

## **Analyse de l'étude** **Perié et al., 2015, Cell 163, 1655-1662,** **"The Branching Point in Erythro-Myeloid Differentiation"**

### **Introduction**

#### ***L'hématopoïèse : un sujet d'intérêt thérapeutique***

La formation de cellules sanguines, ou hématopoïèse, est essentielle au maintien des fonctions circulatoires tout au long de la vie des individus. De nombreuses maladies telles que la leucémie ou les lymphomes résultent directement de dysfonctionnements dans les processus de différenciation hématopoïétique. L'identification précise des différents progéniteurs cellulaires impliqués dans l'hématopoïèse est essentielle à la mise en place de nouveaux traitements plus ciblés.

#### ***Un nouveau modèle de différenciation hématopoïétique***

Une étude de 2015, intitulée "The Branching Point in Erythro-Myeloid Differentiation", propose une nouvelle description des processus de différenciations à l'origine des cellules sanguines, et notamment des cellules myéloïdes (M) et des érythrocytes (E).

Il existe trois stades de différenciation conduisant à la formation des M et des E, correspondant chacun à un type de progéniteur cellulaire : Hematopoietic stem cells (Hsc), Multipotent progenitors (MPP), et Common Myeloid Progenitors (CMP). Un point fort de l'étude est de réaliser, pour chacune de ces trois populations, une analyse du devenir de chaque progéniteur à l'échelle cellulaire, après 6 et 14 jours de différenciation. Cette analyse est permise par l'utilisation d'une large banque de code-barres génétiques, utilisée pour "labelliser" de manière unique chacun des progéniteurs cellulaires et identifier ainsi, par amplification génétique et séquençage, la provenance de chacune des cellules sanguines obtenues après différenciation.

#### ***La réanalyse du devenir des progéniteurs CMPs***

Nous reportons ici une réanalyse des données obtenues à partir du groupe de progéniteurs CMPs. Si le modèle classique décrit, à l'échelle populationnelle, une différenciation directe de ces CMPs en M et en E, le nouveau modèle avancé dans l'article conclut à l'existence, à l'échelle cellulaire, d'une hétérogénéité entre les différents CMPs. Il tend à décrire une population de CMPs bimodale, se différenciant soit exclusivement en E, soit exclusivement en M.

Pourtant, certains CMPs ont bel et bien été observés comme donnant à la fois des M et des E, soit "M+E", dans une faible proportion (5%) après 6 jours de différenciation, mais dans une proportion bien plus importante (26%) après 14 jours de différenciation (Figure 2- A et B dans l'article). Le nouveau modèle exposé dans l'article met donc de côté une catégorie de CMPs pourtant fondamentale d'un point de vue conceptuel, puisque correspondant précisément aux progéniteurs effectivement "communs" aux lignées de M et de E décrits dans le modèle classique.

Notre analyse vise à vérifier le caractère effectivement “négligeable”, ou non, de cette catégorie de CMPs M+E, au terme de 6 et 14 jours de différenciation. Dans un premier temps, nous mettons en avant l’existence de trois groupes de CMPs parmi ceux donnant lieu à des quantités non nulles de M et d’E. L’analyse de la distribution obtenue (Figure 1) nous permet, dans un second temps, de définir une nouvelle classification pour les CMPs. Nous proposons ainsi de décrire les CMPs selon cinq catégories, et non uniquement selon trois comme suggéré dans l’article, ou bien de conserver les trois catégories de l’article mais d’opter pour un seuil de catégorisation M+E différent - on définit par seuil de catégorisation M+E le pourcentage de M ou de E pouvant être négligé en vue de classer un CMP non pas en M+E mais en M ou en E.

## Résultats

### ***L’étude de la distribution des CMPs M+E au jour 6 met au jour trois sous-catégories***

Dans un premier temps, l’étude du ratio  $M/(M+E)$  obtenu pour chaque CMP donnant des quantités non nulles de M et d’E nous permet de mettre en avant, après 6 jours de différenciation, trois sous-catégories de CMPs au sein même de la classe “M+E” (Figure 1). Deux de ces trois sous-catégories s’avèrent en fait être quasiment assimilables aux catégories M et E décrites dans l’article. En effet, elles présentent, pour la première, des taux d’E inférieurs à 20%, dont une moitié reste même inférieure à 2%, et, pour la seconde, des taux de M inférieurs à 10%, dont une moitié est inférieure à 2% également. Seule une minorité des CMPs M+E - environ 18% - donne lieu à des proportions non négligeables de M et de E, tandis que la majorité donne quasiment exclusivement des M ou des E.

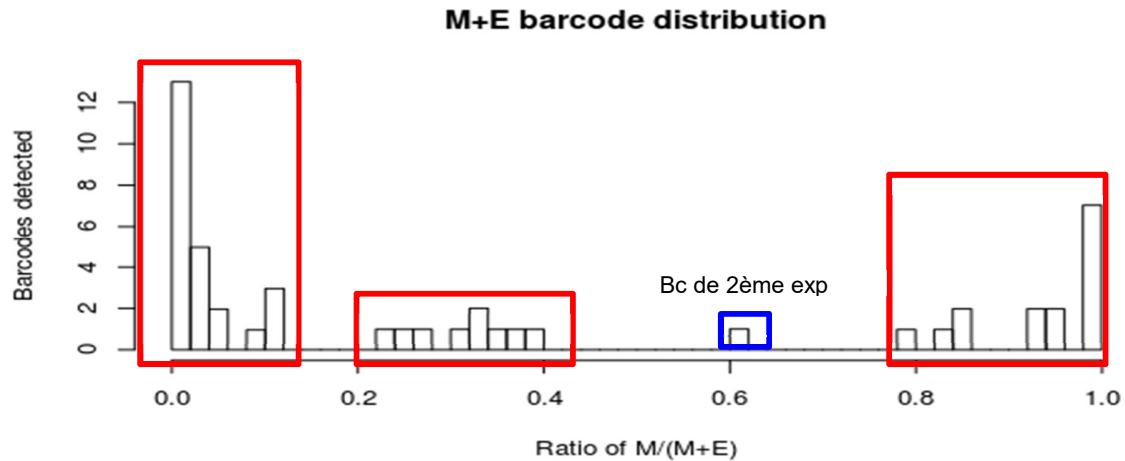
On peut donc choisir de décrire les CMPs selon non plus trois mais cinq catégories :  
100 % M (“M”) -  $> 80\% \text{ M et } < 20\% \text{ E}$  (“M e”) - 100 % E -  $< 10\% \text{ M et } > 90\% \text{ E}$  (“m E”) -  $22\% < M < 40\%$  et  $60\% < E < 78\%$  (M + E).

Cependant, on peut décider également de considérer que les catégories “ $> 80\% \text{ M et } < 20\% \text{ E}$ ” et “ $< 10\% \text{ M et } > 90\% \text{ E}$ ” sont assimilables respectivement aux catégories M (ou 100 % M) et E (100 % E). Ainsi, la classification définie dans l’article peut être conservée, en négligeant les pourcentages de M inférieurs à 10% et les pourcentages de E inférieurs à 20%, c’est-à-dire en optant pour un seuil de catégorisation M+E de 10 % pour les M et 20 % pour les E.

Une alternative plus “raisonnable” pourrait être de ne négliger que 50% des CMPs appartenant aux catégories “ $> 80\% \text{ M et } < 20\% \text{ E}$ ” et “ $< 10\% \text{ M et } > 90\% \text{ E}$ ”, en optant pour un seuil de catégorisation de 2% pour les E et pour les M.

Au final, la description des profils M+E observés au jour 6 permet de redéfinir de nouveaux seuils de catégorisation M+E, différents de ceux choisis dans l’article, et d’aboutir, comme nous le verrons dans un second temps, à une proportion de CMPs M+E amoindrie.

**Figure 1 : Distribution des cellules myéloïdes parmi les cellules myéloïdes et les érythrocytes obtenus après différenciation des CMPs classés comme M+E au seuil de catégorisation 0**



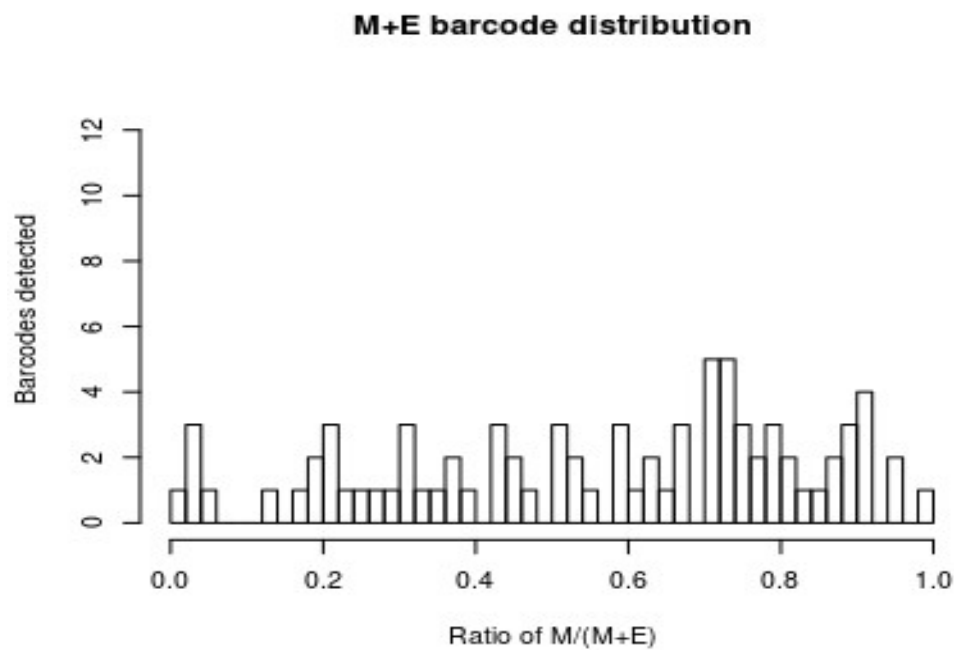
***L'étude de la distribution des CMPs M+E au jour 14 révèle une distribution plus homogène***

La distribution des M et des E au sein des CMPs étiquetés M+E a également été étudiée au jour 14 (Figure 2). Au contraire du jour 6, une très grande diversité de proportions de M et de E a été observée au sein de cette population, ne permettant plus de distinguer nettement des sous-catégories. La diversification des distributions de M et de E constatée entre le jour 6 et le jour 14 a été interprétée comme témoignant de différences de croissance entre ces deux populations. Des différences dans la vitesse de croissance de l'une ou l'autre des populations, ou l'existence de délais retardant leur croissance contribuent probablement à accentuer au cours du temps les écarts entre les pools de M et de E générés à partir de chaque CMP.

Nous avançons également l'hypothèse que des CMPs qui étaient étiquetés comme donnant exclusivement du M ou du E au jour 6, aient, entre le jour 6 et le jour 14, commencé à produire également du E, ou du M, contribuant encore à la diversité des ratios de M et de E observés. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que, comme le décrit l'article de référence, la population de CMPs classés comme M+E est bien supérieure au jour 14 qu'au jour 6. (Figures 4 et 5)

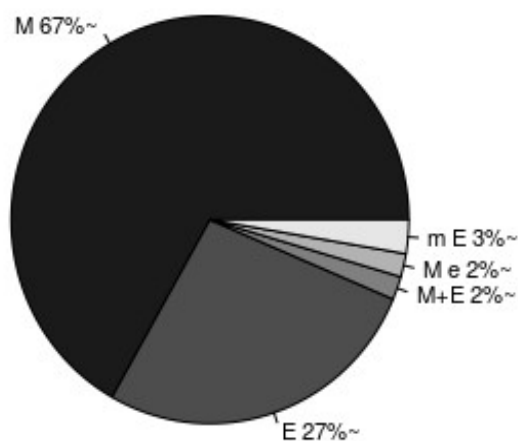
Au final, la classification en M, E, M e, m E, M+E précédemment définie ne peut s'appliquer au jour 14 car la distribution est beaucoup plus homogène (Figure 2) et ne montre pas les mêmes profils.

**Figure 2 : Distribution des cellules d'expérience LP32 à 14 jours sur toutes les souris**

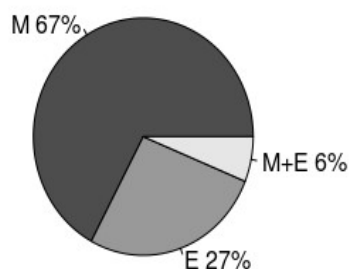


*L'étude des proportions de M, E et M+E à seuil de catégorisation 2%, au jour 6 et au jour 14, permet de confirmer la faible proportion de CMPs M+E au jour 6, et la forte augmentation de cette proportion au jour 14*

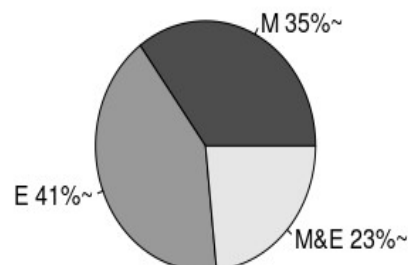
**Figure 3: Proportion des spécificités des CMPs qu'on a classé en 5 catégories, et étude de la distribution dans les M+E au jour 6**



**Figure 4 : Proportion des spécificités des CMPs dans les souris au jour 6 au seuil 2**



**Figure 5 : Proportion des spécificités des CMPs dans les souris à 14 jours à T = 2%**



Les proportions de M et d'E obtenues à partir de l'ensemble des CMPs ont pu être calculées, selon les cinq catégories évoquées précédemment (Figure 3), puis selon les trois catégories utilisées dans l'article mais avec un seuil de catégorisation M+E défini à 2%, au jour 6 et au jour 14. Ce seuil a été défini comme exposé précédemment, de manière à exclure 50% des CMPs "M e" et 50% des CMPs de la catégorie M+E ("m E").

Finalement, l'utilisation de cinq catégories permet de conclure à une proportion de M+E de 2% au jour 6 (et ne s'applique pas au jour 14). Par ailleurs, la catégorisation des M+E à seuil 2% conduit à une proportion de M + E de 6% au jour 6 et 23% au jour 14. Ces derniers chiffres sont cohérents avec ceux de l'article, à savoir 5% au jour 6 et 26% au jour 14, cependant ils sont plus faibles car le seuil de catégorisation est plus élevé. De légères différences peuvent également être expliquées par un nombre de souris réanalysées de 11 contre 12 dans l'article (cela est valable pour tous nos résultats).

Dans les deux cas, la proportion de M+E au jour 6 reste faible en regard de celles de M et de E, et augmente au jour 14. Nous avons déjà émis l'hypothèse que certains CMPs qui n'étaient pas classifiés comme M+E au jour 6 soient devenus M+E au jour 14. Finalement, on pourrait peut-être s'interroger sur la possibilité que tous les CMPs soient en réalité capables de produire à la fois M et E, mais que la production des M et des E ne soit pas exactement synchronisée, car dépendante de signaux de différenciation variables. Considérant un temps de différenciation "infini", pourrait-on observer une proportion de M+E s'approchant de 100%?

## Conclusion

La réanalyse des données observées après 6 jours de différenciation apparaît comme totalement cohérente avec celle menée par l'équipe de recherche.

La redéfinition de la catégorie de CMPs donnant lieu à la fois aux cellules myéloïdes et aux érythrocytes, appuyée sur une description plus précise des CMPs classifiés confirme que les M+E n'apparaissent qu'en quantité négligeable. Comme proposé dans le nouveau modèle, la

population de CMPs suit une distribution quasi bimodale au jour 6, donnant lieu pour la majorité à des cellules myéloïdes uniquement, ou des érythrocytes uniquement.

La définition d'un seuil de catégorisation M+E à 1% proposée dans l'article ne permet pas d'exclure l'ensemble des CMPs se situant à la limite de la catégorie M ou E. Selon nos analyses, un seuil fixé à 2% est le plus adapté, afin d'éliminer les M+E spécifiques de la catégorie M ou E, tout en gardant le maximum de M+E réels. L'idée de tester l'influence de plusieurs seuils sur la part de M+E est un point fort de l'étude ; mais elle prend plus de valeur en étant appuyée de l'étude descriptive des CMPs M+E, que nous proposons à travers cette réanalyse.

Si la proportion de CMPs M+E apparaît comme étant négligeable au jour 6 (Figure 2), elle augmente fortement après 14 jours (Figure 5) de différenciation, ce que le nouveau modèle semble exclure. Notre réanalyse comprend également une part de réinterprétation de ce résultat. Nous proposons en effet l'hypothèse selon laquelle des CMPs classifiés M ou E au jour 6 puissent rejoindre la catégorie M+E au jour 14.

On peut finalement s'interroger sur la possibilité que les CMPs soient en réalité tous capables de produire à la fois M et E, mais que la production des M et des E ne soit pas exactement synchronisée. D'autre part, nous pouvons aussi nous demander quelle est l'influence de l'environnement cellulaire sur ce type de production. Une telle hypothèse, si elle était vraie, pourrait conduire à remettre en question la validité du modèle proposé, en rétablissant l'idée d'une population de progéniteurs effectivement communs aux lignées de M et de E, au stade de différenciation cellulaire CMP.

La différenciation des cellules souches hématopoïétiques sont contrôlées à la fois par des régulateurs cellulaires intrinsèques et extrinsèques<sup>1</sup> (i.e les facteurs de transcription, les voies de transduction du signal). Mais ces réseaux transcriptionnels sont très sensibles à divers stimuli environnementaux et affectent les précurseurs communs. En effet , ces régulateurs induisent une différenciation vers les lignées cellulaires soit myéloïdes ou érythrocytes <sup>2,3</sup>. L'augmentation de la production de M+E au cours du temps (Figures 4 et 5) montre une variabilité dans la différenciation qui peut s'expliquer par des facteur extrinsèques.

Des recherches plus poussées sur les phénomènes de signalisations internes et externes à l'origine de la différenciation des CMPs en M, E ou M+E pourraient permettre d'affiner la notion "d'hétérogénéité" avancée dans l'article pour décrire la différence entre les "destinées cellulaires" des CMPs.

---

<sup>1</sup> Sashida, G. & Iwama, A. *Int J Hematol* (2012) 96:405. <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1183-X>

<sup>2</sup> AKASHI, K. (2005), *Lineage Promiscuity and Plasticity in Hematopoietic Development*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1044: 125-131. doi:[10.1196/annals.1349.016](https://doi.org/10.1196/annals.1349.016)

<sup>3</sup> Wolff, L. and Humeniuk, R. (2013), *Concise Review: Erythroid Versus Myeloid Lineage Commitment: Regulating the Master Regulators*. *STEM CELLS*, 31: 1237-1244. doi:[10.1002/stem.1379](https://doi.org/10.1002/stem.1379)

