

# Production de cellules hématopoïétiques à partir des cellules ES

par Françoise Sainteny,

U362 INSERM, Institut Gustave Roussy, PR1, 39, rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif.

Reçu le 26 février 2001

## RÉSUMÉ

Les cellules embryonnaires de Souris sont des lignées cellulaires dérivées de la masse interne du blastocyste. Ces cellules possèdent deux caractéristiques d'intérêt majeur. D'une part, elles sont pluripotentes, propriété révélée par leur capacité à coloniser tous les tissus de l'embryon après injection dans un blastocyste lui-même réinjecté à une femelle pseudogestante. D'autre part, elles ont la capacité de se différencier *in vitro* dans des conditions spécifiques de culture en différents tissus, nerveux, musculaire et hématopoïétique. Cette dernière propriété permet d'envisager l'utilisation des cellules ES comme moyen d'avenir pour produire des cellules dans la perspective de greffes, d'autant qu'il existe maintenant aux USA des lignées de cellules ES humaines dont l'utilisation devrait être autorisée en France dans un ave-

nir proche. Le modèle de différenciation hématopoïétique des cellules ES s'est imposé au cours des dernières années comme un outil majeur pour l'abord biologique et moléculaire des mécanismes de l'hématopoïèse. Il permet en effet de mesurer le retentissement de manipulations génétiques complexes réalisables dans les cellules ES sur diverses catégories de cellules hématopoïétiques produites *in vitro* par les cellules ES : les progéniteurs myéloïdes, les cellules matures de toutes les lignées myéloïdes, de la lignée lymphoïdes B. Enfin, ce modèle donne accès à une cellule très primitive, l'hémangioblaste, cellule souche commune aux tissus hématopoïétique et endothélial, faisant du modèle de différenciation hématopoïétique des cellules ES le premier modèle d'émergence de l'hémangioblaste *in vitro*.

## SUMMARY Production of hematopoietic cells from ES cells

Murine embryonic stem (ES) cells are cell lines established from blastocyst which can contribute to all adult tissues, including the germ-cell lineage, after re-incorporation into the normal embryo. ES cell pluripotentiality is preserved in culture in the presence of LIF. LIF withdrawal induces ES cell differentiation to nervous, myocardic, endothelial and hematopoietic tissues. The model of murine ES cell hematopoietic differentiation is of major interest because ES cells are non transformed cell lines and the consequences of genomic manipulations of these cells are directly measurable on a hierarchy of synchronized *in vitro* ES

cell-derived hematopoietic cell populations. These include the putative hemangioblast (which represents the emergence of both hematopoietic and endothelial tissues during development), myeloid progenitors and mature stages of myeloid lineages.

Human ES cell lines have been recently derived from human blastocyst in the USA. Their manipulation *in vitro* should be authorized in France in a near future with the possibility of developing a model of human hematopoietic differentiation. This allows to envisage in the future the use of ES cells as a source of human hematopoietic cells.

## PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES CELLULES ES

Les cellules embryonnaires de Souris (cellules ES, de Embryonic Stem cells) sont des lignées cellulaires dérivées de la masse interne du blastocyste (Evans & Kaufman, 1981 ; Martin, 1981). Elles se caractérisent par deux propriétés essentielles. La première est leur pluripoten-

tialité. Celle-ci est démontrée par le fait que, injectées dans un blastocyste lui-même réintroduit chez une femelle pseudo-gestante, les cellules ES sont capables de produire tous les tissus de l'embryon, dont le tissu germinale. Ceci pourra conduire, après plusieurs croisements, à l'obtention de souris de génotype ES, principe sur lequel est basée la fabrication des « souris knock out ». La deuxième propriété des cellules ES est leur capacité

à se différencier *in vitro* en divers types cellulaires. En effet, les cellules ES qui restent à l'état indifférencié en co-culture sur des fibroblastes embryonnaires en présence de Leukemia Inhibitory Factor (LIF), se différencient spontanément dès le retrait du LIF du milieu de culture. Elles forment des structures clonales appelées corps embryonnaires dans lesquels émergent différents types cellulaires, essentiellement des cellules nerveuses, myocardiques, endothéliales et hématopoïétiques dont la présence est révélée par des marqueurs ou des cultures secondaires spécifiques (Wiles & Keller, 1991; Keller *et al.*, 1993).

L'existence d'un certain parallélisme entre le développement des corps embryonnaires et celui de l'embryon a été démontrée : l'expression des marqueurs de l'ectoderme (activine  $\beta$ B), du mésoderme (brachyury) et de l'endoderme (collagène  $\alpha$  IV) suit le même profil au cours du développement des corps embryonnaires entre 0 et 4 jours de différenciation et de celui de l'embryon entre 6 à 7 jours 1/2 post coïtum (Keller *et al.*, 1993).

### DIFFÉRENCIATION HÉMATOPOÏÉTIQUE DES CELLULES ES

La méthode classique de différenciation des cellules ES a été élaborée au début des années 90 (Keller *et*

*al.*, 1993; Schmitt *et al.*, 1991). Elle se décompose en deux étapes qui se déroulent en milieu semi-solide. Dans la première étape les corps embryonnaires (EBs) se développent en l'absence de facteurs de croissance exogènes. La deuxième étape consiste à révéler les progéniteurs myéloïdes qui se sont différenciés dans les corps embryonnaires à partir des cellules ES par des tests clonogéniques en présence d'un cocktail de facteurs de croissance (Fig. 1). Tous les progéniteurs myéloïdes sont présents dans les EBs et émergent selon une cinétique définie. Les premiers apparaissent aux 4-5<sup>ème</sup> jours de différenciation : ils donnent naissance à des colonies de type fœtal composées de cellules érythroïdes nucléées qui expriment essentiellement la forme embryonnaire de la globine, la globine  $\beta$ H1, et disparaissent très rapidement. Aux 5-6<sup>ème</sup> jours peuvent être détectés les progéniteurs érythroïdes adultes qui engendrent des cellules érythroïdes anucléées exprimant la forme adulte  $\beta$ M de la globine. Les progéniteurs granulo-monocytaires et mégacaryocytaires apparaissent à partir du 6<sup>ème</sup> jour de différenciation des EBs. Enfin, les progéniteurs des mastocytes sont détectables au 10<sup>ème</sup> jour de différenciation des EBs. La teneur globale des EBs en progéniteurs décline vers les 10-12<sup>ème</sup> jours. Cependant, une différenciation lymphocytaire B et T plus tardive (vers le 20<sup>ème</sup> jour de différenciation) peut être révélée par marquage immunologique d'antigènes de surface. Le déve-

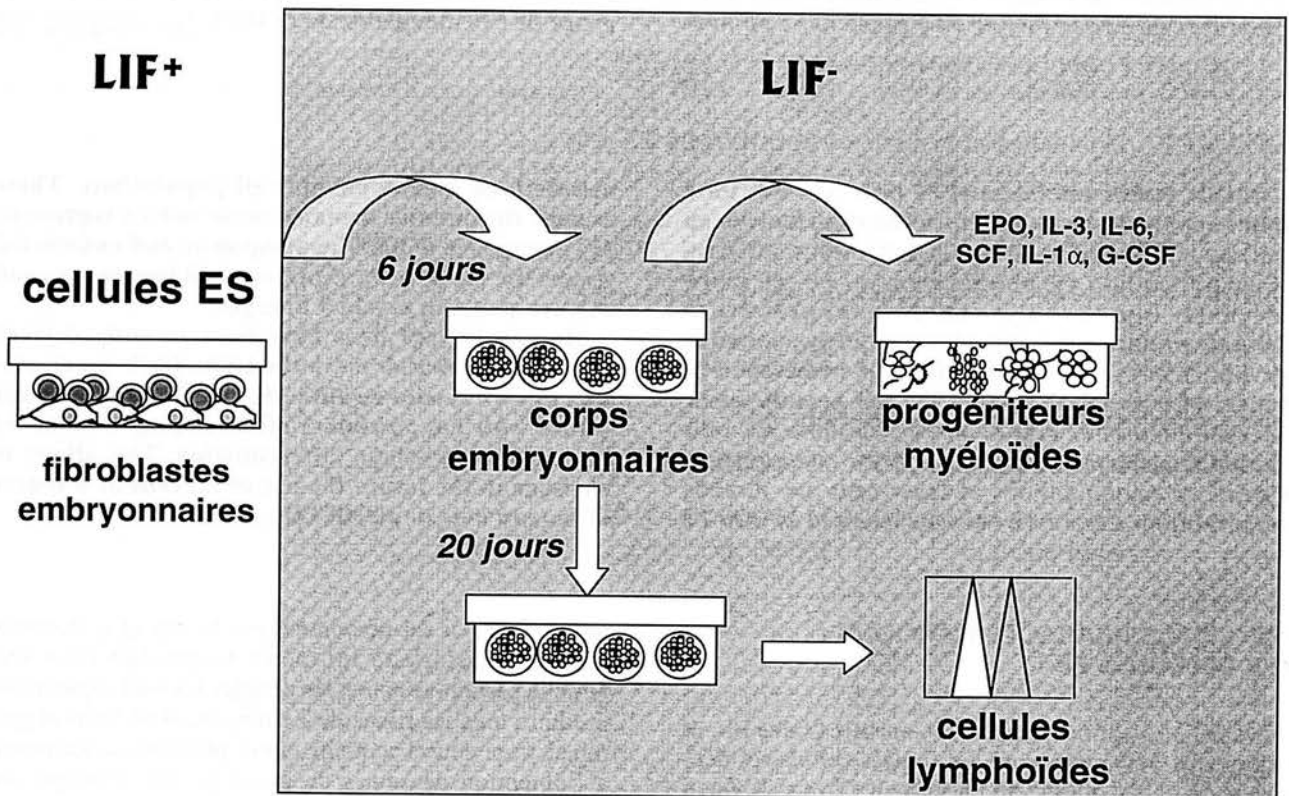


FIG. 1. – Différenciation hématopoïétique des cellules ES en deux étapes (d'après Keller *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 1993, 13, 473).

lancement des EBs et leur différenciation en cellules hématopoïétiques se fait en l'absence de tout facteur de croissance exogène. Il a été clairement démontré que cette dernière est régulée par une synthèse intrinsèque programmée de facteurs de transcription, de facteurs de croissance et de leurs récepteurs.

Il existe un parallélisme entre l'expression de certains gènes marqueurs de l'hématopoïèse au cours du développement des EBs et au cours de l'embryogenèse. Ceci est vrai pour les gènes codant certaines protéines transactivatrices, GATA-1, GATA-3 et SCL/tal-1, pour la protéine Vav, pour les principaux facteurs de croissance impliqués dans l'hématopoïèse et pour leurs récepteurs, l'EPO, le SCF, le M-CSF, l'IL-3 (qui n'est exprimée ni par les cellules d'EBs, ni par celles de l'embryon pendant cette période). D'autres marqueurs hématopoïétiques apparaissent plus tardivement à la fois dans les EBs et chez l'embryon : les transcrits des gènes RAG-1 et RAG-2 sont exprimés aux 13-15<sup>ème</sup> jours de différenciation des cellules ES et sont détectés dans le sac vitellin au 9<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire. De même, l'expression des globines fœtale et adulte au cours de la différenciation des cellules suit le même profil que chez l'embryon (Keller *et al.*, 1993 ; Schmitt *et al.*, 1991).

Une méthode plus récente de différenciation hématopoïétique des cellules ES publiée en 1997 (Kennedy *et al.*, 1997) associe culture en milieu liquide et en milieu semi-solide et présente des avantages majeurs. D'une part, elle permet l'émergence d'une population cellulaire très riche en cellules hématopoïétiques (150 progéniteurs pour 100 cellules ES, versus 30 dans la méthode en 2 étapes) et composée exclusivement de cellules hématopoïétiques et de cellules endothéliales. En effet, la

grande limite de la méthode en deux étapes est la dilution des cellules hématopoïétiques au sein du mélange tissulaire hétérogène constituant les EBs, ce qui rend difficiles certaines interprétations, notamment la spécificité cellulaire d'expression de gènes. D'autre part, cette méthode donne accès à une population de cellules hématopoïétiques pluripotentes plus primitives que les progéniteurs. Son principe (Fig. 2) consiste à faire différencier les cellules ES en EBs en milieu liquide en présence de transferrine et d'acide ascorbique. A trois jours de différenciation émerge, dans les EBs, une cellule Flk1<sup>+</sup>, appelée BL-CFC (Blast colony-forming cell), qui, une fois retransplantée en méthylcellulose en présence de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et de Stem Cell Factor (SCF), donne naissance, en plus d'EBs secondaires non hématopoïétiques, à des clones composés de cellules morphologiquement indifférenciées appelées colonies blastiques. Ces colonies sont composées de cellules hématopoïétiques et de cellules endothéliales. Les transcrits du gène Flk-1, marqueur endothélial codant le récepteur du VEGF, et de gènes exprimés dans le tissu hématopoïétique tels que SCL, GATA-1, ou bien dans ces deux types tissulaires tel que le CD34, sont détectés dans ces populations cellulaires. Leur retransplantation dans les conditions de clonage des progéniteurs myéloïdes révèle la présence de tous les progéniteurs myéloïdes. La concentration en progéniteurs est maximale dans les colonies blastiques de 4 jours puis décline pour être nulle à 10 jours de différenciation. Enfin, les colonies blastiques dissociées et cultivées en milieu liquide en présence soit de G-CSF+SCF + IL-3, soit de M-CSF, soit d'Epo+Il-3, ou de TPO se différencient préférentiellement et respectivement en granulocytes, macro-

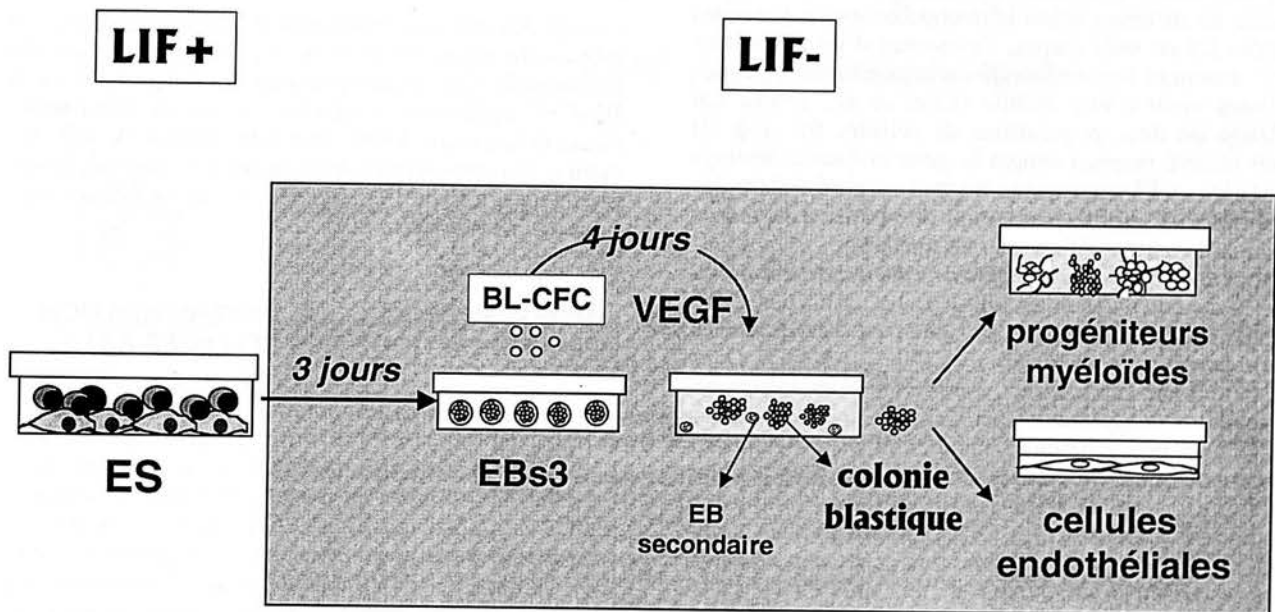


FIG. 2. – Différenciation hématopoïétique des cellules ES en trois étapes (d'après Kennedy *et al.*, 1997, 386, 488).

phages, érythroblastes et mégacaryocytes comme en témoignent les immunomarquages avec des anticorps spécifiques de chaque lignée (Filippi *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2000). En 1999, une méthode de différenciation des cellules ES en lymphocytes B a été proposée. Elle est basée sur la différenciation des cellules ES en présence de ligand de Flt-3 sur une lignée de cellules stromales (OP9) qui ne produit pas de M-CSF, et aboutit à la production de lymphocytes B fonctionnels (Cho *et al.*, 1999).

### EMERGENCE DE L'HÉMANGIOBLASTE AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION HÉMATOPOLÉTIQUE DES CELLULES ES

L'origine des cellules hématopoïétiques et endothéliales chez la Souris n'est pas clairement connue, même si l'on suppose depuis longtemps l'existence d'un précurseur commun aux deux lignées, l'hémangioblaste. Cependant, il existe maintenant des preuves directes de l'association entre les deux types cellulaires : (1) Flk1 est exprimé à la fois sur les cellules endothéliales, sur les cellules hématopoïétiques primitives du sac vitellin et sur les progéniteurs hématopoïétiques du foie fœtal (Yamagushi *et al.*, 1993); (2) les embryons homozygotes pour l'inactivation du gène *flk1* sont dépourvus de cellules endothéliales matures et de cellules hématopoïétiques et meurent *in utero* entre 8,5 et 9,5 jours post coïtum (Shalaby *et al.*, 1997); (3) les cellules ES *Flk1*<sup>-/-</sup> injectées à des blastocystes sauvages ne participent ni au développement des cellules endothéliales, ni à celui des cellules hématopoïétiques primitives du sac vitellin et des cellules hématopoïétiques définitives du foie fœtal chez des souris chimériques (Shalaby, 1997). Dans le modèle de différenciation hématopoïétique *in vitro* des cellules ES en trois étapes, l'existence d'un précurseur *Flk1*<sup>+</sup> commun aux cellules hématopoïétiques et endothéliales vient d'être établie (Choi *et al.*, 1998). Un mélange de deux populations de cellules ES (Fig. 3) ayant intégré respectivement le gène codant la néomycine (néo) ou l'hygromycine (hygro) est cultivé dans des conditions de culture permettant de révéler à la fois le potentiel hématopoïétique et endothélial de ces cellules. Les colonies blastiques issues de ce mélange sont prélevées puis cultivées individuellement dans des puits recouverts de matrigel en présence en VEGF,  $\beta$ FGF (*basic fibroblast growth factor*), EPO, IL-11, SCF. Dans ces conditions, apparaissent, après trois jours de culture, des cellules adhérentes et des cellules non adhérentes. Les cellules non adhérentes engendrent des progéniteurs hématopoïétiques en culture clonogénique. Les cellules adhérentes sont de nature endothéliale, comme en témoigne le profil d'expression des gènes qu'elles expriment. L'analyse de la présence des gènes néo et hygro dans les cellules adhérentes et non adhérentes issues d'une même colonie blastique, montre que les deux populations cellulaires portent systématiquement le même marqueur, néo ou hygro. Ceci démontre la nature

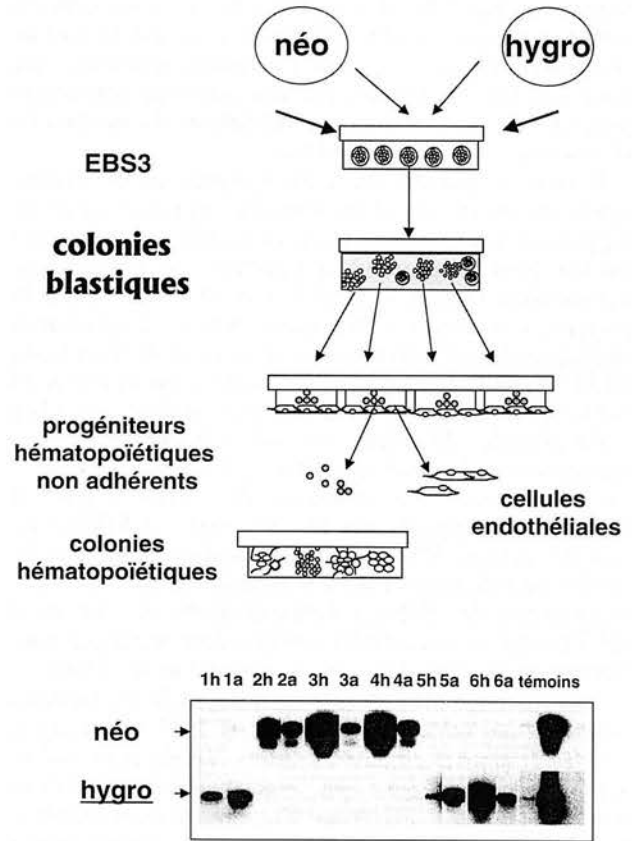


FIG. 3. – Preuves de l'émergence de l'hémangioblaste au cours de la différenciation hématopoïétique des cellules ES (d'après Choi *et al.*, 1998, 125, 725).

clonale des colonies blastiques et l'existence d'une cellule souche bipotente, la BL-CFC, à l'origine des cellules hématopoïétiques et endothéliales. Il a été proposé que la BL-CFC représente l'équivalent *in vitro* de l'hémangioblaste (Choi *et al.*, 1998). Ainsi, le système de différenciation hématopoïétique des cellules ES constitue le seul modèle d'étude de l'émergence des tissus hématopoïétique et endothélial *in vitro*.

### LIMITES DU MODÈLE DE DIFFÉRENCIATION HÉMATOPOLÉTIQUE DES CELLULES ES

Le modèle de différenciation hématopoïétique des cellules ES constitue un outil d'intérêt majeur pour l'étude des mécanismes moléculaires de l'hématopoïèse. En effet, les cellules ES présentent l'intérêt, contrairement à la plupart des lignées cellulaires, de ne pas être transformées, de permettre des manipulations génétiques complexes dont on peut étudier, directement et *in vitro*, les conséquences sur une large population de cellules hématopoïétiques qui s'étend de l'hémangioblaste aux cellules matures de toutes les lignées myéloïdes

(Fig. 4). Cependant, ce modèle a une limite, la présence de la cellule souche hématopoïétique capable de reconstituer l'hématopoïèse à long terme (LTRC, pour Long-Term Repopulating Cell) n'a jamais été démontrée clairement. La caractérisation de ce type cellulaire ferait de ce modèle un outil encore plus performant : il permettrait l'étude directe des conséquences d'une mutation, effectuée *in vitro* dans la cellule ES, sur la reconstitution hématopoïétique *in vivo*, évitant ainsi la fabrication de souris transgéniques. De gros efforts ont été faits par plusieurs équipes, dont la nôtre (Gutierrez-Ramos *et al.*, 1992; Palacios *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1993; Nisitani *et al.*, 1994; Hole *et al.*, 1996; Potocnik *et al.*, 1994; Mitjavila *et al.*, 1998) pour reconstituer l'hématopoïèse de souris irradiées par des cellules hématopoïétiques dérivées des cellules ES *in vitro*. Les résultats ont été décevants, aboutissant le plus souvent à une contribution des cellules ES restreinte au système lymphoïde. Ces difficultés peuvent résulter de différences fondamentales entre les cellules souches hématopoïétiques embryonnaires et adultes et au fait que la cellule souche dérivée des cellules ES ne trouve pas, dans un microenvironnement adulte, les facteurs de croissance et les molécules nécessaires à ses interactions avec le stroma pour survivre et se différencier. Cependant, la greffe intra-hépatique chez le nouveau-né n'a donné aucun résultat. On sait maintenant que les cellules hématopoïétiques dérivées des cellules ES sont dépourvues de certaines molécules de *homing* ou d'adhésion (M.T. Mijavila, communication personnelle). Les travaux s'orientent actuellement vers la transfection de ces

molécules dans les cellules ES, en particulier le récepteur du chimioattractant SDF-1, CXCR4.

### L'AVENIR : PRODUCTION DE CELLULES HÉMATOPOÏÉTIQUES À PARTIR DES CELLULES ES HUMAINES ?

Des lignées de cellules souches embryonnaires humaines ont été récemment établies aux États-Unis (Shamblott *et al.*, 1998; Reubinoff *et al.*, 2000). Elles possèdent beaucoup de points communs avec les cellules ES de Souris, pluripotentialité, normalité du caryotype, capacité d'autorenouvellement, formation de corps embryonnaires et succession des 3 feuillets embryonnaires au cours du développement de ces derniers. Cependant, leur réponse au LIF semble différente. La présence d'antigènes marqueurs de nombreux tissus, dont le tissu hématopoïétique, a été détectée au cours de la différenciation des cellules ES humaines. Bien que les conditions de différenciation hématopoïétique de ces cellules ne soit pas encore clairement définies, ce modèle représenterait un outil performant pour l'étude des mécanismes moléculaires de l'hématopoïèse humaine *in vitro*, et, à long terme, un moyen de production de cellules hématopoïétiques en vue de greffes. On sait déjà que des cellules nerveuses dérivées des cellules ES murines peuvent corriger des altérations de la moelle épinière chez la Souris (McDonald *et al.*, 1999).

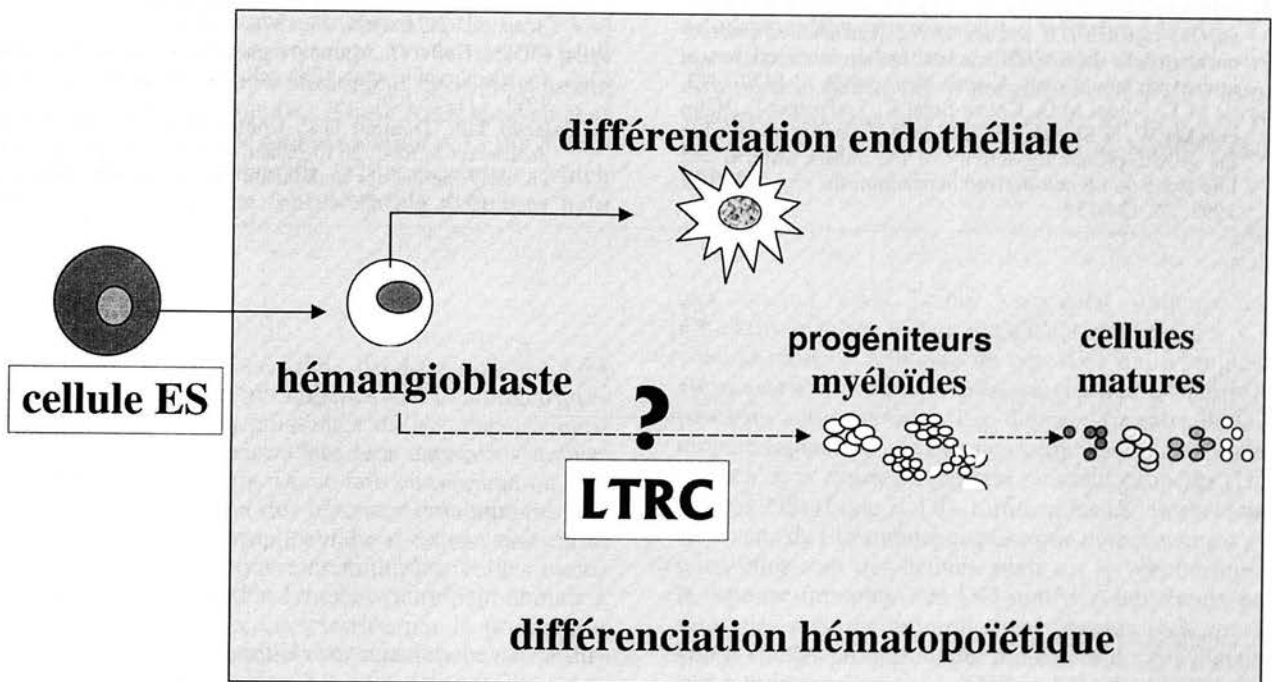


FIG. 4. – Limites du modèle.

## BIBLIOGRAPHIE

- Cho S.K., Webber T.D., Carlyle J.R., Nakano T., Lewis S.M. & Zuniga-Pflücker J.C., Functional characterization of B lymphocytes generated *in vivo* from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 9797-9802.
- Choi K., Kennedy M., Kazarov A., Papadimitriou J. & Keller G., A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, 1998, 125, 725-732.
- Evans M.J. & Kaufman M.H., Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292, 154.
- Filippi M.D., Porteu F., Le Pesteur F., Rameau P., Nogueira M.M., Debili N., Vainchenker W., De Sauvage F.J., Dubart Kupperschmitt A. & Sainteny F., Embryonic stem cell differentiation to hematopoietic cells: a model to study the function of various regions of the intracytoplasmic domain of cytokine receptor *in vitro*. *Exp. Hematol.*, 2000, 28, 1363-1372.
- Gutierrez-Ramos J.C. & Palacios R., *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into lymphocyte precursors able to generate T and B lymphocytes *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 9171-9175.
- Hole N., Graham G.J., Menzel U. & Ansell J.D., A limited temporal window for the derivation of multilineage repopulating hematopoietic progenitors during embryonal stem cell differentiation *in vitro*. *Blood*, 1996, 88, 1266-1276.
- Keller G., Kennedy M., Papayannopoulou T. & Wiles M.V., Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol. Cell. Biol.*, 1993, 13, 473-486.
- Kennedy M., Firpo M., Choi K., Wall C., Robertson S., Kabrun N. & Keller G., A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature*, 1997, 86, 488-493.
- Martin G.R., Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 7634-7638.
- McDonald J.W., Liu X.-Z., Qu Y., Liu S., Mickey S.K., Turetsky D., Gottlieb D.I. & Choi D.W., Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Med.*, 1999, 5, 1410-1412.
- Mitjavila M.T., Filippi M.D., Cohen-Solal K., Le Pesteur F., Vainchenker W. & Sainteny F., 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, 124-134.
- Muller A. & Dzierzak E.A., ES cells have only a limited potential after adoptive transfer into mouse recipients. *Development*, 1993, 118, 1343.
- Nisitani S., Tsubata T., Honjo T., Lineage marker-negative lymphocyte precursors derived from embryonic stem cells *in vitro* differentiate into mature lymphocytes *in vivo*. *Intern. Immunology*, 1994, 6, 909-916.
- Nogueira M.M., Mitjavila-Garcia M.T., Le Pesteur F., Filippi M.D., Vainchenker W., Dubart Kupperschmitt A. & Sainteny F., Regulation of Id gene expression during embryonic stem cell-derived hematopoietic differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, 276, 803-812.
- Palacios R. & Imhof B.A., Primitive lymphohematopoietic precursor cell lines generated in culture from day 7 early-mid-primitive streak stage mouse embryo. *EMBO J.*, 1996, 15, 6869-6876.
- Potocnik A.J., Nielsen P.J. & Eichmann K., *In vitro* generation of lymphoid precursors from embryonic stem cells. *EMBO*, 1994, 13, 5274.
- Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.-Y., Trounson A. & Bongso A., Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nature Biotechnol.*, 2000, 18, 399-404.
- Schmitt R.M., Bruyns E. & Snodgrass H.R., Hematopoietic development of embryonic stem cells *in vitro*: cytokine and receptor gene expression. *Genes and Development*, 1991, 1991, 5, 728-740.
- Shalaby F., Ho J., Stanford W.L., Fischer K., Schuh A.C., Schwartz L., Bernstein A. & Rossant J., A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*, 1997, 89, 981-990.
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X. & Breitman M.L., Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995, 376, 62-66.
- Shamblott M.J., Axelman J.A., Wang S., Bugg E.M., Littlefield J.W., Donovan P.J., Blumenthal P.D., Huggins G.R. & Gearhart J.D., Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 13726-13731.
- Wiles M.V. & Keller G., Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development*, 1991, 111, 259-267.
- Yamaguchi T.P., Dumont D.J., Conlon R.A., Breitman M.L. & Rossant J., flk-1, an fit-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*, 1993, 118, 489-498.