

Le globule rouge de culture : une nouvelle étape dans l'ingénierie cellulaire

Marie-Catherine Giarratana, Luc Douay

EA 1638, Prolifération
et différenciation cellulaire,
CHU Saint-Antoine,
Université Pierre et Marie
Curie, 27, rue de Chaligny,
75012 Paris, France.
luc.douay@trs.aphp.fr

> L'une des caractéristiques majeures du globule rouge (GR) humain est d'être la seule cellule à avoir une durée de vie prolongée (120 jours) malgré l'absence de noyau. L'organisme contient 4 à 5 × 10¹² GR totalement renouvelés en trois semaines dans des conditions physiologiques. Les mécanismes de l'énucléation sont soupçonnés [1, 2] mais non formellement établis faute de conditions expérimentales permettant la production massive *ex vivo* de GR. De telles conditions doivent en effet répondre à trois impératifs : l'amplification massive des cellules souches hématopoïétiques (CSH) primitives, l'induction contrôlée d'une différenciation exclusive vers la voie érythroïde et l'achèvement d'une maturation terminale jusqu'au stade de la cellule énucléée. S'il est relativement aisé d'obtenir une différenciation érythroïde sélective [3], les données de la littérature font toutefois état soit d'une importante prolifération cellulaire sans maturation terminale [4], soit de l'obtention de l'énucléation mais avec une amplification réduite [5]. Aucune condition *ex vivo* n'a été à ce jour décrite qui permette d'associer une prolifération massive et une énucléation de la totalité des érythroblastes.

Nous avons précédemment rapporté un protocole d'expansion de CSH issues de sang de cordon dans un milieu défini et sans stroma, reposant sur l'ajout séquentiel de facteurs de croissance [6]. Partant de cellules CD34⁺, ce proto-

cole permet une production cellulaire massive (jusqu'à une amplification de 200 000 fois) et pure de précurseurs érythroïdes (95 % à 99 %). Contrairement à nos observations *ex vivo*, ces progéniteurs/précurseurs injectés à la souris NOD/SCID (*non-obese diabetic severe combined immunodeficient*, modèle animal utilisé classiquement pour l'analyse de la reconstitution *in vivo* de CSH) sont capables de continuer à proliférer *in vivo* et de se différencier en quatre jours jusqu'au stade terminal de cellules énucléées, confirmant le rôle majeur du micro-environnement dans la différenciation érythroïde terminale (Figure 1). L'hématopoïèse *in vivo* chez l'homme adulte est en effet obtenue grâce à un processus dynamique de fabrication situé dans la moelle osseuse, à partir d'une minorité de CSH, selon une hiérarchie cellulaire construite sur un modèle pyramidal (cellules souches, progéniteurs et cellules matures) [7], en étroite contact avec le micro-environnement [8]. Les cellules stromales jouent un rôle déterminant dans la sécrétion de facteurs solubles de régulation et comme cellules de la matrice extracellulaire. Les contacts intercellulaires et les facteurs solubles activateurs, ou inhibiteurs, sont des éléments clés de la régulation de l'hématopoïèse [9]. Sur la base de ces données, nous avons conçu un protocole d'expansion et de différenciation des cellules CD34⁺ d'origine sanguine, médullaire et de cellules souches en trois phases : une

première (en milieu liquide) de prolifération et d'induction de la différenciation érythroïde en présence de *stem cell factor*, d'interleukine-3 et d'érythropoïétine; une deuxième phase sur un modèle de reconstitution de micro-environnement (lignée stromale murine MS5 ou cellules mésenchymateuses humaines), en présence d'érythropoïétine seule; et une troisième phase, en présence des seules cellules stromales, sans aucun facteur de croissance [10].

Amplification massive de cellules érythroïdes

Ce protocole autorise à la fois l'expansion massive de cellules souches/progéniteurs CD34⁺ et la différenciation complète, jusqu'au stade de GR matures parfaitement fonctionnels. En effet, au 15^e jour, le plateau d'amplification cellulaire est de l'ordre de 15 000 fois pour des cellules CD34⁺ issues de la moelle osseuse ou du sang périphérique, de 30 000 fois pour celles issues de cytophères mobilisées par un facteur de croissance, le *granulocyte-colony-stimulating factor* (G-CSF), et 140 000 fois pour celles provenant de sang de cordon. À J15, 98 % des cellules sont des réticulocytes. À J18, près de 100 % des cellules sont des GR énucléés ayant toutes les caractéristiques morphologiques de GR natifs (Figure 1). La prolifération peut atteindre 2 × 10⁶ fois en prolongeant simplement la première phase pendant trois jours supplémentaires.



Les réticulocytes et les globules rouges de culture sont parfaitement normaux tant en ce qui concerne : (1) leur contenu enzymatique (glucose-6-phosphate-déshydrogénase, pyruvate-kinase), ce qui témoigne de leur capacité à réduire le glutathion et à maintenir la concentration d'ATP pour éviter l'accumulation de 2-3 diphosphoglycérate qui produirait une diminution d'affinité de l'hémoglobine ; (2) leur membrane, leur assurant une parfaite capacité de déformation (évaluée par ektacytométrie et analyse des protéines) ; (3) leur hémoglobine, qui se comporte comme une hémoglobine tétramérique, capable de fixer et de relarguer l'oxygène (établi par photodissociation par flash laser et mesure de la saturation en oxygène) ; (4) leur capacité de survivre *in vivo*, évaluée par injection à la souris NOD/SCID.

Un modèle multidisciplinaire

Nous avons ainsi établi une méthodologie de production en grand nombre de globules rouges humains matures, à partir de cellule souches hématopoïétiques de diverses origines cultivées *ex vivo*. Ce nouveau concept de « globule rouge de culture » est utile à l'analyse fondamentale des mécanismes de l'érythropoïèse terminale non encore complètement identifiés et à la compréhension de la synthèse de l'hémoglobine encore mystérieuse. Il est évidemment extrapolable à une approche transfusionnelle dans la mesure où l'amplification atteinte permet raisonnablement d'envisager la production de l'équivalent de deux à six concentrés globulaires standards à partir d'un prélèvement classique de cytophère ou d'un sang de cordon. Cette méthodologie peut constituer un outil simple pour l'étude du cycle de reproduction de certains agents infectieux ciblant la lignée érythroïde comme *P. falciparum*. Ce globule rouge de culture peut enfin servir de vecteur médicamenteux d'un nouveau genre. Les applications de ce modèle sont donc potentiellement importantes. ♦

**Cultured red blood cells:
a new step in cell engineering**

RÉFÉRENCES

1. Bessis M. Erythroblastic island, functional unity of bone marrow. *Rev Hematol* 1958 ; 13 : 8-11.
2. Qiu LB, Dickson H, Hajibagheri N, Crocker PR. Extruded erythroblast nuclei are bound and phagocytosed by a novel macrophage receptor. *Blood* 1995 ; 85 : 1630-9.
3. Fibach E, Manor D, Oppenheim A, Rachmilewitz EA. Proliferation and maturation of human erythroid progenitors in liquid culture. *Blood* 1989 ; 73 : 100-3.
4. von Lindern M, Zauner W, Mellitzer G, et al. The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors *in vitro*. *Blood* 1999 ; 94 : 550-9.
5. Malik P, Fisher TC, Barsky LL, et al. An *in vitro* model of human red blood cell production from hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1998 ; 91 : 2664-71.
6. Neildez-Nguyen TM, Wajzman H, Marden MC, et al. Human erythroid cells produced *ex vivo* at large scale differentiate into red blood cells *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2002 ; 20 : 467-72.
7. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993 ; 81 : 2844-53.
8. Lemischka IR. Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 1997 ; 15 (suppl 1) : 63-8.
9. Verfaillie CM. Soluble factor(s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation. *Blood* 1993 ; 82 : 2045-53.
10. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, et al. *Ex vivo* generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005 ; 23 : 69-74.

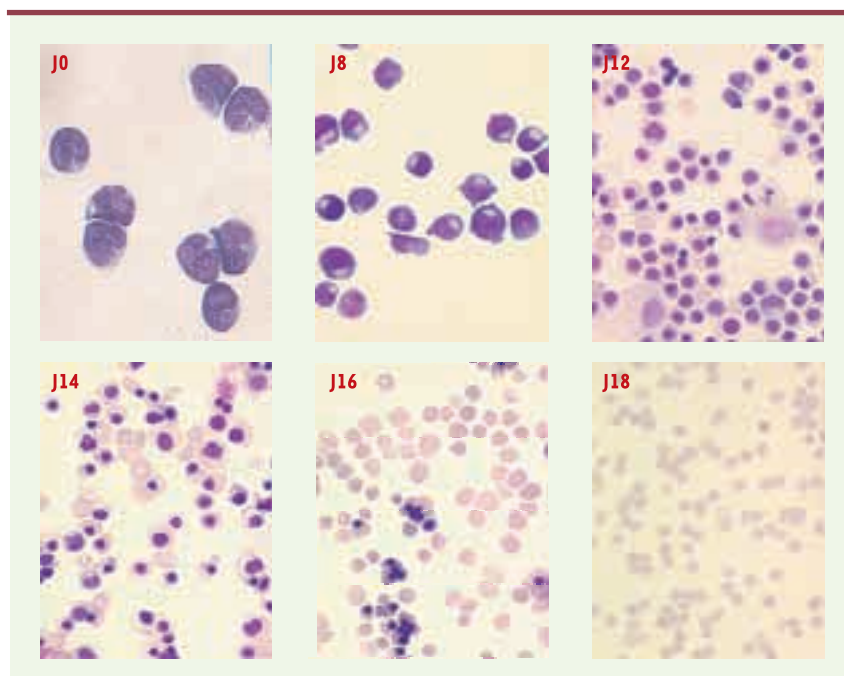


Figure 1. Stades de maturation de la lignée érythroïde vers le globule rouge énucléé. Partant d'une population indifférenciée de cellules souches/progéniteurs, l'engagement érythroïde est évident dès 8 jours de culture. Les cellules suivent alors les stades physiologiques de la différenciation : pro-érythroblastes, érythroblastes basophiles, acidophiles, polychromatophiles, jusqu'au globule rouge mature qui a expulsé son noyau (J18).