



fois de plus que se focaliser sur un cas particulier permet certaines avancées, et suggère une route possible pour de futures investigations. Rappelons qu'à ce jour près de soixante-dix marques épigénétiques sont connues, et en quête de fonctions. De plus, cette étude met en évidence des différences marquées entre les blastomères d'un embryon qui commence à peine à se développer. Nul doute que ces données contribueront au débat très animé que suscite la possibilité d'une régionalisation précoce de l'embryon de souris [4-7]. ♦

Epigenetic regulation of pluripotency in the early mouse embryo


REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient V. Gurchenkov pour la réalisation de la Figure 1 de cet article.

RÉFÉRENCES

1. Torres-Padilla ME, Parfitt DE, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 2007; 445: 214-8.
2. Piotrowska-Nitsche K, Perea-Gomez A, Haraguchi S, Zernicka-Goetz M. Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. *Development* 2005; 132: 479-90.
3. Piotrowska-Nitsche K, Zernicka-Goetz M. Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mech Dev* 2005; 122: 487-500.
4. Zernicka-Goetz M. The first cell-fate decisions in the mouse embryo: destiny is a matter of both chance and choice. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 406-12.
5. Hiiragi T, Alarcon VB, Fujimori T, et al. Where do we stand now? Mouse early embryo patterning meeting in Freiburg, Germany (2005). *Int J Dev Biol* 2006; 50: 581-7.
6. Louvet-Vallee S, Vinot S, Maro B. Mitotic spindles and cleavage planes are oriented randomly in the two-cell mouse embryo. *Curr Biol* 2005; 15: 464-9.
7. Kurotaki Y, Hatta K, Nakao K, et al. Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. *Science* 2007; 316: 719-23.


NOUVELLE



Les cellules souches hématopoïétiques

Une double origine embryonnaire ?

Isabelle Godin, Ana Cumano



I. Godin : Inserm U790,
 Institut Gustave Roussy-PR1,
 39, rue Camille Desmoulins,
 94805 Villejuif, France.
 Université de Paris XI, Orsay, France.
 A. Cumano : Unité de Développement
 des Lymphocytes, Département
 d'immunologie, Institut Pasteur,
 25, rue du Docteur Roux,
 75724 Paris Cedex 15, France et Inserm U668.
cumano@pasteur.fr

► L'origine des cellules souches hématopoïétiques (CSH) a longtemps été, et reste encore, sujette à controverse. Les CSH de la moelle osseuse adulte sont postulées dériver d'une réserve établie pendant le développement embryonnaire. Initialement, la production du contingent de CSH a été attribuée au sac vitellin (SV), parce que les premières cellules hématopoïétiques, principalement des érythrocytes, apparaissent dans cette annexe embryonnaire. Cependant, les expériences de chimères entre des corps embryonnaires de caille et des SV de poulet, effectuées avant l'établissement de la circulation entre l'embryon et le SV, ont clairement démontré que les cellules hématopoïétiques du SV ne contribuaient pas à l'hématopoïèse adulte, qui est fondée par des CSH d'origine intra-embryonnaire. Plus tard, deux groupes ont montré que, chez la souris également, la génération des cellules hématopoïétiques s'opérait indépendamment dans deux sites (Figure 1).

La première a lieu dans le SV qui produit des cellules érythro-myéloïdes, la seconde prend place plus tard dans le compartiment intra-embryonnaire où la région appelée splanchnopleure para-aortique (P-Sp), puis aortogonades-mésonephros (AGM) produit des CSH multipotentes et capables de reconstituer à long terme le système hématopoïétique d'animaux irradiés. Ces observations, aujourd'hui confirmées par plusieurs laboratoires, ont été à la base du concept, généralement accepté, d'une origine des CSH dans le corps embryonnaire, précisément dans la P-Sp/AGM. La quantification des cellules multipotentes a montré qu'elles apparaissaient dans cette région à partir de 8,5 jours de gestation (jdg) et qu'elles atteignaient un nombre maximal de 100-150 par embryon, vers 10,5 jdg (35-37 somites), avant de diminuer rapidement en nombre, puis de disparaître vers 12 jdg (pour revue, voir [1]). Ces expériences ont démontré que, chez la souris, le compartiment intra-

embryonnaire produisait des CSH. Cependant, la possibilité de la génération tardive d'une fraction de CSH au niveau du SV ne peut pas être évaluée après 8 jdg (4-5 somites) puisque, à partir de ce stade, la circulation des cellules sanguines dans le réseau vasculaire entraîne un mélange des cellules provenant du SV et de celles provenant du compartiment intra-embryonnaire. L'approche de ce problème en utilisant des souris *knock in* n'est pas possible puisque les facteurs exprimés et/ou impliqués dans la génération des précurseurs hématopoïétiques sont identiques dans les deux sites. Une contribution du SV à l'hématopoïèse adulte demande pourtant à être évaluée puisque des expériences de greffe chez l'embryon d'amphibiens [2] et de souris [3] ont montré une capacité des cellules du SV à engendrer des lymphocytes.

Contribution du sac vitellin à l'hématopoïèse adulte : les observations

Pour aborder cette question, le groupe de Nishikawa a construit une souris inducible pour l'expression de la recombinase CRE sous le contrôle du promoteur de *Runx1* [4]. *Runx1* (AML1 ou *cbfa2*) est un facteur de transcription exprimé principalement dans le système hématopoïétique (Figure 2), d'abord au niveau du SV où il marque à la fois les cellules endothéliales et hématopoïétiques. Plus tard, il est exprimé dans le compartiment intra-embryonnaire, par les vaisseaux et dans les sites impliqués dans la génération des CSH, au niveau de la partie ventrale de l'aorte, mais aussi des artères ombilicale et omphalomé-sentérique (pour revue, voir [5]).

L'inactivation de ce gène, létale pour les homozygotes vers 12-13 jdg, entraîne une diminution de l'hématopoïèse du SV et l'absence de CSH [6-8]. Il est donc considéré comme strictement nécessaire à l'émergence de ces cellules.

Pour marquer exclusivement les cellules du SV et suivre leur évolution au cours du développement, les souris *Runx1^{CRE/+}* ont été croisées avec des souris transgéniques portant un gène rapporteur (*LacZ* ou *eYFP*) exprimé de façon ubiquitaire, mais sous le contrôle d'un stop transcriptionnel flanqué de sites lox-p. Ainsi, le traitement de la mère par le tamoxifène entraîne une activation temporaire de la recombinase CRE dans les cellules qui expriment *Runx1*, induisant

la délétion dans ces cellules du stop transcriptionnel et l'expression de la β -galactosidase ou de la *eYFP* dans ces cellules et leur descendance.

La validité de l'approche repose entièrement sur la durée de l'induction par le tamoxifène, qui doit permettre le marquage des précurseurs du SV, tout en interdisant celui des précurseurs intra-embryonnaires. Ce point est crucial compte tenu du délai restreint entre les deux phases de génération (24 heures), mais aussi de la variabilité importante des stades de développement des embryons au sein d'une même portée (24 heures [9]) aux premiers stades étudiés (7-8 jdg). Pour évaluer ce point, les auteurs ont comparé l'expression de la β -galactosidase obtenue 4, 6 ou 12 heures après l'induction de la recombinase CRE à celle présente dans des embryons *Runx^{LacZ/+}* [10]. L'efficacité de l'induction est clairement documentée et démontre qu'une induction complète est atteinte 12 heures après l'administration du tamoxifène. Nous ignorons cependant si sa durée d'action excède les douze heures et il paraît concevable qu'une activité résiduelle puisse persister au-delà. Ce point, pourtant essentiel, ne peut malheureusement pas être estimé puisque 12 heures après l'induction, les cellules issues du sac vitellin circulent dans le réseau vasculaire (extra- et intra-embryonnaire), ce qui rend impossible l'identification éventuelle de cellules intra-embryonnaires marquées. Si l'activité du tamoxifène est soutenue au-delà de 12 heures, l'induction vers 7,5 jdg marquera des cellules du SV, mais également une fraction de cellules qui exprimeront *Runx1* à des stades plus tardifs. Dans ces conditions, la stricte corrélation entre l'expression de la β -galactosidase à des stades tardifs et l'expression temporelle de *Runx1* reste spéculative.

Lorsque l'induction est effectuée entre 6,5 et 8 jdg, elle entraîne un

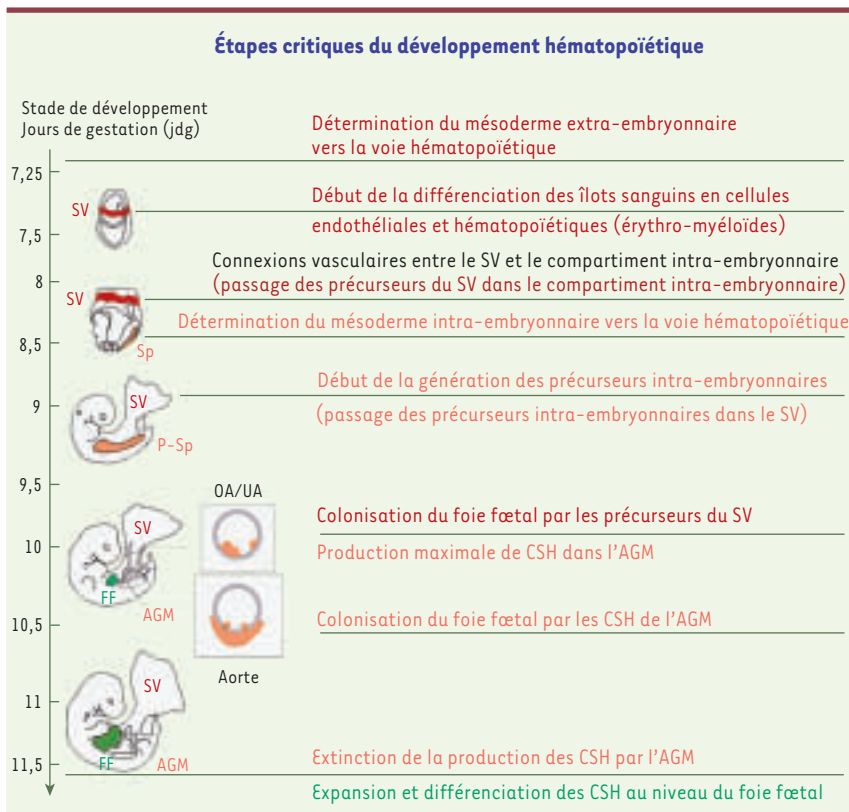


Figure 1. Les grandes étapes du développement hématopoïétique. Synthèse sur les phases initiales du développement hématopoïétique, qui se déroulent dans le compartiment extra-embryonnaire (en rouge) et intra-embryonnaire (en jaune). En encart figurent les sites impliqués dans la génération des CSH, c'est-à-dire l'aorte et sa partie ventrale de façon certaine, et peut-être aussi les artères omphalomé-sentérique (OA) et ombilicale (UA). AGM : aorte-gonades-mésonephros ; FF : foie fœtal ; P-Sp : splanchnopleure para-aortique ; Sp : splanchnopleure ; SV : sac vitellin



marquage β -galactosidase restreint aux vaisseaux et cellules hématopoïétiques du SV. Lorsque les embryons sont analysés plus tardivement après induction, des cellules β -galactosidase positives apparaissent dans les vaisseaux ombilicaux et dans l'aorte, puis quelques heures plus tard au niveau du foie. Lorsque le tamoxifène est administré après 8 jdg, l'activité β -galactosidase est détectée, entre autres, dans des cellules de la P-Sp/AGM, avec un marquage de l'ensemble de l'endothélium, mais aussi du mésenchyme situé au-dessous et autour de l'aorte.

L'expression de la β -galactosidase α , par la suite, été analysée dans le foie fœtal à des stades plus tardifs de la gestation et dans les CSH de la moelle osseuse d'individus adultes (Figure 2).

Analyse critique des données expérimentales

Lors d'une induction de la CRE à 7,5 jdg, aucun marquage β -galactosidase n'est observé dans la P-Sp/AGM 12 heures plus tard, alors que 5 % des précurseurs cKit⁺/CD34⁺ et 20 % des cellules érythro-myéloïdes du foie fœtal expriment la β -galactosidase à 12 jdg. Plus tard, environ 5 % des cellules du thymus sont également clairement marquées. Chez l'adulte, entre 1 et 10 % des CSH expriment la β -galactosidase, indiquant que, si l'action du tamoxifène n'excède pas les 12 heures qui suivent l'administration, un pourcentage restreint, mais significatif, des CSH adultes proviennent du sac vitellin. Ce résultat, extrêmement intéressant, peut avoir différentes interprétations. Celle défendue par les auteurs est qu'une fraction des CSH adultes sont

probablement originaires du sac vitellin. Cependant, une activité résiduelle du tamoxifène (au-delà de 12 heures) pourrait entraîner, plus tardivement, le marquage des premières CSH de la P-Sp/AGM, qui expriment Runx1, et qui seraient alors responsables des 1-10 % de CSH marquées dans la moelle osseuse adulte.

L'induction vers 9,5 jdg entraîne l'expression de β -galactosidase dans les CSH de la moelle osseuse adulte qui atteint les 100 %. Il est intéressant de souligner que cette induction produit un marquage important dans la P-Sp/AGM et quasi inexistant dans le SV. Ce résultat confirme que les CSH intra-embryonnaires constituent la source majeure des cellules souches médullaires adulte. Par ailleurs, le fait qu'une contribution de 100 % soit atteinte chez l'adulte indique

qu'il n'existe probablement pas de génération ultérieure de CSH, ni au cours de l'ontogenèse tardive, ni au cours de la vie adulte.

L'induction de la recombinase CRE à 10,5 jdg conduit à une expression de LacZ dans 0-10 % des CSH de l'adulte, malgré l'expression de Runx1 par l'ensemble des CSH de l'AGM (Figure 2). Il est possible que les différents organes des embryons plus développés soient moins accessibles au tamoxifène et que les doses injectées soient donc insuffisantes pour provoquer l'induction. Il est aussi possible que Runx1 soit exprimé à des niveaux moins importants dans les CSH aux stades plus tardifs. L'induction de la recombinase CRE, dont l'expression est contrôlée par le

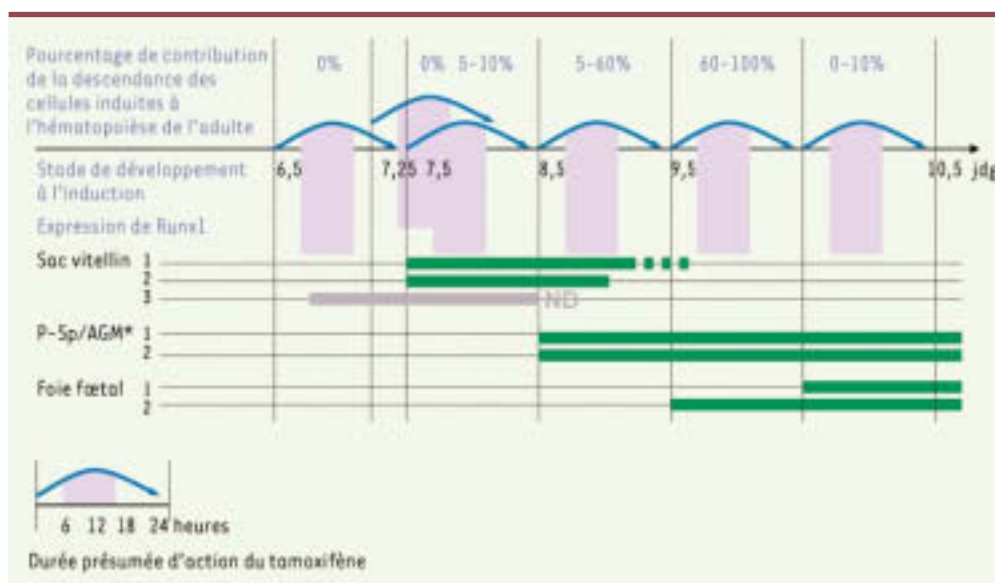


Figure 2. Contribution de la descendance des cellules marquées à l'hématopoïèse adulte. Panneau supérieur : pourcentage de contribution à l'hématopoïèse de l'adulte de la descendance des cellules marquées, en fonction du stade de gestation au moment du traitement par le tamoxifène (panneau médian), marqué par le début de la flèche bleue (qui indique la durée possible d'action du tamoxifène). Le panneau inférieur résume les données connues de l'expression de Runx1 au cours du développement hématopoïétique, déterminées par la détection, soit de l'activité β -galactosidase chez des embryons *Runx^{LacZ/+}* (1 [13, 14] ; 2 [4]), soit des transcrits de Runx1 par hybridation *in situ* sur des embryons sauvages (3 [8]). *Alors que la localisation des précurseurs hématopoïétiques dans le site hématogène est connue après 10 jdg (dans l'AGM), nous n'avons pas d'information pour les stades antérieurs (dans la P-Sp). L'expression de Runx1 est donc montrée de façon globale, dans les régions montrées *in vivo* et *in vitro* comme contenant des CSH, et cela sans tenir compte du marquage des cellules circulantes provenant du SV.

promoteur de Runx1, serait alors moins efficace dans l'induction de la recombinaison des sites lox-p.

L'ensemble des expériences décrites dans cette publication a été réalisé sur des embryons hétérozygotes pour l'expression de Runx1, puisque l'insertion de la cassette MER-CRE-MER dans le locus Runx-1 entraîne l'inactivation de la séquence codante. Or, plusieurs groupes ont montré qu'une réduction de dosage de Runx1 entraînait des anomalies du développement hématopoïétique, avec une accélération de 12 à 24 heures de l'apparition des CFU-S dans le sac vitellin et des CSH dans la P-Sp/AGM [11, 12]. Cet effet renforce les interrogations déjà mentionnées sur la durée d'action du tamoxifène, puisque l'effet « accélérateur du développement hématopoïétique » résultant de l'haplo-insuffisance pourrait permettre le ciblage de précurseurs intra-embryonnaires lors d'inductions effectuées à 7,5 jdg. Il conviendrait donc de vérifier les résultats présentés dans cette publication en appliquant une stratégie similaire avec un gène qui n'affecte pas la cinétique d'apparition des précurseurs hématopoïétiques.

L'hypothèse, envisagée par les auteurs, selon laquelle les cellules responsables de la contribution adulte pourraient provenir du SV et domicilier au niveau de la P-Sp/AGM ne reçoit pas de démonstration effective, puisque les cellules de l'AGM ne sont pas identifiables clairement par marquage de l'activité

β -galactosidase lors d'une induction effectuée à 7,5 jdg (comparer le marquage de l'aorte « induite » de la figure 4C de [4], avec le marquage endogène de la figure 1 de [4]). Par ailleurs, il a été précédemment montré que le territoire présomptif de la P-Sp/AGM, explanté avant circulation et maintenu en culture organotypique, pouvait engendrer des CSH, démontrant l'origine indépendante des précurseurs des deux sites. En considérant qu'une migration interstitielle des cellules du SV ait pu « contaminer » le territoire présomptif de la P-Sp/AGM, avant circulation lors de ces expériences, l'induction de Runx1 effectuée à 7,25-7,5 jdg devrait alors entraîner le marquage des cellules de ce territoire, ce qui n'est pas observé (figure supplémentaire 5 de [4]).

L'avancée la plus marquante de cette publication reste la démonstration, jusqu'ici inexistante, que toutes les cellules hématopoïétiques de l'adulte dérivent d'une réserve établie pendant l'ontogenèse, qu'il ne se produit pas de nouvelle génération de CSH après le jour 11 de gestation, et que les premières cellules hématopoïétiques, engendrées dans le sac vitellin à 7,25 jdg ne contribuent pas à l'hématopoïèse adulte. ♦

Hematopoietic stem cells : where do they come from at last ?

RÉFÉRENCES

1. Godin I, Cumano A. The hare and the tortoise : an embryonic haematopoietic race. *Nat Rev Immunol* 2002 ; 2 : 593-604.

2. Bechtold TE, Smith PB, Turpen JB. Differential stem cell contributions to thymocyte succession during development of *Xenopus laevis*. *J Immunol* 1992 ; 148 : 2975-82.

3. Weissman I, Papaioannou V, Gardner R. Fetal hematopoietic origins of the adult hemolymphoid system. In : Clarkson B, Mark P, Till J, eds. *Differentiation of normal and neoplastic cells*, vol. 5. New York : Cold Spring Harbour Laboratory, 1978 : 33-47.

4. Samokhvalov IM, Samokhvalova NI, Nishikawa S. Cell tracing shows the contribution of the yolk sac to adult haematopoiesis. *Nature* 2007 ; 446 : 1056-61.

5. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol* 2007 ; 25 : 745-85.

6. Wang Q, Stacy T, Binder M, et al. Disruption of the *Cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 3444-9.

7. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, et al. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996 ; 84 : 321-30.

8. Lacaud G, Gore L, Kennedy M, et al. Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro. *Blood* 2002 ; 100 : 458-66.

9. Downs KM, Davies T. Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* 1993 ; 118 : 1255-66.


10. Samokhvalov IM, Thomson AM, Lalancette C, et al. Multifunctional reversible knockout/reporter system enabling fully functional reconstitution of the AML1/Runx1 locus and rescue of hematopoiesis. *Genesis* 2006 ; 44 : 115-21.

11. Cai Z, de Bruijn M, Ma X, et al. Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity* 2000 ; 13 : 423-31.

12. Lacaud G, Kouskoff V, Trumble A, et al. Haploinsufficiency of Runx1 results in the acceleration of mesodermal development and hemangioblast specification upon *in vitro* differentiation of ES cells. *Blood* 2004 ; 103 : 886-9.

13. North T, Gu TL, Stacy T, et al. *Cbfa2* is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development* 1999 ; 126 : 2563-75.

14. North TE, de Bruijn MF, Stacy T, et al. Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity* 2002 ; 16 : 661-72.



Tarifs d'abonnement M/S - 2007

Abonnez-vous

à Médecine/Sciences

> Depuis 20 ans, grâce à m/s, vous vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement
page 678 dans ce numéro de m/s

