



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 *TSL/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 homologe 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 homologe, 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.

(c'est-à-dire en l'absence de fécondation). Sur les 202 ovocytes, 27 se sont développés jusqu'au stade de blastocystes, mais une seule lignée de cellules ES *Rag2*^{-/-} (que l'on nomme ntES, pour *nuclear transfer*) a pu être dérivée de la masse interne de ces blastocystes. Avant de « réparer ces cellules ES » encore fallait-il s'assurer de leur « pluripotence », c'est-à-dire de leur capacité à contribuer *in vivo* à la constitution de tous les tissus embryonnaires. Or, les cellules ES ayant perdu la capacité de donner les annexes (placenta) requises pour le développement d'un embryon viable, elles doivent être « complétées », ce qui est fait par leur agrégation à des cellules embryonnaires tétraploïdes (obtenues par électrofusion de cellules embryonnaires au stade deux cellules) [5]. Dans ces conditions, tous les tissus des embryons dérivent des cellules ES et les annexes des cellules tétraploïdes. Des 14 embryons tétraploïdes injectés avec des cellules ES, et de leur masse interne une lignée de cellules ES (*ntES-Rag2*^{-/-}) est dérivée. **Étape 2** : la mutation inactivatrice de *Rag2* est corrigée sur un allèle dans ces cellules *ntES-Rag2*^{-/-} par recombinaison homologue. **Étape 3** : une population de cellules souches hématopoïétiques est obtenue à partir de ces cellules *ntES-Rag2*^{+R/-}. Des corps embryonnaires sont tout d'abord obtenus spontanément à partir des cellules ES par le retrait du LIF, puis les cellules des corps embryonnaires sont transduites par l'ADNc *HoxB4* par l'intermédiaire d'un rétrovirus murin. L'expression de *HoxB4* entraîne la conversion des cellules des corps embryonnaires en une population de cellules souches hématopoïétiques (CSH) que l'on peut amplifier *in vitro*. **Étape 4** : la transplantation de ces CSH dérivant des *ntES-Rag2*^{+R/-} aux souris *Rag2*^{-/-} assure en théorie la réparation du déficit immunitaire, et ne devrait pas poser de problèmes de compatibilité immunologique. En réalité (voir texte), les auteurs se sont heurtés à un rejet de la greffe par les cellules NK des receveurs, les obligeant à utiliser comme receveurs des souris *Rag2*^{-/-} croisées avec des souris dépourvues de la chaîne γ c, commune aux récepteurs des interleukines 2, 7, 9, 15, et donc indispensable à la prolifération NK. La partie **B** du dessin schématise la stratégie utilisée pour vérifier la fonction pluripotente des cellules ntES et *ntES-Rag2*^{+R/-}.

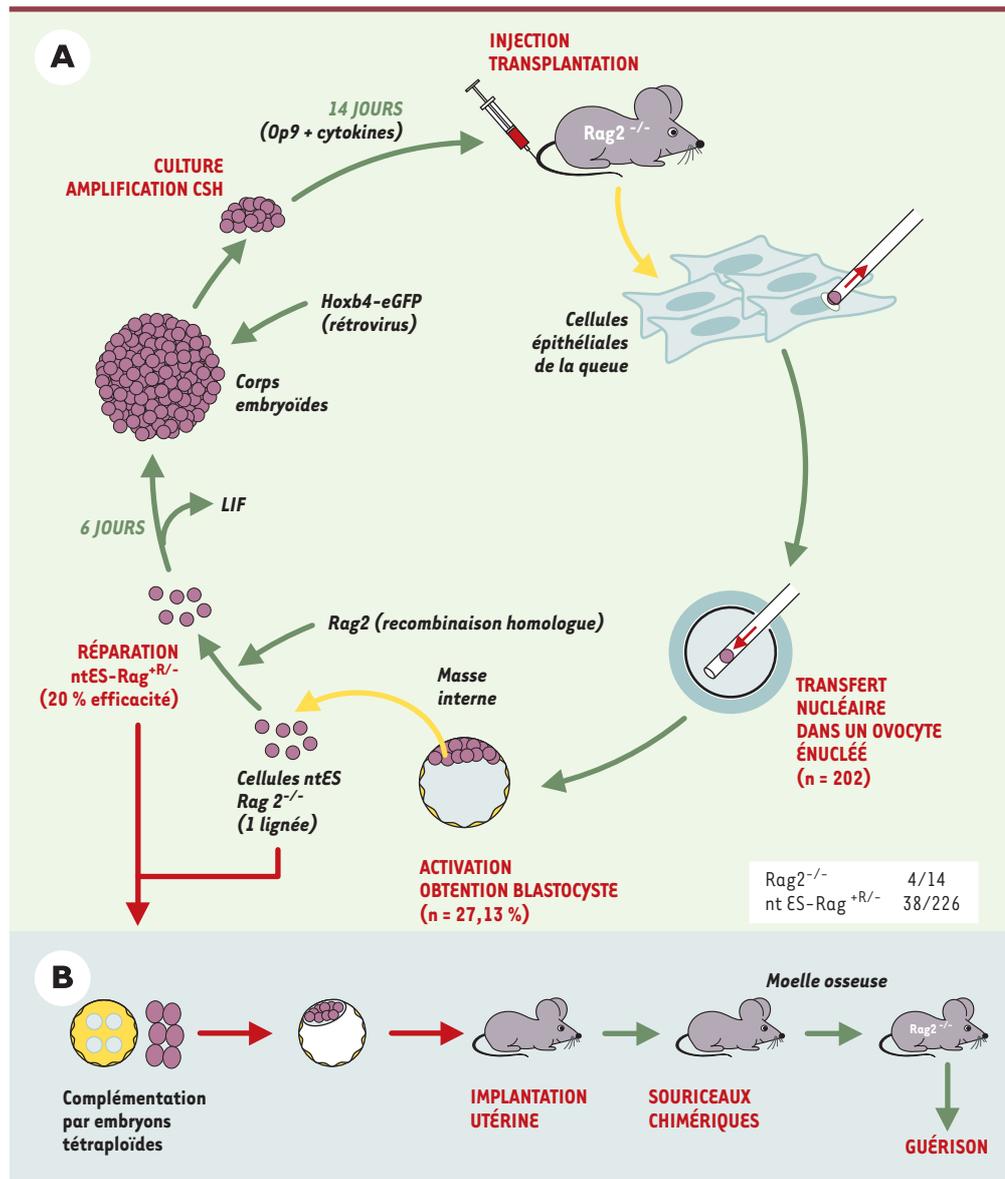


Figure 1. Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la réparation par transfert nucléaire du déficit des souris *Rag2*^{-/-}. **A. Étape 1** : les cellules isolées de la queue des souris sont cultivées *in vitro*, puis les noyaux de ces cellules sont transférés dans des ovocytes énucléés. Cette étape conduit à l'obtention de blastocystes, et de leur masse interne une lignée de cellules ES (*ntES-Rag2*^{-/-}) est dérivée. **Étape 2** : la mutation inactivatrice de *Rag2* est corrigée sur un allèle dans ces cellules *ntES-Rag2*^{-/-} par recombinaison homologue. **Étape 3** : une population de cellules souches hématopoïétiques est obtenue à partir de ces cellules *ntES-Rag2*^{+R/-}. Des corps embryonnaires sont tout d'abord obtenus spontanément à partir des cellules ES par le retrait du LIF, puis les cellules des corps embryonnaires sont transduites par l'ADNc *HoxB4* par l'intermédiaire d'un rétrovirus murin. L'expression de *HoxB4* entraîne la conversion des cellules des corps embryonnaires en une population de cellules souches hématopoïétiques (CSH) que l'on peut amplifier *in vitro*. **Étape 4** : la transplantation de ces CSH dérivant des *ntES-Rag2*^{+R/-} aux souris *Rag2*^{-/-} assure en théorie la réparation du déficit immunitaire, et ne devrait pas poser de problèmes de compatibilité immunologique. En réalité (voir texte), les auteurs se sont heurtés à un rejet de la greffe par les cellules NK des receveurs, les obligeant à utiliser comme receveurs des souris *Rag2*^{-/-} croisées avec des souris dépourvues de la chaîne γ c, commune aux récepteurs des interleukines 2, 7, 9, 15, et donc indispensable à la prolifération NK. La partie **B** du dessin schématise la stratégie utilisée pour vérifier la fonction pluripotente des cellules ntES et *ntES-Rag2*^{+R/-}.



inséré dans la construction remplaçant l'exon 3 de *Rag2* et flanqué de la séquence *loxP* étant excisé secondairement par la recombinaison Cre exprimée par transfection transitoire de l'ADNc. À nouveau, la fonctionnalité de ces cellules ES « réparées » (ou *ntES-Rag^{R/+}*) a été analysée après leur complémentarité avec des embryons tétraploïdes (38 naissances sur 226 embryons tétraploïdes injectés). L'analyse des paramètres hématologiques des souriceaux nés, en particulier du nombre de lymphocytes B et T circulants, du taux d'immunoglobulines, et de la polyclonalité des réarrangements des récepteurs T et B a confirmé la restauration d'un développement lymphoïde T et B normal. Qui plus est, la moelle et le sang néonatal de ces animaux nés de cellules *ntES-Rag^{R/+}* étaient capables, après leur transplantation à des animaux *Rag2^{-/-}* initiaux, de corriger le déficit immunitaire, démontrant bien la fonctionnalité de ces cellules ES « réparées ». Mais, l'obtention de souris à partir de ces cellules ES réparées, sources de tissus à greffer, n'étant évidemment possible que dans cette situation expérimentale et pas chez l'homme, il fallait démontrer que ces cellules ES pouvaient se différencier *ex vivo* en cellules souches hématopoïétiques, seules utilisables comme greffon dans une perspective d'application clinique. Greffées aux souris *Rag2^{-/-}*, elles corrigeraient alors les conséquences du déficit des cellules souches hématopoïétiques endogènes. Rappelons que l'absence de lignées lymphoïdes B et T endogènes confère un avantage sélectif pour le développement de lignées lymphoïdes à partir d'un greffon normal, et ce même en l'absence de conditionnement (c'est-à-dire de déplétion de l'hématopoïèse endogène, nécessaire pour que la greffe prenne). Ce même avantage sélectif était présent chez les patients atteints de XSCID traités par l'équipe de A.

(→) m/s
2000, n°5,
p. 681

Fisher (→).
Mais cette démarche se heurtait à deux écueils

majeurs : l'un était l'impossibilité jusqu'à maintenant de pouvoir reconstituer le système hématopoïétique de souris irradiées par des cellules ES injectées par voie intraveineuse (voie habituelle de la transplantation de cellules médullaires). Le second provenait de notre incapacité d'identifier, *ex vivo*, à quel moment les cellules ES s'engagent dans la voie hématopoïétique, et ce en raison de l'absence de marqueurs directs, immunologiques ou autres. C'est là qu'intervient à point nommé le travail de l'équipe de Kyba publié simultanément dans *Cell* [6], s'inspirant probablement des travaux pionniers du groupe de K. Humphries [7], et identifiant *HoxB4* comme l'élément clé de la restriction du potentiel de cellules ES pluripotentes vers les lignées somatiques hématopoïétiques. F. Sainteny nous apprend dans une nouvelle publiée conjointement (→) en quoi ce travail est une découverte majeure.

Il fallait donc ajouter une étape supplémentaire de transduction du gène *HoxB4* dans les corps embryoides obtenus à partir de ces cellules *ntES-Rag2^{R/+}* sevrées de LIF (*leukemia inhibiting factor*), ce qui entraîne immédiatement leur différenciation et la perte de leur pluripotentialité. Les cellules transduites étaient ensuite cultivées pendant 14 jours en présence de cytokines hématopoïétiques, puis injectées aux receveurs *Rag2^{-/-}* irradiés. C'est ce qui a été fait, mais, alors qu'on touchait au but, une observation inattendue a grippé le système : l'absence de chimérisme observée après l'administration de cellules « *ntES-Rag2^{R/+}-Hox-B4* » aux souris *Rag2^{-/-}*. Les coupables sont les cellules *natural killer* (NK) des souris *Rag2^{-/-}*, présentes en nombre normal et tout à fait fonctionnelles. Les cellules NK repèrent tout intrus qui n'exprime pas les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), qu'il soit autologue ou allogénique, et l'élimine [8]. *A priori*, on pouvait espérer, c'était

même sa principale justification, que le clonage « thérapeutique » par transfert nucléaire ne modifierait pas le statut immunologique des cellules puisque le donneur et le receveur sont une seule et même personne. Oui, mais... encore faut-il que l'expression des molécules HLA à la surface des cellules ne soit pas modifiée, surtout diminuée, sous l'effet de signaux divers, ce qui risquerait de déclencher l'activation cytotoxique indésirable des cellules NK. C'est exactement la situation à laquelle a été confrontée l'équipe de Jaenish : les cellules ES induites en cellules souches hématopoïétiques par *HoxB4* n'exprimaient plus autant de molécules HLA de classe I H2-Kb et H2-Db. Il n'y a pas encore d'explication claire à cette observation, mais on peut remarquer que les cellules embryonnaires du sac vitellin ont, elles aussi, une faible expression des molécules du CMH. Frustrés de ne pouvoir évaluer l'efficacité thérapeutique éventuelle des cellules « *ntES-Rag2^{R/+}-HoxB4* », les auteurs ont débarrassé les souris *Rag2^{-/-}* de leurs cellules NK soit par immunodéplétion en les traitant par l'anticorps anti-NK1.1, ce qui s'est avéré insuffisant, soit en les croisant avec des souris dépourvues de la chaîne γ c du récepteur de l'IL-2 (entre autres interleukines) [9]. Chez ces souris *Rag2^{-/-}* x γ c^{-/-} greffées avec des cellules « *ntES-Rag2^{R/+}-HoxB4* », on a pu observer effectivement une reconstitution polyclonale, quoique incomplète, des lignées B et T, avec la restauration d'un certain degré de fonctionnalité de la fonction immune, synthèse et sécrétion d'immunoglobulines notamment. L'efficacité était cependant bien inférieure à la reconstitution observée dans les souriceaux nés de la complémentarité des embryons tétraploïdes par les cellules *ntES-Rag^{R/+}*. Il semble s'agir surtout d'une anomalie de la différenciation terminale, surtout T, et peut-être d'un frein au passage des cellules dans la circulation. Les auteurs privilégient l'hypothèse d'une interférence de l'expression

de *HoxB4* avec la différenciation lymphoïde, puisque sa surexpression dans d'autres circonstances entraîne une différenciation myéloïde privilégiée.

La morale de cette superbe histoire est que la difficulté survient là on ne l'attend pas nécessairement. Cela confirme, s'il en était besoin, que nous avons du pain sur la planche avant que ne paraisse dans *Cell* le premier article sur l'efficacité thérapeutique du transfert nucléaire chez l'homme. *médecine/sciences* 2020 ? ♦

Therapeutic cloning: illustration in *Rag*^{-/-} mutant mice

RÉFÉRENCES

1. Rideout WM, 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.
2. Notarangelo LD, Villa A, Schwartz K. RAG and RAG defects. *Curr Opin Immunol* 1999 ; 11 : 435-42.
3. Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, Yanagimachi R, Mombaerts P. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 14984-9.
4. Jouveau A, Renard JP. Cellules souches embryonnaires et clonage thérapeutique. *Med Sci* 2002 ; 18 : 169-80.
5. Wang ZQ, Kiefer F, Urbaneck P, Wagner EF. Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech Dev* 1997 ; 62 : 137-45.
6. 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.
7. 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.
8. Schleinitz N, Lopez F, Vivier E, Vely F. Les cellules *natural killer* : tuer ou ne pas tuer ? *Med Sci* 2001 ; 17 : 504-9.
9. Mazurier F, Fontanellas A, Salette S, et al. A novel immunodeficient mouse model-RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants-requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. *J Interferon Cytokine Res* 1999 ; 19 : 533-41.

NOUVELLE

L'érythropoïétine : un facteur de croissance neuronale

Patrick Mayeux

Département d'Hématologie,
Institut Cochin,
27, rue du Faubourg Saint-Jacques,
75014 Paris, France.

> L'érythropoïétine (Epo) est bien connue comme facteur de croissance hématopoïétique contrôlant la production de globules rouges. L'inactivation des gènes codant pour l'Epo [1] ou son récepteur (EpoR) [1-3] est létale chez la souris. La mort des animaux survient entre 13 et 14 jours de gestation et est due à l'absence de globules rouges issus de l'érythropoïèse « définitive » dans le foie. Au tout début de la gestation, les érythrocytes, qui sont nucléés, sont produits dans une annexe extra-embryonnaire, le sac vitellin, et cette érythropoïèse, dite primitive, est partiellement indépendante de l'Epo. En revanche, à partir du 12^e jour de gestation chez la souris, le foie devient le principal site de

l'érythropoïèse. Cette érythropoïèse hépatique est très comparable à l'érythropoïèse médullaire définitive tant par le type de globules rouges produits - ceux-ci sont énucléés - que des mécanismes de contrôle de cette production. En particulier, comme c'est le cas pour l'érythropoïèse médullaire, l'érythropoïèse hépatique est strictement dépendante de l'Epo, hormone indispensable pour assurer la survie et la prolifération des progéniteurs érythroïdes. La mort précoce par anémie des souris dont les gènes codant pour l'Epo ou pour son récepteur avaient été invalidés n'avait pas permis, dans les expériences initiales, d'identifier d'autres actions importantes de l'Epo. Un défaut de développement car-

diacque avait été rapporté chez ces souris en 1999 [4] et, récemment, un article publié par le groupe de T. Noguchi montre que l'EpoR est aussi impliqué dans la formation du cortex cérébral [5]. Ces auteurs montrent d'abord par immunohistochimie une forte expression de l'EpoR, à partir de 10,5 jours de gestation, dans toutes les couches neuro-épithéliales (zones germinatives) du cerveau, dont le cortex. L'expression du récepteur diminue ensuite graduellement au cours des jours suivants selon un axe rostro-caudal, et se restreint d'abord à la zone intermédiaire sous-ventriculaire. Le cerveau des souris *EpoR*^{-/-} présente plusieurs défauts. Une hypoplasie tissulaire de la couche neuro-épithéliale dans la région adjacente au quatrième