

L'HÉMATOPOIÈSE

BMC 423

Julien FELLAH
jsfella@snv.jussieu.fr

I. INTRODUCTION

Hématopoïèse : ensemble des mécanismes qui assurent le remplacement régulé et continu des cellules sanguines

Sang : cellules matures des différentes lignées à taux constant et ayant une durée de vie limitée

	Nombre 10^{12}	Durée de vie	Production/j en 10^9
GR	20	120 j	200
PN	0,5	24 h	50
PLQ	1	7 j	100



L'hématopoïèse se déroule à partir d'une population de cellules rares et indifférenciées :

→ Les cellules souches hématopoïétiques (C.S.H.)

→ À l'origine de toutes les lignées sanguines

Utilisation potentielle des CSH en médecine régénérative

Transplantation de CSH: traitements de maladies dues
à des désordres hématopoïétiques

- Apporter un système immunitaire fonctionnel à des individus atteints d'une immunodéficience
- Remplacer un système hématopoïétique défectueux par un système fonctionnel dans le cas de maladies génétiques (drépanocytose)
- Restaurer le système hématopoïétique de patients atteints de cancer et traités par des agents cytotoxiques
- Utilisation des CSH en thérapie génique (intéressant car les CSH sont capable d'autorenouvellement ce qui permet d'éviter l'injections périodiques de cellules matures)

Les compartiments hématopoïétiques

4 compartiments:

LES CSH

Multipotentes

LES PROGÉNITEURS

Cellules engagées dans un lignage cellulaire

LES PRÉCURSEURS

Cellules qui se divisent et se maturent

LES CELLULES MATURES

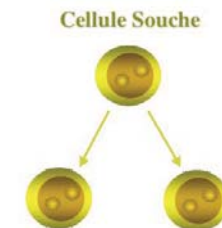
Cellules fonctionnelles qui
passent dans le sang

II. Les Cellules Souches Hématopoïétiques

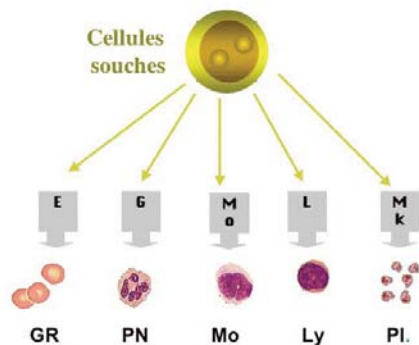
Deux propriétés fondamentales

a/ L'autorenouvellement : capable de se diviser à l'identique
sans se différencier

→ maintien du pool de CSH



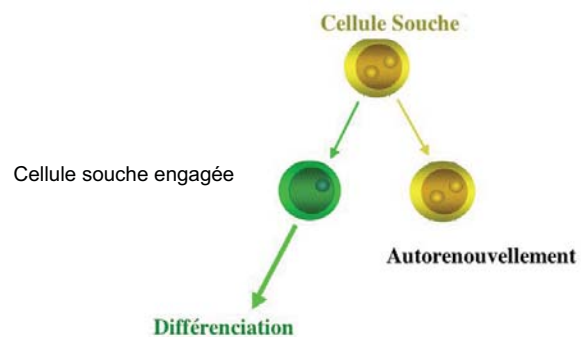
b/ Multipotence: capacité de se différencier en n'importe quelle cellule du **sang**



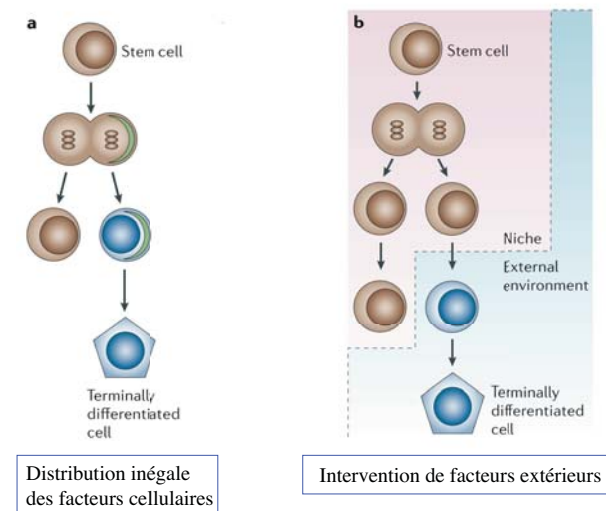
Caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques

- Cellules très rares (0,01% à 0,1% des cellules de la m.o.)
- Cellules indifférenciées
- Pas de marqueurs spécifiques
- Non reconnaissable morphologiquement
- 90% en G0 (stade quiescent)

Engagement dans une voie de différenciation par division asymétrique



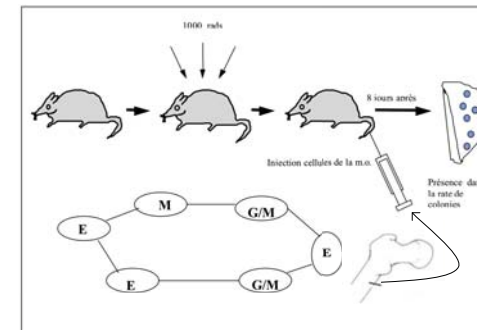
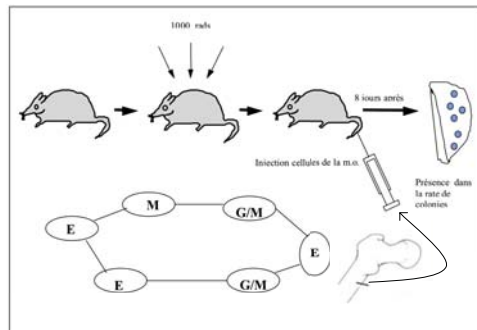
Les deux modèles de la division asymétrique



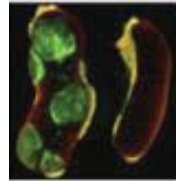
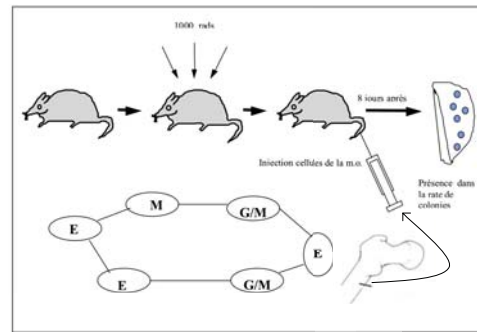
III. MISE EN ÉVIDENCE DES C.S.H.

Première mise en évidence de cellules multipotentes
chez la souris : Expérience de Till et Mc Culloch (1961)

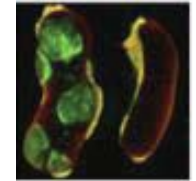
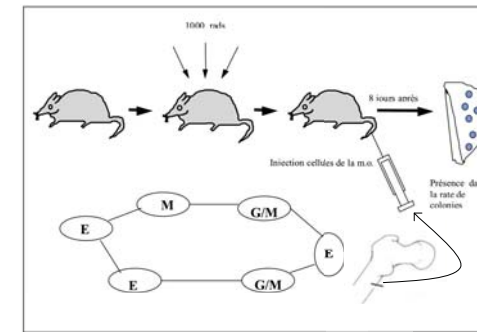
Première mise en évidence de cellules multipotentes
chez la souris : Expérience de Till et Mc Culloch (1961)



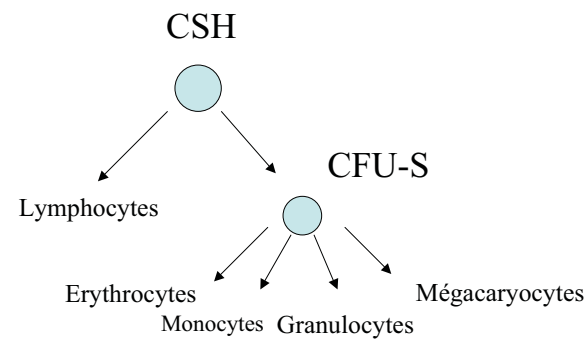
Première mise en évidence de cellules multipotentes
chez la souris : Expérience de Till et Mc Culloch (1961)



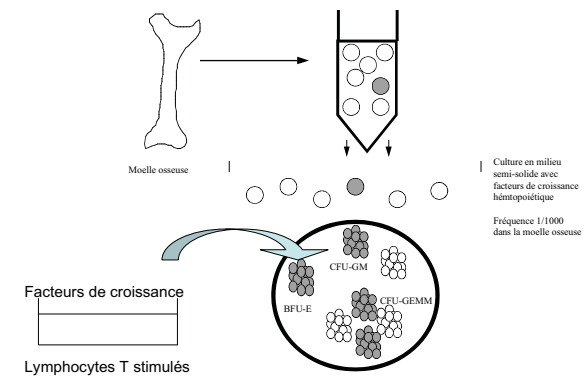
Première mise en évidence de cellules multipotentes
chez la souris : Expérience de Till et Mc Culloch (1961)

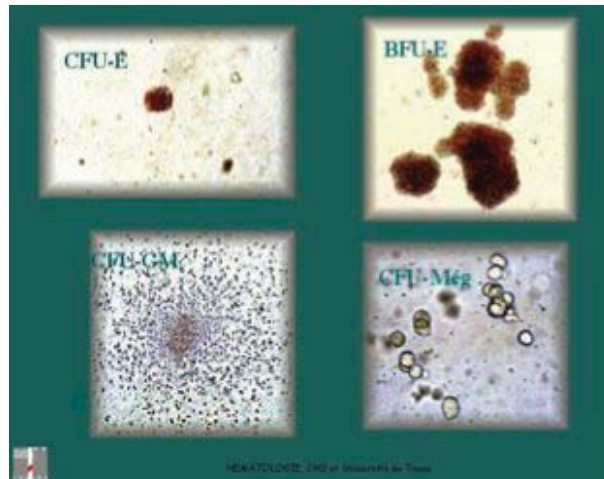


Chaque colonie est issue d'une seule cellule de la m.o appelée
CFU-S : Colony Forming Unit in the Spleen



Mise en évidence des CSH par culture des cellules de m.o.
en milieu semi-solide (Méthylcellulose).
Expérience de Metcalf (1966)





Mise en évidence des CSH chez l'Homme

Apport de la pathologie: clonalité des tumeurs

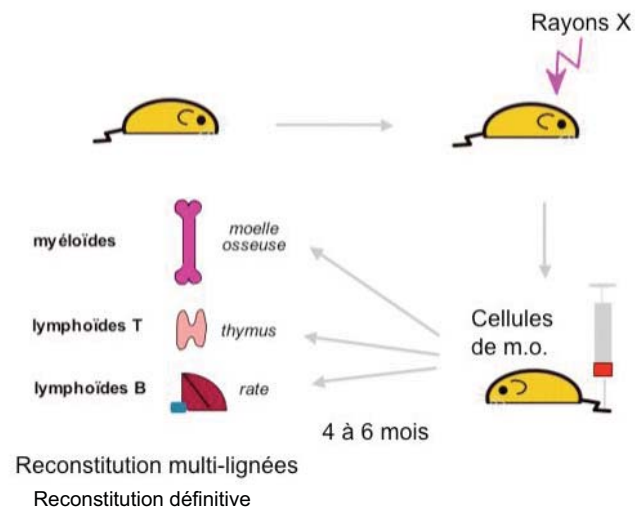
Exemple de la L.M.C. (leucémie myéloïde chronique)

→ toutes les cellules de la lignée myéloïde

(GR-PN-macrophage-Megacaryocytes) et les lymphocytes B
présentent la même anomalie chromosomique :

**Le chromosome Philadelphie qui résulte d'une translocation
entre le chr 9 et le chr 22.**

Reconstitution de l'hématopoïèse. Utilisation des souris SCID (severe combined immunodeficiency)



Caractérisation phénotypique des CSH de la moelle osseuse

Chez la souris : Expérience d'I. Weissman

Utilisation d'anticorps monoclonaux et du tri cellulaire par cytométrie en flux

Prélèvement des cellules de la m.o

→ élimination des cellules matures:

- Ac anti CD4, anti-CD8 et anti CD3: lymphocytes T
- Ac anti B220: Lymphocytes B
- Ac anti-Mac-1: Macrophages et cellules NK
- Ac anti-GR20: granulocytes
- Ac anti-Ter 119: Globules rouges

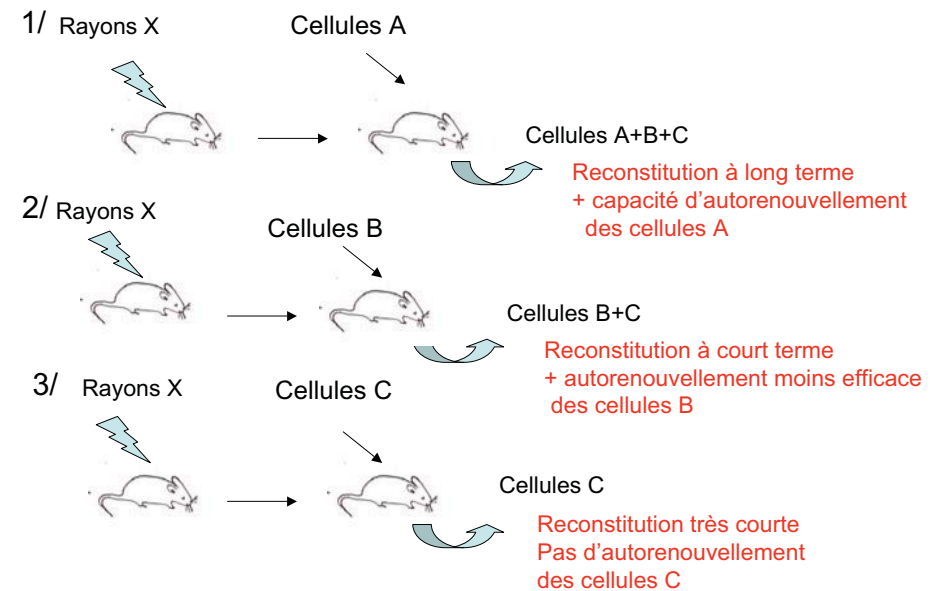
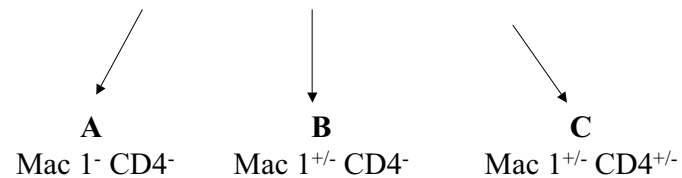
→ Cellules sans marqueurs de différenciation : **cellules LIN⁻**

Utilisation d'autres anticorps

→ Permet d'isoler une population de cellules

Thy1^{+/-} Sca1⁺ cKIT⁺ LIN⁻

→ 0,02% des cellules de la m.o. = CSH

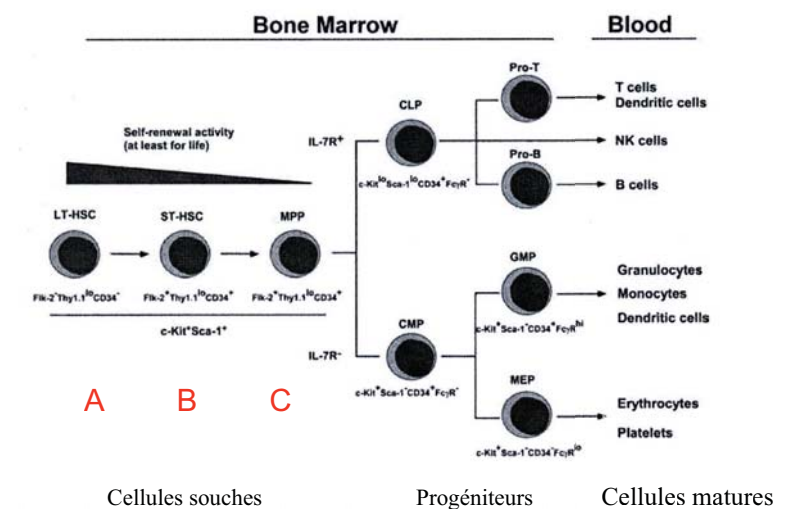


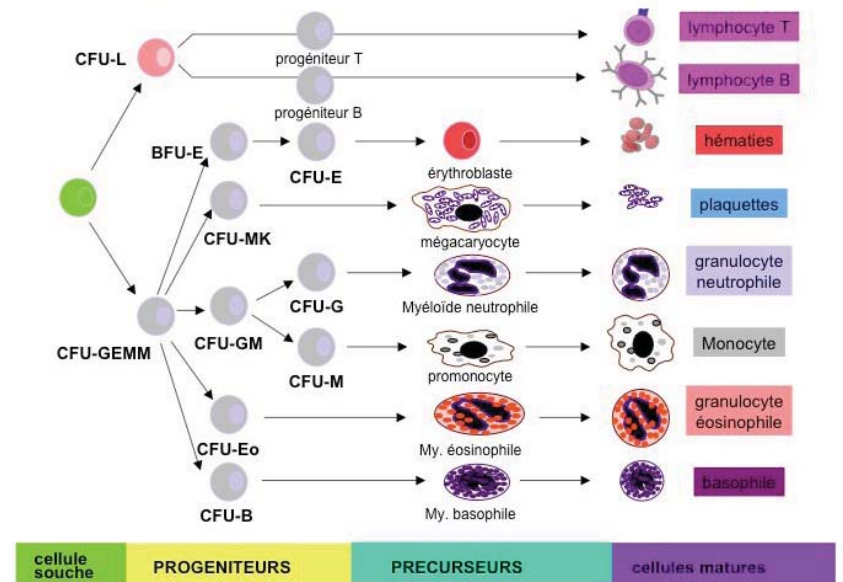
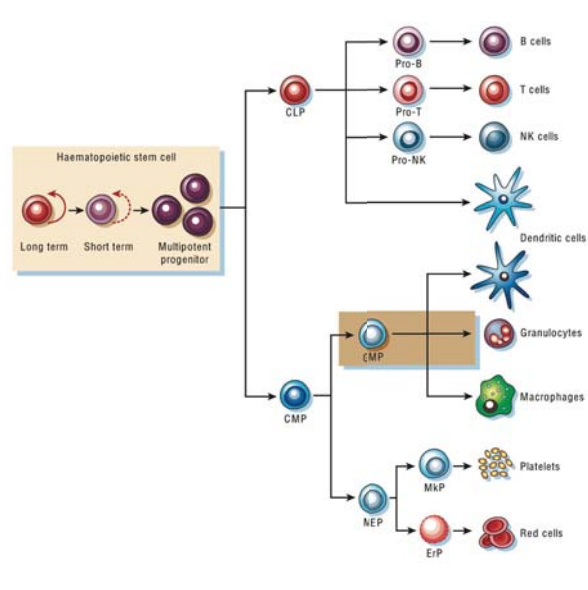
Potentialité de reconstitution A > B > C

Les cellules A (Mac1⁻ CD4⁻ CKIT⁺ Sca 1⁺ Thy1⁺ LIN⁻) : véritables CSHs,

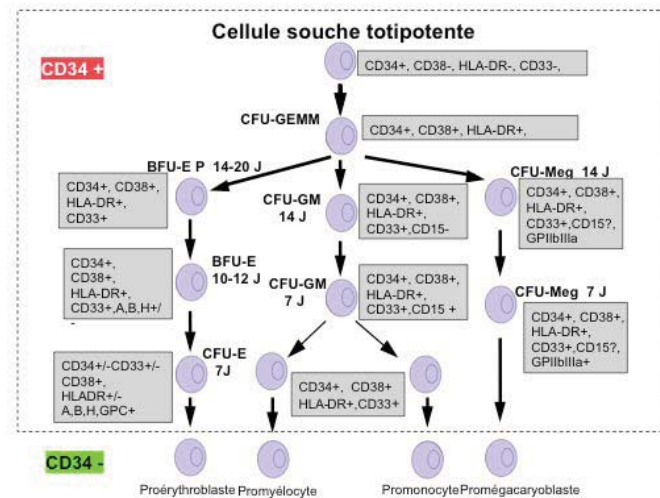
→ seule population capable d'autorenouvellement
et de **reconstituer** définitivement les territoires hématopoïétiques
d'une souris irradiée (production de toutes les cellules du sang)

Compartiments hématopoïétiques

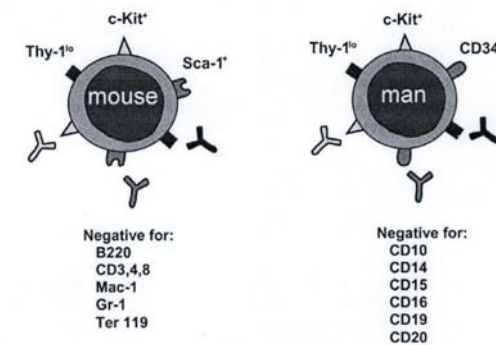




CD34 marqueur des CSHs humaines



Phénotype des CSH de la moelle osseuse



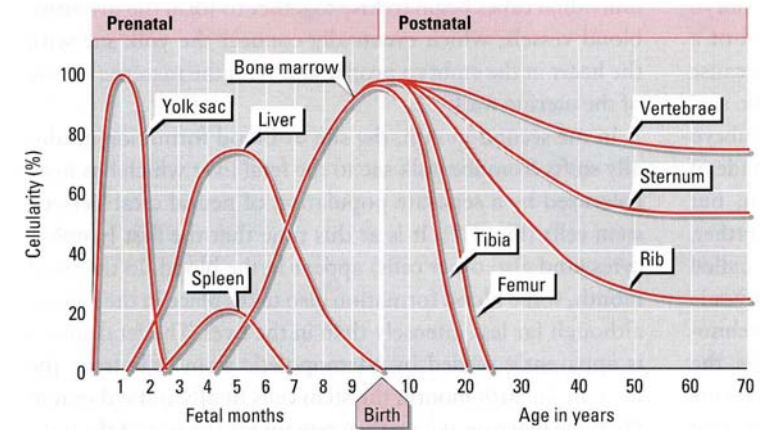
Cellules KTLS

Lin-CD34⁺CD38⁺Thy1⁺/Thy1⁻ Kit⁺

Lin⁻Sca1⁺Kit⁺Thy1⁺/Thy1⁻CD34⁺CD48⁺CD150⁺

IV. Les territoires hématopoïétiques

Territoires où se déroule l'hématopoïèse
→ Variation au cours du développement

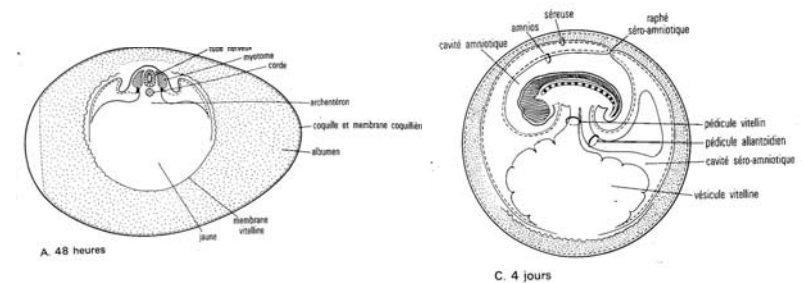


Où sont générées les CSH chez l'embryon?

Travaux réalisés chez le poulet
(Nicole le Douarin et Françoise Dieterlen)

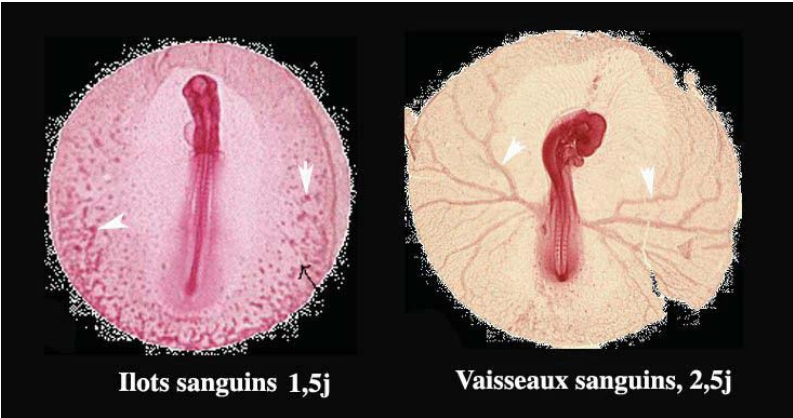
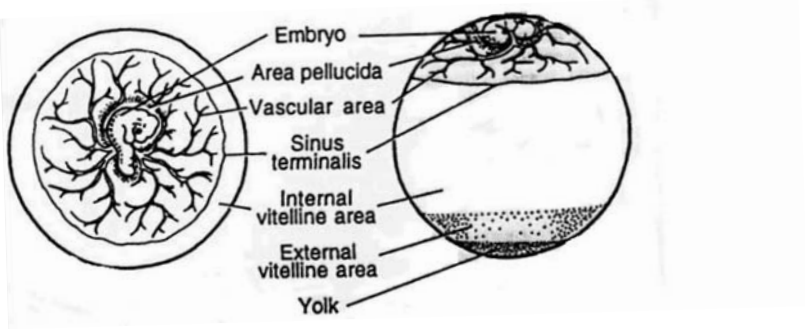
Œufs d'oiseaux deux régions:

→ blanc d'œuf (l'albume) et jaune d'œuf où se développe l'embryon



→ Aires embryonnaires et extra-embryonnaires

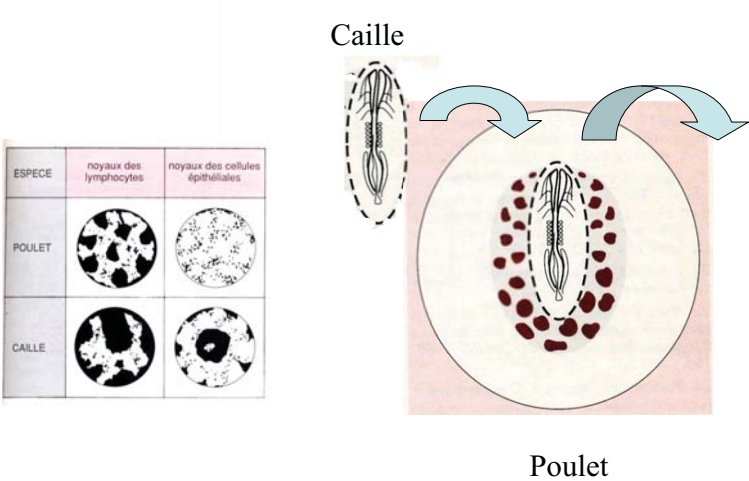
Dans l'aire extra-embryonnaire (sac vitellin) apparition des premiers vaisseaux sanguins → Ilôts sanguins (1er globules rouges)



D'où proviennent les CSH responsables de la formation de ces premiers globules rouges ?

→ Aire embryonnaire ou extra-embryonnaire ?

Utilisation des greffes caille-poulet (chimères)



Observations des coupes au microscope :

→ 7^{ème} jour : GR de type poulet

→ 10^{ème} jour : GR et lymphocytes de type caille

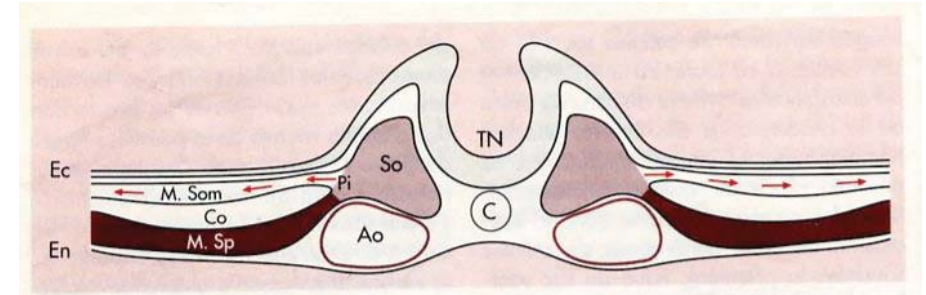
2 sites de production de CSH qui se succèdent :

- **Sac vitellin** : **hématopoïèse primitive**
- **Embryon** qui donne les CSH qui colonisent les organes hématopoïétiques (foie fœtal, thymus)
- **hématopoïèse définitive**

Territoire embryonnaire = **Splanchnopleure para-aortique**

Se transforme en un territoire appelé **AGM**
aorte-gonado-mesonephros

(comprend l'aorte, les ébauches des crêtes génitales et l'ébauche du rein)

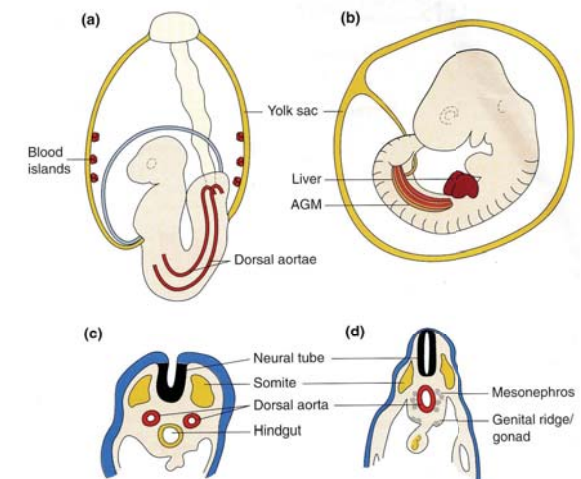


Expériences chez la souris réalisées par A. Cumano :

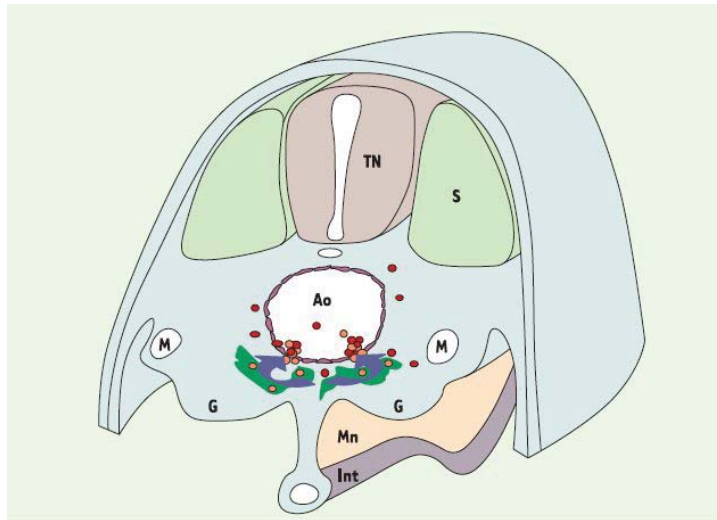
Mêmes successions d'événements chez les mammifères
avec deux territoires de production des CSH chez l'embryon

→ Sac vitellin et AGM

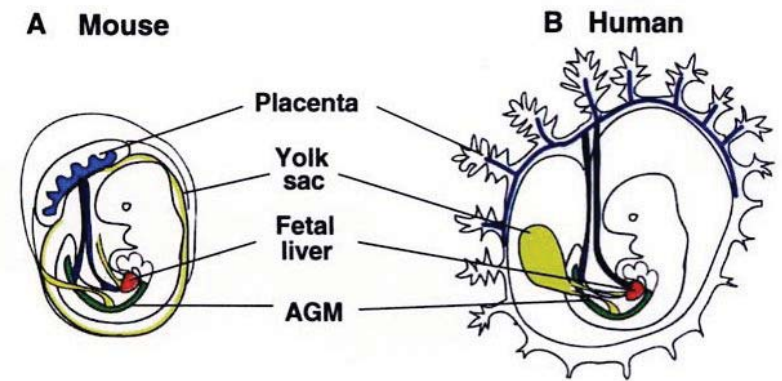
Les territoires de production des CSH chez l'embryon de souris



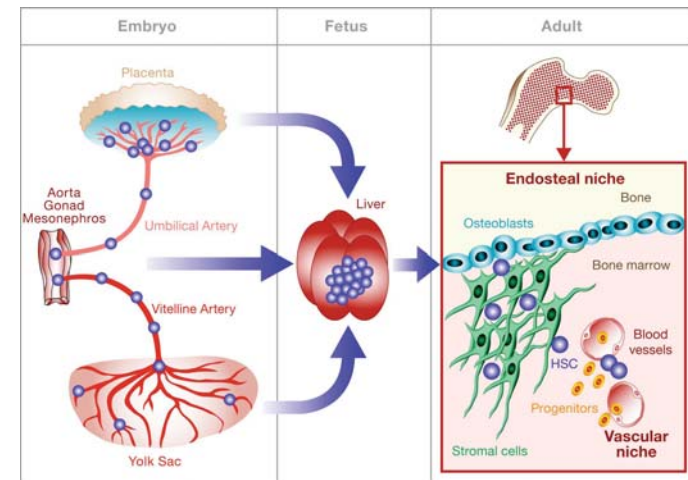
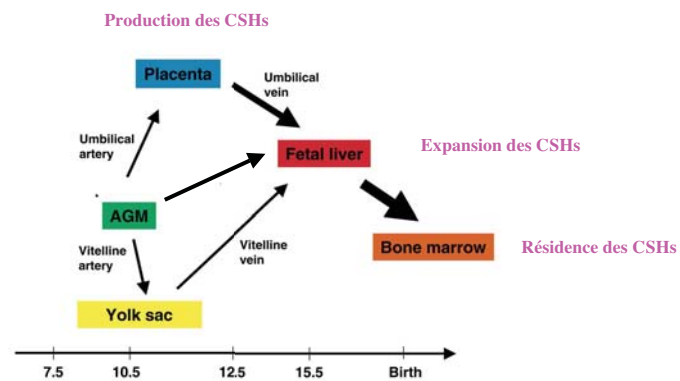
Les CSH de l'aorte



Le placenta : nouveau site de production des CSH embryonnaires



Succession de territoires hématopoïétiques au cours de l'ontogenèse



V. Régulation de l'hématopoïèse

1/ Facteurs extrinsèques

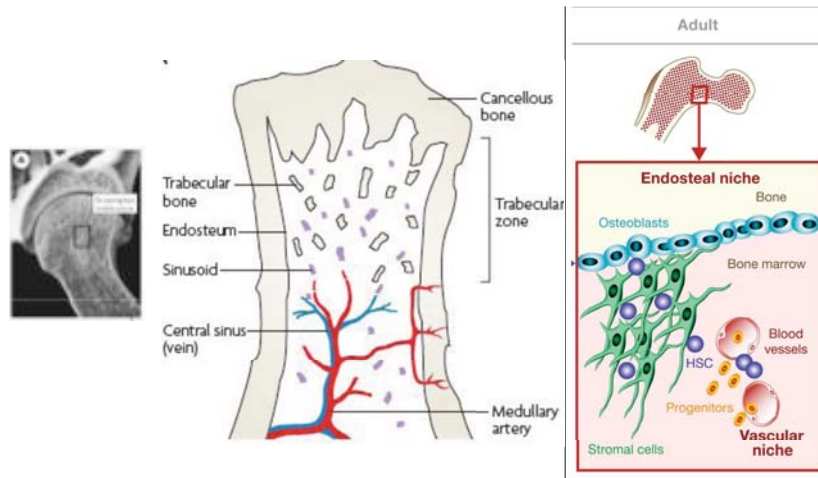
a/ rôle du microenvironnement

→ niche hématopoïétique :

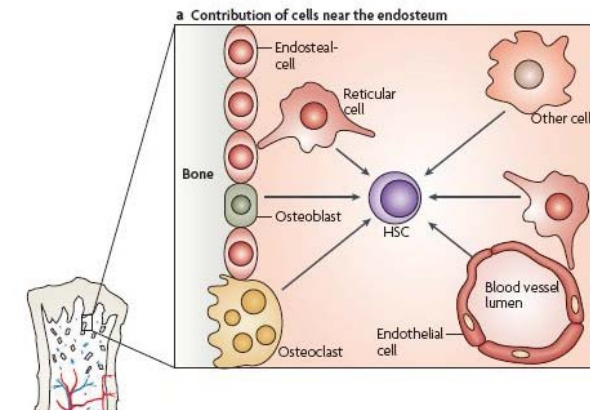
Dans moelle osseuse

- Ostéoblastes (endostéum)
- Ostéoclastes (endostéum)
- Cellules réticulaires
- Cellules péri-vasculaires (Cellules endothéliales...)
- Matrice extracellulaire

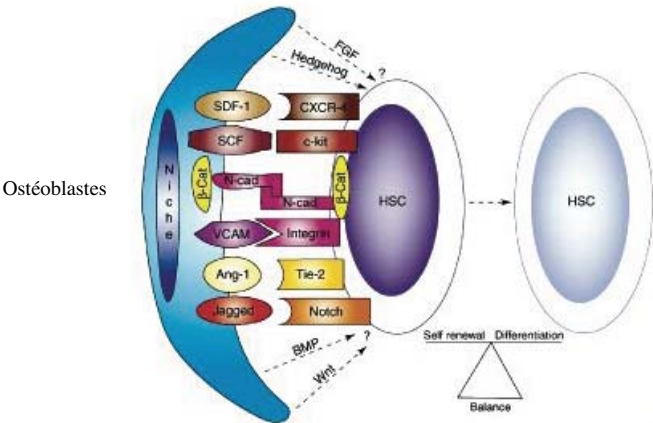
Les niches hématopoïétiques dans la moelle osseuse



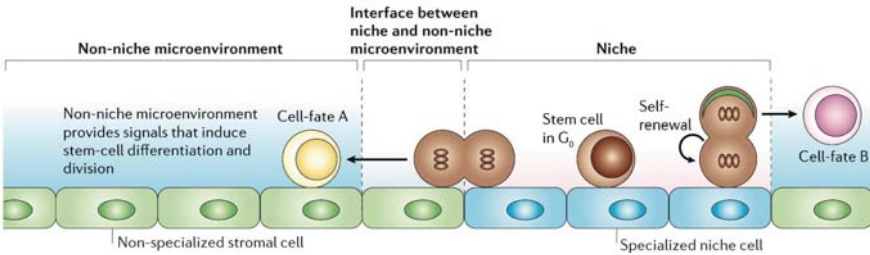
Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans la biologie des CSH



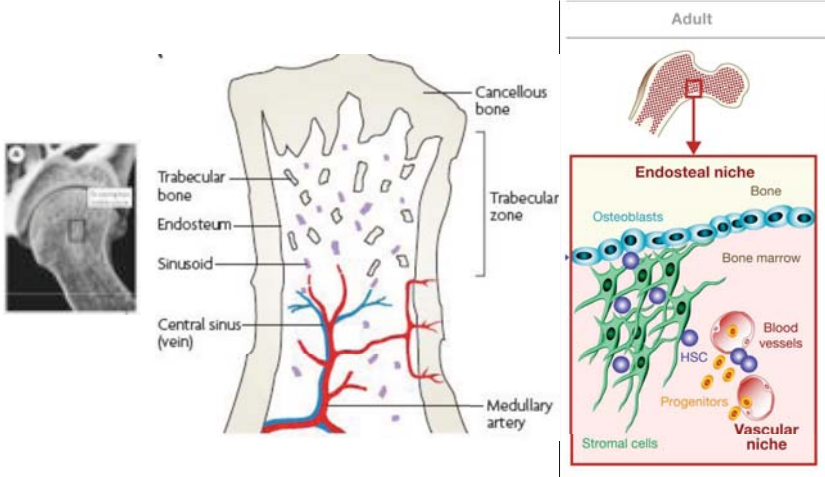
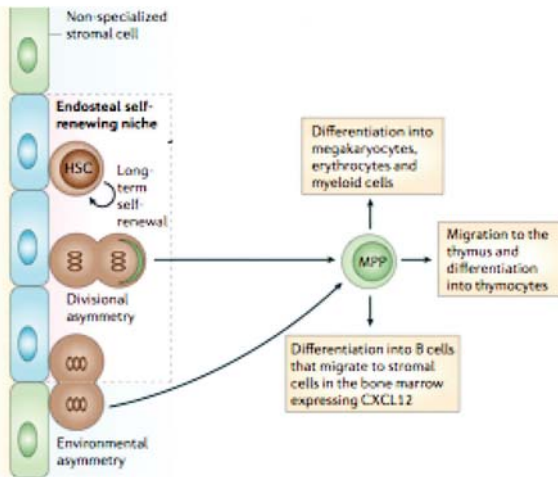
Les interactions niche hématopoïétique-CSH



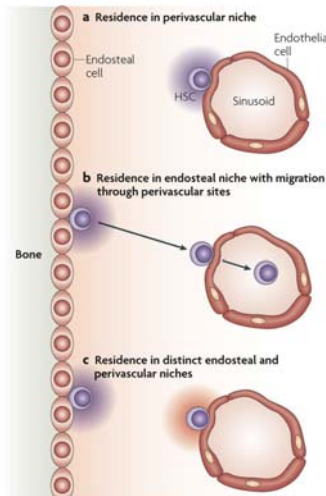
Implication de la niche dans la quiescence et l'auto-renouvellement des CSH



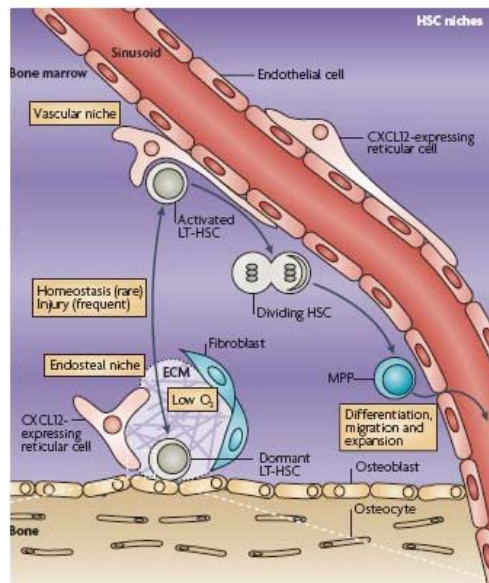
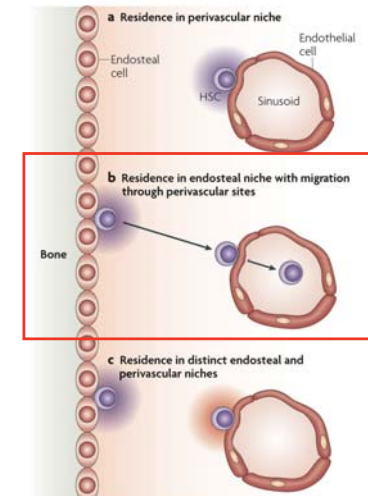
Les niches hématopoïétiques dans la moelle osseuse



Hypothèses sur l'existence d'une niche périvasculaire



Hypothèses sur l'existence d'une niche périvasculaire



b/ Rôle des facteurs de croissance ou cytokines

- Glycoprotéines
- production locale **excepté EPO et la TPO** produites à distance respectivement par le rein et le foie
 - **cellules du stroma**
 - **lymphocytes T**
 - **monocytes/macrophages**
- Action **à faible concentration**
- Action **synergique** et parfois **redondante**

Facteurs synergiques : SCF (Stem Cell factor), FLT3-L, IL1 , IL6 , IL11
LIF(Leukemia inhibitory factor),

Action sur les CSH: ↑ survie, ↑nb en cycle,
sensibilisent les cellules aux autres FC (expression des récepteurs)

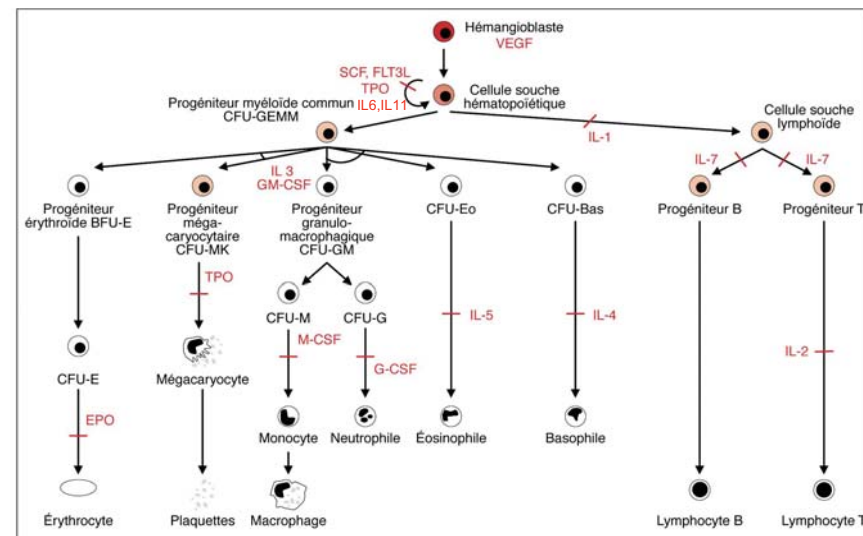
Facteurs multipotents: IL3, GM-CSF (prog. myéloïdes)
IL7 (prog. Lymphoïdes)

Action sur les progéniteurs: ↑ survie, action sur plusieurs lignées, sortie de
l'état de quiescence

Facteurs restreints: G-CSF, M-CSF, EPO, TPO, IL5

Facteurs de différenciation terminale

Facteurs de maturation

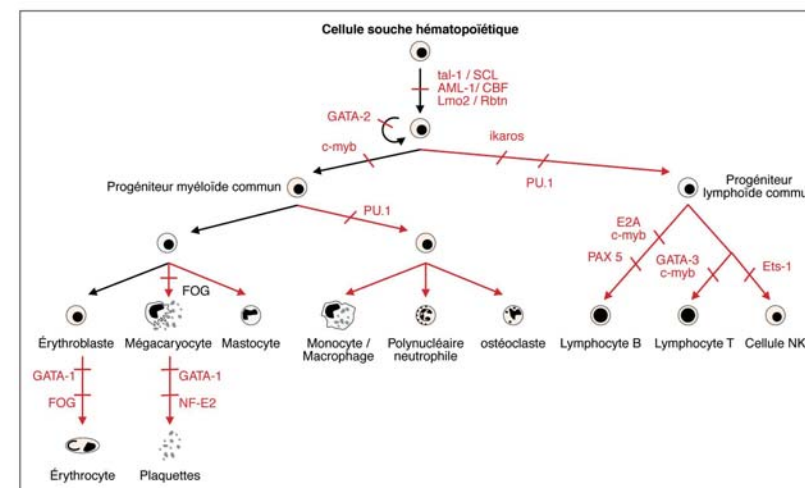


2/ Facteurs intrinsèques

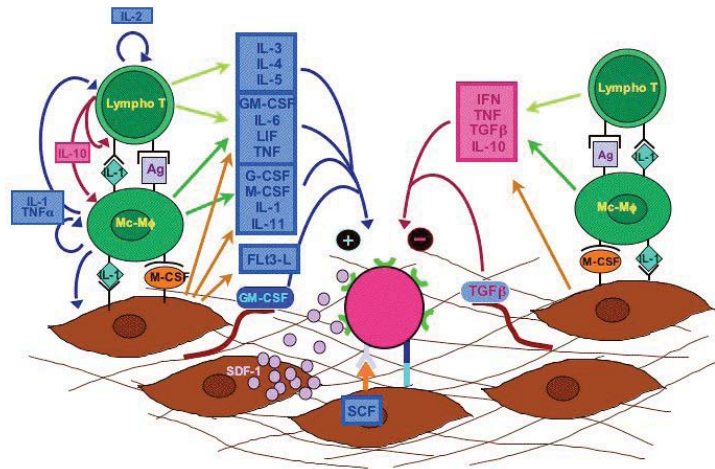
Les facteurs de transcription: Permettent
l'expression de gènes codant les protéines nécessaires
à la fonction des cellules.

FACTEUR	TYPE	EXPRESSION	PHENOTYPE K/O
GATA-1	Zinc F	Eryth, Meg, E, Mast	Pas d'erythro/megaK
PU.1	Ets	Pr. myéloïdes, B	Pas de myélop / B
AML1	Runt	C. hematopoïétiques	Pas d'Hématopoïèse
PAX-5	P. box	Cellules B	Pas de cellules B
IKAROS	Zinc F	Cellules T	Pas de C. lymphoïdes

Les facteurs de transcription



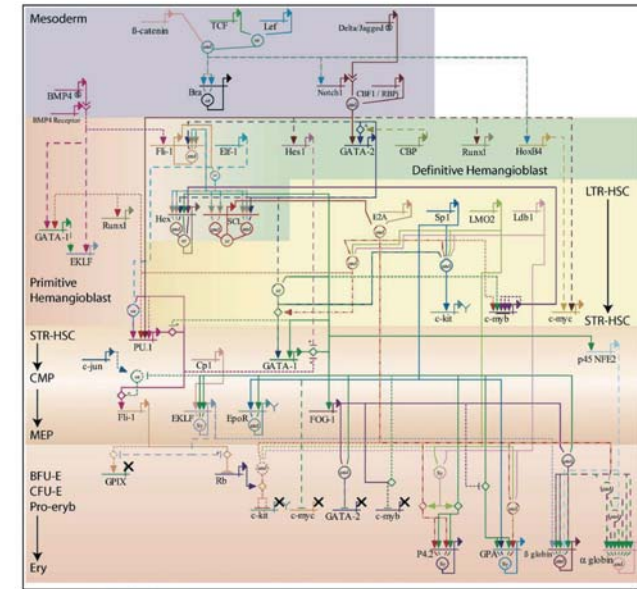
L'intervention des facteurs de transcription dans l'hématopoïèse est
déterminée par l'utilisation de souris KO.



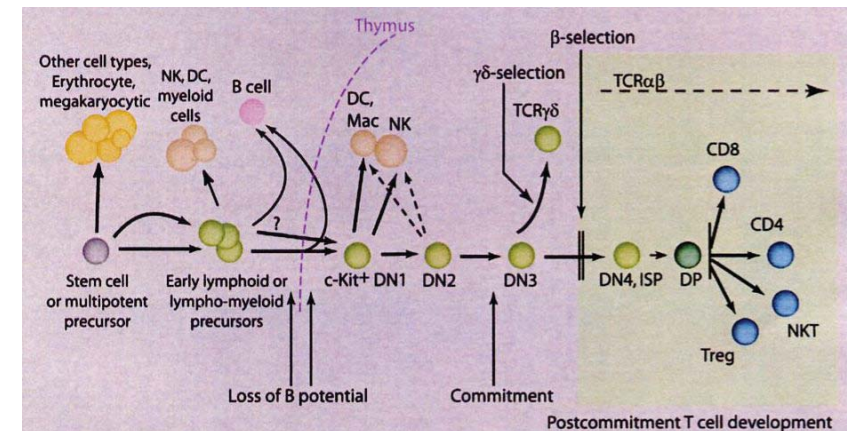
Les CSH doivent intégrer l'ensemble des signaux pour :

- Survivre ou mourir
- Se différencier ou s'autorenouveler

Les réseaux d'interactions possibles entre les gènes impliqués dans l'hématopoïèse



VI. Différenciation des lymphocytes T et B à partir des CSH



DP : CD4⁺CD8⁺

DN : CD4⁺CD8⁻

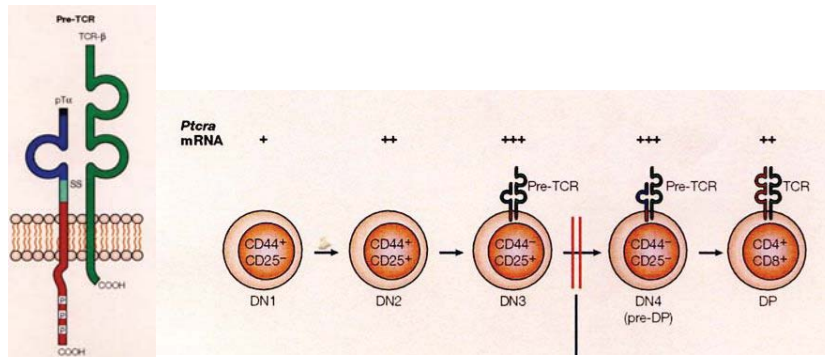
DN1 : CD44⁺CD25⁻

DN2 : CD44⁺CD25⁺

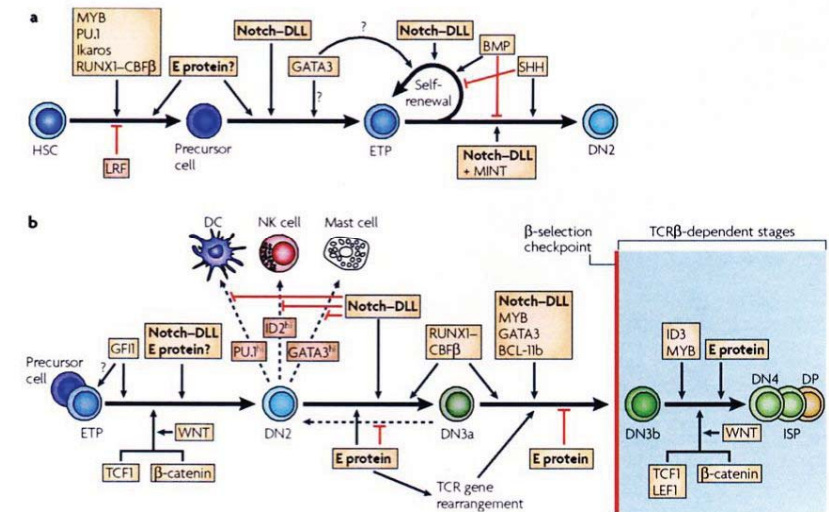
DN3 : CD44⁺CD25⁺

DN4 : CD44⁺CD25⁻

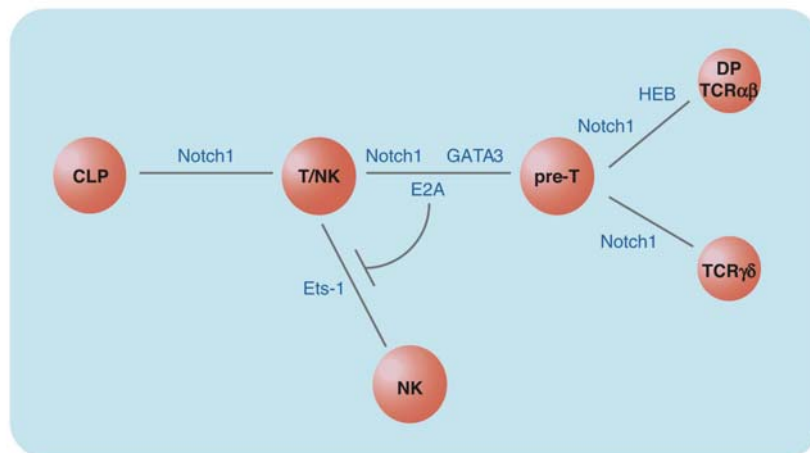
Le pré-TCR, étape clé de la lymphopoïèse T



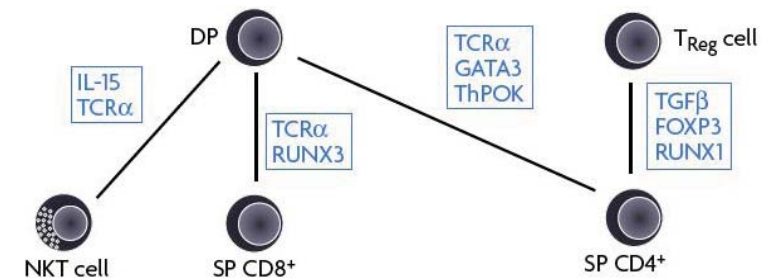
Les facteurs qui régulent la différenciation T

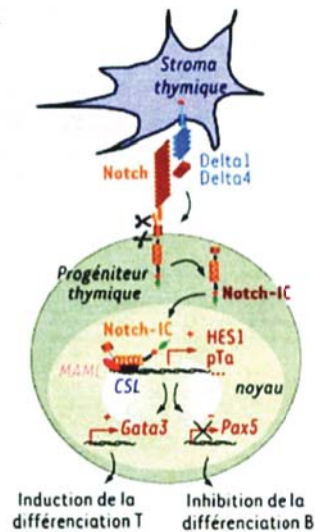


Les facteurs qui régulent la différenciation T (1)

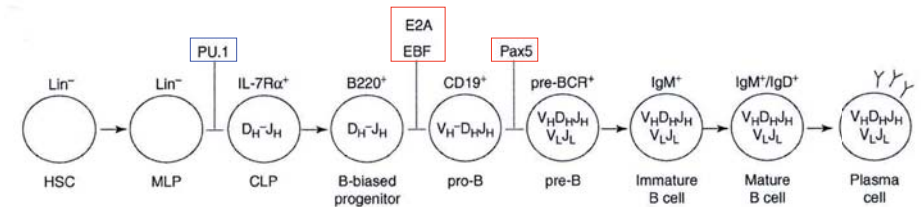


Les facteurs qui régulent la différenciation T (2)





Les facteurs qui régulent la différenciation B



Transcription Factors Active in Lymphocyte Development*

Factor	Class	Targets	Expression	Phenotype of knockout mutant
Multilineage CBFβ2 = AML1, PEBP2αB	Runx	TCRα, β, γ, δ; RAG1; CD3ε; CD3ζ, Igh	Thymocytes, T-cell lines, B-cell lines, myeloid cell lines, pluripotent pre- cursors	Lack of definitive hematopoiesis; all lin- eages
c-Myb	Myb	TCRγ, δ, CD4, c-kit, Lck, Bcl-2	Hematopoietic cells, other embryonic tissues	Multilineage fetal hematopoiesis defect
PU.1	Ets Winged helix	Igh, IgJ chain, Igh, Igh, CD79a	PU.1 mainly in B cells and macro- phages, also precursors and early T cells	Perinatal or perinatal death due to mac- rophage loss; also elimination of B cells and stem cells, early loss, late recovery of T-cell development
Ikaros	Zn finger (Hunchback)	CD3ε, CD2, CD6ε, TdT, RAG1, Lck proximal?	T cells, thymocytes, early B cells, hematopoietic stem cells, some myeloid precursors	Dominant negative; no lymphoid devel- opment (T, B, NK), some myeloid abnormalities. Null mutation: block of B, NK, fetal T development but post- natal T development recovers
T-Cell "specific" TCF-1	HMG	TCRα, β, δ; CD3ε, CD4, CD6ε, IL-4, IL-13, Lck proximal?	Thymocytes > mature T cells; many nonhematopoietic embryonic cell types	T-cell development blocked during DN → DP transition
LEF-1	HMG	Same as TCF-1	Pre-B cells, thymocytes, many nonhe- matopoietic embryonic cell types	Lack of B-1 B cell lineage; lack of whis- kers, hair, teeth; neurological defects; most thymic populations appear OK
Sox-4	HMG	CD2, CD3ε	Thymocytes, gonads, and multiple embryonic tissues	Cardiac malformation, early B develop- mental defect; also T lineage slow- down
CREB	bZIP (CREB/ATF)	TCRα, β, CD2, CD6ε	Ubiquitous, also many ubiquitous family members; possible T-cell- specific splice variants	Complete knockout: perinatal death whenever detect; also selective block of fetal TCRβ ⁺ thymocytes, not other hematopoietic cells; dominant nega- tive from T-cell specific promoter; normal T-cell development, inhibited response to activation
GATA-3	Zn finger (GATA)	TCRα, β, δ, CD2, CD6ε	Hematopoietic precursors, T cells, other embryonic tissues, including midbrain and eye	Severe neurologic abnormalities, gross defects in fetal liver hematopoiesis; T-lineage developmental block in RAG-/- chimeras
B-Cell "specific" E2A (similar target genes possible for HEB or other bHLH)	bHLH class A	RAG1, CD4, CD6ε, TCRγ, Igh, Igh, TdT, EBF? Pax5? cyclin-depen- dent kinase inhibitor p21	Ubiquitous	E2A knockout: severe B-lineage devel- opmental arrest, slowdown of T-line- age devel due to early defect. E2A/HEB double heterozygotes show similar effects
EBF	EBF/OF HLH-like	CD79a (Igα, mb-1), A5, Irfx6, Pax5?	Olfactory neurons, adipocytes, B-cell precursors	Severe B-lineage developmental arrest
Pax5	Pax Paired, homeo	CD19, A5, VpreB, btk kinase, IgJ chain, Vh germline promoter, Igκ	Central nervous system, B cells	Posterior midbrain abnormal, severe B-lineage developmental arrest, no V-DJ joining
Other Ets family	Ets Winged helix	TCRα, β, γ, δ, Bcl2, CD2, CD3ε, TCRγ, CD4, CD6ε, Lck, per- forin, many B-cell genes	Many detailed expression patterns for different family members. Ets-1 in mature B & T cells	Ets-1 knockout: T, B cells develop but show accelerated cell death, plasma cell differentiation in response to ac- tivation