

Somatomédine C/« insulin-like growth factor » I (SMC/IGF-I) et érythropoïèse *in vitro*

Mireille CLAUSTRES (*) (**), P. CHATELAIN (**), Ch. SULTAN (***)

(*) *Laboratoire de Biochimie Médicinale B, Institut de Biologie, 34000 Montpellier.*

(**) *Unité 34 INSERM, Hôpital Debrousse, 69000 Lyon.*

(***) *Unité 58 INSERM et Laboratoire des Stéroïdes, Hôpital Lapeyronie, 34100 Montpellier.*

Summary. The effect of human somatomedin C/insulin-like growth factor I (SM-C/IGF-I) and human growth hormone (hGH) on colony formation by erythroid precursor cells (CFU-E and BFU-E) from children's bone marrow or blood was studied by methylcellulose cloning assay. We found that physiological concentrations of IGF-I, but not of hGH, stimulated erythropoiesis *in vitro* in the presence of erythropoietin, as demonstrated by the increased activity of a cytosolic enzyme of the heme pathway (uroporphyrinogen I synthase). The results suggest that IGF-I could be involved in the regulation of erythroid differentiation.

Le développement des précurseurs érythroïdes en culture est influencé par de nombreuses hormones, en particulier les stéroïdes 5β (1), les hormones thyroïdiennes ou l'insuline (2), qui stimulent la formation des colonies érythroblastiques issues des CFU-E (Colony Forming Unit-erythroid) et des BFU-E (Burst Forming Unit-erythroid). L'effet stimulant de l'IGF-I sur l'érythropoïèse *in vitro* a été décrit chez la souris (3), celui de l'IGF-II chez l'homme (4), et une seule équipe a publié l'effet direct de l'hGH sur la croissance des précurseurs érythroblastiques (5). Nous rapportons ici les résultats de l'addition d'hGH et d'IGF-I à des cultures de cellules hématopoïétiques provenant de sang ou de moelle osseuse d'enfants hématologiquement normaux. Les effets de ces facteurs de croissance ont été appréciés par comptage du nombre de colonies érythroblastiques développées ainsi que par dosage d'une activité enzymatique reflétant la différenciation érythroïde (uroporphyrinogène I synthétase ou porphobilinogène désaminase).

Matériel et méthodes. 1°) *Culture des progéniteurs érythroblastiques.* — Nous avons utilisé la technique en milieu semi-solide décrite par Iscove (6) après modifications et adaptation en microméthode. La suspension cellulaire obtenue après centrifugation de la moelle osseuse ou du sang sur gradient de Ficoll-Métrizoate est introduite dans un milieu (Iscove's modified Dulbecco's Medium : IMDM, Gibco) contenant 0,8 % de méthylcellulose (Prolabo), 1 % d'albumine sérique bovine (Sigma) préalablement détoxifiée, 30 % de sérum foetal de veau (Flobio) déstéroïdé par absorption par du charbon, et des concentrations définies (0,5 UI/ml pour les CFU-E, 1 UI/ml pour les BFU-E) d'érythropoïétine sérique de porc (EPO, activité spécifique 60 UI/mg, CNTS, Orsay, France). Des volumes de 130 μ l contenant 6×10^4 cellules (moelle osseuse) ou $1,4 \times 10^5$ cellules (sang) sont répartis dans les micropuits d'une plaque Falcon 3070. Les facteurs de croissance testés (IGF-I, 30 μ g/ml, purifié par le Dr. Chatelain-Lyon et hGH, 1 mg/ml, Assoc. France-Hypophyse) sont dilués avec de l'IMDM et ajoutés au milieu de culture dans un volume de 10 μ l. Les colonies érythroblastiques dérivées des CFU-E et des BFU-E sont comptées au microscope inversé après respectivement 7 et 14 jours de culture à 37 °C en atmosphère saturée en vapeur d'eau con-

tenant 5 % de CO₂. 2° *Dosage de l'uroporphyrinogène I synthétase (UROS)*. — Après comptage des colonies, l'activité UROS a été mesurée dans le contenu de chaque puits de culture selon la méthode spectrophotométrique antérieurement décrite (1). L'activité enzymatique est exprimée en picomoles d'uroporphyrinogène formé par heure et par puits.

Résultats et discussion. Dans les conditions de culture décrites, le nombre de colonies dérivées des CFU-E de la moelle osseuse varie, selon le prélèvement, de 57 à 200 colonies/60 000 cellules cultivées en présence de 0,5 UI/ml d'EPO, correspondant à une activité UROS de 7 à 20 pmoles/h. En ce qui concerne les BFU-E circulant dans le sang, on obtient 35 à 50 bursts/1,4 × 10⁵ cellules mises en culture en présence de 1 UI/ml d'EPO, l'activité UROS variant de 16 à 35 pmoles/h. La figure 1 montre les effets de l'addition de différentes concentrations d'IGF-I (0,1 à 250 ng/ml) aux cultures de CFU-E et de BFU-E : en présence d'EPO, indispensable, l'IGF-I stimule la croissance et la différenciation des précurseurs érythroblastiques à des doses aussi faibles que 1 ng/ml, l'effet optimal étant observé avec moins de 50 ng/ml. L'hGH testée dans les mêmes conditions ne provoque aucun effet significatif : ce n'est qu'avec des doses supérieures à 200 ng/ml que peut être observée une légère augmentation du nombre des colonies.

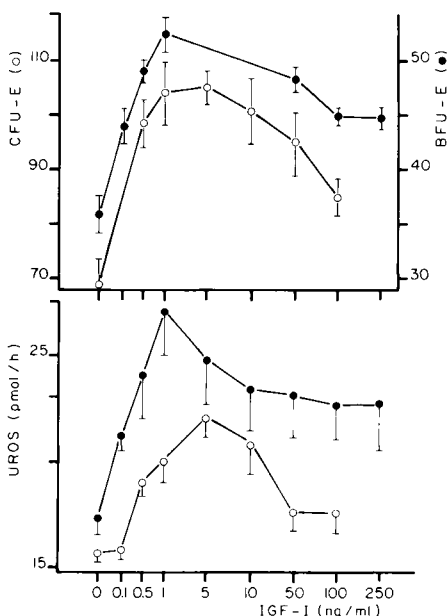


FIG. 1. — Effets de différentes concentrations d'IGF-I sur le nombre (en haut) et l'activité UROS (en bas) des colonies érythroblastiques issues des CFU-E (○) et des BFU-E (●) provenant d'une moelle osseuse normale. Chaque point représente la moyenne ± SEM de 4 puits de culture.

En conclusion, ce travail montre que l'IGF-I est capable de stimuler directement la croissance des progéniteurs érythroïdes humains en culture, ce qui suggère son intervention dans les mécanismes régulateurs de la différenciation érythroblastique.

- (1) Claustres M., Sultan C., 1986. *Hormone Res.*, **23**, 91-98.
- (2) Bersch N., Groopman J. E., Golde D. W., 1984. *J. clin. Endocrinol. Metabol.*, **55**, 1209-1211.
- (3) Kurtz A., Jekmann W., Bauer C., 1982. *FEBS Letters*, **149**, 105-108.
- (4) Dainiak N., Kreczko S., 1985. *J. clin. Invest.*, **76**, 1237-1242.
- (5) Golde D. W., Bersch N., Kaplan S., Rimoin D. L., Hao Li C., 1980. *N. Engl. J. Med.*, **303**, 1156-1159.
- (6) Iscove N. N., Sieber F., Winterhalter K. H., 1974. *J. cell. Physiol.*, **83**, 309-320.