

HoxB4 : un déterminant crucial du potentiel de reconstitution de l'hématopoïèse définitive dans les cellules embryonnaires

Françoise Sainteny

> L'hématopoïèse qui se développe dans les corps embryonnaires (EB) dérivés des cellules souches embryonnaires (cellules ES) de souris récapitule l'hématopoïèse embryonnaire du sac vitellin. Comme les cellules souches du sac vitellin, les cellules hématopoïétiques dérivées des cellules ES ont longtemps été considérées comme incapables de reconstituer à long terme le tissu hématopoïétique d'une souris irradiée, incapacité attribuée soit à l'immaturité de ces cellules, soit à des anomalies dans leur adressage à la moelle osseuse [1, 2]. Les tentatives ont toujours donné lieu à des reconstitutions lymphoïdes et/ou myéloïdes partielles et éphémères [1-4]. En aucun cas, une reconstitution hématopoïétique de receveurs secondaires par la moelle des receveurs primaires n'a été observée. Cela signe l'absence, ou la faible concentration, dans la moelle primaire, de cellules primitives répondant aux critères de définition de la cellule souche hématopoïétique (CSH), autorenouvellement et multipotentialité.

Les mécanismes moléculaires contrôlant le passage de l'hématopoïèse primitive à l'hématopoïèse définitive sont très mal connus. On sait cependant que plusieurs homéogènes sont exprimés dans les CSH définitives, à l'inverse de celles du sac vitellin. Il s'agit de *HoxB3*, *B4*, *A4* et *A5* [5]. Ainsi, *HoxB4* apparaissait comme un bon candidat pour promouvoir l'hématopoïèse définitive. On savait par ailleurs que : (1) l'introduction d'*HoxB4* dans la moelle osseuse adulte induit une stimulation de la

capacité de repopulation de cette dernière sans interférer avec la différenciation [6] ; (2) *HoxB4* est impliqué dans l'autorenouvellement des CSH définitives [6] ; (3) *HoxB4* stimule la production de colonies hématopoïétiques mixtes (contenant des cellules de plusieurs lignées) à partir des cellules ES [7]. Une étude parue au mois d'avril 2002 dans la revue *Cell* montre que l'expression ectopique du gène *HoxB4* dans les cellules ES, associée à leur co-culture avec une lignée stromale, induit la commutation de l'hématopoïèse primitive dérivée de cellules ES à l'hématopoïèse définitive et permet la reconstitution lympho-myéloïde à long terme de receveurs primaires et secondaires [8]. Les cellules du sac vitellin acquièrent les mêmes propriétés en subissant le même traitement. L'expression d'*HoxB4* dans les cellules de sacs vitellins prélevés avant la mise en circulation du sang (stade E8,25) est obtenue à l'aide d'un rétrovirus co-exprimant la GFP, protéine fluorescente qui permet la sélection des cellules infectées, puis leur identification et leur tri dans la moelle des souris receveuses. Une phase de culture des cellules transduites avec la lignée stromale murine Op9, qui permet le développement des progéniteurs hématopoïétiques dérivés des cellules ES [9] est introduite dans le protocole avant injection à des souris adultes irradiées létalement. Ces receveurs présentent une reconstitution myélo-lymphoïde de type donneur (GFP⁺) importante : 15, 34, 26 et 5 % de cellules de moelle sont respectivement Gr1⁺ (granuleux), Mac-1⁺ (macrophages),

Inserm U.362, Institut Gustave Roussy, 39, rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France.

B220⁺ (lymphocytes B) et CD8⁺ (lymphocytes T). La moelle de ces receveurs primaires est capable de reconstituer des receveurs secondaires jusqu'à cinq mois au moins après la greffe : à ce stade, le sang périphérique de ces derniers contient, parmi les cellules dérivées de la moelle primaire (GFP⁺), 80 % de cellules positives pour GR-1, 8 % pour B220 et 9 % pour CD4 ou CD8. L'expression d'*HoxB4* dans les pré-curseurs primitifs du sac vitellin induit donc un potentiel de CSH définitives.

L'expression d'*HoxB4* au cours de la différenciation des cellules ES a été réalisée grâce à l'introduction dans les cellules ES d'un transgène dans lequel la séquence d'*HoxB4* est placée sous le contrôle d'un promoteur inducible par la doxycycline (Figure 1). L'expression d'*HoxB4* est induite au 4^e jour de différenciation des cellules ES en corps embryonnaires et ceci pendant 48 heures. Cette période de différenciation a été choisie car elle correspond probablement à l'étape au cours de laquelle l'hémangioblaste dérivé des cellules ES (→) s'engage dans la différenciation vers la CSH primitive. La culture en méthylcellulose des cellules d'EB à l'issue de la période de surexpression

du gène *HoxB4* montre que celle-ci induit une stimulation très marquée des progéniteurs les plus primitifs détectables par ce test, les CFU-GEMM (*colony-forming unit granulocyte-erythroid-macrophage-*

(→) m/s
 1999, n°2,
 p. 292



megakaryocyte), alors que les CFU-GEMM produites par les cellules d'EB non transfectées sont rares et ont un potentiel érythroïde très limité. Les colonies dérivées des EB exprimant *HoxB4* sont, comme celles de la moelle, de plus grande taille, très denses et majoritairement érythroïdes. Les cellules d'EBs sont ensuite cultivées sur la lignée Op9 en présence de cytokines et en maintenant l'induction d'*HoxB4* par la doxycycline. Des colonies semi-adhérentes de type blastique se développent, majoritairement composées de cellules exprimant des marqueurs caractéristiques de la CSH définitive, c-kit (81 % des cellules) et CD31 (78 %). Une plus faible proportion de cellules exprime les marqueurs de différenciation macrophagique (Mac-1 : 21 %) et granulocytaire (Gr-1 : 6 %). Les marqueurs érythroïde (Ter119) et lymphocytaire (B220) sont encore plus minoritaires (0,7 et 0,6 %). La culture des cellules surexprimant *HoxB4* aboutit donc à la formation d'une population de CSH primitives qui semblent s'autorenouveler mais se différencier. Cette population, peu analysée par RT-PCR, exprime la globine β majeure, suggérant que l'expression d'*HoxB4* et la lignée Op9 éteignent l'érythropoïèse embryonnaire. Un autre élément important est l'activation de l'expression du récepteur de la chimiokine SDF-1, CXCR-4, dont la présence est requise pour l'adressage des cellules souches à la moelle osseuse [9, 10] et celle du gène *Tel*, impliquée dans la transition de l'hématopoïèse du foie fœtal à celle de la moelle osseuse [11]

prouvant que l'expression d'*HoxB4*, combinée à une phase d'expansion cellulaire sur la lignée Op9, confère l'apparition des marqueurs de l'hématopoïèse définitive à des cellules dérivées de cellules embryonnaires. La capacité des cellules ES de reconstituer l'hématopoïèse à long terme, prouvant la présence de CSH primitives, est clairement montrée. Cinq à 32 % de cellules d'origine du greffon (GFP⁺) sont retrouvées dans la moelle des receveurs irradiés 2 semaines après la greffe. Quinze semaines plus tard, une reconstitution substantielle de tous les lignages est observée : reconstitution myéloïde GR-1⁺

(71 %), Mac-1, et lymphoïde (B220⁺ : 30 %, CD4⁺ : 22 % et CD8⁺ : 5 %). Les marqueurs des CSH, c-kit, Sca-1 et AA4-1 sont aussi détectés sur les cellules GFP⁺ de la moelle des receveurs. L'induction d'*HoxB4* *in vivo* n'est pas nécessaire pour obtenir la prise de greffe, suggérant que l'expression d'*HoxB4* pendant la phase de culture suffit à conférer le potentiel de reconstitution de l'hématopoïèse définitive aux cellules dérivées des cellules ES. Ces cellules ont la capacité de reconstituer des receveurs secondaires pendant au moins 5 mois, montrant sans aucune ambiguïté que l'induction transitoire d'*HoxB4* dans

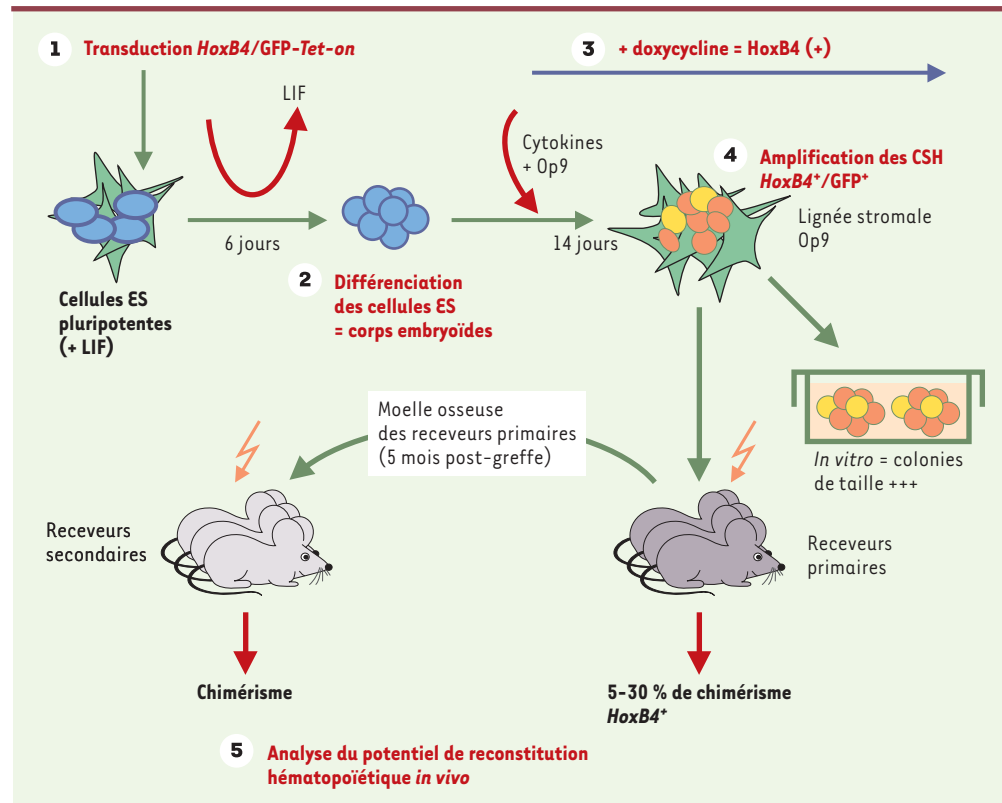


Figure 1. Induction d'un potentiel de cellule souche hématopoïétique définitive dans les cellules ES. Les cellules ES, maintenues à l'état pluripotent en présence d'une source de LIF (*leukemia inhibiting factor*), sont transduites avec un rétrovirus codant pour *HoxB4* sous contrôle d'un promoteur inducible par la doxycycline. Les cellules ES sont sevrées de LIF, ce qui entraîne leur différenciation en corps embryoides. Ceux-ci sont exposés 48 heures à la doxycycline pour induire *HoxB4* et transférés pendant 14 jours en présence de cytokines et de la lignée stromale Op9. L'ajout de doxycycline est prolongé. Le potentiel des cellules obtenues après cette phase d'amplification cellulaire est analysé *in vitro* (test de colonies) et *in vivo* dans un système de transplantation hématopoïétique à des receveurs irradiés. La moelle et le sang des receveurs sont analysés pour la présence de cellules d'origine de donneur, et la moelle est injectée à des receveurs secondaires irradiés afin de tester la présence, chez le receveur primaire, de cellules souches hématopoïétiques. Il faut noter que l'ajout de doxycycline n'est pas maintenu *in vivo*, mais est limité aux 14 jours de culture *in vitro*.



les cellules dérivées des cellules ES a permis l'émergence d'une CSH dotée de la potentialité de reconstituer l'hématopoïèse adulte. On ne sait pas aujourd'hui si *HoxB4* détermine l'acquisition de cette potentialité chez l'embryon. De même, compte tenu de la redondance des gènes, il est possible que d'autres gènes de la famille *Hox*, notamment *HoxA4*, soient capables de provoquer l'émergence de la CSH définitive. Néanmoins, les résultats convaincants que décrit cet article sont de

première importance dans le contexte de l'aptitude des cellules ES humaines à se différencier en cellules hématopoïétiques [12] et de l'intérêt

croissant pour la thérapie cellulaire en médecine réparatrice. Il faut enfin signaler que ce modèle a permis la correction d'une anomalie génétique de la souris en combinant transplantation nucléaire, thérapie génique et cellulaire [13] (→). ♦

HOXB4 triggers long term reconstituting capability to ES cells and yolk sac-derived cells

(→) m/s
2002, n°6-7,
p. 651

RÉFÉRENCES

1. Muller A, Dzierzak EA. ES cells have only a limited potential after adoptive transfer into mouse recipients. *Development* 1993 ; 118 : 1343-51.
2. Yoder MC, Hiatt K. Engraftment of embryonic hematopoietic cells in conditioned newborn recipients. *Blood* 1997 ; 89 : 2176-83.
3. Potocnik AJ, Kohler H, Eichman K. Hematolymphoid *in vivo* reconstitution potential of subpopulations derived from *in vitro* differentiated embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.
4. Mitjavila MT, Filippi MD, Cohen-Solal K, et al. The Mpl-ligand is involved in the growth-promoting activity of the murine stromal cell line MS-5 on ES cell-derived hematopoiesis. *Exp Hematol* 1998 ; 26 : 124-34.
5. Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34⁺ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 12223-7.
6. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, et al. Overexpression of *HOXB4* in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations *in vitro* and *in vivo*. *Genes Dev* 1995 ; 9 : 1753-65.
7. Helgason CD, Sauvageau G, Lawrence HJ, Largman C, Humpries RK. Overexpression of *HOXB4* enhances the hematopoietic potential of embryonic stem cells differentiated *in vitro*. *Blood* 1996 ; 87 : 2740-9.
8. Kyba M, Perlingeiro RCR, Daley GQ. *HoxB4* confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* 2002 ; 109 : 29-37.
9. Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 1994 ; 265 : 1098-101.
10. Peled A, Petit I, Kollet O, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999 ; 283 : 845-7.
11. Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, et al. The *TEL/ETV6* gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 1998 ; 12 : 2392-402.
12. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 10716-21.
13. Rideout WM, 3rd, Hochedlinger K, Kyba M, Daley GQ, Jaenisch R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 2002 ; 109 : 17-27.

NOUVELLE

« Clonage thérapeutique » : de la théorie à la pratique

Laure Coulombel

> L'article publié par le groupe de R. Jaenisch dans *Cell* [1] est remarquable à plus d'un titre : c'est le premier essai expérimental grandeur nature de réparation génétique chez la souris à partir de cellules ES (*embryonic stem cells*) obtenues par transfert de noyaux somatiques. Succès oui, mais partiel en raison de la survenue de problèmes inattendus... Ce qui frappe aussi à la lecture de cet article, c'est que le travail tire parti de toutes les technologies de manipulation du génome développées au cours de ces

10 dernières années, recombinaison homologue dans les cellules ES, excision génétique par le système *Cre/lox*, transfert nucléaire, et, à ce titre, montre l'ampleur du chemin parcouru et la maîtrise acquise.

Les auteurs ont choisi de « réparer » le déficit immunitaire des souris *Rag2*^{-/-}. Ces animaux, dont la mutation a été créée par recombinaison homologue, sont dépourvus de la recombinaison permettant le réarrangement des gènes d'immunoglobulines formant les récepteurs TCR et

BCR. Il en résulte un profond déficit immunitaire. La lignée NK (*natural killer*), dont la différenciation ne comprend

aucune étape de réarrangement génique, est épargnée, ce qui a son importance pour la suite de l'histoire [2].

Première étape, obtenir une lignée de cellules ES « autologue » à partir d'une cellule somatique de ces souris par transfert nucléaire [3, 4] (*Figure 1*). Les noyaux de cellules de souris *Rag2*^{-/-} mâles ont été transférés dans des ovocytes énucléés bloqués au stade de métaphase II (202 ovocytes injectés), et ces cellules ont progressé jusqu'au stade de blastocystes « artificiellement »

Inserm U.421,
Faculté de médecine,
8, rue du Général Sarrail,
94010 Créteil, France.