

L'émergence des cellules souches hématopoïétiques chez l'embryon de souris

Les cellules souches, définies par la capacité de donner naissance à une descendance différenciée tout en s'autorenouvelant, ne sont pas l'apanage exclusif du système sanguin. Mais dans d'autres systèmes ou organes, par exemple l'épithélium intestinal, des contraintes anatomiques fortes assignent une localisation repérable aux cellules responsables du renouvellement. Il est donc relativement plus aisé d'identifier ces cellules et d'étudier leur mise en place au cours du développement. L'origine des cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une question particulièrement épineuse parce que (1) les CSH ne se forment pas, chez l'embryon, dans les ébauches des différents organes hématopoïétiques mais les colonisent ; (2) ces cellules, qui migrent donc dès leur apparition, sont, tout au long de la vie, dotées d'une certaine mobilité et peuvent, selon les besoins, circuler d'un organe à l'autre par le système sanguin ; (3) ces cellules sont très peu nombreuses, que ce soit chez l'embryon ou chez l'adulte (5 CSH pour environ 10^4 cellules de la moelle osseuse, voir revue dans [1]) ; (4) ces cellules étant engagées dans la voie hématopoïétique mais non différenciées, elles sont donc presque complètement dépourvues de marqueurs qui permettraient de les identifier. Il est cependant évident que l'émergence des CSH chez l'embryon et leur mise en réserve dans la moelle osseuse sont des processus qui non seulement suscitent la curiosité du chercheur mais peuvent avoir des retombées cliniques. Différentes thérapeutiques font en effet appel aux CSH natives ou manipulées, en général obtenues à partir de la moelle

osseuse de l'adulte. Le sang de cordon du nouveau-né est aujourd'hui une source alternative de CSH qui offrent certains avantages [2]. Les CSH des stades plus précoces du développement pourraient présenter des propriétés intéressantes dans cette perspective.

L'hématopoïèse de l'embryon des vertébrés se caractérise par des transitions successives : le site où elle se produit change plusieurs fois selon un calendrier précis, les caractères morphologiques ou biochimiques des cellules de différentes classes changent également. Le cas des globules rouges, particulièrement exemplaire, a fait l'objet de nombreuses études destinées à comprendre le mécanisme moléculaire de l'activation successive des différents gènes qui président à la commutation (le *switch*) des hémoglobines. Le premier site actif est une annexe de l'embryon, le sac vitellin ou, chez les amphibiens, son équivalent appelé l'îlot sanguin ventral. Le sac vitellin ainsi que l'îlot ventral sont les seules ébauches qui produisent leurs propres précurseurs *in situ*. Il était donc logique de proposer, comme l'ont fait Moore et Owen [3], que cette annexe de l'embryon produit en une fois toutes les CSH nécessaires à la vie de l'individu. Il a été possible chez l'embryon d'oiseau ou d'amphibien de tester directement cette hypothèse en associant le sac vitellin ou l'îlot ventral à un embryon étranger, les deux partenaires étant pourvus de marqueurs appropriés susceptibles d'être retrouvés sur les cellules qui en dérivent, quelles que soient leurs migrations. En fait, ces « chimères » ne produisent de sang dérivé de CSH du sac vitellin que pendant une courte

période [4, 5] ; quant aux ébauches des organes hématopoïétiques, elles sont exclusivement peuplées de CSH provenant de l'embryon [6, 7]. L'analyse approfondie de ces chimères a bien démontré que des CSH d'origine intra-embryonnaire remplacent rapidement les progéniteurs du sac vitellin (voir revue dans [8]). Dans les conditions habituelles du développement, ceux-ci ne sont donc pas capables de se constituer en réserve et ne manifestent donc pas la capacité d'autorenouvellement qui permettrait de les considérer comme des CSH. Les cellules souches intra-embryonnaires apparaissent pendant une période bien définie du développement, dans le mésoderme associé à l'aorte.

Qu'en est-il chez les mammifères ? Bien que l'émergence de CSH intra-embryonnaires chez l'embryon d'oiseau ait été mise en évidence dès 1975 [6], les premiers arguments expérimentaux en faveur d'un schéma de développement analogue chez l'embryon de souris n'ont été obtenus qu'en 1993. Il est en effet difficile, sinon impossible, de manipuler un embryon de mammifère comme un embryon d'oiseau. Il faut donc des stratégies alternatives susceptibles de détecter des cellules représentées en très petit nombre dans des structures minuscules et de déterminer si ces cellules ont pu, ou non, migrer d'une région de l'embryon à l'autre. Une équipe anglaise et nous-mêmes avons abordé cette question en parallèle à l'aide d'approches un peu différentes [9-12]. Nous avons utilisé une méthode de culture en deux étapes (figure 1A) qui permet l'expansion des progéniteurs puis la différencia-

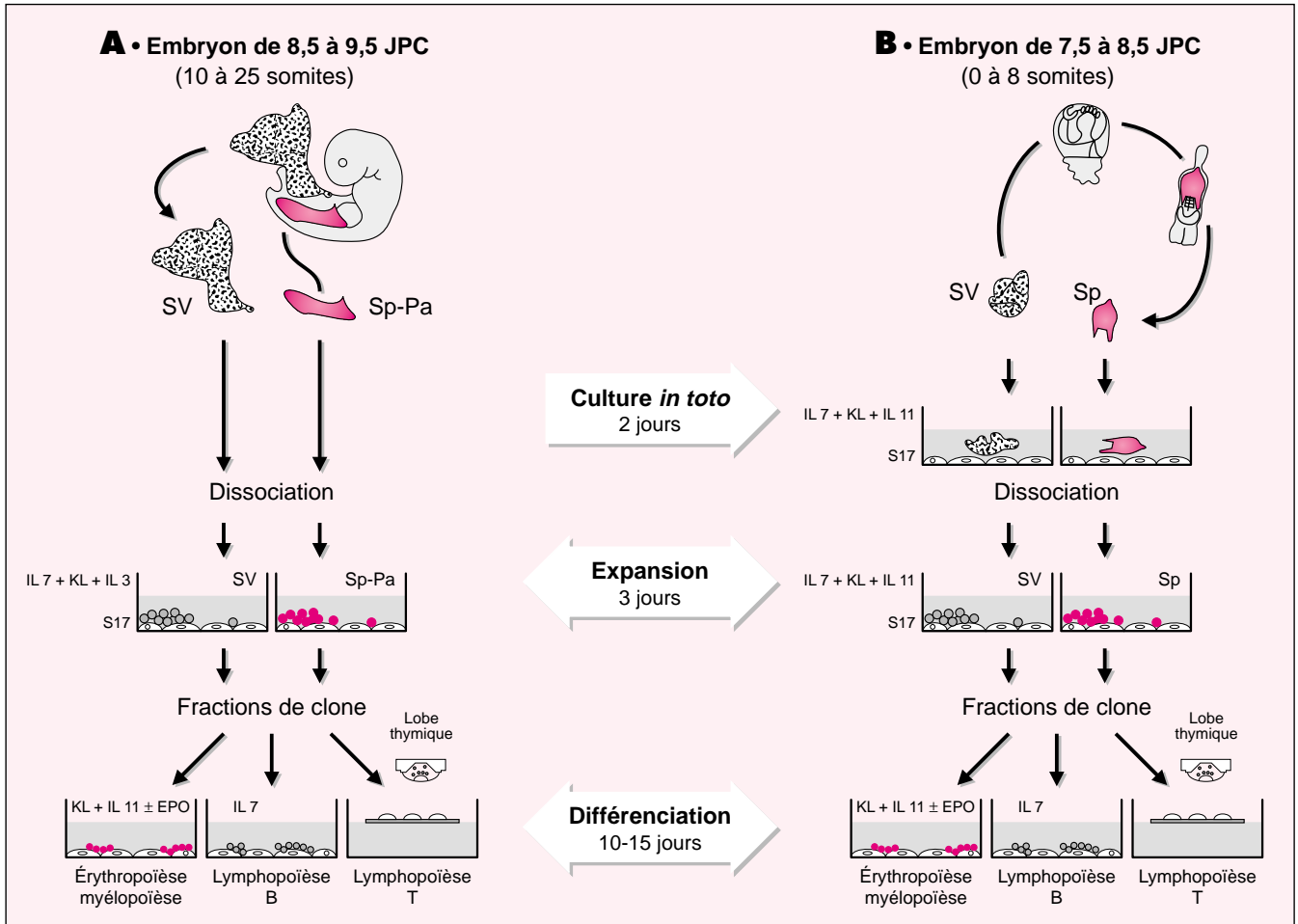


Figure 1. **Méthodes de culture en plusieurs étapes pour détecter l'émergence de progéniteurs hématopoïétiques chez le très jeune embryon de souris.** **A:** Culture en deux étapes [12, 13]. Cette méthode permet de révéler des progéniteurs peu nombreux et de tester leur pluripotentialité. **B:** Culture en trois étapes. Une étape de culture *in toto*, introduite avant la dissociation, permet l'émergence des progéniteurs dans des régions de l'embryon isolées à des stades très précoces, avant la différenciation vasculaire. SV: sac vitellin; Sp-Pa: splanchnopleure para-aortique; IL: interleukine; KL: Kit ligand; EPO: érythropoïétine. S17: lignée cellulaire utilisée comme couche nutritive.

tion des clones auxquels ils donnent naissance [13]; les tissus à étudier sont dissociés et les cellules sont ensemencées sur une lignée stromale dérivée de la moelle osseuse en présence des cytokines ligand de Kit, IL3 et IL7, et donnent naissance à des clones, qui, divisés en trois lots, sont soumis à des conditions de différenciation myéloïde (IL3, GM-CSF), lymphoïde B (IL7), ou lymphoïde T (colonisation d'un thymus embryonnaire déplété de ses propres progéniteurs distinguables par un marqueur). Cette deuxième étape permet de tester la pluripotentialité des clones. Le groupe d'Elaine Dzierzak (Londres,

GB) a recherché la présence de progéniteurs pluripotents par la technique des CFU-S (*colony-forming-units in the spleen*) observées 8 ou 11 jours après injection à des souris irradiées. Nous avons détecté des précurseurs dans une région homologue de la région para-aortique de l'oiseau, chez l'embryon de 8,5 à 9 jours *postcoïtum* (jpc), c'est-à-dire aux stades de 10 à 25 paires de somites [12]. Nous désignons cette région sous le nom de « splanchnopleure para-aortique » (Sp-Pa) parce qu'elle comporte l'endoderme et le mésoderme, c'est-à-dire les feuilletts constitutifs de la splanchnopleure, et les vaisseaux

intra-embryonnaires déjà formés dans le mésoderme à ce stade. La culture sur la lignée S17 révèle la présence de progéniteurs multipotents dans la Sp-Pa et dans le sac vitellin; le nombre de ces progéniteurs (c'est-à-dire le nombre de clones obtenus) évolue en parallèle dans la Sp-Pa et le sac vitellin: absents (1 tous les 3-4 embryons) au stade de 10 somites, ils atteignent une quinzaine au stade de 25 somites. En revanche il n'y en a jamais aucun dans le reste de l'embryon, après que ces deux régions ont été enlevées. La deuxième étape de culture démontre que les clones sont pluripotents. Le groupe d'Elaine Dzierzak a trouvé des

CFU-S dans la même région mais à un stade un peu plus tardif entre 25 et 40 somites, soit à 9-11 jpc. Ces chercheurs travaillent sur les structures qui se sont alors différenciées à partir de la Sp-Pa, et de la pièce intermédiaire (structure mésodermique à l'origine du rein), c'est-à-dire l'aorte, les gonades, le mésonephros (AGM). Ils y ont trouvé des CFU-S à partir du stade de 31-33 somites. Le nombre de celles-ci atteint un pic (7 CFU-S/AGM) à la fin du 10^e jpc (20-40/10⁵ cellules) [9], soit une fréquence analogue à celle de la moelle osseuse adulte. Signalons qu'une telle fréquence dans ces structures très petites met ces progéniteurs à la limite de la détection, si bien que seuls trois receveurs irradiés sur 96 se sont trouvés reconstitués à long terme [10]. Le nombre est plus faible encore dans le sac vitellin et à peu près nul dans le corps de l'embryon moins l'AGM. Il faut ensuite attendre l'expansion des CSH colonisatrices du foie pour trouver chez l'embryon une population plus respectable de CFU-S.

De toute façon, ces expériences, de même que les nôtres, établissent seulement la présomption d'un rôle spécifique d'une région de l'embryon par rapport au sac vitellin. En effet la circulation sanguine entre l'embryon et son annexe s'établit au stade de 8 paires de somites et les CSH peuvent dès lors circuler dans un sens comme dans l'autre.

Nos expériences récentes [14] apportent la preuve indiscutable que des CSH apparaissent dans l'embryon proprement dit et qu'elles sont plus performantes que celles du sac vitellin, car ces expériences portent sur des embryons de 0 à 8 somites (7,5-8 jpc), chez lesquels il n'y a pas encore de communication sanguine entre le sac vitellin et l'embryon. Nous avons mis en œuvre la même méthode qu'en 1995, à une importante modification près. En effet, la culture en deux étapes ne détecte aucun progéniteur chez ces très jeunes embryons, que ce soit dans la splanchnopleure intra-embryonnaire (avant et pendant le développement de l'aorte) ou dans le sac vitellin. Mais si on introduit une étape préalable, pendant laquelle les structures

disséquées sont cultivées *in toto* (figure 1B), alors on obtient des clones multipotents. Ces résultats signifient que les progéniteurs ne sont pas encore présents chez les embryons de 0 à 10 paires de somites, mais que des interactions cellulaires, assurées par le maintien en culture de la structure tridimensionnelle des feuilletts embryonnaires, permettent leur émergence. Plus intéressant encore, ces progéniteurs manifestent des potentiels entièrement différents selon qu'ils sont apparus dans les cultures de splanchnopleure ou de sac vitellin: dès les plus jeunes stades presque toutes les splanchnopleures donnent des progéniteurs à potentiel lymphoïde, alors que les sacs vitellins ne commencent à le faire qu'après l'établissement de la circulation. Enfin, les progéniteurs issus de la splanchnopleure se renouvellent beaucoup plus longtemps en culture que ceux du sac vitellin.

Dans le même temps, Medvinsky et Dzierzak [15], cherchant sans doute à améliorer les reconstitutions à long terme relativement médiocres qu'ils avaient obtenues avec les AGM de 10-11 jours, mettaient en œuvre une

stratégie analogue à la nôtre, c'est-à-dire qu'ils soumettaient les AGM à une période de culture organotypique de 4 jours avant de les dissocier et de les injecter individuellement à des adultes irradiés. Comme dans nos expériences, l'introduction de cette «préculture» a eu un effet spectaculaire. Après 11 jours de reconstitution la rate des receveurs est bourrée de colonies: 31 colonies en moyenne par AGM de 11 jpc, contre 9 à partir du sac vitellin et 2 à partir du foie fœtal. D'une manière générale, la culture organotypique multiplie 4 à 9 fois le nombre de progéniteurs présents dans l'AGM, alors que ceux du sac vitellin ou du foie ne sont augmentés que légèrement. Quant à la reconstitution à long terme (8 mois), elle est obtenue chez 24 receveurs d'AGM de 10 jpc précultivé sur 27, mais jamais chez les receveurs de foie ou de sac vitellin du même âge, même précultivés. Ces données indiquent un rôle essentiel de l'AGM dans la production de CSH dotées de la potentialité de reconstitution à long terme dites LTR-HSC (*long term repopulating-hematopoietic stem cells*); cette conclusion converge avec la nôtre, puisque la région

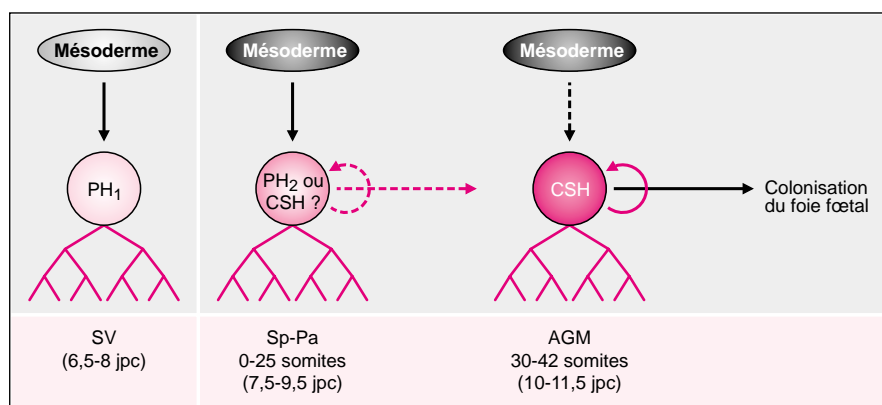


Figure 2. **Représentation schématique de l'émergence des précurseurs hématopoïétiques chez l'embryon de souris.** Trois populations ont été observées à des stades successifs au niveau du sac vitellin (SV), de la splanchnopleure para-aortique (Sp-Pa) et de la structure qui en dérive ou aorte-gonades-mésonephros (AGM). La première population (PH1), formée dans le SV, ne donne pas naissance aux suivantes. En revanche, la relation entre cellules de la Sp-Pa et cellules de l'AGM n'a pas encore été établie. S'il existe une filiation (encore à démontrer) entre ces deux populations, les cellules de la Sp-Pa pourront être considérées comme des CSH. Si les cellules de la Sp-Pa constituent, comme celles du SV, une population indépendante, elles ne seraient alors que des précurseurs hématopoïétiques (PH2) non renouvelables à long terme.

concernée est la même, prélevée à un stade un peu plus tardif.

Cependant, la question est posée de la relation entre les progéniteurs multipotents dont nous démontrons l'émergence dans la Sp-Pa entre 0 et 25 paires de somites (7,5 à 9 jpc) et les LTR-HSC présents dans l'AGM à 10-11 jpc. La Sp-Pa prélevée aux stades de 3 à 8 somites et soumise à la culture *in toto* et à l'amplification n'apparaît pas capable de reconstituer des souris irradiées à long terme, alors que l'AGM cultivé dans les mêmes conditions le fait [14]. Cette capacité apparaît donc un peu plus tard. Or il est clair d'après l'ensemble des expériences décrites ci-dessus qu'une région bien définie de l'embryon proprement dit produit des progéniteurs sanguins de manière continue entre 8 et 11 jpc. Il y a donc deux possibilités: plusieurs populations de progéniteurs distincts par leurs capacités se déterminent successivement à partir de cellules mésodermiques au long de cette période ou, au contraire, les capacités des progéniteurs qui se déterminent puis se multiplient au cours de cette période sont modulées par l'environnement qui leur est offert (figure 2). Les termes de cette alternative devraient être testés non plus par la restauration d'animaux adultes irradiés mais par la restauration d'embryons dont l'hématopoïèse est déficiente, qui fourniraient aux progéniteurs de la Sp-Pa un environnement synchrone. Cette expérience permettrait de déterminer si une génération de progéniteurs

non renouvelables est produite avant les LTR-HSC, et de préciser les caractéristiques moléculaires de leur descendance.

En conclusion, des données concrètes appuient maintenant la validité chez la souris du modèle ontogénique établi dans le cas du système hématopoïétique d'autres vertébrés, en démontrant la non-pérennité des progéniteurs du sac vitellin et l'émergence de CSH intra-embryonnaires. Il y a donc au moins deux populations indépendantes de progéniteurs sanguins, il reste à déterminer si d'autres peuvent être individualisées par des approches expérimentales et à élucider les signaux intercellulaires impliqués dans l'émergence de ces populations ■

Françoise Dieterlen-Lièvre

*Institut d'Embryologie cellulaire et moléculaire du Cnrs et du Collège de France
49 bis, avenue de la Belle-Gabrielle,
94736 Nogent-sur-Marne Cedex, France.*

RÉFÉRENCES

1. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 35-71.
2. Gluckman E, Carosella E. Utilisation thérapeutique des cellules souches hématopoïétiques du sang de cordon. *Med Sci* 1995; 11: 28-34.
3. Moore MAS, Owen JTT. Stem cell migration in developing myeloid and lymphoid systems. *Lancet* 1967; 2: 658-62.
4. Beaupain D, Martin C, Dieterlen-Lièvre F. Are developmental hemoglobin changes related to the origin of stem cells and site of erythropoiesis? *Blood* 1979; 53: 212-25.

5. Lassila O, Martin C, Toivanen P, Dieterlen-Lièvre F. Erythropoiesis and lymphopoiesis in the chick yolk-sac-embryo chimeras: contribution of yolk sac and intraembryonic stem cells. *Blood* 1982; 59: 377-81.

6. Dieterlen-Lièvre F. On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J Embryol Exp Morphol* 1975; 33: 607-19.

7. Martin C, Beaupain D, Dieterlen-Lièvre F. Developmental relationships between vitelline and intra-embryonic haemopoiesis studied in avian «yolk sac chimaeras». *Cell Differ* 1978; 7: 115-30.

8. Dieterlen-Lièvre F. Ontogénèse des cellules souches hématopoïétiques: modèles animaux. *Hématologie* 1995; 4: 295-302.

9. Medvinsky AL, Samoylina NL, Müller AM, Dzierzak EA. An early pre-liver intra-embryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 1993; 364: 64-6.

10. Müller AM, Medvinsky AL, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzak E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1994; 1: 291-301.

11. Godin I, Garcia-Porrero J, Coutinho A, Dieterlen-Lièvre F, Marcos MAR. Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryo contains B1a-cell progenitors. *Nature* 1993; 364: 67-70.

12. Godin I, Dieterlen-Lièvre F, Cumano A. Emergence of multipotent hematopoietic cells in the yolk sac and para-aortic splanchnopleura of 8.5 dpc mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 773-7.

13. Cumano A, Paige CJ, Iscove NN, Brady G. Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver. *Nature* 1992; 356: 612-5.

14. Cumano A, Dieterlen-Lièvre F, Godin I. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 1996; 86: 907-16.

15. Medvinsky AL, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996; 86: 897-906.

TIRÉS À PART

F. Dieterlen-Lièvre.

3^e CONGRÈS INTERNATIONAL INFECTIONS ET NÉOPLASIES DU BAS APPAREIL GÉNITAL DÉFIS ET STRATÉGIES

- Papillomavirus en pathologie humaine, état de l'art
- Nouveaux développements dans le dépistage du cancer du col – Conférence Eurogin – OMS
- Progrès dans la prise en charge des MST

PRÉSIDENTS HONORAIRES : H. Zur Hausen (Allemagne), L. Dubertret (France) – PRÉSIDENTS : L. Koss (USA), G. Orth (France) – COORDINATEUR SCIENTIFIQUE : J. Monsonogo (France)

PARIS-FRANCE-UNESCO
Secrétariat scientifique
J. Monsonogo
174, rue de Courcelles, 75017 Paris, France
Tél. : 33 01 47 66 05 29

Organisé par EUROGIN
EUROPEAN RESEARCH ORGANISATION ON GENITAL INFECTION AND NEOPLASIA

24-27 MARS 1997
Secrétariat du Congrès Baxon
69-73, avenue du Général-Leclerc, BP 304,
92102 Boulogne, France
Tél. : 33 01 46 20 04 56