

Faible expression d'un transgène dans des cellules souches hématopoïétiques reconstituant les lignées myéloïde, lymphoïde B et lymphoïde T de la souris SCID humanisée

L'identification des cellules souches hématopoïétiques est un enjeu capital pour la biologie moderne, afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent le comportement de cette population rare de cellules. Les progrès de ces connaissances préparent les développements technologiques qui seront à l'origine de thérapeutiques innovantes dans le domaine de la transplantation autologue ou allogénique de progéniteurs hématopoïétiques, telles que l'expansion *in vitro*, ou le transfert de gène dans les cellules souches hématopoïétiques [1].

Au cours des dernières années, de nombreux travaux se sont attachés à démontrer qu'il était possible de modifier génétiquement des cellules souches hématopoïétiques, sans détruire leur capacité de reconstituer les différentes lignées lymphoïdes et myéloïdes du receveur. Cependant, les modèles expérimentaux sont peu nombreux qui permettent d'étudier simultanément la reconstitution, à partir d'une population unique de cellules, des lignées lymphoïdes B et T, et des différentes lignées myéloïdes. L'injection de cellules hématopoïétiques humaines dans le péritoine ou dans la circulation de souris NOD-SCID permet d'étudier la reconstitution du compartiment des progéniteurs clonogéniques, des cellules myéloïdes et des

cellules B. Le modèle développé à partir des souris *bnx* (*beige-nude-xid*), dans lequel les souris immunodéficientes sont co-transplantées avec les cellules d'intérêt et avec une lignée stromale génétiquement modifiée pour produire de l'interleukine-3 humaine, permet d'étudier la reconstitution myéloïde et lymphoïde T. Les souris SCID (C.B-17 scid/scid) « humanisées » (souris SCID-hu) – chez lesquelles sont implantés, soit un fragment d'os fœtal humain en position sous-cutanée, soit un fragment de thymus associé à un fragment de foie fœtal humain, en position sous-capsulaire – permettent d'étudier simultanément la totalité du potentiel de reconstitution hémato-lymphoïde d'une population de cellules hématopoïétiques humaines. Enfin, l'implantation de cellules humaines chez des embryons ovins donne naissance à des moutons chimériques chez lesquels il est possible de détecter des cellules myéloïdes, lymphoïdes B et T d'origine humaine pendant plusieurs années (pour une revue, voir également [2]) : malgré son intérêt théorique, ce modèle de chimère mouton-homme est cependant restreint dans son utilisation par les contraintes de temps, d'espace et de coût qui s'y attachent. Tous les modèles d'hématopoïèse humaine implantée chez des souris immunodéficientes ont été utilisés

pour évaluer la possibilité de modifier génétiquement des progéniteurs hématopoïétiques humains immatures. En utilisant des souris NOD-SCID, le groupe de John Dick (Toronto, Ontario, Canada) a démontré avec un vecteur rétroviral défectueux codant pour le gène de résistance à la néomycine, *neo*, qu'il était possible d'infecter avec une faible fréquence les *SCID-repopulating-cells* (SRC) présentes dans la population CD34⁺/CD38⁻ du sang de cordon humain [3], et que la population des SRC était distincte de celle de progéniteurs immatures qui peuvent être mis en évidence dans des tests *in vitro*, les *long-term culture-initiating cells*, ou LTC-IC.

Le groupe de Donald Kohn (Los Angeles, CA, USA) a démontré que les cellules exprimant l'antigène membranaire CD34 présentes dans le sang périphérique adulte après mobilisation, ou dans la moelle osseuse adulte, pouvaient produire pendant plusieurs semaines des cellules myéloïdes et des cellules T exprimant *neo*, lorsqu'elles étaient injectées à des souris *bnx* après infection [4] ; en outre, en utilisant le site d'intégration du vecteur rétroviral comme marqueur de clonalité (identification du site d'intégration par PCR inverse et séquençage du fragment amplifié), ce travail démontre que les mêmes clones participent à la production de

cellules myéloïdes et de cellules lymphoïdes T.

Notre groupe – associé au Département d'immunologie humaine du *DNAX Research Institute of Molecular and Cellular Biology, Inc.* – a utilisé le modèle de la souris SCID humanisée (SCID-hu), avec des implants fœtaux humains osseux ou thymiques, pour démontrer que la même population de cellules progénitrices génétiquement modifiées pouvait participer à la reconstitution des trois lignées myéloïde, lymphoïde B et lymphoïde T: les cellules de foie fœtal humain définies par le phénotype CD34⁺/CD38⁻/Lineage⁻, un phénotype associé aux propriétés fonctionnelles de progéniteurs très immatures, ont été infectées par un vecteur rétroviral défectueux pour exprimer une version modifiée de la β -galactosidase d'*E. coli*, et ont donné naissance dans les implants osseux et dans les implants thymiques de ces animaux chimériques à des cellules « filles » provenant du donneur et exprimant à une faible fréquence le transgène, jusqu'à 17 semaines après la réinjection [5]. On a également observé dans les fragments d'os fœtaux humains la présence de progéniteurs clonogéniques humains caractérisés par leur capacité de prolifération considérable *in vitro*: ces *high-potential proliferative colony-forming cells* (HPP-CFC) étaient présentes jusqu'à 14 semaines après l'injection des cellules génétiquement modifiées, et une petite proportion des colonies, aisément détectable, exprimait le gène β -gal, comme cela peut être montré par une réaction colorimétrique simple (X-gal). Faute d'avoir pu utiliser le site d'intégration du rétrovirus comme marqueur de clonalité (comme cela était le cas dans l'étude précédente), ce travail ne démontre pas formellement que nous avons réussi à transférer le gène dans la cellule souche hématopoïétique humaine. Cependant, ces observations sont encourageantes et confirment les données récemment publiées démontrant la possibilité de détecter des cellules T humaines exprimant un marqueur de surface (CD2) murin, dans le fragment thymique humain implanté chez des souris SCID humanisées, après réin-

jection de cellules CD34⁺ de sang de cordon humain qui avaient été préalablement transduites à l'aide d'un vecteur rétroviral défectif [6].

L'ensemble de ces observations confirme qu'il est possible de modifier génétiquement des progéniteurs hématopoïétiques humains. Cette conclusion doit cependant être tempérée par la relative inefficacité des stratégies actuellement employées. Dans notre travail, malgré des conditions expérimentales particulièrement favorables – utilisation d'une population très enrichie en progéniteurs hématopoïétiques immatures et caractérisée par un statut prolifératif sans commune mesure avec celui des progéniteurs hématopoïétiques issus de tissus adultes [7] – l'expression du transgène dans les cellules dérivant de la population injectée est très modeste. Ces résultats confirment les observations précliniques, précédemment publiées par d'autres groupes, de l'infection d'une fraction minoritaire des cellules. Ils confirment également les résultats cliniques rapportés jusqu'ici, soit avec un gène marqueur [8-10], soit avec un gène d'intérêt [11], qui montrent la faible efficacité d'infection par des vecteurs rétroviraux défectueux de cellules souches hématopoïétiques humaines, que ce soit en présence ou en l'absence de cytokines, et en présence ou en l'absence de cellules stromales censées favoriser le maintien et la prolifération des progéniteurs les plus immatures. Enfin, ces résultats qui ont tous été obtenus avec des populations enrichies en cellules exprimant l'antigène CD34, ou avec des sous-populations de cellules CD34⁺ doivent maintenant être reconsidérés avec attention, compte tenu de la publication récente d'observations suggérant la possibilité qu'une partie au moins des cellules souches hématopoïétiques humaines n'exprime pas l'antigène CD34 [12].

Après les premiers essais cliniques qui ont permis d'établir la faisabilité des stratégies de transfert de gène en situation clinique, il est plus que jamais nécessaire que les chercheurs poursuivent leur travail, à la fois pour élaborer des vecteurs améliorés dont la capacité d'intégration dépende

moins du statut prolifératif de la cellule, par exemple, et pour mieux comprendre la physiologie de la cellule souche hématopoïétique humaine et préparer ses manipulations *in vitro*.

**L.H.
P.M.
C.C.**

1. Coulombel L, Vainchenker W. Les cellules souches hématopoïétiques. *Med Sci* 1995; 11: 13-6.
2. Zanjani E, Almeida-Parada G. Utilisation de modèles animaux pour l'analyse de l'hématopoïèse humaine. *Hématologie* 1996; 2: 487-96.
3. Laroche A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JCY, Bhatia M, *et al.* Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 1996; 2: 1329-37.
4. Nolte J, Dao MA, Wells S, Smogorzewska EM, Kohn DB. Transduction of pluripotent human hematopoietic stem cells demonstrated by clonal analysis after engraftment in immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2414-9.
5. Humeau L, Chabannon C, Firpo M, Mannoni P, Bagnis C, Roncarolo MG, Namikawa R. Genetically modified CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻ fetal liver progenitors reconstitute the SCID-hu mouse and express the transgene in T, B, myeloerythroid and progenitor cells. *Blood* 1997; 90: 3496-506.
6. Champeix C, Maréchal V, Khazaal I, Schwartz O, Fournier S, *et al.* A cell surface marker transferred with a retroviral vector into CD34⁺ cord blood cells is expressed by their T-cell progeny in the SCID-hu thymus. *Blood* 1996; 88: 107-13.
7. Roberts AW, Metcalf D. Non cycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony stimulating factor and other cytokines. *Blood* 1995; 86: 1600-5.
8. Brenner MK, Hill DR, Holladay MS, Heslop HE, Moen RC, Buschle M, Krance RA, Santana VM, French Anderson W, Ihle JN. Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet* 1993; 342: 1134-7.
9. Dunbar CE, Cottle-Fox M, O'Shaughnessy JA, Doren S, Carter C, *et al.* Retrovirally marked CD34⁺ enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation. *Blood* 1995; 85: 3048-57.
10. Emmons RVB, Doren S, Zujewski J, Cottle-Fox M, Carter CS, *et al.* Retroviral gene transduction of adult peripheral blood or marrow-derived CD34⁺ cells for six hours without growth factors or on autologous stroma does not improve marking efficiency assessed *in vitro*. *Blood* 1997; 89: 4040-6.
11. Kohn DB, Weinberg KI, Nolte JA, Hiss LN, Lenarsky C, *et al.* Engraftment of gene modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1996; 1: 1017-23.
12. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sief CA, Mulligan RC, Johnson RP. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997; 3: 1337-45.