

Plasticité insoupçonnée des progéniteurs érythrocytaires

La vision que nous pouvons avoir d'un phénomène biologique dépend largement des outils dont nous disposons pour l'aborder, et, parmi ceux-ci, les modèles d'étude sont clairement déterminants. Ceux qui abordent l'étude de l'hématopoïèse et des différentes voies de différenciation sont trop nombreux pour être répertoriés dans le cadre de cette revue. On peut néanmoins les regrouper en deux catégories : (1) les modèles *in vivo*, et notamment toutes les souris *knock-out* (KO) créées ces derniers temps, qui fournissent des informations précieuses [1]. Cependant, leur étude fine peut se révéler difficile du fait de l'extrême complexité des interactions à l'œuvre chez un animal entier, de la redondance, parfois révélée par le KO lui-même [2], ainsi que d'éventuels phénotypes embryonnaires létaux ; (2) les modèles *ex vivo*, dont il existe essentiellement deux types : (a) des lignées cellulaires, cet état même de lignée signifiant clairement que le patrimoine génétique des cellules a été altéré, ce qui amène donc à mettre en doute leur pertinence, notamment lors de l'analyse fine des mécanismes de régulation de la croissance ; (b) des cellules primaires présentant deux inconvénients majeurs : l'un est la faible quantité de cellules généralement disponible, et l'autre la différenciation qui accompagne la prolifération de ces cellules de manière indissociable. Cette dernière caractéristique a conduit à une conception selon laquelle seules les véritables cellules souches sont capables d'autorenouvellement, ce terme désignant la capacité de proliférer sans signe évident de différenciation. L'ensemble des résultats de notre groupe ainsi que d'autres équipes à travers le monde tend à

remettre en cause cette notion. Nous proposons que l'autorenouvellement est bel et bien une propriété que des progéniteurs engagés dans une voie de différenciation peuvent partager avec les cellules souches.

Nous sommes arrivés à cette conclusion en tentant de développer un modèle cellulaire idéal d'étude de la différenciation érythrocytaire satisfaisant aux critères suivants :

1. prélever initialement sur l'animal des cellules normales n'ayant subi aucune modification de leur patrimoine génétique ;
2. permettre de maintenir des progéniteurs, les plus immatures possibles, en état de prolifération et pouvoir, à volonté, faire basculer ces cellules dans un état de différenciation le plus complet possible ;
3. être d'une utilisation aisée autorisant des approches de biologie moléculaire et de biochimie traditionnelles, et son implantation dans d'autres laboratoires.

Le premier pas vers un tel modèle a été franchi par l'identification du TGF- α comme facteur de croissance susceptible d'induire l'autorenouvellement des progéniteurs érythrocytaires de poulet [3]. Ce modèle, qui satisfaisait aux critères 1 et 2 énoncés ci-dessus, présentait néanmoins des difficultés d'utilisation pratiques l'éloignant d'un modèle idéal. Le laboratoire dirigé par Hartmut Beug (IMP, Vienne, Autriche) a alors décrit de nouvelles cytokines capables, lorsqu'elles sont associées, d'induire la prolifération de progéniteurs immatures dans un milieu liquide. Ces molécules comprenaient le *stem cell factor* (SCF) aviaire, les œstrogènes et les glucocorticoïdes [4-6]. Les différentes combinaisons de cytokines permettant une prolifération des progéniteurs érythrocytaires

sont représentées sur la *figure 1*. Elles présentaient cependant plusieurs désavantages parmi lesquels l'impossibilité de cultiver des progéniteurs à partir des étapes les plus précoces du développement embryonnaire.

Nous avons alors testé l'association TGF- α et TGF- β dans des cultures liquides de cellules de moelle d'embryon de poulet. Cette combinaison s'est révélée induire l'autorenouvellement de cellules que nous avons appelées T2EC (pour TGF- α /TGF- β -induced erythrocytic cells) [7], qui sont des progéniteurs érythrocytaires extrêmement immatures et dont on peut induire la différenciation jusqu'au stade d'érythrocytes mûrs.

L'intérêt de ce système est qu'il conserve les avantages des systèmes précédents tout en n'en présentant plus les inconvénients : ces cellules peuvent être obtenues à partir d'embryon de poulet de 48 heures ; elles se sont révélées bien plus immatures que les précédentes, ce qui leur donne une capacité proliférative considérable et autorise un accès expérimental aux étapes les plus précoces de l'érythropoïèse. Nous n'avons pas pu obtenir la moindre évidence que ces cellules puissent donner naissance à un autre lignage hématopoïétique qu'érythropoïétique. Il s'agit donc bien de cellules ayant fait de manière homogène le choix (*commitment*) de l'érythropoïèse.

Ces cellules présentent de plus l'intéressante caractéristique de développer une boucle de réponse autocrine au TGF- β après environ une semaine de culture en présence de TGF- β exogène. Cette sécrétion autocrine de TGF- β est nécessaire et suffisante à la prolifération de ces cellules et démontre qu'une boucle autocrine

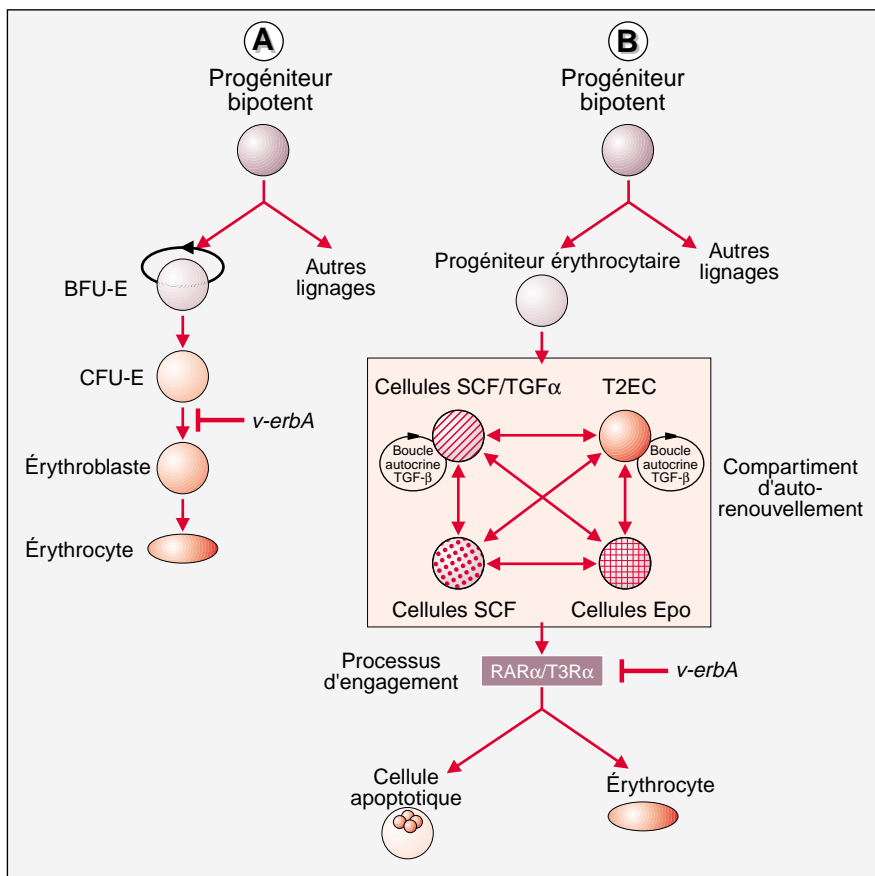


Figure 1. Deux représentations possibles de la séquence de différenciation érythrocytaire. À gauche est figurée la représentation traditionnelle (A). À droite (B), une représentation intégrant, sous l'appellation « hypothèse de l'identité floue », les différents résultats relatifs à l'existence de progéniteurs érythrocytaires. Dans le cadre de l'hypothèse traditionnelle, la différenciation progresse séquentiellement par palier, avec en amont des progéniteurs peu différenciés mais capables d'une prolifération importante, et qui, au fur et à mesure qu'ils se différencient, perdent progressivement leur capacité de se diviser. Dans le cadre de « l'hypothèse de l'identité floue », les progéniteurs, après avoir définitivement choisi d'acquiescer une identité érythrocytaire, forment un compartiment dans lequel ils vont être capables de s'autorenouveler en présence de combinaisons variées de facteurs. Chaque combinaison induirait l'autorenouvellement d'une population de progéniteurs présentant des caractères antigéniques propres. Les combinaisons suivantes sont représentées : SCF + TGF- α + estradiol + dexaméthasone (SCF/TGF- α cells [4, 15]); TGF- α +TGF- β + dexaméthasone (T2Ecs [7]); SCF (SCF cells [6]); Epo + SCF + dexaméthasone (cellules Epo [14, 16]). Il est possible de classer les différentes populations dans un ordre de maturité croissante : TEC \rightarrow SCF/TGF- α \rightarrow SCF \rightarrow Epo. Dans ce cadre, la cellule en état d'autorenouvellement sait qu'elle représente un progéniteur érythrocytaire (identité) mais est néanmoins capable de moduler son phénotype pour s'adapter à des conditions différentes (floue). Un tel modèle tente de rendre compte de la plasticité observée au niveau cellulaire mais reste bien évidemment à confirmer au niveau moléculaire (le programme génétique des progéniteurs est-il modulable ? Ou bien les variations observées s'expliquent-elles uniquement, par exemple, par des vitesses de croissance différentes suivant les combinaisons de facteurs ?).

peut être mise en place dans une cellule normale, sans induire le phénomène de transformation. Nous avons alors exploré la possibilité qu'une telle boucle autocrine ait existé dans les modèles précédents et nous avons effectivement pu observer que l'ajout du TGF- β inhibait fortement la prolifération des TEC en milieu semi-solide, ainsi que celle des cellules proliférant en milieu liquide en présence d'une combinaison de SCF et de TGF- α . Cela illustre la difficulté rencontrée si l'on veut définir tous les facteurs nécessaires à la conservation d'une cellule dans un état prolifératif, en dehors même des activités apportées par le sérum.

Le caractère normal de ces cellules peut être déduit d'un ensemble de propriétés qui les distinguent des cellules transformées utilisées dans d'autres études : (a) ces cellules présentent une durée de vie finie en culture correspondant à la limite de Hayflick (qui a démontré que les cellules normales avaient une capacité de division limitée) ; (b) elles restent strictement dépendantes de l'ajout dans le milieu extérieur de TGF- α et de glucocorticoïdes ; (c) le génome de ces cellules n'a pas été altéré expérimentalement et la cinétique d'apparition de ces cellules est incompatible avec l'activation spontanée d'un proto-oncogène ; (d) enfin, on peut induire la différenciation de ces cellules en les exposant aux facteurs physiologiques apportés par le sérum de poulet anémié. Parce qu'elles sont normales, ces cellules permettront l'étude des mécanismes de mission du signal en réponse à des cytokines, du contrôle de la prolifération, des événements conduisant à la différenciation des progéniteurs érythrocytaires ou des altérations biochimiques induites par l'expression d'un oncogène donné. Les informations apportées par ce système *ex vivo* devraient, de ce fait, se révéler plus pertinentes vis-à-vis de situations physiologiques que celles apportées par d'autres modèles reposant sur des cellules ayant subi des altérations oncogéniques.

L'ensemble de ces résultats nous oblige à repenser un modèle de la différenciation érythrocytaire tenant

compte de l'extrême plasticité dont les progéniteurs semblent capables pour proliférer dans diverses conditions. En effet, nous disposons à l'heure actuelle de quatre combinaisons de cytokines capables d'induire l'autorenouvellement des progéniteurs érythrocytaires (figure 1), chacune entraînant l'autorenouvellement de progéniteurs à des niveaux de maturité différents, les plus immatures étant observés sous l'influence conjointe du TGF- α et du TGF- β . Des résultats préliminaires semblent indiquer que ces différentes populations sont en fait relativement proches et que la seule modification de la combinaison de facteurs à laquelle elles sont soumises permet de passer d'un stade de maturité à un autre. On observe alors un certain nombre de modifications, notamment des variations dans l'expression d'antigènes de surface, caractéristiques d'étapes de la séquence de différenciation érythrocytaire [8]. Cela ne signifie nullement que chaque population dérive d'une autre de manière ordonnée. Nous avons notamment montré que l'on pouvait produire directement des T2EC à partir de cellules Epo (voir figure 1, « hypothèse de l'identité floue »).

La sortie de ce compartiment se ferait sous l'influence des petites molécules lipophiles (L-T3 ou RA) agissant via leurs récepteurs nucléaires respectifs (T3R α et RAR α) et conduirait soit à l'apoptose, soit à la différenciation terminale selon que les facteurs inducteurs de la différenciation, Epo et insuline, sont absents ou présents dans le milieu extérieur. Cette sortie du compartiment d'autorenouvellement deviendrait impossible en présence de l'oncogène *v-erbA* [7].

Une telle plasticité des progéniteurs érythrocytaires évoque un ensemble de résultats récents qui démontrent que l'on a très probablement largement sous-estimé la plasticité du génome, soit en tant que noyau isolé [10], soit au sein de son contexte cytoplasmique [11, 12]. Le dogme selon lequel la différenciation de la cellule souche en un progéniteur engagé dans une voie donnée de différenciation serait un processus irréversible semble pour le moins ébranlé par toutes ces observations.

L'existence d'un *pool* de progéniteurs plastiques dans leur réponse proliférative et différenciatrice pourrait satisfaire à la nécessité d'une grande souplesse à l'échelle de l'organisme entier pour répondre par exemple aux situations d'urgences. En effet, dans de telles situations, de grandes quantités de cellules mûres, dépassant celles prévues par l'homéostasie générale, sont requises rapidement pour assurer la survie de l'organisme [13].

Il n'existe pas à ce jour, chez les mammifères, de modèle équivalent aux cellules T2EC décrites chez le poulet. Des résultats récents semblent cependant ouvrir la voie au développement d'un tel modèle chez l'homme: une combinaison de SCF, érythropoïétine et dexaméthasone induit en effet la prolifération prolongée (jusqu'à 20 divisions) de pro-érythroblastes humains [14]. Une telle capacité d'autorenouvellement, initialement restreinte à des progéniteurs érythrocytaires de poulet, pourrait donc être partagée par un nombre croissant de progéniteurs, appartenant à d'autres espèces, voire concerner d'autres lignages cellulaires.

1. Jordan CT, Van Zant G. Recent progress in identifying genes regulating hematopoietic stem cell function and fate. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 716-20.
2. Taneja R, Roy B, Plassat JL, et al. Cell-type and promoter-context dependent retinoic acid receptor (RAR) redundancies for RAR β 2 and Hoxa-1 activation in F9 and P19 cells can be artifactually generated by gene knockouts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6197-202.
3. Pain B, Woods CM, Saez J, et al. EGFR as a hemopoietic growth factor receptor: the c-erbB product is present in normal chicken erythrocytic progenitor cells and controls their self-renewal. *Cell* 1991; 65: 37-46.
4. Wessely O, Deiner EM, Beug H, von Lindern M. The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *EMBO J* 1997a; 16: 267-80.
5. Steinlein P, Wessely O, Meyer S, Deiner EM, Hayman MJ, Beug H. Primary, self-renewing erythroid progenitors develop through activation of both tyrosine kinase and steroid hormone receptors. *Curr Biol* 1995; 5: 191-204.
6. Hayman MJ, Meyer S, Martin F, Steinlein P, Beug H. Self-renewal and differentiation of normal avian erythroid progenitor cells: regulatory roles of the TGF α /c-erbB and SCF/c-kit receptors. *Cell* 1993; 74: 157-69.

7. Gandrillon O, Schmidt U, Beug H, Samarut J. TGF β cooperates with TGF α to induce the self-renewal of normal erythrocytic progenitors: evidence for an autocrine mechanism. *EMBO J* 1999; 18: 2764-81.
8. Frampton J, McNagny K, Sieweke M, Philip A, Smith G, Graf T. v-Myb DNA binding is required to block thrombocytic differentiation of Myb-Ets-transformed multipotent haematopoietic progenitors. *EMBO J* 1995; 14: 2866-75.
9. Gandrillon O, Ferrand N, Michaille JJ, Roze L, Zile, MH, Samarut J. c-erbA/T3R α and RARs control commitment of hematopoietic self-renewing progenitor cells to apoptosis or differentiation and are antagonized by the v-erbA oncogene. *Oncogene* 1994; 9: 749-58.
10. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmot I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380: 64-6.
11. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-30.
12. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 1999; 283: 534-7.
13. Bauer A, Gandrillon O, Samarut J, Beug H. Nuclear receptors in hematopoietic development: cooperation with growth factor receptors in regulation of proliferation and differentiation. In: Zon L, ed *Hematopoiesis: a developmental approach*. New York: Oxford University Press, 1999 (sous presse).
14. Von Lindern M, Zauner W, Mellitzer G, et al. 1999. The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors *in vitro*. *Blood* 1999; 94: 550-9.
15. Wessely O, von Lindern M, Levitzki A, et al. Distinct regulatory roles of the receptor tyrosine kinases c-ErbB and c-Kit in erythroid differentiation and proliferation. *Cell Growth Diff* 1997; 8: 481-93.
16. Wessely O, Bauer A, Quang CT, et al. A novel way to induce erythroid progenitor self renewal: cooperation of c-Kit with the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 1999; 380: 187-202.

Olivier Gandrillon

Centre de génétique moléculaire et cellulaire, UMR Cnrs 5534, Université Claude-Bernard Lyon I, Bâtiment 741, 43, boulevard du 11-Novembre-1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

Anne Mey
Jacques Samarut

Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, UMR 5665 Cnrs/ENS, École normale supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 7, France.