

## **Les cellules souches hématopoïétiques : une population beaucoup plus hétérogène qu'il n'y paraît**

Une série d'expériences publiées par Norman J. Wolf *et al.* (université de Washington, Seattle, USA) dans le numéro de mai 1993 d'*Experimental Hematology* apporte de très intéressantes informations confirmant la hiérarchie des cellules souches dans la moelle osseuse de souris [1].

Le système hématopoïétique peut être présenté comme une pyramide au sommet de laquelle se trouve la population des cellules souches et dont la base est constituée par les cellules sanguines différenciées. Entre ces deux extrêmes se positionne toute une cascade de progéniteurs hématopoïétiques qui, progressivement, se différencient dans les divers lignages hématopoïétiques tout en perdant leurs capacités de prolifération (*m/s* n° 6, vol. 6, p. 569, [2]). La notion de cellules souches est apparue rapidement, partant de la simple évidence que l'hématopoïèse se maintient durant la vie de l'individu, avec un nombre considérable de cellules différenciées produites à chaque instant : nous disposons donc d'une population de cellules pouvant à la fois se différencier dans tous les lignages hématopoïétiques et s'automaintenir, deux propriétés qui servent à définir la cellule souche. La conséquence de cette définition est que lorsqu'une cellule souche est transplantée dans un receveur conditionné, elle doit pouvoir repeupler tous les organes hématopoïétiques, myéloïdes et lymphoïdes, et assurer à l'infini la survie du receveur greffé.

Ce sont les travaux pionniers de Till et McCulloch à l'Ontario Cancer Institute (Toronto, Canada) en 1961 [3] qui semblèrent matérialiser l'existence des cellules souches hématopoïétiques. Il était connu que l'injection de cellules de moelle osseuse à un receveur

syngénique irradié le protège de la mort par déplétion hématopoïétique, ce qui, tout en confortant les caractéristiques fondamentales des cellules souches, ajoutait à leur potentiel celui de la transplantabilité [4]. Till et McCulloch constatèrent que l'injection d'un nombre réduit de cellules de moelle provoquait dans la rate des receveurs irradiés l'apparition en sept à huit jours de nodules hématopoïétiques, nodules fréquemment constitués de plusieurs lignages hématopoïétiques. Il fut démontré ultérieurement que ces colonies spléniques étaient d'origine clonale [5], qu'elles contenaient plusieurs lignages cellulaires [6] et que leur transplantation chez des receveurs secondaires donnait à nouveau des colonies spléniques [7]. Les cellules à l'origine de ces colonies spléniques (et dénommées pour cela *colony forming unit in spleen* ; CFU-S) furent considérées pendant des années comme représentant la cellule souche, unique, multipotente et douée d'auto-renouvellement.

L'utilisation de substances qui détruisent les cellules en phase de synthèse de l'ADN (hydroxyurée, 5-fluorouracile,...) a permis de montrer que la majorité des cellules souches hématopoïétiques sont quiescentes. Le maintien en G0 des cellules souches peut dépendre de la présence dans le micro-environnement de facteurs inhibiteurs [8, 9]. Ainsi, le térapeptide Ac-Ser-Asp-Cys-Pro peut empêcher l'entrée en phase S des CFU-S [10] tout comme la *macrophage inflammatory protein-1a* [11].

Par ailleurs, l'étude de la sensibilité des cellules souches hématopoïétiques à des agents cytotoxiques a apporté la première entorse à la théorie de la population de cellules souches uniques et multipotentes. Rosendaal *et*

*al.* (Cancer Institute, Melbourne, Australia) [12] démontrèrent ainsi que les colonies spléniques obtenues après transplantation de moelle osseuse de souris traitées par l'hydroxyurée sont plus grosses et contiennent un taux de CFU-S plus élevé que celles obtenues à partir de moelle osseuse normale. Cette observation a conduit les auteurs à proposer une structure hiérarchisée de la population des cellules souches hématopoïétiques qui s'ordonneraient selon leur âge relatif, les plus immatures, hors cycle, ayant le plus fort potentiel de prolifération et d'auto-renouvellement (*generation age-hypothesis*).

Ces travaux furent confirmés ultérieurement par Magli *et al.* au *Basel Institut für Immunologie* (Bâle, Suisse) [13] qui démontrèrent que les colonies spléniques observées au 8<sup>e</sup> jour n'étaient plus visibles au 12<sup>e</sup>-13<sup>e</sup> jour alors que pouvaient être observées des colonies spléniques non détectées au 8<sup>e</sup> jour. Il fallait donc conclure à l'existence de deux populations de CFU-S qui furent définies sur la base des critères expérimentaux comme les CFU-S 8j et CFU-S 12j. Cette définition de l'hétérogénéité de la population des cellules souches se trouva confortée par les observations de Ploemacher et Brons à l'université Erasmus (Rotterdam, Pays-Bas) [14] montrant qu'il existe une population de cellules souches pré-CFU-S capables de produire les CFU-S 12j. Enfin la question semblait se compliquer encore quand il fut observé que des retransplantations systématiques de cellules médullaires d'un receveur à l'autre, espacées d'un mois, aboutissaient à la perte progressive des capacités de repeuplement [15], alors que des transferts plus espacés per-

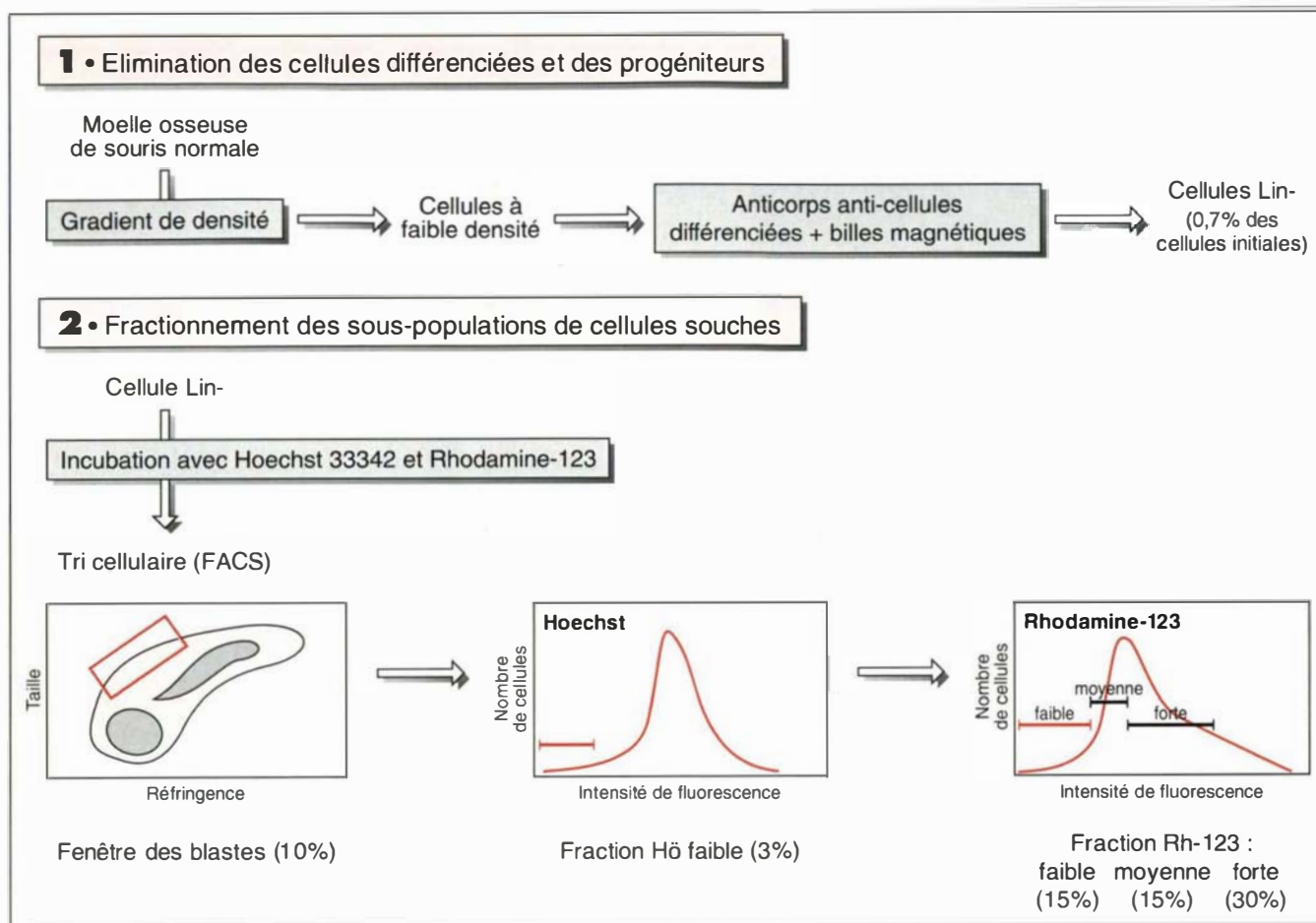


Figure 1. **Schéma du protocole de fractionnement des populations de cellules souches utilisé par Wolf, et al [1].** FACS = fluorescence activated cell sorter.

mettaient le maintien des capacités de repeuplement [16].

Finalement, c'est le manque de définition expérimentale de la cellule souche hématopoïétique qui entretient la confusion. Les auteurs s'accordent maintenant sur le fait que les CFU-S 8j ou 12j ne sont pas les cellules souches les plus immatures. Cependant, nombre d'expérimentateurs utilisent comme critère expérimental, soit le test de reconstitution hématopoïétique à long terme chez des animaux irradiés, soit des essais clonaux révélant des cellules très immatures qui engendrent des colonies hématopoïétiques géantes (HPP-CFC ou *highly proliferative potential-colony forming cell*).

L'obtention d'anticorps monoclonaux

reconnaissant des antigènes portés par les cellules souches et l'identification de colorants vitaux discriminant les cellules selon leur activité cyclique a permis à de nombreux groupes d'isoler, par cytofluorométrie, des fractions cellulaires très enrichies en cellules satisfaisant aux critères choisis des cellules souches. Pour une revue plus exhaustive, le lecteur peut se référer aux articles récents de Spangrude *et al.* (université de Stanford, CA, USA) [17] et Barteleméz *et al.* (Fred Hutchinson Cancer Research, Seattle, USA) [18].

Après avoir éliminé les lymphocytes B et T, les macrophages, les granulocytes et les cellules de la lignée érythroïde à l'aide d'anticorps spécifiques, la purification peut consister en le tri

des cellules exprimant faiblement Thy1 et marquées positivement par un anticorps reconnaissant l'antigène Scf [19]. Vingt de ces cellules, enrichies de surcroît en cellules exprimant le récepteur c-kit du SCF (*stem cell factor*), peuvent repeupler aussi bien les lignages myéloïdes que lymphoïdes B et T des souris irradiées [20].

Une autre possibilité réside dans la marquage des cellules Thy1<sup>low</sup>Lin<sup>-</sup> par le colorant Hoechst 33342 qui se fixe de façon réversible et vitale à l'ADN [21] ou la rhodamine 123 qui reconnaît les membranes mitochondriales [22]. L'expérience a prouvé que la sélection des cellules faiblement marquées par Hoechst 33342 [1] ou par la Rh123 [23] aboutissait à un enrichissement considérable en

cellules capables de restaurer l'hématopoïèse de souris irradiées. Bien évidemment de nombreuses expériences ont été rapportées qui croisent sélection antigénique et sélection tinctoriale, et aboutissent à un enrichissement considérable en cellules souches.

Le grand intérêt de l'étude récente de Wolf *et al.* [1] est d'avoir fractionné la moelle osseuse de souris selon une séquence de ces diverses méthodes et d'avoir alors étudié pour chaque fraction le taux de CFU-S 8j et 12j, de HPP-CFC et de cellules reconstituant l'hématopoïèse à long terme. Pour cela, les cellules de faible densité de la moelle de souris ont été d'abord recueillies sur gradient de densité, puis les cellules différenciées ont été éliminées par un cocktail d'anticorps, et les cellules blastiques sélectionnées par cytofluorométrie en fonction de leur taille et de leur complexité structurale (*forward* et *right angle scatter*) ; enfin, les cellules présentant une faible fluorescence après marquage par Hoechst 33342 (3 % des cellules) sont encore séparées en trois fractions selon l'intensité de la fluorescence après marquage par la rhodamine 123 en cellules faiblement, moyennement et fortement fluorescentes. Les différentes étapes de cet enrichissement sont représentées dans la *figure 1*. L'étude des potentialités de ces trois populations révèle des caractéristiques tout à fait intéressantes. Placées en culture *in vitro* en agar et en présence d'une combinaison d'IL3, IL1, CSF-1 et SCF, les cellules de ces trois fractions forment des colonies de type HPP-CFC de très grande taille avec une efficacité de repiquage ou de clonage de 50 à 100 %, pour les trois populations. Mais, lorsqu'est testée la capacité de ces cellules à former des colonies spléniques en 8 ou 12 jours chez des animaux irradiés, on constate alors que la population des CFU-S 8j disparaît rapidement des fractions les moins marquées par la rhodamine alors que les CFU-S 12j sont bien préservées. Lorsque l'on suit la survie des animaux à 30 jours, 200 des cellules des diverses fractions assurent une survie totale. Lorsqu'on réduit le nombre des cellules injectées apparaît un phé-

nomène très caractéristique et déjà noté par d'autres auteurs : 150 cellules de la population Rh123<sup>high</sup> préservent 70 % des animaux alors qu'aucun receveur de 150 cellules Rh123<sup>low</sup> ne survit. La différence entre les deux populations est donc criante. Comment expliquer ce phénomène ? L'explication fournie est simple : les cellules souches Rh123<sup>low</sup>, particulièrement immatures, ne peuvent assurer la prise de greffe immédiate (contrairement aux cellules souches Rh123<sup>high</sup>), et les animaux meurent de déplétion hématopoïétique ou d'infection dans les jours qui suivent l'irradiation et la greffe. La vérification de cette explication tient dans l'expérience suivante, réalisée par les auteurs en utilisant la technologie mise au point par Szilvassy *et al.* (Terry Fox Laboratories, Vancouver, Canada) [24] : des femelles irradiées reçoivent 20 cellules de la fraction Rh123<sup>low</sup> provenant de donneurs mâles et 3x10<sup>6</sup> cellules médullaires de femelles « altérées ». L'altération consiste à passer chez deux receveurs successifs (secondaires et tertiaires) des cellules de moelle d'un donneur normal, l'intervalle de transfert étant de trois semaines à un mois. Cette opération a pour résultat la perte des cellules souches les plus immatures (qui n'ont pas le temps de rétablir leur nombre normal) et la préservation des progéniteurs les plus mûrs. Ces progéniteurs vont donc assurer dans les premières semaines la survie des animaux greffés, temps nécessaire à l'expression des cellules souches plus primitives, dont la descendance est évaluée par la présence du chromosome Y. Les résultats sont très clairs : 5 à 10 mois après la greffe, aussi bien les cellules de moelle des receveurs que leurs cellules B et T présentent à 100 % le caryotype mâle. Quand la même expérience est réalisée avec les cellules Rh123<sup>high</sup>, le caryotype mâle est faiblement représenté (et dans ce cas, pas dans les trois lignages), voire non détecté.

Ces expériences démontrent donc clairement que la population des cellules souches est hétérogène dans ses paramètres physiques mais surtout dans ses propriétés biologiques. Cer-

taines peuvent assurer une reconstitution rapide après transplantation, d'autres ne le font que tardivement. La filiation des diverses cellules souches avec leurs principales caractéristiques est représentée dans la *figure 2*. La connaissance de la structure pyramidale de la population des cellules souches revêt un caractère fondamental chez l'homme : la manipulation des cellules à greffer ne doit pas aboutir à l'élimination de telle ou telle population au risque de perdre la capacité de ces cellules à assurer la reconstitution précoce et/ou tardive. Ces expériences démontrent également que le progéniteur de type HPP-CFC, dont la population est également hétérogène, est très voisin de, sinon identique à la cellule souche. Cela n'est pas sans intérêt dans la mesure où, pouvant être caractérisé *in vitro*, il peut être étudié facilement.

Cette hiérarchie fonctionnelle peut être déduite d'un autre type d'expériences qui ont apporté, de surcroît, des informations fort surprenantes sur le fonctionnement individuel des cellules souches. Les cellules souches peuvent être infectées, comme beaucoup d'autres cellules, par des rétrovirus défectueux pour la réplication et porteurs d'un marqueur génétique, en l'occurrence le gène bactérien *neo* qui confère la résistance à la néomycine. L'intégration de l'ADN viral (après transcription inverse) se réalise de façon aléatoire dans l'ADN cellulaire : chaque cellule souche infectée sera donc caractérisée par le site d'intégration de l'ADN viral, aisément reconnaissable par la taille des fragments de restriction auxquels le site d'intégration peut donner naissance. Il est donc possible de suivre à la trace les cellules provenant de telle ou telle cellule souche après greffe à un receveur irradié. On a pu ainsi démontrer une expression séquentielle de certains clones ; parfois même, un clone reste dormant chez le receveur primaire mais est détecté chez les receveurs secondaires [25]. Les quatre à six premiers mois qui suivent la greffe sont marqués par une fluctuation dans la prolifération des marqueurs, traduisant la mise en activité et l'arrêt de certaines cellu-





ment par le bas de la population ou d'un mécanisme de rétro-contrôle se mettant en place lorsque se différencient (tardivement) les cellules souches issues de la cellule souche primaire ? La réponse ne peut être donnée pour le moment.

L'autre hypothèse est que toutes les cellules souches d'une population donnée ne sont pas en activité simultanément. Lorsque l'hématopoïèse a retrouvé son niveau d'équilibre, un faible nombre de cellules souches assurent la production hématopoïétique. Faut-il en conclure que la pérennité de la population des cellules souches résulte en fait d'une utilisation minimale de ses capacités de production et que le nombre des cellules souches est largement surdimensionné par rapport aux besoins, ou que cette pérennité est assurée par un auto-renouvellement systématique de la cellule en division, l'une des cellules filles retournant à l'état initial ? Les expériences à venir devraient être très instructives dans ce domaine ■

## Jean-Paul Blanchet

Professeur

## Guy Mouchiroud

Chargé de recherche à l'Inserm

Université Claude-Bernard, Centre de génétique moléculaire et cellulaire, UMR 106, 43 boulevard du 11-Novembre-1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

## RÉFÉRENCES

1. Wolf NS, Kone A, Priestlez GV, Bartelmez SH. *In vivo* and *in vitro* characterization of long term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection. *Exp Hematol* 1993 ; 21 : 614-22.
2. Wendling F, Tambourin P. La superfamille des récepteurs de cytokines et l'oncogène v. mpl. *medecine/sciences* 1991 ; 7 : 569-77.
3. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells. *Rad Res* 1961 ; 14 : 213-22.
4. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DWH, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimacras. *Nature* 1956 ; 177 : 452-4.
5. Wu AM, Till JE, Siminovitch L, McCulloch EA. A cytological study of the capacity for differentiation of normal hematopoietic colony forming cells. *J Cell Physiol* 1967 ; 69 : 177-84.
6. Lewis JP, Trobaugh FC. Hematopoietic stem cells. *Nature* 1964 ; 204 : 589-90.
7. Curry JL, Trentin JJ, Wolf N. Hemopoietic spleen colony studies. II. Erythropoiesis. *J Exp Med* 1967 ; 125 : 703-20.
8. Frindel E, Guigon M. Inhibition of CFU entry into cycle by a bone marrow extract. *Exp Hematol* 1977 ; 5 : 74-6.
9. Lord BI, Mori KJ, Wright EG, Lajtha LG. An inhibitor of stem cell proliferation in normal bone marrow. *Br J Haematol* 1976 ; 34 : 441-3.
10. Lenfant M, Wdieczak-Bakala J, Guitet E, Prome JC, Sotty D, Frindel E. Inhibitor of hematopoietic pluripotent stem cell proliferation : purification and determination of its structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 776-82.
11. Dunlop DJ, Wright EG, Lorimore S, Graham GJ, Holyoake T, Kerr DJ, Wolpe SD, Pragnell IB. Demonstration of stem cell inhibition and myeloprotective effects of SCI/rh MIP-1  $\alpha$  *in vivo*. *Blood* 1992 ; 79 : 2221-5.
12. Rosendaal M, Hodgson GS, Bradley TR. Organization of hematopoietic stem cells : the generation age hypothesis. *Cell Tissue Kinet* 1976 ; 12 : 17-29.
13. Magli MC, Iscove NN, Ordatchenko N. Transient nature of early hematopoietic spleen colonies. *Nature* 1982 ; 295 : 527-9.
14. Ploemacher RE, Brons RHC. Separation of CFU-S from primitive cells responsible for reconstitution of the bone marrow hematopoietic stem cell compartment following irradiation. Evidence for a pre-CFU-S compartment. *Exp Hematol* 1989 ; 17 : 263-6.
15. Hellman S, Botnick LE, Hannon EC, Vigneulle RM. Proliferative capacity of murine hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978 ; 75 : 490-4.
16. Vos O. Multiplication of hematopoietic colony forming units (CFU) in mice after X-irradiation and bone marrow transplantation. *Cell Tissue Kinet* 1972 ; 5 : 341-50.
17. Spangrude GJ, Smith L, Uchida N, Ikuta K, Heimfeld S, Friedman J, Weissman IL. Mouse hematopoietic stem cells. *Blood* 1991 ; 78 : 1395-402.
18. Bartelmez SH, Andrews RG, Bernstein ID. Uncovering the heterogeneity of hematopoietic repopulating cells. *Exp Hematol* 1991 ; 19 : 861-2.
19. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988 ; 241 : 58-62.
20. Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 1502-6.
21. Lalande ME, Ling V, Miller RG. Hoechst 33342 dye uptake as a probe of membrane permeability changes in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 363-67.
22. James TW, Bohman R. Proliferation of mitochondria during the cell cycle of the human cell line (HL-60). *J Cell Biol* 1981 ; 89 : 256-60.
23. Bertoncello I, Hodgson GS, Bradley TS. Multiparameter analysis of transplantable hematopoietic stem cells. I. The separation and enrichment of stem cells homing to marrow and spleen on the basis of rhodamine 123 fluorescence. *Exp Hematol* 1985 ; 13 : 999-1006.
24. Szilvassy SJ, Fraser CC, Eaves CJ, Lansdorp PM, Eaves AC, Humphries RK. Retrovirus-mediated gene transfer to purified hematopoietic stem cells with long-term lympho-myelopoietic repopulating ability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 8798-802.
25. Lemischka IR, Raulot DH, Mulligan RC. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 1986 ; 45 : 917-27.
26. Jordan CT, Lemischka IR. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev* 1990 ; 4 : 220-32.
27. Van Zant G, Eldridge PW, Behringer RR, Dewey MJ. Genetic control of hematopoietic kinetics revealed by analysis of allophenic mice and stem cell suicide. *Cell* 1983 ; 35 : 639-45.
28. Van Zant G, Scott-Micus K, Thompson BP, Fleischman RA, Perkins S. Stem cell quiescence/activation is reversible by serial transplantation and is independent of stromal cell genotype in mouse aggregation chimeras. *Exp Hematol* 1992 ; 20 : 470-5.

## TIRÉS A PART

J.-P. Blanchet.