and reaction was stopped with three volumes of cold PBS. Cells were then washed and blocked with anti-CD16/CD32 prior to extracellular labelling. For detection of p16 expression, cells were prepared as described above, fixed, permeabilized, and then blocked with 1% BSA for intracellular staining with the recombinant anti-CDKN2A/p16^{INK4a} antibody for 1 h. Primary antibody was detected with Alexa Fluor 488-conjugated F(ab')₂-goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody. Samples were acquired on a BD LSRFortessa four laser flow cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA) and analyzed using FACS DiVa software (v. 8.1) or FlowJo (v. 10.1) software. See Table 3.1 for additional details on antibodies.

For imaging flow cytometry, BM cells were harvested by flushing mice tibiae, femora and iliac crests with PBS using a 25-gauge syringe needle. Samples were first enriched for HSCs and progenitor cells with the EasySep™ Mouse Hematopoietic Cell Isolation Kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) and then stained with anti-Sca1, anti-CD117 and anti-CD150 (see Table 3.1). Cells were washed with PBS, fixed, permeabilized and blocked with BSA as described above, prior to intracellular labeling with anti-Cdc42 or anti-non-phospho (active) β -catenin overnight. Intracellular staining was detected with R-Phycoerythrin-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) for 1 h and counterstained with DAPI (0.025 μ g/mL) for 15 min. Cells were acquired with Amnis Imagestream Mark II imaging flow cytometer (EMD Millipore) and analyzed with IDEAS v6.1 software. Polarity was determined using delta centroid and modulation morphology features for Cdc42, while β -catenin nuclear translocation was determined by similarity with DAPI (nuclear translocation feature), similar to what we have previously published (Kwarteng *et al.*, 2018). See Table 3.1 for additional details on antibodies.

Table 3.1 List of antibodies used for flow cytometry.

Analysis	Antibody name	Clone	Fluorochrome	Dilution	Company
BM HSCs and progenitor cells	CD16/32 (Fc block)	2.4G2	Purified	1/100	BD Biosciences
	CD48	HM48-1	BV421	1/400	BD Biosciences
	CD117 (c-kit)	2B8	PE	1/400	BD Biosciences
	Ly-6A/E (Sca1)	D7	PE-Cy7	1/800	BD Biosciences
	CD150 (SLAM)	TC15-12F12.2	Alexa Fluor 647	1/400	BioLegend
	CD11b	M1/70	biotin	1/400	BD Biosciences
	Ter119	TER-119	biotin	1/800	BD Biosciences
	CD3 ϵ	145-2C11	biotin	1/400	BD Biosciences
	B220 (CD45R)	RA3-6B2	biotin	1/400	BD Biosciences
	Gr1 (Ly-6C/G)	RB6-8C5	biotin	1/400	BD Biosciences
	CD135 (Flt3)	A2F10	PerCP-eFluor 710	1/400	eBioscience
	CD45.1	A20	APC-Cy7	1/100	BD Biosciences
	CD45.2	104	FITC	1/200	BD Biosciences

	Streptavidin	561419	V500	1/1600	BD Biosciences
Peripheral blood	CD45.2	104	FITC	1/200	BD Biosciences
	CD19	1D3	PE	1/800	BD Biosciences
	CD3ε	145-2C11	PE-Cy7	1/400	BD Biosciences
	CD45.1	A20	APC	1/200	eBioscience
	Gr1 (Ly-6C/G)	RB6-8C5	APC-Cy7	1/800	BD Biosciences
Mature BM/Spleen cells	CD11c	HL3	bv711	1/800	BD Biosciences
	CD19	1D3	PE	1/800	BD Biosciences
	CD3ε	145-2C11	PE-Cy7	1/400	BD Biosciences
	CD11b	M1/70	APC	1/800	BD Biosciences
	IgD	11-26c.2a	APC	1/800	BD Biosciences
	Gr1 (Ly-6C/G)	RB6-8C5	APC-Cy7	1/800	BD Biosciences
	CD4	GK1.5	APC-Cy7	1/400	BD Biosciences
	CD8a	53-6.7	V450	1/800	BD Biosciences
	CD45.1	A20	FITC	1/200	eBioscience
Cell cycle	CD48	HM48-1	PerCPCy5.5	1/400	eBioscience
	CD117 (c-kit)	2B8	PE	1/400	BD Biosciences
	Ly-6A/E (Sca1)	D7	PE-Cy7	1/800	BD Biosciences
	CD150 (SLAM)	TC15-12F12.2	Alexa Fluor 647	1/400	BioLegend
	CD11b	M1/70	biotin	1/400	BD Biosciences
	Ter119	TER-119	biotin	1/800	BD Biosciences
	CD3ε	145-2C11	biotin	1/400	BD Biosciences
	B220 (CD45R)	RA3-6B2	biotin	1/400	BD Biosciences
	Gr1 (Ly-6C/G)	RB6-8C5	biotin	1/400	BD Biosciences
	Streptavidin	563262	BV711	1/400	BD Biosciences
Imaging flow cytometry	CD117	2B8	BB515	1/800	BD Biosciences
	Ly-6A/E (Sca1)	D7	PE-Cy7	1/400	BD Biosciences
	CD150 (SLAM)	TC15-12F12.2	Alexa Fluor 647	1/400	BioLegend

Intracellular staining	Foxp3/Transcription Factor Set	-	-	-	eBioscience (cat# 00-5523-00)
	KI-67	SolA15	FITC	1/200	eBioscience
	DAPI	-	Purified	0.25 µg/mL	Life Technologies (cat# D3571)
	Cdc42	EPR15620	Purified	1/170	Abcam
	Non-phospho active β-catenin	D13A1	Purified	1/200	Cell Signalling Technology
	F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	-	R-PE	1:1500 (Cdc42), 1:500 (β-catenin)	Jackson Immunoresearch Labs (cat# 111-116-144)
	CDKN2A/p16 ^{INK4a}	EPR20418	Purified	1/200	Abcam
F(ab') ₂ -Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	-	Alexa Fluor 488	1/8000	Invitrogen (cat# A11070)	
Colony assays	CD117 (c-kit)	2B8	PE	1/400	BD Biosciences
	CD11c	HL3	PECy7	1/800	BD Biosciences
	CD11b	M1/70	APC	1/800	BD Biosciences
	Gr1 (Ly-6C/G)	RB6-8C5	APC-Cy7	1/800	BD Biosciences

3.6.3 Colony assays

BM single-cell suspensions were prepared in IMDM (Life Technologies) containing 10% Premium FBS (Wisent Bio Products, Saint-Bruno, QC, Canada). Using a syringe fitted with a blunt-ended needle, cells were plated in duplicates into 35-mm non-adherent petri dishes at a density of 2×10^4 cells/dish in methylcellulose medium optimized for multilineage erythromyeloid growth (MethoCult™ GF M3434; Stem Cell Technologies). Cultures were incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 10-14 days and hematopoietic colonies were counted and identified based on morphology under an inverted microscope. Cells were harvested by pooling duplicates for flow cytometry analysis (see Table 3.1).

3.6.4 Transplantation assays

For competitive long-term reconstitution experiments, HSC equivalents were calculated by flow cytometry prior to transplants to adjust the amount of total BM cells to inject as previously described (Hétu-Arbour *et al.*, 2021a; Kwarteng & Heinonen, 2016). Equivalents were adjusted

so that an equal number of either WT or *Vangl2*^{Δ/Δ} HSCs mixed with the same amount of competitive HSCs were injected by lateral vein into the tail of a lethally irradiated (2 x 4.5 Gy; 16-hour interval) recipient mice. For secondary and tertiary transplants, an equal number (2.5 x 10⁶) of total BM cells from two primary or secondary recipients were pooled and injected into lethally irradiated secondary or tertiary recipients. To analyze short and long-term reconstitution, peripheral blood was collected from the mandibular vein of recipient mice at 4, 8, 12, and 16 weeks post-transplant. Mice were euthanized 20 weeks post-transplant and BM/spleen were collected and prepared as described above for flow cytometry analysis.

3.7 Statistical analysis

Each value represents at least three independent experiments, unless otherwise indicated. Two-tailed Student's t test was used to determine statistical significance unless otherwise noted. A *p* value of 0.05 or less was considered significant.

3.8 Acknowledgements

We acknowledge the staff of the Laboratoire national de biologie expérimentale for their assistance in animal care. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC Discovery grant #2018-05258) and the Canada Foundation for Innovation (CFI Leaders Fund #31377). KMH is a Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) Junior Research Scholar. SB was supported by a Canada Graduate Scholarship from Canadian Institutes for Health Research (CIHR).

3.9 Author Contributions

S.B.: Conception and design, data collection, data analysis, visualization and manuscript writing. R.H.A.: Data collection and analysis. C.G.: Data collection and analysis. K.M.H.: Supervision and funding, conception and design, data analysis, editing and final approval of manuscript.

3.10 Declaration of interests

The authors have no conflicts of interest to declare.

3.11 Supplemental information

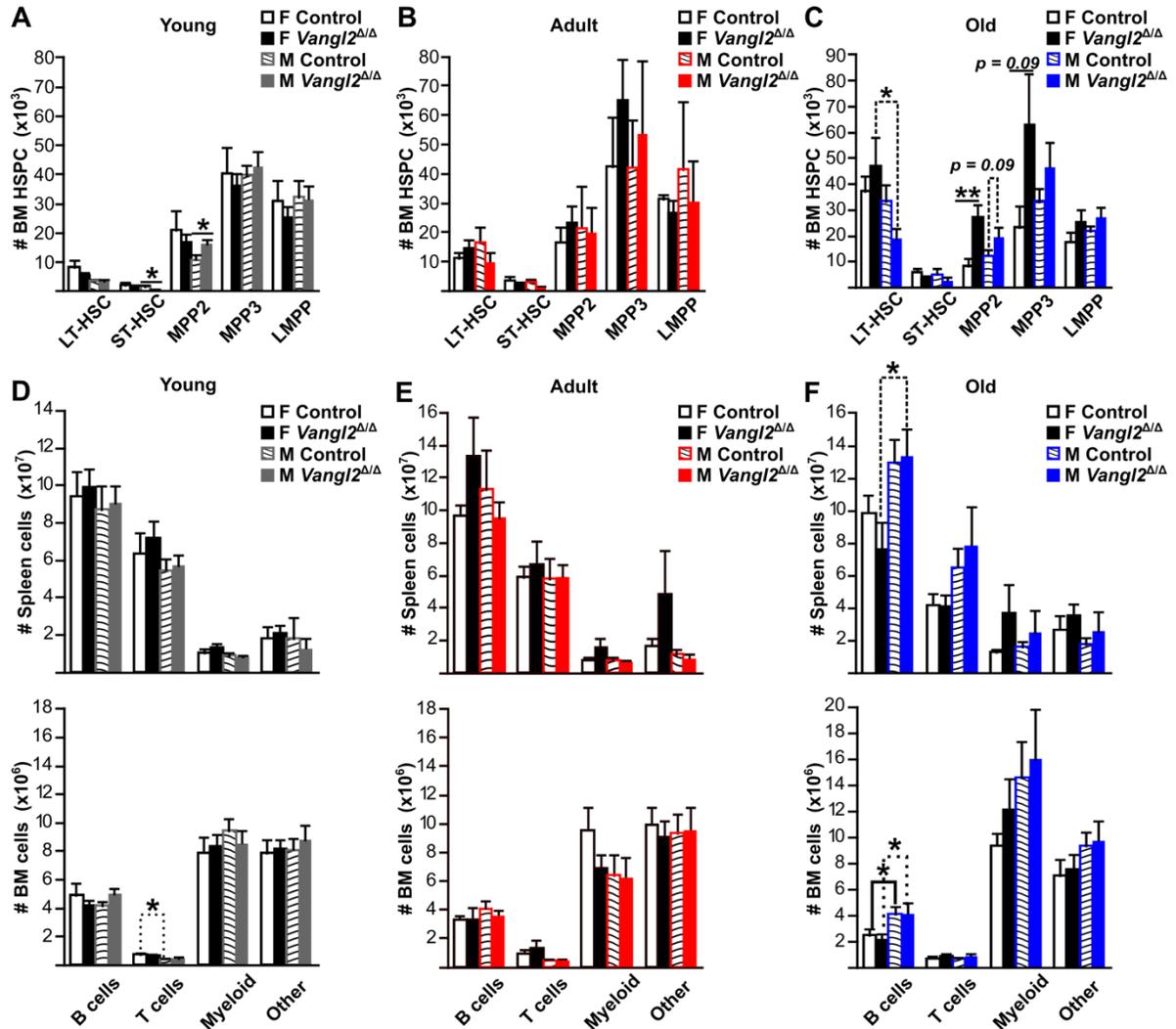


Figure S 3.7 Sex-related analysis of *Vangl2* loss in HSCs, progenitor cells and mature BM/spleen cells in female and male mice, Related to Figures 3.1 and 3.2.

(A-C) Quantitative results of HSCs and progenitors flow cytometry analysis are represented in (A) for young, (B) adult, and (C) old females and males. Histograms represent absolute numbers of BM cells (mean + SEM). (D-F) Histograms represent absolute spleen (top panels) and BM (bottom panels) B lymphocyte (CD19⁺), T lymphocyte (CD3 ϵ ⁺), and myeloid (CD11b^{hi}) cell numbers for (D) young mice, (E) adult mice, and (F) old mice (mean + SEM). CD19- CD3 ϵ - CD11b^{lo} cells are represented as "Other". Young females (n=10 control, 11-12 *Vangl2*^{Δ/Δ}), young males (n=7 control, 7 *Vangl2*^{Δ/Δ}), adult females (n=5 control, 6 *Vangl2*^{Δ/Δ}), adult males (n=5 control, 5 *Vangl2*^{Δ/Δ}), old females (n=7 control, 7 *Vangl2*^{Δ/Δ}), old males (n=6 control, 6 *Vangl2*^{Δ/Δ}). **p*≤0.05, ***p*≤0.005.

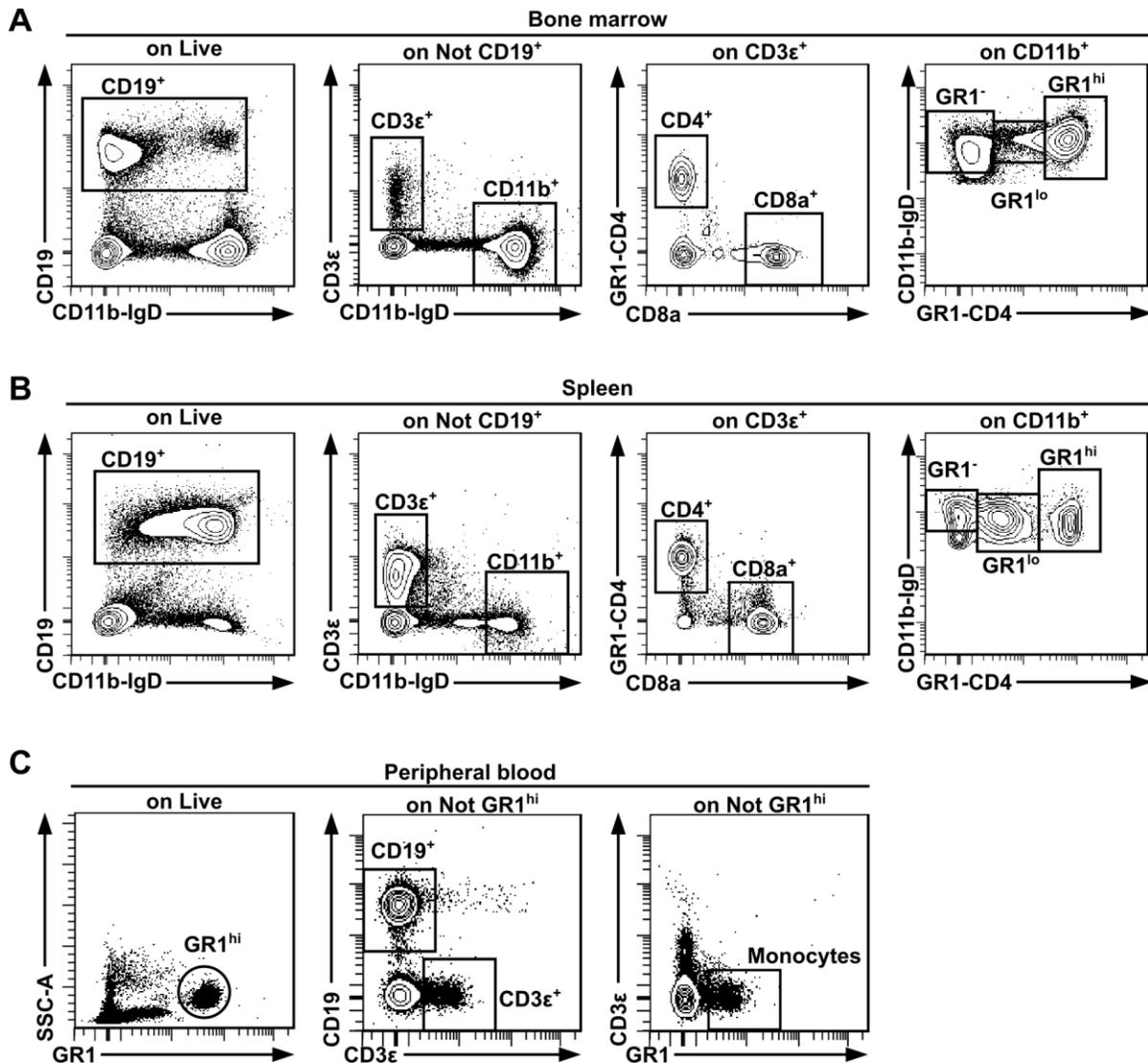


Figure S 3.8 Flow cytometry gating strategies, Related to Figures 3.2, 3.4 and 3.5.

(A and B) (A) Bone marrow and (B) spleen mature cells gating strategy. Within live single cells, CD19⁺ B cells are selected. On “not CD19⁺” cells, CD3ε⁺ T cells and CD11b⁺ myeloid cells are selected. CD3ε⁺ T cells are divided into CD3ε⁺CD4⁺ and CD3ε⁺CD8⁺ T cells, and CD11b⁺ cells are divided into CD11b⁺GR1⁻ cells, CD11b⁺GR1^{lo} cells and CD11b⁺GR1^{hi} cells. (C) Peripheral blood gating strategy. Within live single cells, SSC-A^{hi}GR1^{hi} cells are selected. On “not GR1^{hi}”, CD19⁺ B cells and CD3ε⁺ T cells are selected. CD3ε⁺GR1^{int} monocytes are also selected within “not GR1^{hi}” cells.

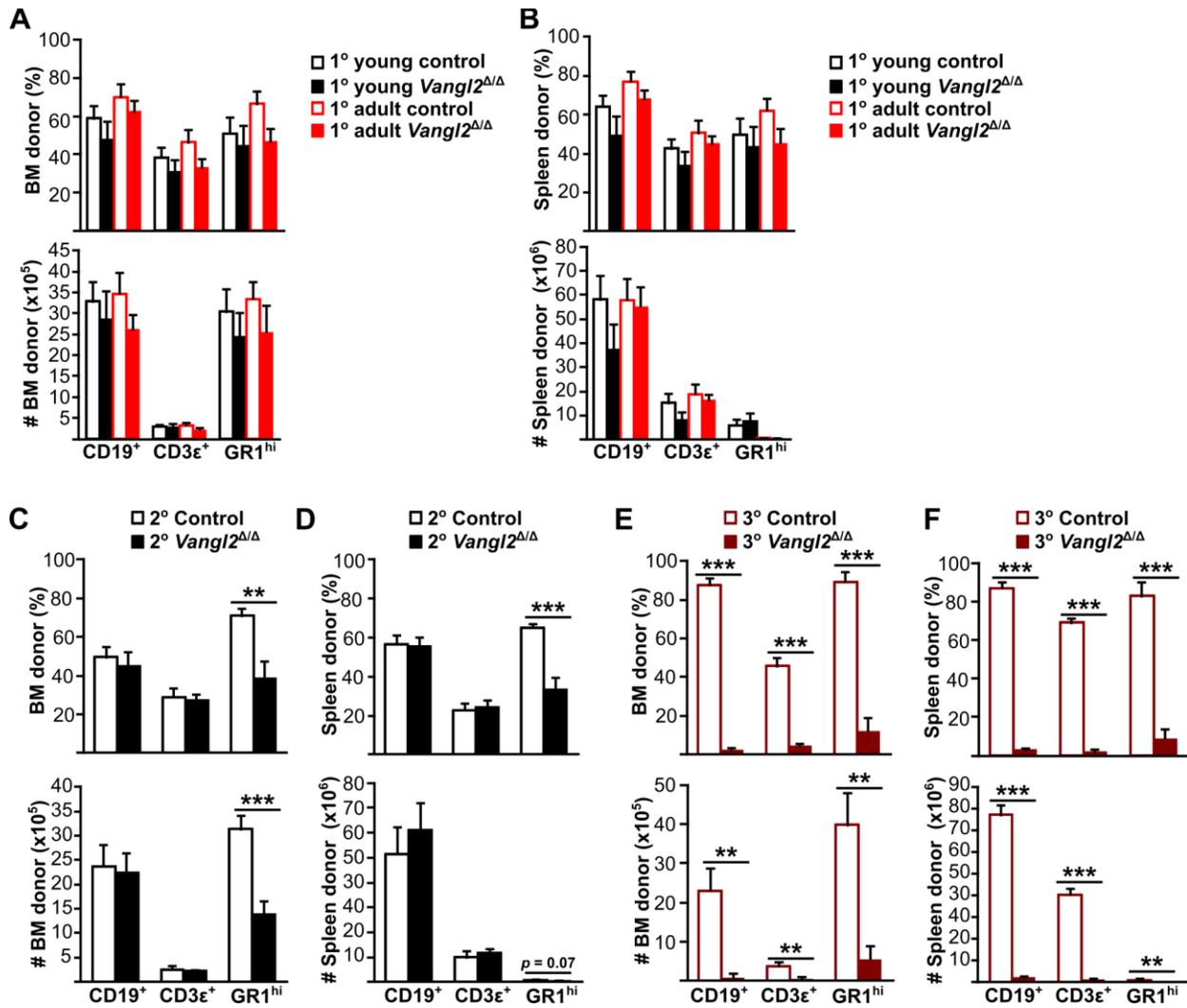


Figure S 3.9 *Vangl2* loss impairs myeloid cells reconstitution in secondary female recipients, and both myeloid/lymphoid cells reconstitution in tertiary female recipients. Related to Figures 3.4 and 3.5.

(A and B) Histograms represent percentage (top) or absolute numbers (bottom) of donor-derived CD19⁺ B cells, CD3ε⁺ T cells and GR1^{hi} cells in primary recipient (A) bone marrow and (B) spleen for young and adult donors (mean+SEM). Histograms represent percentage (top) or absolute numbers (bottom) of donor-derived CD19⁺ B cells, CD3ε⁺ T cells and GR1^{hi} cells in recipient. Young female transplants represent three independent experiments (n=14-16 control, 13-15 *Vangl2*^{Δ/Δ}) and adult female transplants represent two independent experiments (n=10 control, 11 *Vangl2*^{Δ/Δ}). (C-F) Histograms represent percentage (top) or absolute numbers (bottom) of donor-derived CD19⁺ B cells, CD3ε⁺ T cells and GR1^{hi} cells in secondary recipients (C) bone marrow and (D) spleen, and in tertiary recipients (E) bone marrow and (F) spleen (mean+SEM). Secondary female transplants represent two independent experiments (n=9 control, 10 *Vangl2*^{Δ/Δ}) and tertiary female transplants represent one independent experiment (n=4 control, 6 *Vangl2*^{Δ/Δ}). **p*≤0.05, ***p*≤0.005, ****p*≤0.0005.

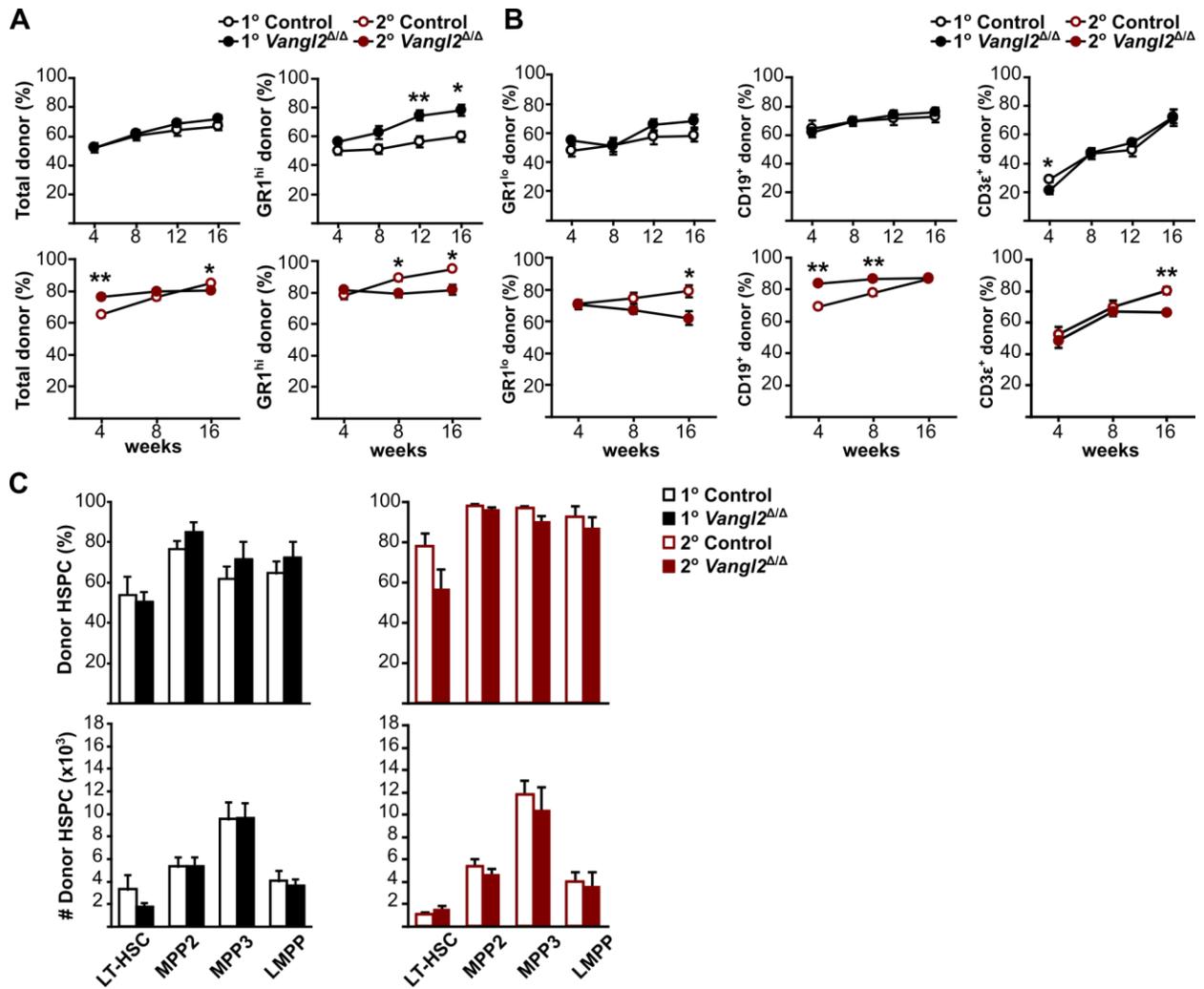


Figure S 3.10 *Vangl2* loss alters long-term post-transplant peripheral blood reconstitution in secondary male recipients, Related to Figures 3.4 and 3.5.

(A) Graphs represent pooled results of donor-derived total and GR1^{hi} cells in male primary (in black) and secondary (in red) recipient peripheral blood (mean+SEM). (B) Graphs represent pooled results of donor-derived GR1^{lo} cells, CD19⁺ B cells and, CD3ε⁺ T cells in male primary (in black) and secondary (in red) recipient peripheral blood (mean + SEM). (C) Histograms represent mean of donor-derived HSPCs percentage or absolute cell numbers in primary and secondary male recipient BM 20 weeks post-transplant (mean + SEM). Primary male transplants represent three independent experiments (n=10 control, 14 *Vangl2*^{Δ/Δ}) except peripheral blood at 12-16 weeks which comes from two independent experiments (n=7 control, 10 *Vangl2*^{Δ/Δ}), and secondary male transplants represent one independent experiment (n=4 control, 5 *Vangl2*^{Δ/Δ}). No fresh competitor cells were added in male secondary recipients. **p*≤0.05, ***p*≤0.005.

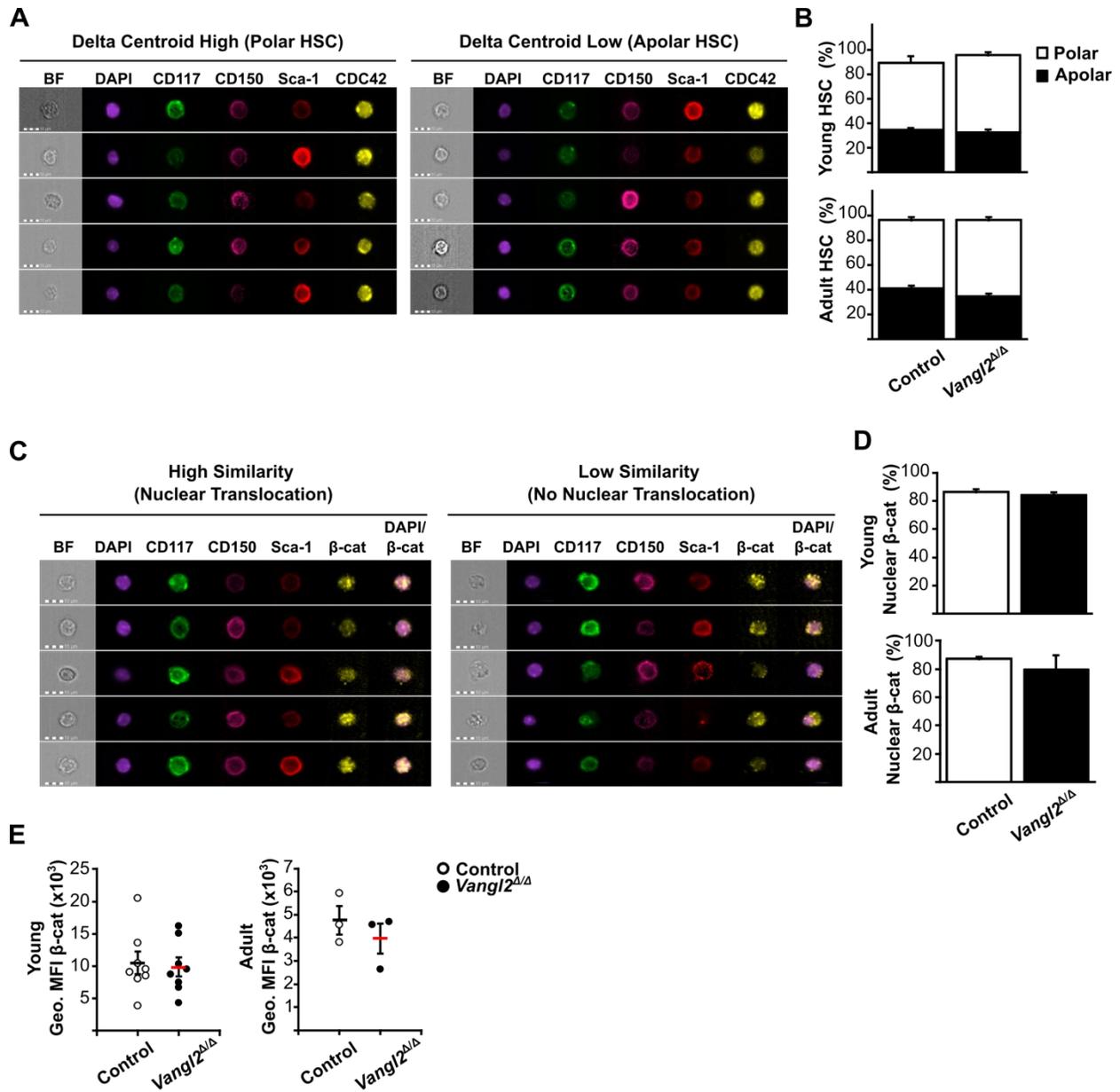


Figure S 3.11 *Vangl2* loss does not impair *Cdc42* localization and β -catenin activation in young and adult mice, Related to Figure 3.6.

(A) Representative imaging flow cytometry images of polar and apolar $CD150^+$ LSK cells. (B) Histograms represent polar and apolar young and adult $CD150^+$ LSK $^+$ cells (mean + SEM). (C) Representative imaging flow cytometry images of β -catenin (β -cat) nuclear translocation based on β -catenin/DAPI similarity analysis. (D) Histograms represent mean of nuclear β -catenin localization in young and adult $CD150^+$ LSK $^+$ cells (mean + SEM). (E) β -catenin geometric mean of fluorescence intensity (Geo. MFI) in young and adult $CD150^+$ LSK $^+$ cells. Young mice represent three independent experiments (n=8-10 control, 8-11 *Vangl2* $^{\Delta/\Delta}$) and adult mice represent three independent experiments (n=3-4 control, 3-4 *Vangl2* $^{\Delta/\Delta}$).

4 DISCUSSION

L'hématopoïèse est le processus par lequel toutes les cellules sanguines de l'organisme sont générées grâce aux CSH et leur deux caractéristiques clés : leur capacité d'auto-renouvellement et leur capacité de différenciation. Il est essentiel pour les CSH de maintenir un équilibre entre cet auto-renouvellement, qui permet d'entretenir un nombre stable de CSH tout au long de la vie adulte, et la différenciation, qui assure le renouvellement quotidien des cellules sanguines. Des altérations de ces deux fonctions peuvent entraîner divers désordres pathologiques. En effet, un auto-renouvellement défectueux peut mener à la perte du réservoir de CSH et une différenciation altérée peut mener à des défauts de production et remplacement des cellules sanguines matures.

Plusieurs facteurs retrouvés dans la niche hématopoïétique peuvent réguler l'équilibre prolifératif des CSH. Certains facteurs sont essentiels à la survie des CSH, comme le Scf ou CXCL12, et d'autres peuvent influencer le devenir des CSH. Par exemple, la thrombopoïétine (TPO) est essentielle à la différenciation mégacaryocytaire mais également au maintien des CSH (Morrison & Scadden, 2014; Qian *et al.*, 2007), et l'IL-6 favorise la différenciation myéloïde en réponse à une infection (Mirantes *et al.*, 2014). Les cellules de Schwann non-myélinisantes, le TGF- β (Yamazaki *et al.*, 2006), l'Ang-1 (Arai *et al.*, 2004) et la chimiokine CXCL4 (Bruns *et al.*, 2014) assurent tous de diverses façons le maintien de la quiescence des CSH. Ces différents facteurs mentionnés, qui constituent une partie et non une totalité, interagissent avec les CSH pour réguler leur fonction. D'autres protéines régulatrices, les protéines Wnt exprimées dans la MO, influencent les CSH via trois différentes principales voies de signalisation connues. La voie canonique Wnt/ β -caténine est largement étudiée et est principalement connue pour son rôle dans la prolifération (Luis *et al.*, 2012). Les voies non-canoniques Wnt/ Ca^{2+} et Wnt/PCP sont quant à elles plutôt connues pour leur rôle dans le maintien (De, 2011; Seifert & Mlodzik, 2007).

Le rôle de la voie Wnt/PCP dans le maintien des CSH fut récemment mis de l'avant dans plusieurs études. Des travaux antérieurs au laboratoire ont démontré le rôle de Fzd6, un récepteur clé de la voie Wnt/PCP, dans l'auto-renouvellement et la survie des CSH (Abidin *et al.*, 2015). D'autres protéines clés de la voie Wnt/PCP ont un rôle dans le maintien des CSH

comme Fzd8, Celsr1 et Ptk-7 tel que discuté précédemment (Lhoumeau *et al.*, 2016; Sugimura *et al.*, 2012). De plus, la surexpression des protéines de la voie PCP a été associée à la leucémie lymphoïde chronique et pourrait influencer le pronostic de la maladie (Kaucká *et al.*, 2013). Ceci dit, la pertinence des protéines de la voie PCP dans le maintien des CSH a récemment été mise de l'avant par plusieurs groupes, néanmoins nous avons constaté qu'aucune étude à ce jour ne s'est concentrée sur le rôle de Vangl2 dans les CSH, qui est pourtant une protéine membranaire clé dans la régulation de la voie PCP. De plus, Vangl2 est fortement exprimé par les CSH et cellules progénitrices comparativement à la majorité des cellules sanguines matures (Choi *et al.*, 2019; Kwarteng *et al.*, 2018) et possède un important rôle dans l'établissement de polarité dans d'autres types cellulaires, ce qui nous a mené à établir l'hypothèse selon laquelle Vangl2 possède un rôle important dans le maintien des CSH. Les résultats présentés dans le chapitre ***Vangl2 Regulates Long-term HSC Maintenance*** et qui seront discutés dans les prochains paragraphes révèlent pour la première fois le rôle essentiel de Vangl2 dans le maintien des CSH, particulièrement à long terme et en fonction de l'âge.

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons d'abord généré un modèle murin dans lequel le gène Vangl2 est retiré de la lignée hématopoïétique par le système de recombinaison *Vav-iCre-LoxP* (Georgiades *et al.*, 2002). Ce modèle murin (souris *Vangl2^{ΔΔ}*) possède donc des CSH, cellules progénitrices hématopoïétiques et cellules hématopoïétiques matures dans lesquelles le gène Vangl2 est inactivé. Nous avons d'abord étudié le rôle de Vangl2 dans le maintien homéostatique du réservoir de CSH et cellules progénitrices, tout en prenant en compte le sexe et l'âge des souris étudiées. Ceci nous a permis de déterminer le rôle spécifique de Vangl2 en conditions homéostatiques en prenant en considération le vieillissement attendu normal des CSH, dépendamment ou non de différences reliées au sexe. Notons que les effets du vieillissement sur les CSH sont connus : celui-ci entraîne une expansion accrue des CSH à biais myéloïde et mène à divers désordres hématopoïétiques dont la baisse d'immunité (Beerman *et al.*, 2010b). Nous voulions par conséquent comparer cet effet du vieillissement en absence de Vangl2. Bien que la perte de Vangl2 n'ait pas altéré le réservoir de CSH et cellules progénitrices chez les souris jeunes et adultes, les vieilles souris *Vangl2^{ΔΔ}* quant à elles présentaient une augmentation significative de progéniteurs de type MPP2 et MPP3 par rapport à leurs contrôles du même âge. Notons que cette expansion des progéniteurs était déjà visible en pourcentages chez les souris *Vangl2^{ΔΔ}* adultes, suggérant dès lors que la perte de Vangl2

engendre des changements graduels dans le réservoir de CSH et cellules progénitrices en fonction de l'âge et du temps. En effet, en conditions homéostatiques, l'absence de changements majeurs chez les jeunes souris *Vangl2^{ΔΔ}* et l'expansion significative des progéniteurs chez les vieilles souris *Vangl2^{ΔΔ}* suggèrent ainsi que *Vangl2* altère le vieillissement normal des CSH. Les vieilles souris *Vangl2^{ΔΔ}* présentent une diminution du pourcentage de CSH en concordance avec une augmentation des pourcentages de progéniteurs multipotents à biais myéloïde (MPP2 et MPP3). Par conséquent, la perte de *Vangl2* pourrait mener à un vieillissement prématuré des CSH et à une suractivation de celles-ci, soit en altérant la régulation de leur quiescence ou en régulant positivement leur prolifération et différenciation, menant ultimement à l'augmentation des progéniteurs multipotents, causant à long terme la perte du réservoir de CSH par un maintien homéostatique altéré.

L'analyse phénotypique des CSH et cellules progénitrices chez les souris femelles et mâles a démontré qu'il n'y avait pas de changements majeurs significatifs dépendants du sexe. Cependant, nous avons observés quelques différences entre les deux groupes. D'abord, les jeunes mâles présentaient une augmentation significative du nombre de MPP2 *Vangl2^{ΔΔ}* par rapport à leurs contrôles respectifs. Toutefois, les comptes de MPP2 *Vangl2^{ΔΔ}* mâles étaient semblables aux comptes de MPP2 *Vangl2^{ΔΔ}* femelles, suggérant que cette différence provient plutôt du fait que les contrôles mâles avaient un nombre basal de MPP2 moins élevé. Ceci étant dit, la différence majeure entre les mâles et femelles dépendante de l'absence de *Vangl2* réside plutôt dans le nombre de LT-HSC *Vangl2^{ΔΔ}* chez les vieilles souris. En effet, les vieux mâles *Vangl2^{ΔΔ}* possèdent un réservoir de LT-HSC *Vangl2^{ΔΔ}* significativement diminué par rapport aux LT-HSC *Vangl2^{ΔΔ}* des vieilles souris femelles. Cette différence suggère une susceptibilité accrue des mâles *Vangl2^{ΔΔ}* à la perte des CSH par vieillissement accéléré. En effet, les femelles *Vangl2^{ΔΔ}* semblent conserver un nombre constant de LT-HSC malgré l'augmentation des MPP2 et MPP3, et à l'inverse le maintien de cet équilibre est altéré chez les mâles *Vangl2^{ΔΔ}*. La littérature actuelle semble s'accorder vers une fonction similaire des CSH et de l'hématopoïèse entre les mâles et femelles sans distinctions majeures indépendamment du sexe. Par contre, il a également été démontré que l'augmentation des niveaux d'estrogènes chez les souris femelles, particulièrement pendant la grossesse, entraînait une augmentation du réservoir de CSH et de leur division (Nakada *et al.*, 2014). De plus, cette étude révèle que la voie de signalisation de l'estradiol et du récepteur alpha des œstrogènes (ER α) favorise la division des CSH chez les souris femelles, ce qui augmente l'auto-renouvellement des CSH

femelles (Nakada *et al.*, 2014). Ainsi, l'absence de diminution des LT-HSC *Vangl2^{ΔΔ}* chez les femelles âgées pourrait venir du fait que les femelles possèdent une capacité améliorée du maintien du réservoir de CSH durant leur vie adulte par la régulation des œstrogènes et ER α , absente chez les mâles. Enfin, ceci implique un niveau basal d'auto-renouvellement plus élevé chez les CSH femelles par rapport aux CSH mâles en conditions homéostatiques et pourrait dès lors expliquer les différences dans les comptes de LT-HSC *Vangl2^{ΔΔ}* liées au sexe observées dans notre étude.

Pour continuer, bien que des changements dans le réservoir de CSH et cellules progénitrices *Vangl2^{ΔΔ}* furent observés en conditions homéostatiques, aucune différence ne fut observée dans les comptes de cellules sanguines matures, soient les lymphocytes B CD19⁺, lymphocytes T CD3 ϵ ⁺ et les cellules myéloïdes CD11b⁺ entre les souris contrôles et *Vangl2^{ΔΔ}*, autant dans la MO que la rate des souris des différents groupes d'âges. Les vieux mâles *Vangl2^{ΔΔ}* présentaient toutefois davantage de lymphocytes B par rapport aux vieilles femelles *Vangl2^{ΔΔ}* dans la MO et la rate. De plus, nous avons également observé une augmentation de l'indice splénique chez les vieilles souris *Vangl2^{ΔΔ}*, déterminé par le rapport poids de la rate (g)/poids total (g), malgré des comptes de cellules spléniques similaires aux contrôles. Ceci suggère que les splénomégalias observées chez les vieilles souris *Vangl2^{ΔΔ}* ne vient pas directement d'une accumulation des lymphocytes ou cellules myéloïdes, mais pourrait provenir de l'accumulation d'autres cellules sanguines, notamment les érythrocytes et plaquettes. En effet, les MPP2, ayant un biais pour la différenciation mégacaryocytaire et érythrocytaire, sont significativement augmentés chez les vieilles souris *Vangl2^{ΔΔ}*, ce qui pourrait entraîner des accumulations anormales de ces cellules ou des défauts de production dans ces deux lignées. Ainsi, une perspective intéressante de ce projet serait d'étudier le rôle de *Vangl2* dans la différenciation des érythrocytes, mégacaryocytes et plaquettes. *Vangl2* est d'ailleurs exprimé par la lignée mégacaryocytaire (Choi *et al.*, 2019) et il est connu que les mégacaryocytes sont nécessaires au maintien des CSH en régulant notamment leur quiescence (Bruns *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014). Une altération de la lignée mégacaryocytaire pourrait alors altérer, de façon indirecte, le maintien des CSH dans la MO. Nous avons également analysé le sang périphérique des vieilles souris par cytométrie en flux et les résultats préliminaires semblent démontrer une tendance à la baisse des érythrocytes ainsi qu'une tendance à la hausse des plaquettes dans le sang des vieilles souris *Vangl2^{ΔΔ}* par rapport à leurs contrôles, suggérant un potentiel défaut de différenciation dans ces deux lignées.

Nous avons précédemment suggéré que les changements observés dans le réservoir de CSH chez les vieilles souris sont causés par une altération de la régulation de leur prolifération à long terme, ce qui nous a orientés à analyser le cycle cellulaire des CSH *Vangl2^{ΔΔ}*. Lors du vieillissement, le réservoir de CSH s'agrandit par une perte de quiescence et un auto-renouvellement accru. En revanche, cet auto-renouvellement accru est altéré et mène à la production de CSH moins fonctionnelles et biaisées vers la lignée myéloïde au détriment de la lignée lymphoïde. Ceci peut causer divers désordres hématologiques apparaissant durant la vieillesse, notamment une immunité affaiblie, une augmentation des cellules myéloïdes pouvant augmenter les risques de leucémies myéloïdes, une diminution des globules rouges pouvant entraîner des anémies, etc. (Beerman *et al.*, 2010b). Nous avons en effet observé une expansion des cellules ayant le phénotype des CSH avec le temps chez les vieilles souris par rapport aux jeunes souris. Toutefois, le pourcentage de LT-HSC *Vangl2^{ΔΔ}* chez les vieilles souris était significativement diminué par rapport à leurs contrôles du même âge, qui s'expliquait entre autres par une augmentation significative des MPP2 et MPP3 dans la MO des vieilles souris en absence de *Vangl2*. Ces changements nous ont mené à l'hypothèse selon laquelle une suractivation de la différenciation en cellules progénitrices au détriment de l'auto-renouvellement et du maintien de la quiescence des CSH chez les vieilles souris pouvait advenir. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié le cycle cellulaire des CSH et cellules progénitrices à l'aide d'un marquage intracellulaire au KI-67 et DAPI par cytométrie en flux. L'antigène KI-67, étant exprimé par les cellules en phase active de prolifération, et DAPI, permettant le marquage de l'ADN, nous a permis de différencier les différentes phases du cycle cellulaire tel que décrit dans la littérature (Szade *et al.*, 2016). Nous avons observé une augmentation significative de la proportion de LSK *Vangl2^{ΔΔ}* en prolifération, plus précisément en phase G₁, et une diminution significative de la proportion de LSK *Vangl2^{ΔΔ}* en phase G₀ ou quiescence. Cependant, aucune différence ne fut observée dans l'activité proliférative de la majorité des sous-populations constituant les LSK, soient les LT-HSC, MPP2 et MPP3/4 en absence de *Vangl2*. Ceci suggère que les changements prolifératifs observés dans la population LSK *Vangl2^{ΔΔ}* sont de causes indirectes et proviennent plutôt de l'augmentation des progéniteurs multipotents MPP2 et MPP3, proliférant davantage que les CSH, dans le réservoir de cellules LSK chez les vieilles souris *Vangl2^{ΔΔ}* et non d'un défaut prolifératif intrinsèque aux CSH.

Nous avons néanmoins observé une augmentation significative des ST-HSC *Vangl2^{Δ/Δ}* en phase G₀ et une diminution significative des ST-HSC *Vangl2^{Δ/Δ}* en phase G₁, suggérant un possible défaut d'entrée en cycle cellulaire des ST-HSC. En effet, en cas de besoin, les ST-HSC peuvent normalement rapidement sortir de leur état de quiescence pour proliférer. Il se peut alors que la perte de *Vangl2* altère la capacité des ST-HSC à sortir transitoirement de cet état de quiescence en agissant sur la régulation de l'entrée en cycle cellulaire. Toutefois, une limite de notre essai à prendre en considération est que le nombre de ST-HSC analysés est relativement faible comparativement aux autres sous-populations. Par conséquent, les changements de pourcentages dans les diverses phases du cycle cellulaire sont considérablement plus sensibles pour les ST-HSC que les autres sous-populations en fonction de notre stratégie d'analyse, puisque la taille de l'échantillon des ST-HSC est réduite par rapport aux LT-HSC et progéniteurs MPP. Une alternative pertinente à cette limite serait de regrouper plusieurs échantillons de MO, de purifier et de trier les ST-HSC par cytométrie en flux avec trieur pour agrandir la taille de notre échantillonnage et confirmer les changements observés. Une autre limite de notre analyse réside en l'absence d'un marqueur de viabilité dans notre mélange d'anticorps. En revanche, nous utilisons une stratégie de *gating* permettant d'isoler la majorité des cellules mortes et débris, qui se confirme également par le marquage DAPI dans lequel nous observons uniquement deux pics de signal pour les cellules DAPI⁺ et non trois. En effet, en présence de cellules mortes, nous retrouverions un troisième pic négatif en *sub-G₀* représentant les cellules mortes DAPI⁻ que nous n'observons pas dans nos analyses. En somme, bien que la perte de *Vangl2* ait effectivement altéré les pourcentages de LSK en prolifération, ce changement vient plutôt des altérations observées dans le réservoir de HSPC des vieilles souris et non d'un défaut intrinsèque aux CSH et cellules progénitrices.

L'augmentation des progéniteurs multipotents nous a dans un second temps mené à étudier la capacité de différenciation des CSH *in vitro* en conditions homéostatiques. Nous n'avons observé aucune différence dans la différenciation *in vitro* des jeunes et adultes souris indépendamment du sexe. Les cellules provenant de la MO des vieilles souris *Vangl2^{Δ/Δ}* quant à elles génèrent légèrement plus de colonies *in vitro* que leurs contrôles. Néanmoins, malgré l'augmentation légère mais significative du nombre de colonies générées par pétris, celles-ci contenaient moins de cellules, suggérant une capacité plus faible à s'auto-renouveler et former de grosses colonies *in vitro*. De plus, une baisse non significative d'environ 35% du nombre de cellules exprimant CD117, ou le récepteur c-kit, est observée dans les cultures contenant les

cellules de MO des vieilles souris *Vangl2^{ΔΔ}*. La diminution des cellules CD117⁺ peut d'abord suggérer une diminution de la présence de progéniteurs des mastocytes *Vangl2^{ΔΔ}* dans la MO. En effet, ceux-ci découlent des CSH et conservent une forte expression du CD117, contrairement aux autres progéniteurs qui régulent l'expression du récepteur CD117 à la baisse à fur et à mesure de la maturation et différenciation en cellules matures (Metcalf, 2008). En outre, un autre type de colonies pouvant être retrouvées en culture sont les cellules à haut potentiel prolifératif formant des colonies ou *high proliferative potential colony-forming cells* (CFC-HPP). Les CFC-HPP forment de larges colonies pouvant contenir jusqu'à 50 000 cellules et ont une grande capacité proliférative (McNiece *et al.*, 1990). Elles s'apparentent aux progéniteurs multipotents, puisqu'elles peuvent générer des cellules matures de la lignée myéloïde, soit des progéniteurs granulocytes-macrophages et mégacaryocytes-érythrocytes (McNiece *et al.*, 1990). Les progéniteurs myéloïdes expriment CD117 (Akashi *et al.*, 2000), par conséquent une diminution significative du nombre de cellules *Vangl2^{ΔΔ}* en culture et la tendance à la baisse des cellules exprimant CD117 peut également venir d'une diminution des CFC-HPP *Vangl2^{ΔΔ}*, menant à une diminution de prolifération et expansion des cellules en culture. Enfin, les principaux changements observés en conditions homéostatiques en l'absence de la protéine Vangl2 ont encore une fois été mises de l'avant chez les vieilles souris, confirmant davantage l'importance de la variable temporelle dans l'activité de Vangl2 sur le maintien fonctionnel des CSH à long terme.

Le *gold standard assay*, ou l'essai de référence, pour évaluer la fonctionnalité des CSH est d'effectuer des greffes de MO. Par définition, une CSH dite fonctionnelle est capable, selon ses deux caractéristiques distinctives, soient l'auto-renouvellement et la différenciation, de reconstituer le système hématopoïétique complet d'un hôte létalement irradié dont le système hématopoïétique fut compromis, tel que nous l'avons décrit préalablement (voir chapitre ***Experimental Competitive Bone Marrow Transplant Assays***)(Hétu-Arbour *et al.*, 2021a). Un défaut de repopulation par les CSH transplantées mène à la destruction et défaillance totale de la MO. Nous avons donc effectué des greffes compétitives dans lequel nous comparons les CSH contrôles et les CSH *Vangl2^{ΔΔ}* dans leur capacité de reconstitution à long terme, ce qui nous a permis d'analyser l'intégralité et la fonctionnalité des CSH en conditions de stress hématopoïétique pouvant révéler des différences qui ne seraient pas nécessairement perçues en conditions homéostatiques dû à l'état basal de quiescence des CSH.

Lors des greffes primaires, nous avons comparé la fonctionnalité de CSH *Vangl2*^{ΔΔ} jeunes et adultes et nous avons effectivement observé une diminution significative de la reconstitution hématopoïétique périphérique à long terme dans les receveuses ayant été greffées avec des CSH *Vangl2*^{ΔΔ} adultes, confirmant le rôle dépendant de l'âge des CSH pour *Vangl2*. Ceci dit, la reconstitution périphérique des receveuses greffées avec de jeunes CSH *Vangl2*^{ΔΔ} ne fut pas altérée, à l'exception d'une différence notable à la 12^e semaine post-transplantation dans la contribution des lymphocytes T par rapport aux contrôles. Ceci peut s'expliquer entre autres par le fait que nous avons injecté des cellules totales de MO, et non des CSH préalablement triées, ce qui implique la présence d'autres cellules dans le greffon, dont les lymphocytes T. Ceci peut influencer le pourcentage de cellules T provenant du donneur à court terme, puisqu'elles ne sont pas générées par les CSH *Vangl2*^{ΔΔ}, mais sont présentes initialement dans le greffon et peuvent être maintenues par prolifération homéostatique. D'ailleurs, une des façons de pallier à cet effet, outre le tri préalable de CSH ou la déplétion des lymphocytes T avant l'injection, serait d'étudier la reconstitution périphérique au moins jusqu'à la 16^e semaine post-transplantation, où l'on voit effectivement que cette différence disparaît. Une autre façon de valider la contribution des T serait d'analyser la reconstitution thymique à la 20^e semaine post-transplantation, afin d'évaluer s'il y a véritablement une hausse de production des lymphocytes T *Vangl2*^{ΔΔ}. Ceci dit, aucune différence ne fut observée chez les souris greffées avec de jeunes CSH contrôles ou *Vangl2*^{ΔΔ} dans la reconstitution thymique primaire, tel que présenté à la **Figure 4.1 (A,B)**, confirmant que l'augmentation périphérique des T ne vient pas directement des CSH *Vangl2*^{ΔΔ}.

En revanche, en analysant le réservoir de lymphocytes T en périphérie et dans le thymus par cytométrie en flux en conditions homéostatiques, nous avons observé des changements dans le ratio des lymphocytes CD4⁺ *Vangl2*^{ΔΔ} et CD8⁺ *Vangl2*^{ΔΔ} dans la rate des souris *Vangl2*^{ΔΔ}, tel que présenté à la **Figure 4.1 (C-K)**. En effet, la proportion de T CD4⁺ par rapport au pool total de T CD3ε⁺ était significativement augmenté, et la proportion de T CD8⁺ par rapport au pool total de CD3ε⁺ était significativement diminué dans la rate des souris *Vangl2*^{ΔΔ} adultes et âgées, les jeunes souris présentant les mêmes tendances. Ces changements ne sont pas significatifs dans la MO et le thymus des souris *Vangl2*^{ΔΔ}, à l'exception du groupe âgé où cette altération est également observée dans la MO. Ceci dit, ces résultats s'accordent tout de même pour suggérer un potentiel défaut du maintien des lymphocytes T, principalement en périphérie et non dans la production de ces cellules, puisque ces changements ne sont pas significatifs dans le thymus des souris *Vangl2*^{ΔΔ}. Par ailleurs, la littérature révèle que *Vangl2* est fortement

exprimé par les cellules dendritiques (Choi *et al.*, 2019), ce qui renforce l'idée selon laquelle une altération du réservoir de cellules dendritiques et de leur fonction pourrait directement influencer le maintien et la prolifération des T périphériques. Ces premières observations représentent une perspective d'étude intéressante, puisque le rôle de Vangl2 dans les cellules dendritiques et le maintien des lymphocytes T n'est actuellement pas connu.

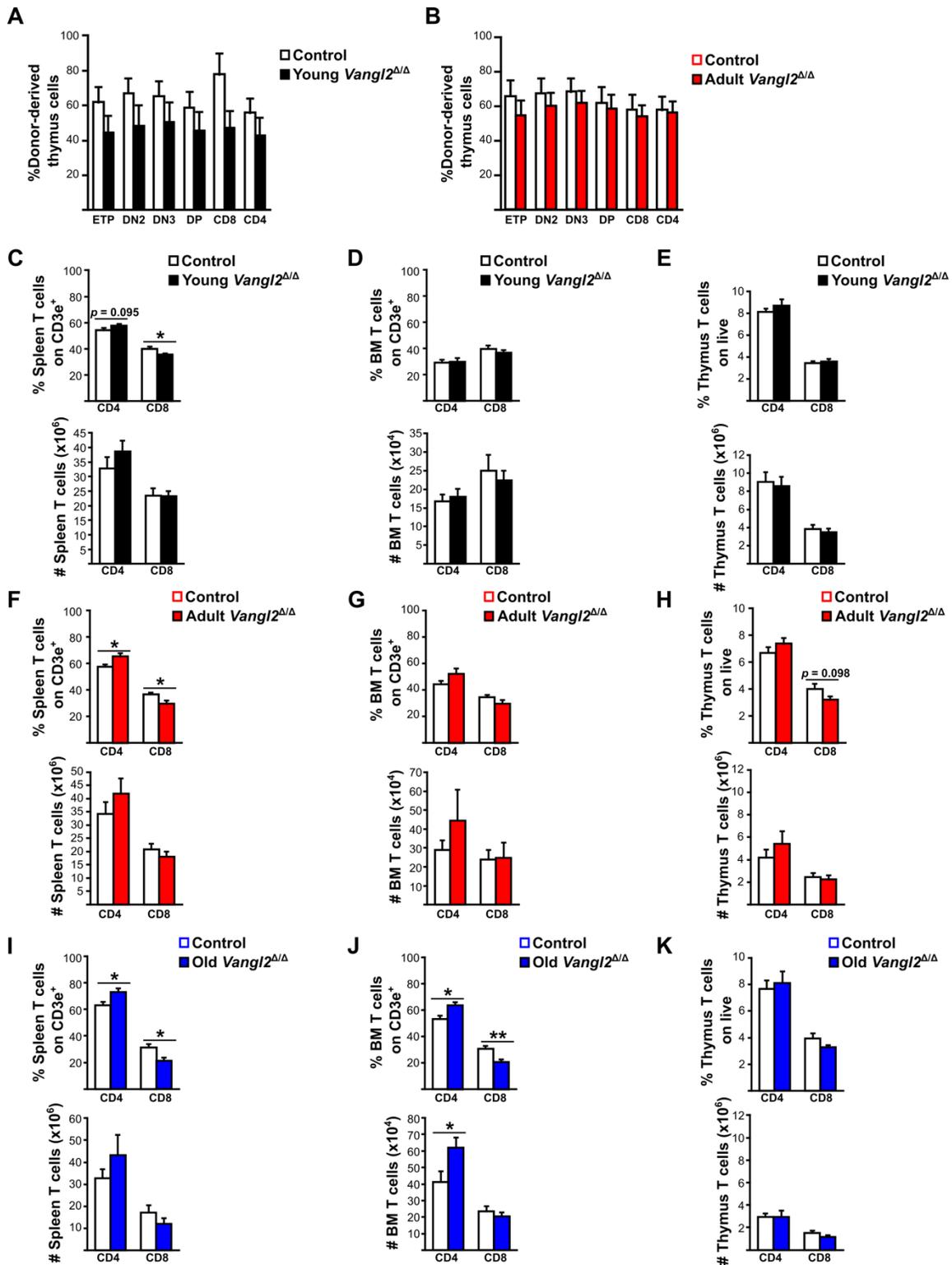


Figure 4.1. La perte de Vangl2 dans les cellules thymiques.

La perte de Vangl2 n'entraîne pas de changements dans la reconstitution thymique lors des greffes primaires, mais le ratio de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ est altéré chez les souris *Vangl2*^{Δ/Δ} en conditions homéostatiques. Voir ANNEXE II pour la légende détaillée de la figure.

Contrairement aux groupes de souris greffées avec de jeunes CSH, les souris greffées avec des CSH *Vangl2^{ΔΔ}* adultes ont quant à eux présenté une diminution significative de la reconstitution périphérique à long terme principalement dans la lignée myéloïde (GR1^{hi} et GR1^{lo}). L'analyse de la MO à la 20^e semaine post-transplantation a révélé que le nombre absolu de LT-HSC *Vangl2^{ΔΔ}* adultes est significativement diminué, avec une diminution marquée de près de 3 fois et demi par rapport aux contrôles, suggérant que les défauts de reconstitution proviennent effectivement d'un défaut d'auto-renouvellement, de maintien et d'expansion des LT-HSC *Vangl2^{ΔΔ}* adultes. En revanche, cette différence n'est pas observée dans les groupes de souris ayant reçu de jeunes CSH *Vangl2^{ΔΔ}*, confirmant la théorie selon laquelle *Vangl2* possède un rôle dépendant de l'âge dans le maintien des CSH à long terme. Enfin, ces résultats suggèrent que la perte de *Vangl2* entraîne une perte de fonction des CSH, potentiellement causé par un vieillissement prématuré de celles-ci.

Pour vérifier si le rôle de *Vangl2* dans le maintien des CSH post-transplantation serait sexe-dépendant, nous avons également effectué des greffes primaires dans des receveurs mâles et issus de jeunes donneurs mâles. Les receveurs présentaient une meilleure reconstitution hématopoïétique périphérique dans le pourcentage de granulocytes *Vangl2^{ΔΔ}*, bien qu'aucune différence ne fut observée dans les autres lignées ou dans la contribution totale des donneurs *Vangl2^{ΔΔ}*. Toutefois, comme les receveuses primaires, il n'y avait aucune différence à la 20^e semaine post-transplantation dans le réservoir de CSH et cellules progénitrices dans la MO des receveurs primaires, suggérant que cette différence réside uniquement dans la reconstitution périphérique à ce stade. De plus, les analyses en conditions homéostatiques démontrent que les jeunes mâles *Vangl2^{ΔΔ}* possèdent davantage de MPP2 dans la MO que leurs contrôles respectifs, autant en pourcentages qu'en nombres absolus, contrairement aux jeunes femelles qui ne présentaient pas cette différence. Ceci peut impliquer une présence accrue de MPP2 dans les greffons des donneurs *Vangl2^{ΔΔ}* mâles, ce qui pourrait influencer la reconstitution hématopoïétique à court terme, puisque les progéniteurs multipotents ont une capacité d'auto-renouvellement et de reconstitution transitoire allant jusqu'à la 6^e semaine post-transplantation (Kiel *et al.*, 2005). Bien que les MPP2 soient majoritairement biaisés pour la lignée mégacaryocytaire et érythrocytaire, ceux-ci peuvent également générer d'autres cellules myéloïdes dont les granulocytes, et même de petites quantités de lymphocytes *in vivo* (Cheng *et al.*, 2020), ce qui pourrait influencer la reconstitution granulocytaire observée lors des greffes primaires mâles. Tel qu'il sera discuté plus tard, cette différence de reconstitution disparaît effectivement lors des greffes secondaires.

Par la suite, pour approfondir notre étude fonctionnelle des CSH, nous avons effectué des transplantations en séries en performant des greffes secondaires issues des receveuses primaires et des greffes tertiaires issues des receveuses secondaires. La reconstitution périphérique fut significativement diminuée chez les receveuses secondaires dans la lignée myéloïde de la 4^e à la 16^e semaine post-transplantation pour les granulocytes GR1^{hi} *Vangl2*^{Δ/Δ} et de la 8^e à la 16^e semaine post-transplantation pour les monocytes GR1^{int} *Vangl2*^{Δ/Δ}. Ceci confirme notre hypothèse selon laquelle le rôle de *Vangl2* assure le maintien des CSH à long terme, en fonction de leur activation et de leur âge, puisque les receveuses primaires issues de jeunes donneuses *Vangl2*^{Δ/Δ} ne présentaient pas encore ces défauts de reconstitution contrairement aux receveuses secondaires. Ceci suggère par le fait même un défaut d'auto-renouvellement des CSH *Vangl2*^{Δ/Δ}, menant à des défauts de reconstitution hématopoïétique lors des transplantations en séries. En effet, ceci est d'autant plus confirmé par une diminution du réservoir de CSH et cellules progénitrices *Vangl2*^{Δ/Δ} dans la MO à la 20^e semaine post-transplantation. La seule sous-population n'ayant pas diminué de façon significative par rapport aux contrôles sont les LMPP *Vangl2*^{Δ/Δ}. Toutefois, une tendance à la baisse est déjà observée à cette étape. Ceci pourrait également expliquer l'absence de différence dans la production des cellules de la lignée lymphoïde lors de la reconstitution périphérique, puisque les LMPP *Vangl2*^{Δ/Δ} ne sont pas significativement réduits par rapport aux contrôles à ce stade. En bref, la perte de *Vangl2* affecte d'abord la lignée myéloïde, et ceci est expliqué par une perte du réservoir de LT-HSC, MPP2 et MPP3 *Vangl2*^{Δ/Δ} par défaut d'auto-renouvellement. De plus, en établissant un ratio d'expansion des LT-HSC *Vangl2*^{Δ/Δ} à la 20^e semaine post-transplantation dans la MO des receveuses secondaires par rapport aux LT-HSC *Vangl2*^{Δ/Δ} présents dans le greffon, nous avons observé une diminution drastique d'expansion par rapport aux contrôles. En effet, les CSH contrôles ont doublés en quantité, contrairement aux LT-HSC *Vangl2*^{Δ/Δ} qui ne se sont ni maintenus, ni multipliés, mais qui ont diminués d'environ 50% par rapport au jour 0, confirmant leur défaut d'auto-renouvellement. Cette perte de l'auto-renouvellement et du réservoir de LT-HSC *Vangl2*^{Δ/Δ} peut être causé par plusieurs facteurs, dont des défauts de prolifération, des défauts d'entrée en cycle cellulaire suite à un stress hématopoïétique, des défauts de migration vers la MO, ou encore une hypersensibilité des cellules menant à leur perte comme l'accumulation de dommages à l'ADN menant à la sénescence ou à une survie cellulaire altérée comparée aux contrôles. De ce fait, ces voies constitueraient toutes des perspectives d'études intéressantes à évaluer lors des transplantations.

Bien que le défaut de fonctionnalité des CSH *Vangl2^{ΔΔ}* fut auparavant démontré lors des greffes secondaires, les greffes tertiaires ont permis de mener les CSH *Vangl2^{ΔΔ}* à l'épuisement complet. En effet, la reconstitution périphérique fut significativement diminuée autant à court terme qu'à long terme, et ce autant dans la lignée myéloïde que lymphoïde, suggérant une perte totale de fonction des CSH *Vangl2^{ΔΔ}*. Le réservoir des CSH et cellules progénitrices *Vangl2^{ΔΔ}* dans la MO des receveuses tertiaires fut en effet quasi-inexistant, confirmant davantage le défaut de maintien des CSH *Vangl2^{ΔΔ}*. Nous avons observé lors des greffes primaires et secondaires une absence de changement dans le nombre de cellules matures lymphoïdes provenant des donneurs *Vangl2^{ΔΔ}*. Ceci suggère que malgré la diminution des CSH *Vangl2^{ΔΔ}* dans les greffes primaires issues de vieilles donneuses et dans les greffes secondaires, les CSH *Vangl2^{ΔΔ}* restantes assuraient encore la différenciation hématopoïétique jusqu'à un certain point. Ceci implique par le fait même que le principal défaut de reconstitution provient effectivement d'un défaut d'auto-renouvellement à long terme de celles-ci et non d'une altération de la différenciation. Ceci fut ainsi confirmé par les greffes tertiaires où les cellules matures lymphoïdes et myéloïdes *Vangl2^{ΔΔ}* étaient absentes autant dans la MO que dans la rate des receveuses tertiaires. Enfin, il est à noter que nous n'injectons pas des CSH triées mais des cellules totales de la MO des donneurs, ce qui implique que le greffon peut contenir des cellules matures qui peuvent s'auto-renouveler dans la MO indépendamment des CSH *Vangl2^{ΔΔ}* pendant une certaine période, notamment les lymphocytes T, expliquant leur présence aux stades précoces. En ce qui concerne les groupes de receveurs mâles, nous avons observé une diminution de la reconstitution périphérique des granulocytes *Vangl2^{ΔΔ}* à partir de la 8^e semaine post-transplantation chez les receveurs secondaires, à l'inverse des receveurs primaires, suggérant une possible suractivation initiale suivie d'un effet d'épuisement des CSH *Vangl2^{ΔΔ}*. Toutefois, l'absence de changements dans la MO implique que les CSH *Vangl2^{ΔΔ}* mâles semblent moins susceptibles que les CSH *Vangl2^{ΔΔ}* femelles. Toutefois, il est à noter que nous n'avons analysé qu'un seul groupe de greffes secondaires mâles et ces expériences devront donc être répétées pour confirmer la validité de ces résultats et évaluer la différence de reconstitution hématopoïétique entre mâles et femelles. Enfin, des greffes tertiaires permettraient par ailleurs de valider le principe de perte par épuisement à long terme chez les mâles.

Tel que décrit dans le chapitre ***Experimental Competitive Bone Marrow Transplant Assays***, nos essais de transplantations sont compétitifs, dans lequel des cellules contrôles et tests (*Vangl2^{ΔΔ}* dans ce cas-ci) sont présentes dans un ratio équivalent dans le greffon et

compétitionnent entre-elles pour repeupler la MO (Hétu-Arbour *et al.*, 2021a). Cet essai compétitif comporte comme tout essai ses avantages et ses limites. Tout d'abord, l'environnement compétitif des cellules du greffon permet d'évaluer la fonctionnalité relative des CSH *Vangl2^{ΔΔ}* par rapport aux contrôles dans le même environnement limité. Cet environnement compétitif permet par le fait même de souligner de petites différences de fonctionnalité entre les CSH contrôles et *Vangl2^{ΔΔ}*, où les CSH les plus fonctionnelles l'emporteront sur la reconstitution de la MO. De plus, les CSH contrôles servant de compétition permettent d'assurer la survie et la reconstitution hématopoïétique des souris greffées en cas de défaut fonctionnel des CSH *Vangl2^{ΔΔ}*, ce qui nous permet d'étudier ces défauts à long terme dans notre modèle malgré leur défectuosité. Enfin, les CSH contrôles servant de compétition constituent un contrôle interne quant à la réussite des essais de transplantations, notamment en évaluant leur capacité de reconstitution en fonction de la réussite de l'irradiation, et la réussite de leur migration dans la MO à travers l'injection des cellules de MO par voie intraveineuse. Quant aux limites des essais compétitifs, puisque les CSH contrôles et *Vangl2^{ΔΔ}* sont retrouvées dans un ratio 1 pour 1 dans le greffon, les résultats observés quant à la fonctionnalité des CSH *Vangl2^{ΔΔ}* pourraient effectivement être accentués par la présence des CSH contrôles qui compétitionnent avec elles. Des essais de greffes primaires non compétitifs permettraient de confirmer les résultats observés indépendamment de la présence de compétition dans le greffon. De plus, nos essais de greffes impliquent l'injection de cellules totales de la MO et tel que discuté précédemment, la présence de progéniteurs et cellules matures dans le greffon, comme les lymphocytes T, peuvent influencer les résultats de reconstitution à court terme. Une des façons de pallier à cette limite est d'analyser la reconstitution à long terme, au delà de 16 semaines, et d'effectuer des transplantations en séries comme nous l'avons fait dans cette étude. Une autre alternative serait d'effectuer des groupes de greffes avec des CSH triées afin de valider si les défauts fonctionnels seront également observés à court terme. Toutefois, l'injection de cellules triées possède également ses limites, comme un temps de traitement des échantillons plus long qui peut entraîner une diminution de la viabilité des cellules du greffon (Kwarteng & Heinonen, 2016).

Par la suite, pour vérifier que les défauts fonctionnels perçus lors de nos essais fonctionnels de transplantation ne soient pas causés par une capacité moindre de migration des CSH *Vangl2^{ΔΔ}* dans la MO, nous avons également effectué un essai fonctionnel d'irradiation sous-létale pour évaluer la capacité de récupération des CSH *Vangl2^{ΔΔ}*. Dans cet essai, les souris contrôles et *Vangl2^{ΔΔ}* sont soumises à une dose non-létale d'irradiation, puis la récupération de celles-ci et

la reprise hématopoïétique par les CSH, qui sont déjà établies dans la MO des souris, est analysée à court-terme. De ce fait, les changements observés sont totalement indépendants de la capacité migratoire des CSH *Vangl2^{ΔΔ}*, mais de leur capacité d'assurer la reprise hématopoïétique suite à un stress myélotoxique. Les résultats préliminaires montrent que les souris adultes *Vangl2^{ΔΔ}* récupèrent plus lentement que les souris contrôles, suggérant une hypersensibilité aux conséquences de l'irradiation (voir **ANNEXE III**). Ces résultats préliminaires constituent une perspective d'étude prometteuse pour valider l'effet de sensibilité accrue des souris *Vangl2^{ΔΔ}* qui pourrait être causée par plusieurs facteurs, dont la perte de fonction des CSH *Vangl2^{ΔΔ}*, incapables d'assurer la reprise hématopoïétique suite au stress myélotoxique. Cette perte de fonction pourrait entre autres être causée par l'accumulation de dommages à l'ADN suite à l'irradiation, pouvant notamment mener à un arrêt de la prolifération par sénescence ou à la mort cellulaire. La phosphorylation de l'histone H2AX sur le résidu serine 139 est une étape essentielle à l'initiation des réparations des dommages à l'ADN puisqu'elle permet le recrutement des protéines de la réponse aux dommages à l'ADN (Mah *et al.*, 2010). De ce fait, nous pourrions évaluer l'initiation de la réponse aux dommages à l'ADN en utilisant un anticorps ciblant la phospho-Histone H2A.X (ser-139) dans la MO des souris irradiées par cytométrie en flux. De plus, la perte de fonction des CSH *Vangl2^{ΔΔ}* pourrait également être causée par une augmentation du stress oxydatif, qui peut être évaluée par cytométrie en flux en mesurant les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène ou *reactive oxygen species* (ROS). Enfin, une autre cause potentielle de perte de fonction des CSH serait l'induction de la sénescence suite à l'irradiation, qui peut être étudiée en évaluant l'activité de la β-galactosidase associée à la sénescence ou l'expression du marqueur de sénescence p16^{INK4a} par cytométrie en flux. En somme, plusieurs mécanismes peuvent être évalués afin de déterminer la perte de récupération des souris *Vangl2^{ΔΔ}* observée lors des essais d'irradiation sous-létale.

Par la suite, les changements phénotypiques observés chez les vieilles souris en conditions homéostatiques, ainsi que les changements fonctionnels observés lors des greffes, nous ont finalement mené à investiguer aux mécanismes utilisés par *Vangl2* dans la régulation du maintien des CSH. Comme mentionné auparavant, *Vangl2* est une protéine clé de la voie Wnt/PCP connue pour contrôler la polarité des cellules. De plus, *Vangl2* est nécessaire au recrutement de *Fzd6* dans l'oreille interne des souris (Wang *et al.*, 2006), un récepteur au rôle prévalant dans la voie PCP (Chang *et al.*, 2016). Nous avons donc investigué quant au maintien de la polarité des CSH *Vangl2^{ΔΔ}* par analyse de la localisation de *Cdc42* par imagerie de

cytométrie en flux. Aucune différence ne fut observée dans la localisation de Cdc42 indépendamment du groupe d'âge analysé, suggérant que Vangl2 ne régule pas la polarité des CSH dépendante au Cdc42 ni dans sa distribution qui est normalement activé par la voie Wnt/Ca²⁺. Notre analyse de polarité basée sur la distribution du Cdc42 est cependant en accord avec la littérature, puisque nous observons une diminution de la polarité chez les vieilles CSH par rapport aux jeunes CSH tel qu'attendu (Florian *et al.*, 2012). De plus, il est à noter que malgré l'absence de différence significative dans la distribution de Cdc42, nous observons cependant une légère tendance à la hausse du pourcentage de CSH *Vangl2*^{Δ/Δ} polaires par rapports aux contrôles, et ce, dans tous les différents groupes d'âges. En effet, cette tendance à la hausse est minime, soit d'environ 5 à 10% par rapport aux contrôles, mais s'observe de façon répétée autant chez les jeunes, adultes et vieilles souris. Par ailleurs, la littérature suggère un rôle de la voie PCP dans le maintien de la division symétrique des cellules souches musculaires. En effet, les résultats de l'étude en question suggèrent que la voie PCP et Vangl2 sont nécessaires au maintien de la division symétrique des cellules souches satellites musculaires via la protéine Wnt7a et le récepteur Frizzled-7 (Le Grand *et al.*, 2009). Wnt7a induit la distribution membranaire de Vangl2 à des pôles opposés des futures cellules filles et cette redistribution ne se retrouve pas lors des divisions cellulaires apicales-basales (polaires), ce qui suggère que Vangl2 pourrait avoir un rôle dans le maintien de la symétrie de division des cellules souches (Le Grand *et al.*, 2009). Une hypothèse reliant cette étude et nos observations serait donc que la voie PCP pourrait contrôler le maintien de la division symétrique des CSH en maintenant leur état apolaire, qui permettrait la génération de deux cellules souches filles identiques et pourrait expliquer la légère augmentation de polarité chez les CSH *Vangl2*^{Δ/Δ}. Une hausse de polarité pourrait engendrer davantage de divisions asymétriques, où une CSH donne naissance à une cellule fille identique et une cellule progénitrice différenciée, au détriment des divisions symétriques donnant deux CSH et permettant d'assurer l'auto-renouvellement de celles-ci. Ceci pourrait également influencer la hausse des MPP *Vangl2*^{Δ/Δ} à long terme chez les vieilles souris. Enfin, il faudrait néanmoins confirmer le rôle de Vangl2 dans la polarité à l'aide d'autres marqueurs polaires, ou en évaluant directement l'activation de la voie PCP en l'absence de Vangl2, sachant que celle-ci mène à une distribution asymétrique de ses composantes à des pôles opposés dans la cellule (Montcouquiol *et al.*, 2006).

La littérature actuelle suggère que les voies non-canoniques pourraient inhiber la voie canonique dans les CSH contribuant ainsi à leur maintien (Nemeth *et al.*, 2007). De plus, une suractivation de la voie Wnt canonique peut mener à l'altération du réservoir de CSH (Luis *et*

al., 2011), ce qui nous a mené à évaluer l'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans les CSH *Vangl2* ^{Δ/Δ} avec l'imagerie par cytométrie en flux. Les pourcentages de cellules où la β -caténine fut détectée en colocalisation avec DAPI, soit à l'intérieur du noyau, était similaire entre les CSH *Vangl2* ^{Δ/Δ} et contrôles indépendamment des groupes d'âges. En revanche, l'intensité de la β -caténine active était significativement plus élevée chez les vieilles CSH *Vangl2* ^{Δ/Δ} . De plus, cette augmentation du signal fut observée pour chaque paires de souris contrôles et *Vangl2* ^{Δ/Δ} analysées, suggérant une accumulation des niveaux de β -caténine active dans les CSH *Vangl2* ^{Δ/Δ} . Ceci pourrait entraîner une activation chronique de la voie canonique, potentiellement causée par une baisse de son inhibition par la voie PCP, et contribuer à la perte de fonction des CSH *Vangl2* ^{Δ/Δ} à long terme. Cependant, une limite à souligner concernant nos expériences d'imagerie par cytométrie en flux est la pureté de notre population analysée. Bien qu'une déplétion négative fut effectuée préalablement au marquage extracellulaire, notre mélange d'anticorps permettant l'identification des CSH ne contient pas le marqueur CD48, permettant de distinguer les CSH des cellules progénitrices. En raison du nombre limité de couleurs pouvant être utilisées, nous avons donc opté pour un mélange contenant les marqueurs principaux soit Sca-1, CD117 et CD150, les deux derniers canaux étant nécessaire pour l'anticorps secondaire détectant le Cdc42 ou la β -caténine et un canal sans couleur servant de champ lumineux permettant d'évaluer la morphologie de nos cellules. De ce fait, notre analyse est conduite sur des LSK CD150⁺ et inclut des CSH, mais aussi des MPP2 qui expriment également le CD150. Ceci dit, nous pouvons tout de même conclure que l'activité Wnt canonique est augmentée dans le réservoir de CSH et MPP2 *Vangl2* ^{Δ/Δ} . Cependant, des expériences complémentaires avec l'anticorps CD48 ou en effectuant un tri préalable des CSH, permettrait d'assurer la pureté de notre population et de valider si les changements observés seraient plus importants dans une population homogène.

De plus, la littérature indique que l'activation chronique de la voie Wnt/ β -caténine mène à l'activation des voies de sénescence dans plusieurs types cellulaires, comme les MSC dans la MO (Gu *et al.*, 2014), et mène également à l'épuisement des CSH (Scheller *et al.*, 2006). Nos résultats vont également dans ce sens et démontrent une hausse significative dans l'expression du marqueur de sénescence p16^{INK4a} dans le réservoir de cellules LSK *Vangl2* ^{Δ/Δ} et LT-HSC *Vangl2* ^{Δ/Δ} provenant de vieilles souris. En effet, p16 est utilisé comme biomarqueur de sénescence est exprimé par plusieurs cellules sénescents (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). L'activation de p16 résulte en l'inhibition des cyclines kinases dépendantes ce qui empêche l'inactivation par phosphorylation de la pRB. La pRB active se lie au facteur de

transcription E2F ce qui empêche la transcription des gènes de prolifération et la progression du cycle cellulaire (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Contrairement aux essais d'imagerie par cytométrie en flux, ces expériences furent conduites par cytométrie en flux traditionnelle, ce qui ne nous limita pas dans l'utilisation de nombreux anticorps, dont CD48, permettant la distinction des différentes sous-populations qui sont les LT-HSC, ST-HSC, LMPP, MPP2 et MPP3. Ceci nous a permis d'observer que les pourcentages de LT-HSC *Vangl2*^{Δ/Δ} p16⁺ étaient significativement augmentés de près de 3 fois par rapport aux contrôles, suggérant une activation au moins partielle de voies de sénescence dans les LT-HSC *Vangl2*^{Δ/Δ} provenant de l'activation chronique de la voie Wnt canonique. En somme, les vieilles CSH *Vangl2*^{Δ/Δ} à long terme possèdent des niveaux plus élevés de β-caténine active, pouvant mener à l'augmentation de la sénescence observée dans ces mêmes cellules et expliquant par le fait même les défauts d'auto-renouvellement observés particulièrement chez les vieilles souris *Vangl2*^{Δ/Δ} et post-transplantation, ce qui constitue une première voie mécanistique expliquant la perte de fonction et du maintien des CSH *Vangl2*^{Δ/Δ} à long terme.

5 CONCLUSION

En conclusion, ce projet de maîtrise avait pour but d'élucider le rôle de la protéine Vangl2, protéine clé de la voie Wnt/PCP, dans l'hématopoïèse et particulièrement dans le maintien des CSH. Ces recherches ont permis d'identifier pour la première fois Vangl2 comme important régulateur fonctionnel dans la biologie des CSH, et ce, autant en conditions homéostatiques qu'en contexte thérapeutique lors des greffes de MO. Nous avons également mis de l'avant l'importance de la variable temporelle quant au rôle de Vangl2 dans le maintien des CSH à long terme. En effet, les changements dans le réservoir de CSH et cellules progénitrices en l'absence de Vangl2 ont principalement été observées chez les vieilles souris âgées de 18 mois, suggérant que l'activité de Vangl2 n'est pas cruciale au maintien de l'hématopoïèse en conditions homéostatiques à court terme, mais essentielle au maintien des CSH à long terme. Nous avons observé une augmentation des niveaux de β -caténine active dans les LSK CD150⁺ *Vangl2* ^{$\Delta\Delta$} des vieilles souris en accord avec une expression accrue du marqueur de sénescence p16, suggérant un vieillissement prématuré des CSH *Vangl2* ^{$\Delta\Delta$} . Nous avons donc émis l'hypothèse que l'augmentation de la sénescence pouvait être une conséquence directe de la suractivation de la voie canonique dans les vieilles CSH *Vangl2* ^{$\Delta\Delta$} . De plus, sachant que les voies non-canoniques pourraient inhiber la voie canonique, nous avons également suggérer que cette accumulation des niveaux de β -caténine active provient d'une diminution de l'activation de la voie Wnt/PCP, altérée en l'absence de Vangl2. De futures recherches permettront de valider ces interprétations, notamment pour caractériser la fonction des autres protéines Wnt/PCP ainsi que l'activation mécanistique des protéines effectrices de la voie Wnt/PCP en absence de Vangl2. En somme, ces observations s'accordent toutes pour confirmer une même idée commune : la perte de Vangl2 entraîne un maintien altéré des CSH avec le temps.

Ce défaut de maintien est traduit par une perte de fonction des CSH *Vangl2* ^{$\Delta\Delta$} observée autant au niveau homéostatique chez les vieilles souris que lors des greffes de MO. Chez les vieilles souris *Vangl2* ^{$\Delta\Delta$} , nous avons observé une augmentation significative de progéniteurs multipotents myéloïdes. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ces observations pourraient être engendrées par une légère augmentation de polarité et perte de division symétrique des CSH, dont nous n'avons vu qu'une tendance non-significative mais constante et répétée dans les trois groupes d'âges. Nous avons également observé un nombre de cellules par colonies diminué lors des cultures *in vitro* des cellules *Vangl2* ^{$\Delta\Delta$} , ce qui solidifie l'hypothèse

selon laquelle un défaut d'auto-renouvellement est accentué chez les vieilles souris *Vangl2^{Δ/Δ}*. La perte de fonction accentuée avec le temps en l'absence de *Vangl2* fut d'autant plus observée au niveau fonctionnel lors des greffes de MO où nous avons observé dans les greffes primaires une baisse de reconstitution périphérique *Vangl2^{Δ/Δ}* et une diminution du nombre de LT-HSC *Vangl2^{Δ/Δ}* issues des donneuses adultes comparativement aux jeunes donneuses qui n'ont pas démontré ces baisses de fonctionnalité. Effectivement, les jeunes CSH *Vangl2^{Δ/Δ}* ont pu reconstituer efficacement la MO contrairement aux CSH *Vangl2^{Δ/Δ}* adultes. Les transplantations en série ont validé le rôle de *Vangl2* dépendant de l'âge, puisque mêmes les jeunes CSH *Vangl2^{Δ/Δ}* ont ultimement présenté un défaut de maintien à plus long terme. Les greffes secondaires et tertiaires ont effectivement mené à une perte de reconstitution hématopoïétique périphérique et une perte significative du réservoir de CSH et cellules progénitrices *Vangl2^{Δ/Δ}*. En effet, les CSH *Vangl2^{Δ/Δ}* n'ont pu s'amplifier par auto-renouvellement dans la MO des souris receveuses contrairement à leurs contrôles. Les greffes tertiaires ont ultimement mené à l'absence totale de la contribution des CSH *Vangl2^{Δ/Δ}* dans la reconstitution hématopoïétique, autant en périphérie que dans la MO et organes secondaires, dont le thymus et la rate, témoignant d'un épuisement des CSH *Vangl2^{Δ/Δ}* par défaut de maintien et auto-renouvellement à long terme.

En somme, les résultats de ce projet de recherche mettent de l'avant pour la première fois le rôle fonctionnel de la protéine *Vangl2* dans l'hématopoïèse et le maintien des CSH. Ces avancées contribuent à la caractérisation la voie Wnt/PCP dans la biologie des CSH, leur auto-renouvellement et leur différenciation qui demeure peu étudiée. L'identification de ce régulateur des CSH ouvre une nouvelle voie prometteuse vers de futures recherches et perspectives quant au rôle de *Vangl2* dans le vieillissement et la biologie des CSH, pouvant mener à d'importantes avancées cliniques et à l'amélioration des thérapies issues des CSH comme les greffes de MO.

6 ANNEXE I

Dear Dr Bouali

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "Vangl2 Regulates Long-term HSC Maintenance" to be considered for publication in Frontiers in Cell and Developmental Biology, section Stem Cell Research.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:
<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

If you have already created a Frontiers account using a different email address, please add this one as a secondary email to your Frontiers profile following this link:

<https://loop.frontiersin.org/settings/email>

For any questions on the above, you can contact support@frontiersin.org

You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you receive access the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript. If the required number of reviewers endorse your manuscript in the Independent Review stage, their tabs will be closed and the manuscript will be forwarded to the Review Finalized stage, where you will be able to interact with the handling editor via the Editor tab.

Best regards,

Your Frontiers in Cell and Developmental Biology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team
www.frontiersin.org
Avenue du Tribunal Fédéral 34
Lausanne, Switzerland
Office T 41 21 510 1789

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)

-----MANUSCRIPT DETAILS-----

Manuscript title: Vangl2 Regulates Long-term HSC Maintenance

Manuscript ID: 760248

Submitted By: Krista M Heinonen

Authors: Sarah Bouali, Roxann Hétu-Arbour, Célia Gardet and Krista M Heinonen

Journal: Frontiers in Cell and Developmental Biology, section Stem Cell Research

7 ANNEXE II

Légende détaillée de la Figure 4.1. La perte de Vangl2 dans les cellules thymiques.

(A-B) Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules thymiques dérivés du donneur dans le thymus 20 semaines après la transplantation pour (A) les groupes de greffes issues de jeunes donneuses ou (B) les groupes de greffes issues de donneuses adultes (moyenne + SEM). Les groupes de greffes issues de jeunes donneuses représentent trois expériences indépendantes (n=14 contrôle, 12 Vangl2^{Δ/Δ}) et les groupes de greffes issues de donneuses adultes représentent deux expériences indépendantes (n=9 contrôle, 11 Vangl2^{Δ/Δ}).

(C-E) Pourcentages et nombres de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans la (C) rate, (D) moelle osseuse (BM) et (E) thymus des jeunes souris (n=12-16 contrôle, 15-17 Vangl2^{Δ/Δ}).

(F-H) Pourcentages et nombres de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans la (F) rate, (G) moelle osseuse et (H) thymus des souris adultes (n=8-11 contrôle, 8-12 Vangl2^{Δ/Δ}).

(I-K) Pourcentages et nombres de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans la (I) rate, (J) moelle osseuse et (K) thymus des vieilles souris (n=10-13 contrôle, 10-13 Vangl2^{Δ/Δ})(moyenne + SEM). * p≤0,05, ** p≤0,005 (test t de Student bilatéral non apparié). ETP : *early thymic progenitors*/progéniteurs thymiques précoces, DN2/DN3 : thymocytes doubles-négatives 2 et 3, DP : thymocytes doubles-positives.

8 ANNEXE III

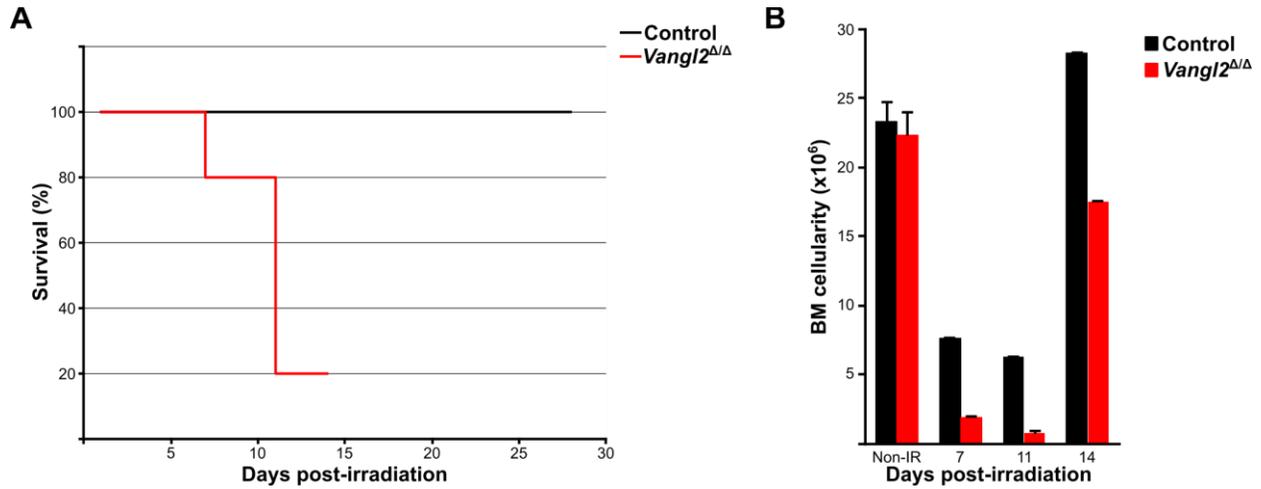


Figure 8.1. Les souris *Vangl2*^{Δ/Δ} ont une sensibilité accrue à l'irradiation sous-létale

Résultats préliminaires démontrant une sensibilité accrue des souris adultes *Vangl2*^{Δ/Δ} (6 mois) à l'irradiation sous-létale. (A) Courbe de survie présentant le taux de survie (%) des souris suivant une irradiation sous-létale corporelle totale de 4,5 Gy. (B) Comptes cellulaires de la moelle osseuse (BM) des souris suivant une irradiation sous-létale corporelle totale de 4,5 Gy. Les contrôles non-irradiés (Non-IR) proviennent d'expériences indépendantes (contrôles n=6, *Vangl2*^{Δ/Δ} n=6). Souris contrôles irradiées (n=1/jour), souris *Vangl2*^{Δ/Δ} irradiées (n=1 jour 7 et 14, n=3 jour 11).

9 RÉFÉRENCES

- Abidin BM, Hammami A, Stäger S, Heinonen KM (2017) Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. *PLOS Pathogens* 13(8):e1006422-e1006422.
- Abidin BM, Owusu Kwarteng E, Heinonen KM (2015) Frizzled-6 Regulates Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Survival and Self-Renewal. *The Journal of Immunology* 195(5):2168.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404(6774):193-197.
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T (2004) Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche. *Cell* 118(2):149-161.
- Attema JL, Pronk CJH, Norddahl GL, Nygren JM, Bryder D (2009) Hematopoietic stem cell ageing is uncoupled from p16INK4A-mediated senescence. *Oncogene* 28(22):2238-2243.
- Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, Sigvardsson M, Weissman IL, Bryder D, Rossi DJ (2010a) Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(12):5465.
- Beerman I, Maloney WJ, Weissmann IL, Rossi DJ (2010b) Stem cells and the aging hematopoietic system. *Current Opinion in Immunology* 22(4):500-506.
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh J-C, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R (1996) A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 382:225.
- Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M (2012) Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nature Reviews Immunology* 12(6):443-458.
- Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M (1998) Dishevelled Activates JNK and Discriminates between JNK Pathways in Planar Polarity and *wingless* Signaling. *Cell* 94(1):109-118.
- Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, Scheiermann C, Schiff L, Poncz M, Bergman A, Frenette PS (2014) Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nature Medicine* 20(11):1315-1320.
- Campisi J & d'Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(9):729-740.
- Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chèvre R, A-González N, Kunisaki Y, Zhang D, van Rooijen N, Silberstein LE, Weber C, Nagasawa T, Frenette PS, Castrillo A, Hidalgo A (2013) Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153(5):1025-1035.
- Catlin SN, Busque L, Gale RE, Guttorp P, Abkowitz JL (2011) The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* 117(17):4460-4466.
- Chagraoui J, Girard S, Spinella J-F, Simon L, Bonneil E, Mayotte N, MacRae T, Coulombe-Huntington J, Bertomeu T, Moison C, Tomellini E, Thibault P, Tyers M, Marinier

- A,Sauvageau G (2021) UM171 Preserves Epigenetic Marks that Are Reduced in *Ex Vivo* Culture of Human HSCs via Potentiation of the CLR3-KBTBD4 Complex. *Cell Stem Cell* 28(1):48-62.e46.
- Chang H, Smallwood PM, Williams J,Nathans J (2016) The spatio-temporal domains of Frizzled6 action in planar polarity control of hair follicle orientation. *Developmental Biology* 409(1):181-193.
- Cheng H, Zheng Z,Cheng T (2020) New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein & Cell* 11(1):34-44.
- Choi J, Baldwin TM, Wong M, Bolden JE, Fairfax KA, Lucas EC, Cole R, Biben C, Morgan C, Ramsay KA, Ng AP, Kauppi M, Corcoran LM, Shi W, Wilson N, Wilson MJ, Alexander WS, Hilton DJ,de Graaf CA (2019) Haemopedia RNA-seq: a database of gene expression during haematopoiesis in mice and humans. *Nucleic acids research* 47(D1):D780-D785.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC,Keller G (1998) A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125(4):725.
- Cobas M, Wilson A, Ernst B, Mancini SpJC, MacDonald HR, Kemler R,Radtke F (2004) β -Catenin Is Dispensable for Hematopoiesis and Lymphopoiesis. *Journal of Experimental Medicine* 199(2):221-229.
- Cohen S, Roy J, Lachance S, Delisle J-S, Marinier A, Busque L, Roy D-C, Barabé F, Ahmad I, Bambace N, Bernard L, Kiss T, Bouchard P, Caudrelier P, Landais S, Larochelle F, Chagraoui J, Lehnertz B, Corneau S, Tomellini E, van Kampen JJA, Cornelissen JJ, Dumont-Lagacé M, Tanguay M, Li Q, Lemieux S, Zandstra PW,Sauvageau G (2020) Hematopoietic stem cell transplantation using single UM171-expanded cord blood: a single-arm, phase 1–2 safety and feasibility study. *The Lancet Haematology* 7(2):e134-e145.
- Congdon KL & Reya T (2008) Divide and conquer: how asymmetric division shapes cell fate in the hematopoietic system. *Current Opinion in Immunology* 20(3):302-307.
- Cui YZ, Hisha H, Yang GX, Fan TX, Jin T, Li Q, Lian Z,Ikehara S (2002) Optimal protocol for total body irradiation for allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Bone Marrow Transplant* 30(12):843-849.
- Czechowicz A, Kraft D, Weissman IL,Bhattacharya D (2007) Efficient transplantation via antibody-based clearance of hematopoietic stem cell niches. *Science (New York, N.Y.)* 318(5854):1296-1299.
- De A (2011) Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43(10):745-756.
- de Haan G & Lazare SS (2018) Aging of hematopoietic stem cells. *Blood* 131(5):479-487.
- Dieterlen-Lievre pF (1975) On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 33(3):607.
- Ding L & Morrison SJ (2013) Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495(7440):231-235.
- Ding L, Saunders TL, Enikolopov G,Morrison SJ (2012) Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481(7382):457-462.

- Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE (2010) Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nature Immunology* 11(7):585-593.
- Dykstra B, Kent D, Bowie M, McCaffrey L, Hamilton M, Lyons K, Lee SJ, Brinkman R, Eaves C (2007) Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell stem cell* 1(2):218-229.
- Dykstra B, Olthof S, Schreuder J, Ritsema M, de Haan G (2011) Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *Journal of Experimental Medicine* 208(13):2691-2703.
- Dzierzak E & Speck NA (2008) Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nature Immunology* 9(2):129-136.
- Eaves CJ (2015) Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 125(17):2605-2613.
- Endo Y, Wolf V, Muraiso K, Kamijo K, Soon L, Üren A, Barshishat-Küpper M, Rubin JS (2005) Wnt-3a-dependent Cell Motility Involves RhoA Activation and Is Specifically Regulated by Dishevelled-2. *Journal of Biological Chemistry* 280(1):777-786.
- Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, Gingras S, Ruel R, Mayotte N, Csaszar E, Knapp DJHF, Miller P, Ngom M, Imren S, Roy D-C, Watts KL, Kiem H-P, Herrington R, Iscove NN, Humphries RK, Eaves CJ, Cohen S, Marinier A, Zandstra PW, Sauvageau G (2014) Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science (New York, N.Y.)* 345(6203):1509-1512.
- Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet (London, England)* 373(9674):1550-1561.
- Ficara F, Murphy MJ, Lin M, Cleary ML (2008) Pbx1 Regulates Self-Renewal of Long-Term Hematopoietic Stem Cells by Maintaining Their Quiescence. *Cell Stem Cell* 2(5):484-496.
- Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, Guo J, Leahy KM, Kronenberg HM, Scadden DT (2008) Wnt Signaling in the Niche Enforces Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Is Necessary to Preserve Self-Renewal In Vivo. *Cell Stem Cell* 2(3):274-283.
- Florian MC, Dörr K, Niebel A, Daria D, Schrezenmeier H, Rojewski M, Filippi M-D, Hasenberg A, Gunzer M, Scharffetter-Kochanek K, Zheng Y, Geiger H (2012) Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell* 10(5):520-530.
- Florian MC & Geiger H (2010) Concise Review: Polarity in Stem Cells, Disease, and Aging. *STEM CELLS* 28(9):1623-1629.
- Florian MC, Klose M, Sacma M, Jablanovic J, Knudson L, Nattamai KJ, Marka G, Vollmer A, Soller K, Sakk V, Cabezas-Wallscheid N, Zheng Y, Mulaw MA, Glauche I, Geiger H (2018) Aging alters the epigenetic asymmetry of HSC division. *PLoS biology* 16(9):e2003389-e2003389.
- Florian MC, Nattamai KJ, Dörr K, Marka G, Uberle B, Vas V, Eckl C, Andrä I, Schiemann M, Oostendorp RAJ, Scharffetter-Kochanek K, Kestler HA, Zheng Y, Geiger H (2013) A canonical to non-canonical Wnt signalling switch in haematopoietic stem-cell ageing. *Nature* 503(7476):392-396.
- Folley JH, Borges W, Yamawaki T (1952) Incidence of leukemia in survivors of the atomic bomb in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *The American Journal of Medicine* 13(3):311-321.

- Gao J, Li Y, Lu S, Wang M, Yang Z, Yan X, Zheng Y (2009) Enhanced in vivo motility of human umbilical cord blood hematopoietic stem/progenitor cells introduced via intra-bone marrow injection into xenotransplanted NOD/SCID mouse. *Exp Hematol* 37(8):990-997.
- Georgiades P, Ogilvy S, Duval H, Licence DR, Charnock-Jones DS, Smith SK, Print CG (2002) vavCre Transgenic mice: A tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages. *genesis* 34(4):251-256.
- Golde WT, Gollobin P, Rodriguez LL (2005) A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)* 34(9):39-43.
- Greenbaum AM & Link DC (2011) Mechanisms of G-CSF-mediated hematopoietic stem and progenitor mobilization. *Leukemia* 25(2):211-217.
- Gu Z, Tan W, Feng G, Meng Y, Shen B, Liu H, Cheng C (2014) Wnt/ β -catenin signaling mediates the senescence of bone marrow-mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients through the p53/p21 pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry* 387(1):27-37.
- Guo N, Hawkins C, Nathans J (2004) Frizzled6 controls hair patterning in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(25):9277-9281.
- Gyurkocza B, Rezvani A, Storb RF (2010) Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. *Expert Review of Hematology* 3(3):285-299.
- Harrison DE, Jordan CT, Zhong RK, Astle CM (1993) Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations. *Exp Hematol* 21(2):206-219.
- Hatakeyama J, Wald JH, Printsev I, Ho H-YH, Carraway KL, 3rd (2014) Vangl1 and Vangl2: planar cell polarity components with a developing role in cancer. *Endocrine-related cancer* 21(5):R345-R356.
- Heinonen KM, Vanegas JR, Lew D, Krosi J, Perreault C (2011) Wnt4 Enhances Murine Hematopoietic Progenitor Cell Expansion Through a Planar Cell Polarity-Like Pathway. *PLoS ONE* 6(4):e19279.
- Heisenberg C-P, Tada M, Rauch G-J, Saúde L, Concha ML, Geisler R, Stemple DL, Smith JC, Wilson SW (2000) Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405(6782):76-81.
- Hétu-Arbour R, Bouali S, Heinonen KM (2021a) Experimental Competitive Bone Marrow Transplant Assays. *Leukemia Stem Cells: Methods and Protocols*, Cobaleda C & Sánchez-García I (Édit.) Springer US, New York, NY 10.1007/978-1-0716-0810-4_12. p 195-214.
- Hétu-Arbour R, Tlili M, Bandeira Ferreira FL, Abidin BM, Kwarteng EO, Heinonen KM (2021b) Cell-intrinsic Wnt4 promotes hematopoietic stem and progenitor cell self-renewal. *STEM CELLS* n/a(n/a).
- Hock H, Hamblen MJ, Rooke HM, Schindler JW, Saleque S, Fujiwara Y, Orkin SH (2004) Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. *Nature* 431(7011):1002-1007.
- Hu Y, Chen Y, Douglas L, Li S (2009) β -Catenin is essential for survival of leukemic stem cells insensitive to kinase inhibition in mice with BCR-ABL-induced chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 23(1):109-116.

- Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH (1951) Recovery from Radiation Injury. *Science (New York, N. Y.)* 113(2940):510.
- Jenny A, Reynolds-Kenneally J, Das G, Burnett M, Mlodzik M (2005) Diego and Prickle regulate Frizzled planar cell polarity signalling by competing for Dishevelled binding. *Nature cell biology* 7(7):691-697.
- Jessen JR & Solnica-Krezel L (2004) Identification and developmental expression pattern of van gogh-like 1, a second zebrafish strabismus homologue. *Gene Expression Patterns* 4(3):339-344.
- Johnson C, Belluschi S, Laurenti E (2020) Beyond “to divide or not to divide”: Kinetics matters in hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* 92:1-10.e12.
- Johnson GR & Moore MAS (1975) Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature* 258(5537):726-728.
- Kabiri Z, Numata A, Kawasaki A, Edison, Tenen DG, Virshup DM (2015) Wnts are dispensable for differentiation and self-renewal of adult murine hematopoietic stem cells. *Blood* 126(9):1086-1094.
- Kaucká M, Plevová K, Pavlová Š, Janovská P, Mishra A, Verner J, Procházková J, Krejčí P, Kotašková J, Ovesná P, Tichý B, Brychtová Y, Doubek M, Kozubík A, Mayer J, Pospíšilová Š, Bryja V (2013) The Planar Cell Polarity Pathway Drives Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia by the Regulation of B-Lymphocyte Migration. *Cancer Research* 73(5):1491.
- Kaushansky K (1997) Thrombopoietin: The Primary Regulator of Platelet Production. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 8(2):45-50.
- Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ (1986) Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood* 68(3):770-773.
- Kibar Z, Salem S, Bosoi CM, Pauwels E, De Marco P, Merello E, Bassuk AG, Capra V, Gros P (2011) Contribution of VANGL2 mutations to isolated neural tube defects. *Clinical genetics* 80(1):76-82.
- Kibar Z, Vogan KJ, Groulx N, Justice MJ, Underhill DA, Gros P (2001) Ltap, a mammalian homolog of Drosophila Strabismus/Van Gogh, is altered in the mouse neural tube mutant Loop-tail. *Nature Genetics* 28(3):251-255.
- Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ (2005) SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell* 121(7):1109-1121.
- Klingensmith J & Nusse R (1994) Signaling by wingless in Drosophila. *Developmental Biology* 166(2):396-414.
- Kockel L, Homsy JG, Bohmann D (2001) Drosophila AP-1: lessons from an invertebrate. *Oncogene* 20(19):2347-2364.
- Kushida T, Inaba M, Hisha H, Ichioka N, Esumi T, Ogawa R, Iida H, Ikehara S (2001) Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood* 97(10):3292-3299.
- Kwarteng EO & Heinonen KM (2016) Competitive Transplants to Evaluate Hematopoietic Stem Cell Fitness. *Journal of visualized experiments : JoVE* 10.3791/54345(114):54345.

- Kwarteng EO, Héту-Arbour R, Heinonen KM (2018) Frontline Science: Wnt/ β -catenin pathway promotes early engraftment of fetal hematopoietic stem/progenitor cells. *Journal of Leukocyte Biology* 103(3):381-393.
- Lacombe J, Herblot S, Rojas-Sutterlin S, Haman A, Barakat S, Iscove NN, Sauvageau G, Hoang T (2010) Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood* 115(4):792-803.
- Laurenti E, Frelin C, Xie S, Ferrari R, Dunant Cyrille F, Zandi S, Neumann A, Plumb I, Doulatov S, Chen J, April C, Fan J-B, Iscove N, Dick John E (2015) CDK6 Levels Regulate Quiescence Exit in Human Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 16(3):302-313.
- Laurenti E & Göttgens B (2018) From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553(7689):418-426.
- Le Grand F, Jones AE, Seale V, Scimè A, Rudnicki MA (2009) Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell* 4(6):535-547.
- Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn J-Y, Carabasi MH, Gale RP, Giralt S, Hale GA, Ilhan O, McCarthy PL, Socie G, Verdonck LF, Weisdorf DJ, Horowitz MM (2002) Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 100(2):406-414.
- Lento W, Ito T, Zhao C, Harris JR, Huang W, Jiang C, Owzar K, Piryani S, Racioppi L, Chao N, Reya T (2014) Loss of β -catenin triggers oxidative stress and impairs hematopoietic regeneration. *Genes & development* 28(9):995-1004.
- Lhoumeau A-C, Arcangeli M-L, De Grandis M, Giordano M, Orsoni J-C, Lembo F, Bardin F, Marchetto S, Aurrand-Lions M, Borg J-P (2016) Ptk7-Deficient Mice Have Decreased Hematopoietic Stem Cell Pools as a Result of Deregulated Proliferation and Migration. *The Journal of Immunology* 196(10):4367.
- Li HW & Sykes M (2012) Emerging concepts in haematopoietic cell transplantation. *Nature Reviews Immunology* 12(6):403-416.
- Li J (2011) Quiescence regulators for hematopoietic stem cell. *Experimental Hematology* 39(5):511-520.
- Li Q, Hisha H, Yasumizu R, Fan TX, Yang GX, Li Q, Cui YZ, Wang XL, Song CY, Okazaki S, Mizokami T, Cui WH, Guo K, Li M, Feng W, Katou J, Ikehara S (2007) Analyses of very early hemopoietic regeneration after bone marrow transplantation: comparison of intravenous and intrabone marrow routes. *Stem Cells* 25(5):1186-1194.
- Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Liu Y, Huang G, Di Giandomenico S, Lee JM, Deblasio A, Menendez S, Antipin J, Reva B, Koff A, Nimer SD (2009) p53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence. *Cell Stem Cell* 4(1):37-48.
- Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E (1951) Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *Journal of the National Cancer Institute* 12(1):197-201.
- Luis TC, Ichii M, Brugman MH, Kincade P, Staal FJT (2012) Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development. *Leukemia* 26(3):414-421.
- Luis Tiago C, Naber Brigitta AE, Roozen Paul PC, Brugman Martijn H, de Haas Edwin FE, Ghazvini M, Fibbe Willem E, van Dongen Jacques JM, Fodde R, Staal Frank JT (2011)

- Canonical Wnt Signaling Regulates Hematopoiesis in a Dosage-Dependent Fashion. *Cell Stem Cell* 9(4):345-356.
- Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC (2010) γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24(4):679-686.
- Majeti R, Park CY, Weissman IL (2007) Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell stem cell* 1(6):635-645.
- Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, Beatty PG, Doney K, McDonald GB, Sanders JE (1990) A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment.
- Maximow AA (1909) Der lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im post Fetalen heben der Säugetiere. *Folia haematologica (Leipzig)* 8:125–134.
- Mayle A, Luo M, Jeong M, Goodell MA (2013) Flow cytometry analysis of murine hematopoietic stem cells. *Cytometry Part A* 83A(1):27-37.
- Mazurier F, Doedens M, Gan OI, Dick JE (2003) Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med* 9(7):959-963.
- McNiece IK, Bertoncello I, Kriegler AB, Quesenberry PJ (1990) Colony-forming cells with high proliferative potential (HPP-CFC). *The International Journal of Cell Cloning* 8(3):146-160.
- Medvinsky A & Dzierzak E (1996) Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region. *Cell* 86(6):897-906.
- Mendelson A & Frenette PS (2014) Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nature Medicine* 20(8):833-846.
- Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466(7308):829-834.
- Metcalfe DD (2008) Mast cells and mastocytosis. *Blood* 112(4):946-956.
- Mirantes C, Passequé E, Pietras EM (2014) Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Experimental cell research* 329(2):248-254.
- Mizukawa B, O'Brien E, Moreira DC, Wunderlich M, Hochstetler CL, Duan X, Liu W, Orr E, Grimes HL, Mulloy JC, Zheng Y (2017) The cell polarity determinant CDC42 controls division symmetry to block leukemia cell differentiation. *Blood* 130(11):1336-1346.
- Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW (2003) Identification of *Vangl2* and *Scrb1* as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423(6936):173-177.
- Montcouquiol M, Sans N, Huss D, Kach J, Dickman JD, Forge A, Rachel RA, Copeland NG, Jenkins NA, Bogani D, Murdoch J, Warchol ME, Wenthold RJ, Kelley MW (2006) Asymmetric Localization of *Vangl2* and *Fz3* Indicate Novel Mechanisms for Planar Cell Polarity in Mammals. *The Journal of Neuroscience* 26(19):5265.

- Mooney CJ, Cunningham A, Tsapogas P, Toellner K-M, Brown G (2017) Selective Expression of Flt3 within the Mouse Hematopoietic Stem Cell Compartment. *International journal of molecular sciences* 18(5):1037.
- Morcos MNF, Schoedel KB, Hoppe A, Behrendt R, Basak O, Clevers HC, Roers A, Gerbault A (2017) SCA-1 Expression Level Identifies Quiescent Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cell Reports* 8(6):1472-1478.
- Morrison SJ & Scadden DT (2014) The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505(7483):327-334.
- Morton D.B. AD, Barclay R., Close B.S., Ewbank R., Gask D., Heath M., Mattic S., Poole T., Seamer & J. SJ, Thompson A., Trussell B., West C. et Jennings M. (1993) Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFWA Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim* 27(1):1-22.
- Murdoch JN, Doudney K, Paternotte C, Copp AJ, Stanier P (2001) Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of *Lpp1*, a novel gene involved in floor plate specification. *Human Molecular Genetics* 10(22):2593-2601.
- Murdoch JN, Henderson DJ, Doudney K, Gaston-Massuet C, Phillips HM, Paternotte C, Arkell R, Stanier P, Copp AJ (2003) Disruption of scribble (*Scrb1*) causes severe neural tube defects in the circletail mouse. *Human Molecular Genetics* 12(2):87-98.
- Nakada D, Oguro H, Levi BP, Ryan N, Kitano A, Saitoh Y, Takeichi M, Wendt GR, Morrison SJ (2014) Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy. *Nature* 505(7484):555-558.
- Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ (2009) Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460(7252):259-263.
- Nemeth MJ, Topol L, Anderson SM, Yang Y, Bodine DM (2007) *Wnt5a* inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(39):15436.
- Nusse R & Varmus HE (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31(1):99-109.
- Ogawa M, Nishikawa S, Yoshinaga K, Hayashi S, Kunisada T, Nakao J, Kina T, Sudo T, Kodama H, Nishikawa S (1993) Expression and function of c-Kit in fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. *Development* 117(3):1089.
- Oguro H, Iwama A, Morita Y, Kamijo T, van Lohuizen M, Nakauchi H (2006) Differential impact of *Ink4a* and *Arf* on hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment in *Bmi1*-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* 203(10):2247-2253.
- Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T (1992) In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* 80(12):3044-3050.
- Orford KW & Scadden DT (2008) Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nature Reviews Genetics* 9(2):115-128.
- Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C (2004) Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *STEM CELLS* 22(3):377-384.

- Ottersbach K & Dzierzak E (2005) The Murine Placenta Contains Hematopoietic Stem Cells within the Vascular Labyrinth Region. *Developmental Cell* 8(3):377-387.
- Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP, Kuby J (2013) *Kuby immunology*. W.H. Freeman, New York
- Pietras EM, Reynaud D, Kang Y-A, Carlin D, Calero-Nieto FJ, Leavitt AD, Stuart JM, Göttgens B, Passegué E (2015) Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* 17(1):35-46.
- Pietras EM, Warr MR, Passegué E (2011) Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *Journal of Cell Biology* 195(5):709-720.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science (New York, N.Y.)* 284(5411):143.
- Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Månsson R, Thoren LA, Ekblom M, Alexander WS, Jacobsen SEW (2007) Critical Role of Thrombopoietin in Maintaining Adult Quiescent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 1(6):671-684.
- Renström J, Istvanffy R, Gauthier K, Shimono A, Mages J, Jardon-Alvarez A, Kröger M, Schiemann M, Busch DH, Esposito I, Lang R, Peschel C, Oostendorp RAJ (2009) Secreted Frizzled-Related Protein 1 Extrinsically Regulates Cycling Activity and Maintenance of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 5(2):157-167.
- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R (1987) The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50(4):649-657.
- Robin C, Bollerot K, Mendes S, Haak E, Crisan M, Cerisoli F, Lauw I, Kaimakis P, Jorna R, Vermeulen M, Kayser M, van der Linden R, Imanirad P, Verstegen M, Nawaz-Yousaf H, Papazian N, Steegers E, Cupedo T, Dzierzak E (2009) Human Placenta Is a Potent Hematopoietic Niche Containing Hematopoietic Stem and Progenitor Cells throughout Development. *Cell Stem Cell* 5(4):385-395.
- Rossi L, Lin KK, Boles NC, Yang L, King KY, Jeong M, Mayle A, Goodell MA (2012) Less is more: unveiling the functional core of hematopoietic stem cells through knockout mice. *Cell stem cell* 11(3):302-317.
- Rundberg Nilsson A, Bryder D, Pronk CJ (2013) Frequency determination of rare populations by flow cytometry: a hematopoietic stem cell perspective. *Cytometry A* 83(8):721-727.
- Sabin FR (1920) Studies on the origin of blood-vessels and of red blood-corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Contributions to embryology*. IX:213-262.
- Santaguida M, Schepers K, King B, Sabnis AJ, Forsberg EC, Attema JL, Braun BS, Passegué E (2009) JunB protects against myeloid malignancies by limiting hematopoietic stem cell proliferation and differentiation without affecting self-renewal. *Cancer Cell* 15(4):341-352.
- Schaniel C, Sirabella D, Qiu J, Niu X, Lemischka IR, Moore KA (2011) Wnt-inhibitory factor 1 dysregulation of the bone marrow niche exhausts hematopoietic stem cells. *Blood* 118(9):2420-2429.

- Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, Taketo MM, Birchmeier W, Tenen DG, Leutz A (2006) Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive β -catenin activation. *Nature Immunology* 7(10):1037-1047.
- Seifert JRK & Mlodzik M (2007) Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nature Reviews Genetics* 8(2):126-138.
- Shao L, Luo Y, Zhou D (2014) Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation. *Antioxidants & redox signaling* 20(9):1447-1462.
- Sharma RP (1973) Wingless a new mutant in *Drosophila melanogaster*. *Drosophila information service* 50:134-134.
- Sharma RP & Chopra VL (1976) Effect of the wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 48(2):461-465.
- Shen FW, Saga Y, Litman G, Freeman G, Tung JS, Cantor H, Boyse EA (1985) Cloning of Ly-5 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(21):7360-7363.
- Siclari VA, Zhu J, Akiyama K, Liu F, Zhang X, Chandra A, Nah H-D, Shi S, Qin L (2013) Mesenchymal progenitors residing close to the bone surface are functionally distinct from those in the central bone marrow. *Bone* 53(2):575-586.
- Staal FJT, Luis TC, Tiemessen MM (2008) WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nature Reviews Immunology* 8:581.
- Strong LC & Hollander WF (1949) HEREDITARY LOOP-TAIL IN THE HOUSE MOUSE: Accompanied by Imperforate Vagina and with Lethal Craniorachischisis When Homozygous. *Journal of Heredity* 40(12):329-334.
- Sugimura R, He XC, Venkatraman A, Arai F, Box A, Semerad C, Haug JS, Peng L, Zhong X-B, Suda T, Li L (2012) Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell* 150(2):351-365.
- Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T (2006) Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* 25(6):977-988.
- Szade K, Bukowska-Strakova K, Zukowska M, Jozkowicz A, Dulak J (2016) Analysis of Cell Cycle Status of Murine Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Heterogeneity: Methods and Protocols*, Turksen K (Édit.) Springer New York, New York, NY 10.1007/7651_2016_361. p 91-99.
- Szilvassy SJ, Humphries RK, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ (1990) Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(22):8736.
- Till JE & McCulloch EA (1961) A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* 14(2):213-222.
- Ting SB, Deneault E, Hope K, Cellot S, Chagraoui J, Mayotte N, Dorn JF, Laverdure J-P, Harvey M, Hawkins ED, Russell SM, Maddox PS, Iscove NN, Sauvageau G (2012) Asymmetric segregation and self-renewal of hematopoietic stem and progenitor cells with endocytic Ap2a2. *Blood* 119(11):2510-2522.
- Torban E, Patenaude A-M, Leclerc S, Rakowiecki S, Gauthier S, Andelfinger G, Epstein DJ, Gros P (2008) Genetic interaction between members of the Vangl family causes neural tube defects in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(9):3449-3454.

- van Amerongen R & Nusse R (2009) Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136(19):3205.
- van Os R, Ausema A, Dontje B, van Riezen M, van Dam G, de Haan G (2010) Engraftment of syngeneic bone marrow is not more efficient after intrafemoral transplantation than after traditional intravenous administration. *Exp Hematol* 38(11):1115-1123.
- Vinson CR & Adler PN (1987) Directional non-cell autonomy and the transmission of polarity information by the frizzled gene of *Drosophila*. *Nature* 329(6139):549-551.
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle & Nerve* 18(12):1417-1426.
- Wallingford JB, Fraser SE, Harland RM (2002) Convergent Extension: The Molecular Control of Polarized Cell Movement during Embryonic Development. *Developmental Cell* 2(6):695-706.
- Wallingford JB, Rowning BA, Vogeli KM, Rothbacher U, Fraser SE, Harland RM (2000) Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* 405(6782):81-85.
- Wang J, Kimura T, Asada R, Harada S, Yokota S, Kawamoto Y, Fujimura Y, Tsuji T, Ikehara S, Sonoda Y (2003) SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34-cells assured by intra-bone marrow injection. *Blood* 101(8):2924-2931.
- Wang Y, Guo N, Nathans J (2006) The Role of Frizzled3 and Frizzled6 in Neural Tube Closure and in the Planar Polarity of Inner-Ear Sensory Hair Cells. *The Journal of Neuroscience* 26(8):2147.
- Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, MacDonald HR, Trumpp A (2008) Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell* 135(6):1118-1129.
- Winter CG, Wang B, Ballew A, Royou A, Karess R, Axelrod JD, Luo L (2001) *Drosophila* Rho-Associated Kinase (Drok) Links Frizzled-Mediated Planar Cell Polarity Signaling to the Actin Cytoskeleton. *Cell* 105(1):81-91.
- Wu M, Kwon HY, Rattis F, Blum J, Zhao C, Ashkenazi R, Jackson Trachette L, Gaiano N, Oliver T, Reya T (2007) Imaging Hematopoietic Precursor Division in Real Time. *Cell Stem Cell* 1(5):541-554.
- Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo Makoto M, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H (2011) Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche. *Cell* 147(5):1146-1158.
- Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S-i, Morita Y, Eto K, Ema H, Nakauchi H (2006) Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *The EMBO Journal* 25(15):3515-3523.
- Yang C-h, Axelrod JD, Simon MA (2002) Regulation of Frizzled by Fat-like Cadherins during Planar Polarity Signaling in the *Drosophila* Compound Eye. *Cell* 108(5):675-688.
- Yang X, Chen D, Long H, Zhu B (2020) The mechanisms of pathological extramedullary hematopoiesis in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 10.1007/s00018-020-03450-w.
- Zeidler MP, Perrimon N, Strutt DI (1999) Polarity determination in the *Drosophila* eye: a novel role for unpaired and JAK/STAT signaling. *Genes & development* 13(10):1342-1353.

- Zhan T, Rindtorff N, Boutros M (2017) Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36(11):1461-1473.
- Zhao C, Blum J, Chen A, Kwon HY, Jung SH, Cook JM, Lagoo A, Reya T (2007) Loss of β -Catenin Impairs the Renewal of Normal and CML Stem Cells In Vivo. *Cancer cell* 12(6):528-541.
- Zhao M, Perry JM, Marshall H, Venkatraman A, Qian P, He XC, Ahamed J, Li L (2014) Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nature Medicine* 20(11):1321-1326.
- Zhou Bo O, Yue R, Murphy Malea M, Peyer JG, Morrison Sean J (2014) Leptin-Receptor-Expressing Mesenchymal Stromal Cells Represent the Main Source of Bone Formed by Adult Bone Marrow. *Cell Stem Cell* 15(2):154-168.
- Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, Wang J, Joe GJ, Hexner E, Choi Y, Taichman RS, Emerson SG (2007) Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* 109(9):3706-3712.
- Zou Y-R, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393(6685):595-599.