



m/s n° 1, vol. 11, janvier 95

LES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

Laure Coulombel
William Vainchenker

Ces dernières années ont vu un regain d'intérêt pour les cellules souches hématopoïétiques car deux faits ont bouleversé le domaine des transplantations en hématologie : l'utilisation de nouvelles sources de cellules comme greffon, et le développement de technologies permettant l'enrichissement des greffons en cellules souches hématopoïétiques et leur manipulation *in vitro*. Les deux articles de C. Chabannon et P. Mannoni (p. 17 de ce numéro), et E. Gluckman et E. Carosella (p. 28) discutent l'intérêt de l'utilisation en thérapeutique de ces nouvelles sources de cellules que représentent les cellules du sang périphérique adulte après mobilisation, et le sang de cordon. En effet, une observation inattendue et inexplicquée est que pratiquement toutes les cytokines, et en particulier le G-CSF et le GM-CSF, induisent l'augmentation massive du nombre des progéniteurs circulants et, probablement, des cellules souches reconstituant l'hématopoïèse à long terme. La facilité avec laquelle ces cellules peuvent être isolées en grand nombre a soulevé beaucoup d'enthousiasme, ce d'autant que leur capacité de reconstitution à court et moyen termes en transplantation autologue (pour le sang périphérique) ou allogénique (pour le sang de cordon) est au moins identique à celle des cellules médullaires. Une étape supplémentaire a été franchie avec l'utilisation comme greffon, uniquement en situation autologue jusqu'à présent, de sous-populations rares de ces cellules, notamment de phénotype CD34⁺, démarche stimulée par la généralisation de techniques de

fractionnement « clés en main ». L'association de cette collecte simple et des techniques de purification ouvre donc la porte à la manipulation de ces cellules (amplification de progéniteurs différenciés *in vitro*, transfert génique). Le temps n'est peut-être pas si loin où il sera possible de choisir un greffon « à la carte » ou un produit purement transfusionnel, selon les nécessités thérapeutiques : progéniteurs mûrs pour prévenir l'aplasie immédiate induite par le conditionnement, associés ou non à un petit nombre de cellules souches responsables de la reconstitution à long terme, et à des cellules lymphoïdes ayant une fonction immunologique bénéfique (cellules responsables de la réaction GVI, *graft versus leukemia*, par exemple). Il y a pourtant un paradoxe : l'identification d'un grand nombre de cytokines, de récepteurs de cytokines, de facteurs de transcription et d'autres protéines qui interviennent à une ou plusieurs étapes de la différenciation hématopoïétique contraste avec la difficulté que nous avons à analyser avec précision le potentiel réel des populations cellulaires sélectionnées. Cela a peu de conséquences pratiques dans le cas des greffes classiques de cellules médullaires où un chimérisme durable a été démontré. En revanche, nous ne savons pas détecter l'altération possible du potentiel de reconstitution de suspensions cellulaires induite par les manipulations *in vivo* et *in vitro* qui sont déjà appliquées dans des protocoles de transplantation, qu'il s'agisse de l'utilisation de cytokines, des techniques de purification dont on sait qu'elles affectent les processus de reconnaissance cel-

ADRESSE

L. Coulombel : directeur de recherche à l'Inserm. W. Vainchenker : directeur de recherche à l'Inserm, directeur de l'unité 362 de l'Inserm. Inserm U. 362, Institut Gustave-Roussy, 94800 Villejuif, France.

lulaire chez la souris, ou des techniques de transfert de gènes.

Pluripotence et autorenouveaulement sont deux propriétés constamment associées à la définition d'une cellule souche depuis l'identification initiale des CFU-S par Till et McCulloch (1961) et les travaux d'Abramson (1977) qui décrivaient déjà une certaine hiérarchie dans la pluripotence des cellules souches. L'identité parfaite entre au moins une cellule fille et la cellule mère, qui définit l'autorenouveaulement, ne peut être démontrée actuellement puisque notre seul critère de reconnaissance d'une cellule souche est rétrospectif. Rien ne prouve que cette propriété d'autorenouveaulement soit réellement nécessaire au fonctionnement prolongé du système hématopoïétique. En revanche, l'avènement des techniques d'infection rétrovirale a permis une analyse beaucoup plus précise du comportement de clones individuels après greffe par l'analyse du polymorphisme d'intégration provirale dans les tissus hématopoïétiques myéloïdes et lymphoïdes. L'utilisation de ces techniques a confirmé qu'une hétérogénéité existe parmi les cellules souches [3]. Des cellules multipotentes sont ainsi identifiées *a posteriori* sur l'observation d'un site d'intégration unique dans les cellules spléniques, thymiques et médullaires et elles coexistent avec des cellules souches de potentialité plus restreinte, en particulier des clones purement lymphoïdes, généralement T. L'existence d'une cellule souche purement lymphoïde a été récemment suggérée par l'absence de lignées B, T et NK chez les souris déficientes pour l'expression du gène *Ikaros* [4]. Dans les premiers mois après la greffe de cellules médullaires, généralement issues d'animaux traités par le 5 fluoro-uracile, la reconstitution est polyclonale et une certaine « instabilité » clonale est mise en évidence, alors qu'au-delà de 9 mois, seul un nombre restreint de clones participe à la reconstitution [3]. Compte tenu de la similitude de fonctionnement des systèmes hématopoïétiques murin et humain, ces observations soulignent, d'une part, l'importance de définir le type de reconstitution recherché (voir C. Chabannon et P. Mannoni) D'autre part, le caractère oligoclonal de la reconstitution décrit chez la souris laisse prévoir des difficultés chez l'hom-

me dans l'efficacité des protocoles thérapeutiques visant à transférer des gènes dans les cellules hématopoïétiques dans un but thérapeutique.

Il est indispensable de travailler à l'échelon clonal pour définir la potentialité des cellules étudiées : cela impose, soit de disposer d'un marqueur génétique stable dont l'intégration dans le génome est aléatoire, soit de travailler à l'échelon unicellulaire, ce qui est irréalisable dans une approche de transplantation *in vivo* dans les modèles murins, même si on dispose maintenant de techniques de purification cellulaire telles que 10 % à 50 % des cellules obtenues sont capables de reconstituer le système hématopoïétique. Chez l'homme, l'existence d'une cellule multipotente (myéloïde/lymphoïde) ne pourra probablement pas être prouvée autrement que par une analyse de clonalité chez des patients greffés avec des cellules ayant intégré un marqueur rétroviral, ou après reconstitution d'animaux immunologiquement tolérants par des cellules humaines. Les stratégies de greffe xénogénique (mouton ou souris) semblent prometteuses puisque la moelle de souris bg-bg/nu-nu/xid-xid greffées avec des cellules CD34⁺ de moelle osseuse adulte transduites avec le gène de résistance à la néomycine contient des progéniteurs hématopoïétiques résistants à la néomycine [5]. La même observation a été faite chez l'homme après greffe autologue [6]. Cependant, aucune analyse de clonalité n'a été publiée, probablement en raison du trop petit nombre de cellules ayant intégré le transgène dans chaque lignée, conséquence d'une faible efficacité d'infection.

In vitro, le principal obstacle à la mise en évidence de cellules multipotentes est l'absence de système expérimental permettant le développement simultané des lignées myéloïdes et lymphoïdes. En effet, les conditions de culture, associant cytokines exogènes et micro-environnement, sont souvent spécifiques (nécessité de cellules stromales thymiques pour le développement lymphoïde T) et parfois incompatibles (inhibition de la lymphopoïèse B par l'IL3). Des cellules de phénotype CD34⁺ issues de moelle osseuse adulte, de moelle fœtale ou de sang périphérique produisent des cellules lymphoïdes T, B et myéloïdes lorsqu'elles sont cultivées

dans des systèmes expérimentaux indépendants optimaux pour chaque lignée de différenciation (cultures à long terme sur cellules stromales, reconstitution de tissu thymique en culture organotypique ou *in vivo* chez la souris, injection de fragments osseux dans la souris SCID). Rien ne prouve cependant, si l'on n'est pas dans des conditions de dilution limite, que ces cellules proviennent d'un progéniteur multipotent unique. Un progéniteur bipotent lymphoïde B/myéloïde de phénotype CD34⁺/Thy1⁺ ou CD34⁺/CD38⁻/HLADR⁺ a été identifié chez l'homme et chez la souris [7, 8]. Ces observations ont été faites à l'échelon unicellulaire avec des cellules sélectionnées à partir de moelle fœtale, mais le progéniteur équivalent dans la moelle adulte ou le sang périphérique n'a pas été identifié. La relative facilité avec laquelle on met en évidence des progéniteurs myéloïdes, B ou T, dans les tissus hématopoïétiques fœtaux et dans le sang de cordon ainsi que leur capacité de prolifération très supérieure à celle de la moelle adulte, quel qu'en soit le mécanisme, justifient l'intérêt des cellules de sang de cordon en transplantation, ce d'autant que les propriétés immunologiques particulières des cellules lymphoïdes à cet âge pourraient minimiser la réaction du greffon contre l'hôte (voir E. Gluckman et E. Carosella). Soulignons, en particulier, la capacité particulière qu'ont les cellules de sang de cordon et les cellules de moelle fœtale de coloniser la moelle de souris SCID en l'absence de cytokines humaines exogènes [9, 10]. L'observation récente que, dans les cellules CD34⁺CD38⁻ fœtales et adultes, certaines structures nucléaires (télomères) corrélées à l'activité proliférative sont différentes, conforte l'hypothèse d'une restriction du potentiel de prolifération des cellules souches avec l'âge [11]. Il apparaît donc évident que des études au cours de l'ontogenèse amélioreront nos connaissances sur les propriétés et la régulation des cellules souches hématopoïétiques.

Définir le potentiel d'une cellule souche implique que l'on dispose de systèmes permettant, non seulement la mise en cycle de ces cellules généralement quiescentes, mais aussi leur détermination et l'amplification de leur descendance, afin qu'un nombre suffisant

de cellules différenciées soit produit pour permettre leur phénotypage. Cette étape d'amplification est probablement réglée en grande partie par des combinaisons de cytokines agissant en synergie avec d'autres molécules synthétisées par les cellules stromales. En revanche, le rôle des cytokines, associées ou non à d'autres molécules synthétisées par les cellules stromales, dans l'induction de la détermination et la mise en cycle des cellules souches, n'a pas été démontré. Si certaines observations privilégient le rôle inductif de cytokines dans la mise en cycle des cellules souches, d'autres suggèrent le rôle de la neutralisation d'inhibiteurs [12]. Le développement d'une réponse à certaines cytokines, du moins celles qui sont spécifiques de lignées, ne semble pas décisif pour la détermination. En effet, l'expression forcée des récepteurs de l'érythropoïétine ou du M-CSF (*c-fms*) dans des progéniteurs pluripotents induit une réponse proliférative de ces cellules mais n'altère pas leur détermination [13]. Au moins dispose-t-on de marqueurs précoces depuis la caractérisation de certains gènes clés dans le développement des lignées de différenciation. La création de mutants homozygotes pour la délétion du gène incriminé a montré l'importance de la fonction des protéines Ikaros dans l'engagement dans les lignées lymphoïde B, T et NK [4], RAG-1 et RAG-2 pour la différenciation des cellules pro-T et pro-B, GATA-1 et Tal-1 pour celle des lignées érythroïde, mégacaryocytaire et mastocytaire. Quant à l'expression du facteur de transcription GATA-2, elle est manifestement essentielle au développement de l'hématopoïèse hépatique et adulte (*m/s* n° 11, vol. 10, p. 1174) [14], mais son absence, comme celle de la protéine myb, ne compromet pas l'hématopoïèse embryonnaire dans le sac vitellin, ce qui confirme l'hypothèse d'une régulation indépendante de l'hématopoïèse embryonnaire et adulte, aussi bien au niveau de la réponse aux cytokines qu'au niveau génique.

Quelle est l'incidence pratique de ces données de biologie fondamentale pour la transplantation de cellules souches chez l'homme : l'une des principales est que nous ne sommes pas capables à l'heure actuelle de caractériser le potentiel de reconstitution hématopoïétique des suspensions cellulaires utilisées en transplantation, ni surtout de dépister les altérations de ce potentiel que pourraient induire les manipulations *ex vivo* de ces cellules, transfert de gènes ou cultures *in vitro* en présence de cytokines. S'il est injustifié que le retard de nos techniques biologiques freine le développement de nouvelles techniques de transplantation qui peuvent nous apprendre beaucoup, peut-être faut-il clarifier une certaine ambiguïté dans l'interprétation des tests dont nous disposons et faire preuve de prudence comme le soulignent C. Chabannon et P. Mannoni. Les tests dont nous disposons à l'heure actuelle permettent d'apprécier en routine le contenu d'un greffon en progéniteurs mûrs (CFU-GM /BFU-E). L'identification immunophénotypique des cellules primitives est une autre méthode actuellement utilisée, mais elle est limitée par la constatation que des cellules de même phénotype immunologique n'ont pas exactement les mêmes propriétés biologiques [15]. Ces informations peuvent garantir en première approximation l'absence de problème technique majeur au cours de la préparation du greffon mais n'apprécient pas le compartiment des cellules responsables de la reconstitution à long terme. Les techniques de culture à long terme identifient une cellule (LTC-IC, *long-term culture initiating cell*, voir C. Chabannon et P. Mannoni) certainement plus immature que les progéniteurs clonogéniques (formant des colonies), mais elle

ne peut pas être assimilée à une cellule souche, et l'amplification de LTC-IC n'a jamais été démontrée. Malgré la simplicité apparente de cette technique, qui est souvent réalisée simultanément au test de colonies, il est indispensable de rester critique dans son interprétation et ce pour deux raisons : la première est la multiplicité des paramètres utilisés dans ce test. Si une LTC-IC produit quatre progéniteurs clonogéniques dans le système décrit par Sutherland [16], ce résultat n'est pas généralisable et dans d'autres conditions de culture une LTC-IC peut produire dix progéniteurs clonogéniques [17]. La seconde raison est que LTC-IC et progéniteurs clonogéniques ne répondent pas aux mêmes *stimuli* [18, 19], et l'amplification de la descendance des LTC-IC (production de progéniteurs clonogéniques) peut se faire sans modification du nombre de LTC-IC. Il est donc inexact de faire du nombre de progéniteurs clonogéniques produits en culture à long terme le reflet mathématique du nombre de LTC-IC initiales, surtout dans des suspensions cellulaires provenant de malades en situation de déséquilibre hématologique. Pour être significatif, ce test doit donc être quantitatif et réalisé en dilution limite.

Ces différentes observations suggèrent donc qu'il faut s'engager avec une grande prudence dans la voie des manipulations *in vitro* des cellules hématopoïétiques et surtout s'entourer des conditions techniques qui permettent d'évaluer très précisément l'effet de ces manipulations. Cette démarche est très liée au développement d'une recherche plus fondamentale visant à la fois à développer des modèles xénogéniques de greffe de cellules humaines et à comprendre si les molécules exogènes jouent un rôle dans la prolifération et la détermination des cellules souches et ont donc une justification thérapeutique ■

RÉFÉRENCES

1. Blanchet JP, Mouchiroud G. Les cellules souches hématopoïétiques : une population plus hétérogène qu'il n'y paraît. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 959-63.
2. Hatzfeld J, Panterne B, Sansilvestri P, et al. La cellule souche hématopoïétique humaine : du mythe à la réalité. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 1110-2.
3. Jordan CT, Lemischka R. Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev* 1990 ; 4 : 220-32.
4. Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, Molnar A, Wu P, Winandy S, Sharpe A. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994 ; 79 : 143-56.
5. Nolte JA, Hanley MB, Kohn DB. Sustained human hematopoiesis in immunodeficient mice by cotransplantation of marrow stroma expressing interleukin-3: analysis of gene transduction of long-lived progenitors. *Blood* 1994 ; 83 : 3041-51.
6. Brenner MK, Rill DR, Holladay MS, Heslop HE, Moen RC, Buschle M, Krance RA,

- Santana VM, Anderson WH, Ihle JN. Gene-marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet* 1993 ; 342 : 1134-7.
7. Baum CM, Weissman I, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 2804-8.
8. Huang S, Terstappen LW. Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34⁺, HLADR⁺, CD38⁻ hematopoietic stem cells. *Blood* 1994 ; 83 : 1515-26.
9. Voormoor J, Lapidot T, Pflumio F, Risdon G, Patterson B, Broxmeyer HE, Dick J. Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1994 ; 83 : 2489-97.
10. Kollman TR, Kim A, Zhuang X, Hachamovitch M, Goldstein H. Reconstitution of SCID with human lymphoid and myeloid cells after transplantation with human fetal bone marrow without the requirement for exogenous cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 8032-6.
11. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells. Loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 9857-60.
12. Cardoso AA, Li MH, Batard P, Hatzfeld A, Brown EL, Levesque JP, Sookdeo H, Panterne B, Sansilvestri P, Clark S, Hatzfeld J. Release from quiescence of CD34⁺CD38⁻ human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 8707-11.
13. Dubart A, Feger F, Lacout C, Goncalves F, Vainchenker W, Dumenil D. Murine pluripotent hematopoietic progenitors constitutively expressing a normal erythropoietin receptor proliferate in response to erythropoietin without preferential erythroid cell differentiation. *Mol Cell Biol* 1994 ; 14 : 4834-42.
14. Tsai FY, Keleir G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994 ; 371 : 221-6.
15. Lansdorp PM, Dragowska W. Maintenance of hematopoiesis in serum-free bone marrow cultures involves sequential recruitment of quiescent progenitors. *Exp Hematol* 1993 ; 21 : 1321-7.
16. Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 3584-8.
17. Croisille L, Auffray I, Katz A, Izac B, Vainchenker W, Coulombel L. Hydrocortisone differentially regulates the ability of murine and human stromal cells to support CD34⁺/CD38⁻ long term culture initiating cells (LTC-IC). *Blood* 1995 (sous presse).
18. Sutherland HJ, Hogge DE, Cook D, Eaves CJ. Alternative mechanisms with and without steel factor support primitive human hematopoiesis. *Blood* 1993 ; 81 : 1465-71.
19. Cashman JD, Lapidot T, Schultz L, Lansdorp P, Eaves CJ, Dick J. Presence of CD34⁺Thy1⁺ cells and LTC-IC in SCID mice repopulated with normal human marrow cells. *Exp Hematol* 1994 ; 22 : 838 (abstr).