

L'HÉMATOPOIÈSE

BMC 423

Julien FELLAH

jsfellah@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



GR



PN



Mo



Ly



Pl.



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

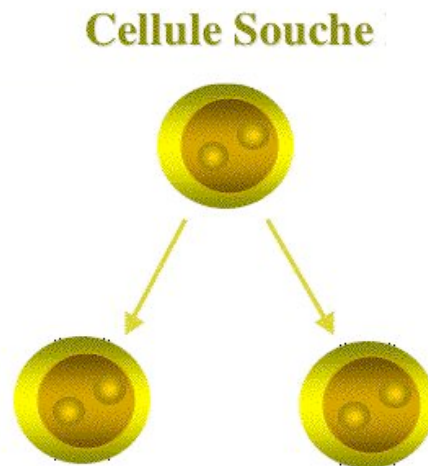
Cellules fonctionnelles qui
passent dans le sang

II. Les Cellules Souches Hématopoïétiques

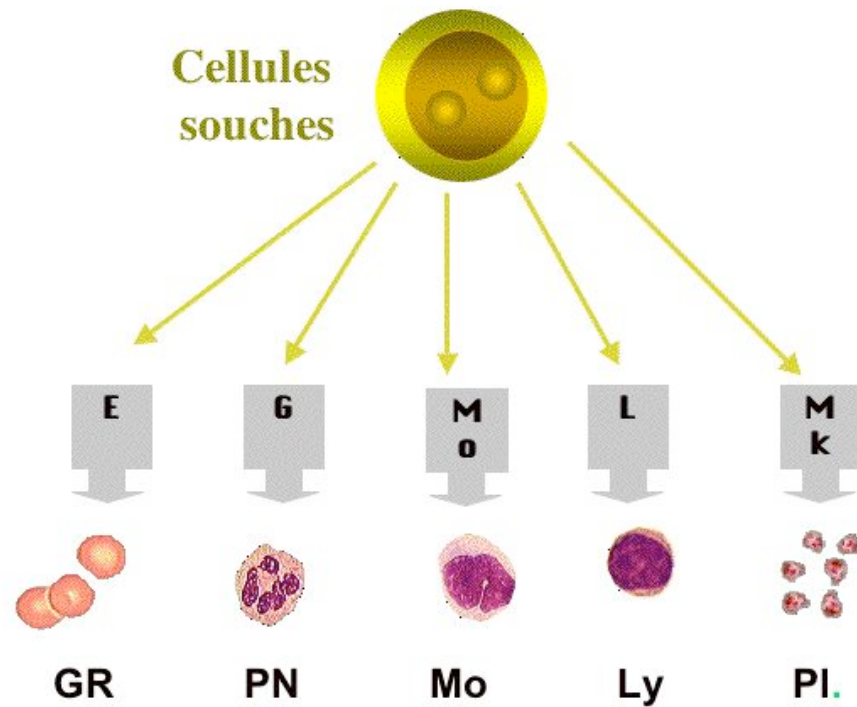
Deux propriétés fondamentales

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

—————> maintien du pool de CSH



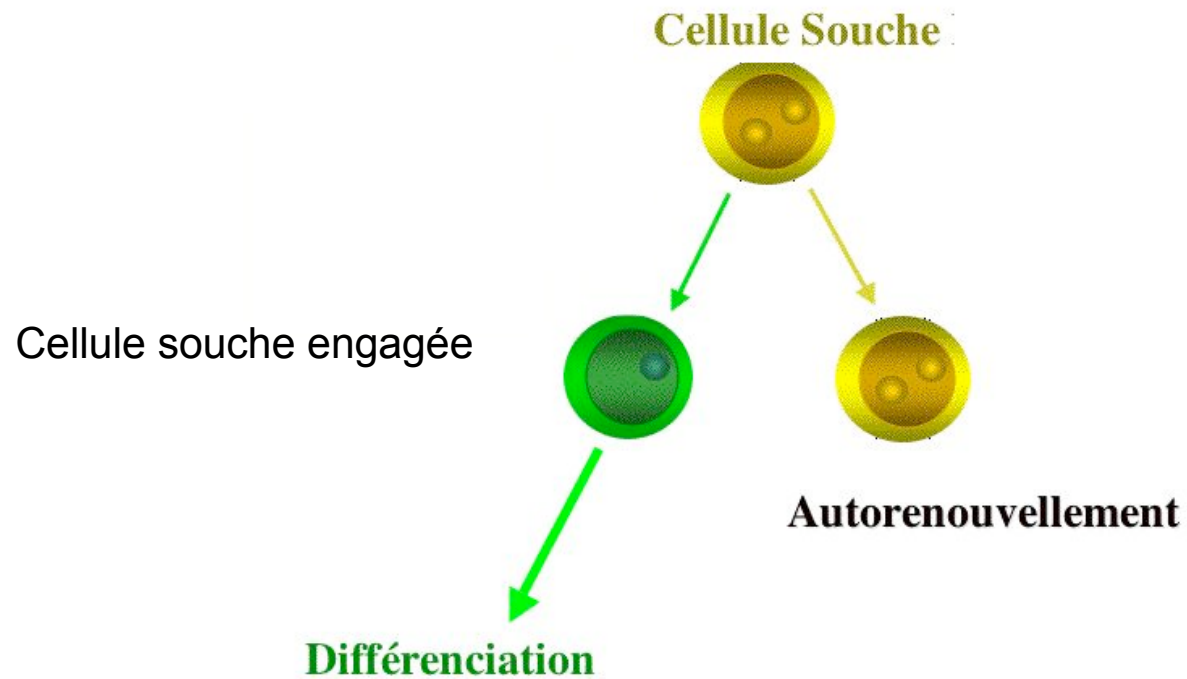
b/ Multipotence: capacité de se différencier en n'importe quelle cellule du **sang**



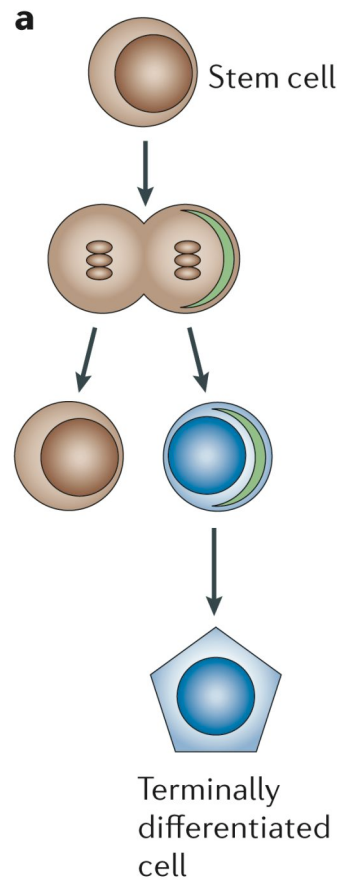
Caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques

- 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)

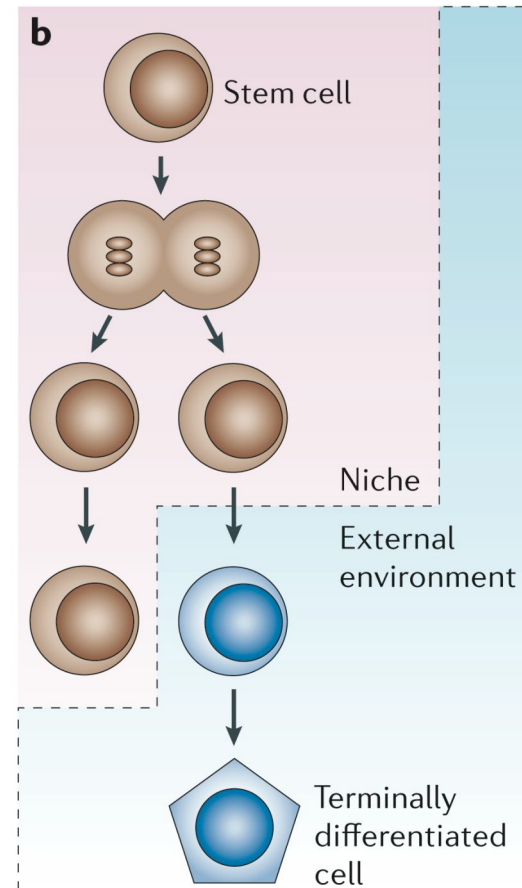
Engagement dans une voie de différenciation par division asymétrique



Les deux modèles de la division asymétrique



Distribution inégale
des facteurs cellulaires

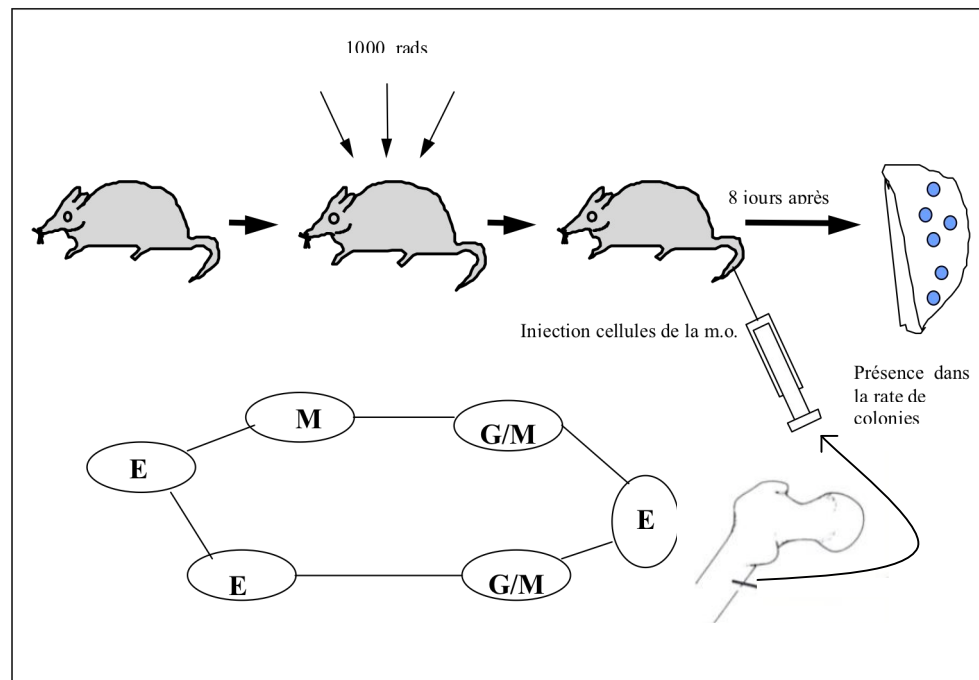


Intervention de facteurs extérieurs

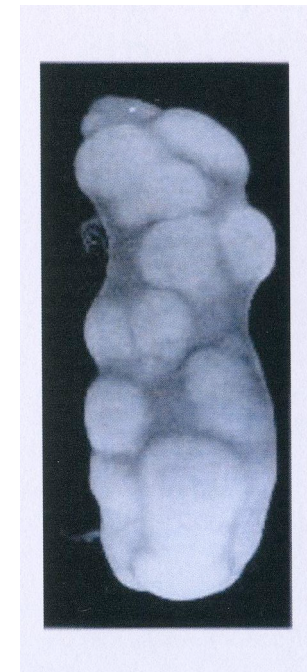
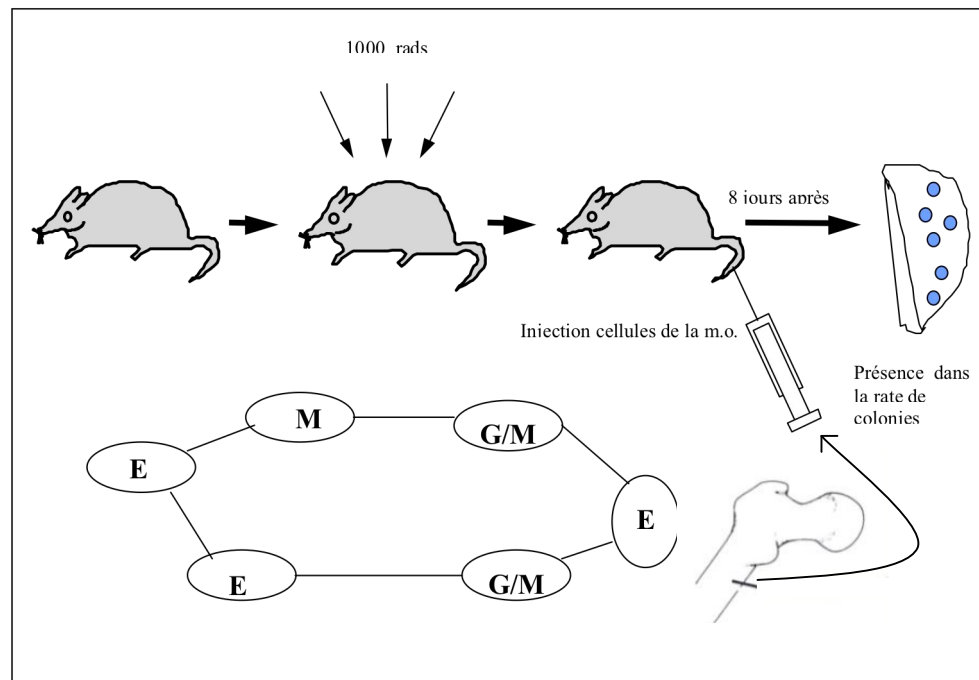
III. MISE EN ÉVIDENCE DES C.S.H.

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

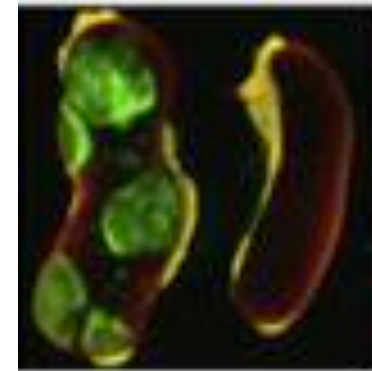
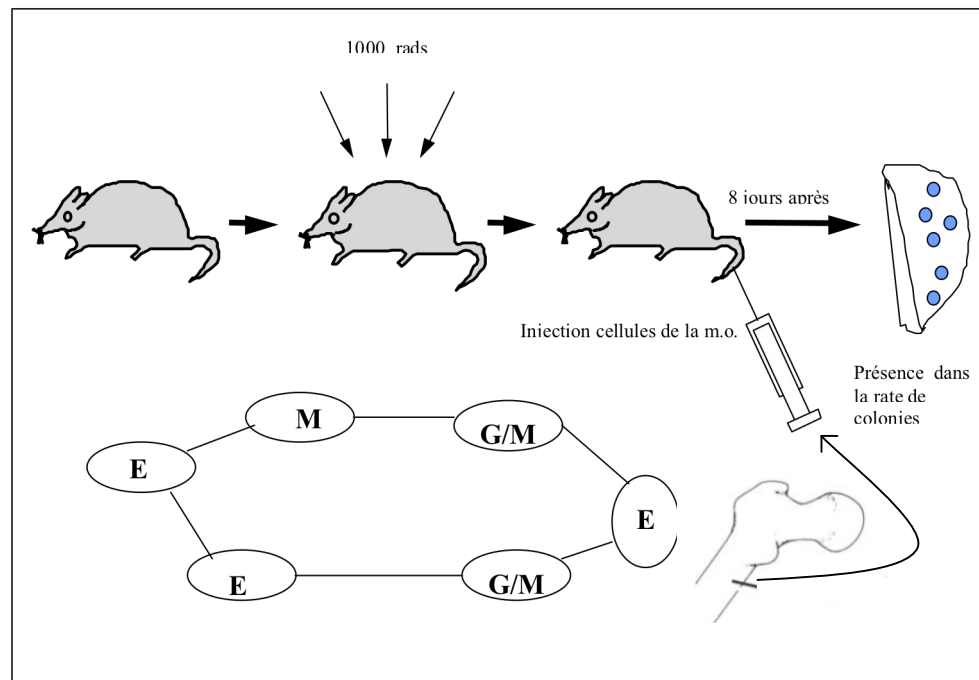
Première mise en évidence de cellules multipotentes chez la souris : Expérience de Till et Mc Culloch (1961)



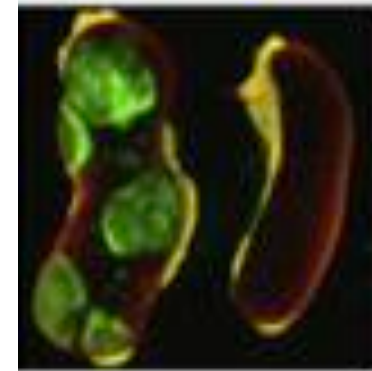
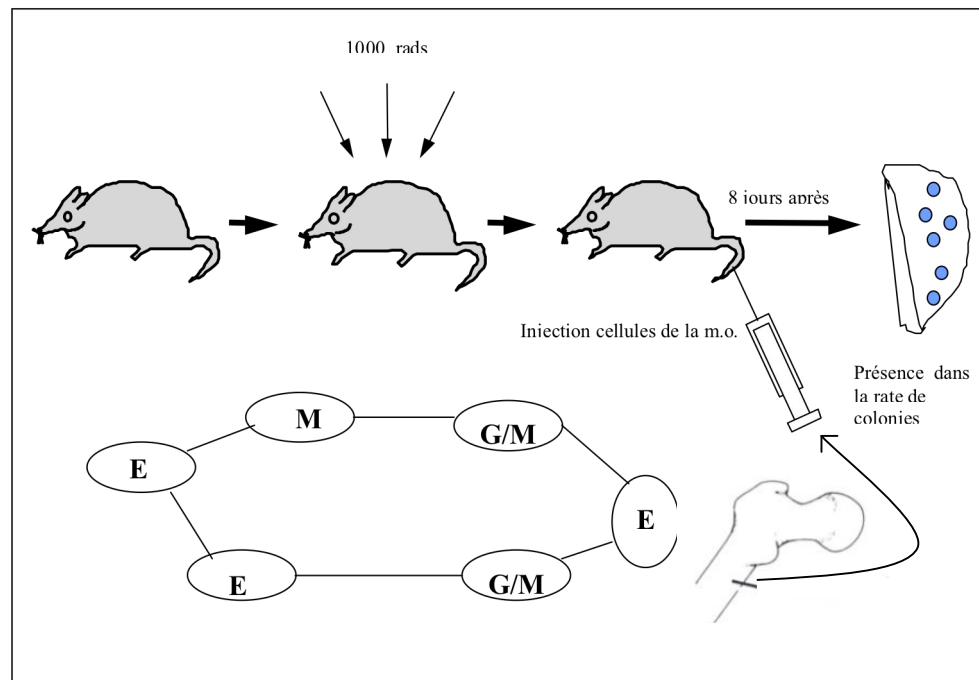
Première mise en évidence de cellules multipotentes chez la souris : Expérience de Till et Mc Culloch (1961)



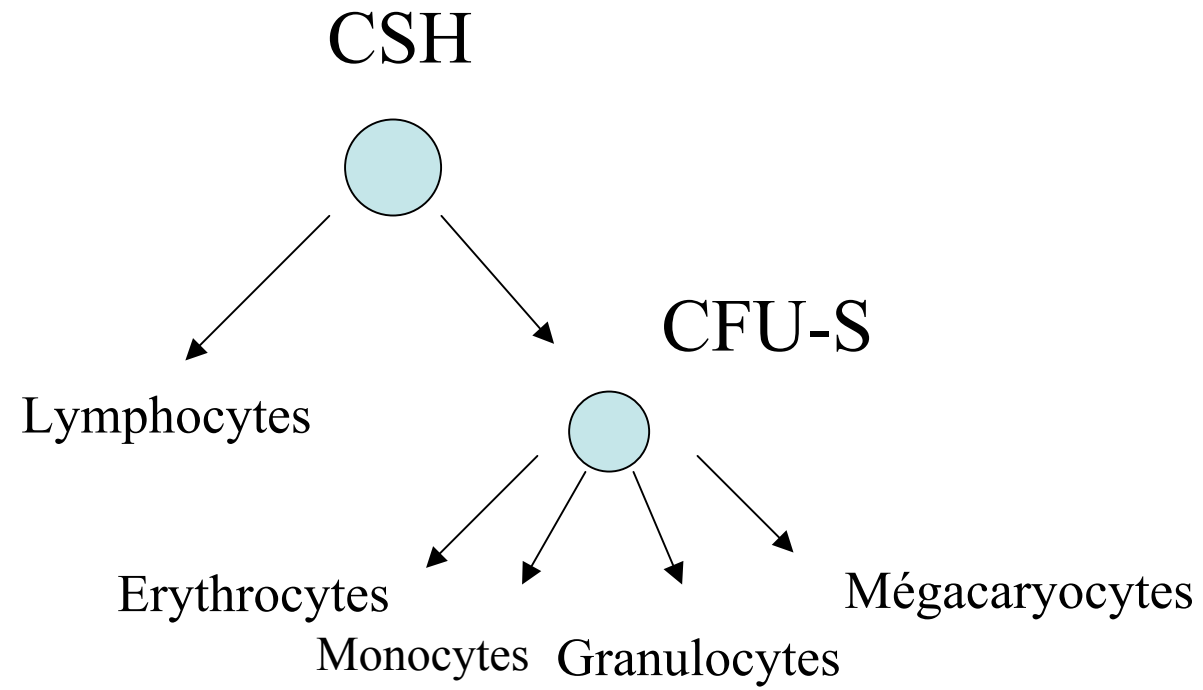
Première mise en évidence de cellules multipotentes chez la souris : Expérience de Till et Mc Culloch (1961)



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

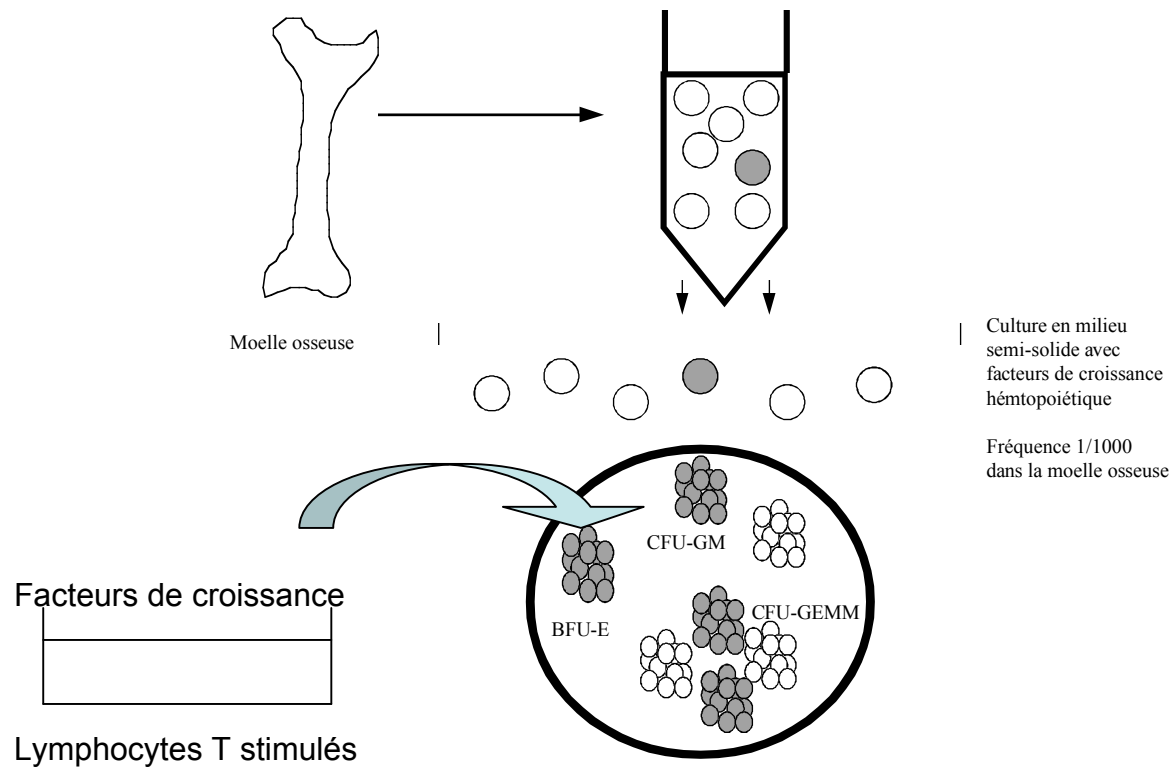


Chaque colonie est issue d'une seule cellule de la m.o appelée
CFU-S : Colony Forming Unit in the Spleen



Mise en évidence des CSH par culture des cellules de m.o. en milieu semi-solide (Methylcellulose).

Expérience de Metcalf (1966)



CFU-É

BFU-E

CFU-GM

CFU-Még



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

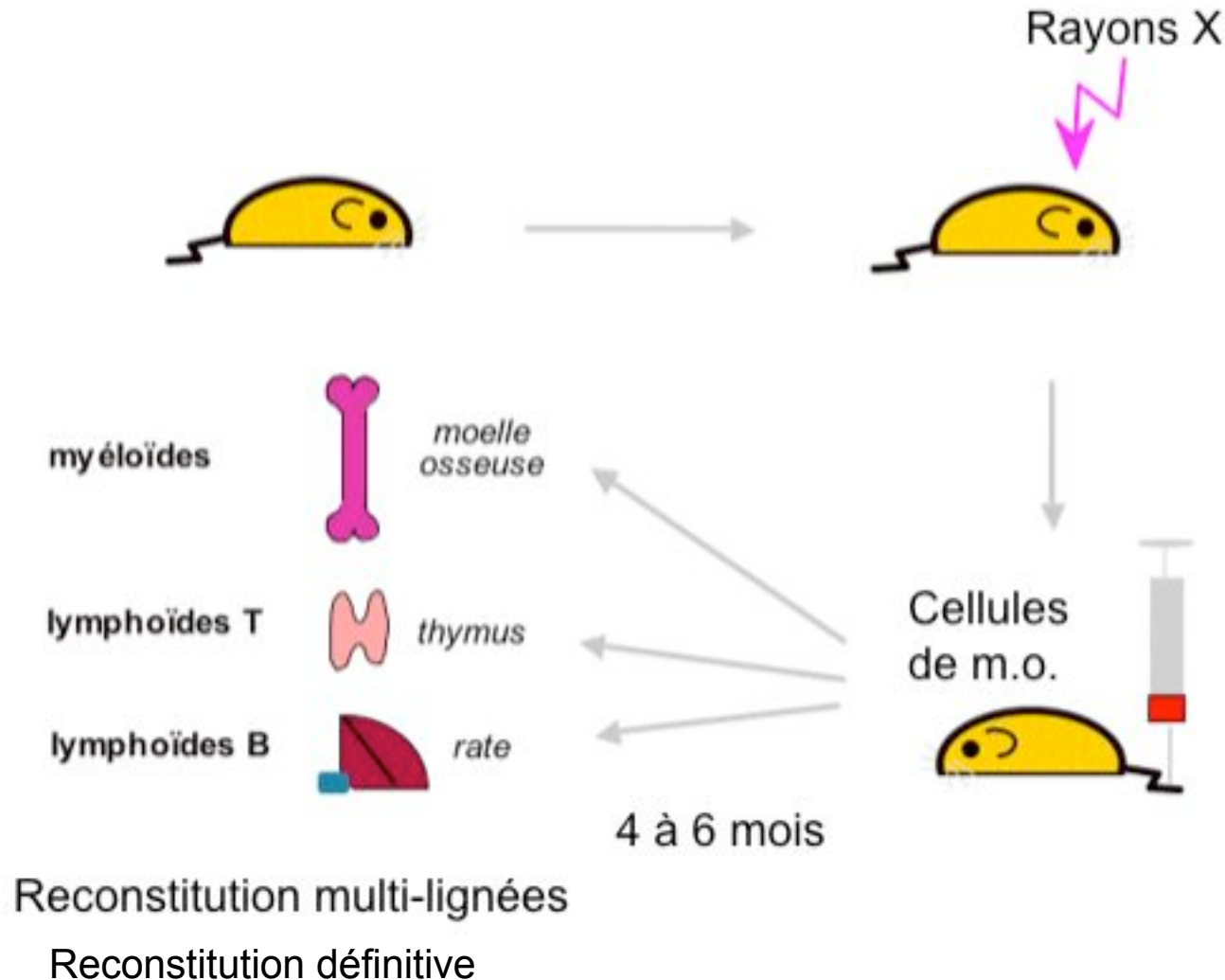
(GR-PN-macrophage-Megacaryocytes) et les lymphocytes B
présentent la même anomalie chromosomique :

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

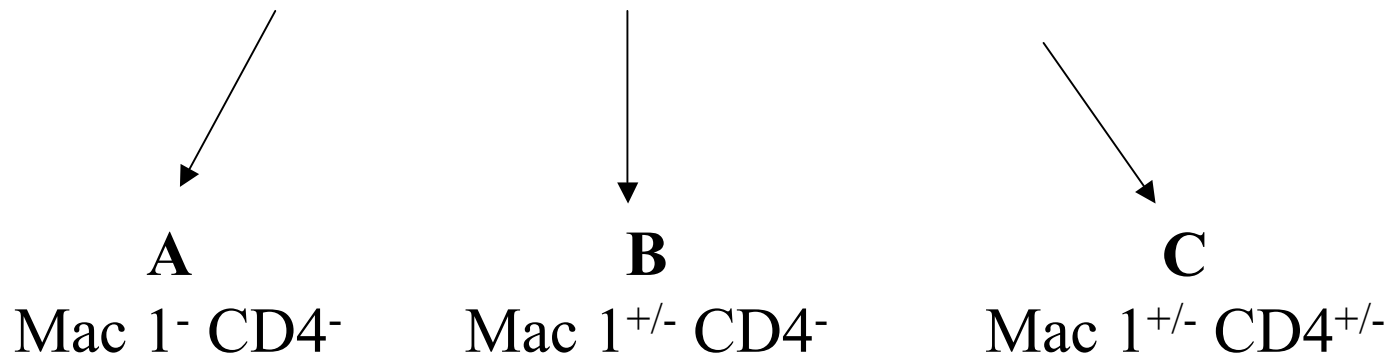
—→ Cellules sans marqueurs de différenciation : cellules LIN-

Utilisation d'autres anticorps

→ Permet d'isoler une population de cellules

Thy1^{+/-} Sca1⁺ cKIT⁺ LIN⁻

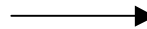
→ 0,02% des cellules de la m.o.= CSH



1/ Rayons X



Cellules A

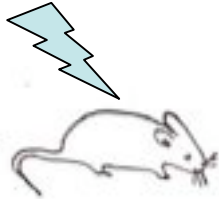


Cellules A+B+C

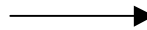


Reconstitution à long terme
+ capacité d'autorenouvellement
des cellules A

2/ Rayons X



Cellules B

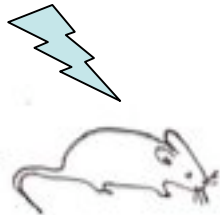


Cellules B+C

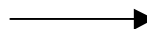


Reconstitution à court terme
+ autorenouvellement moins efficace
des cellules B

3/ Rayons X



Cellules C



Cellules C



Reconstitution très courte
Pas d'autorenouvellement
des cellules C

Potentialité de reconstitution $A > B > C$

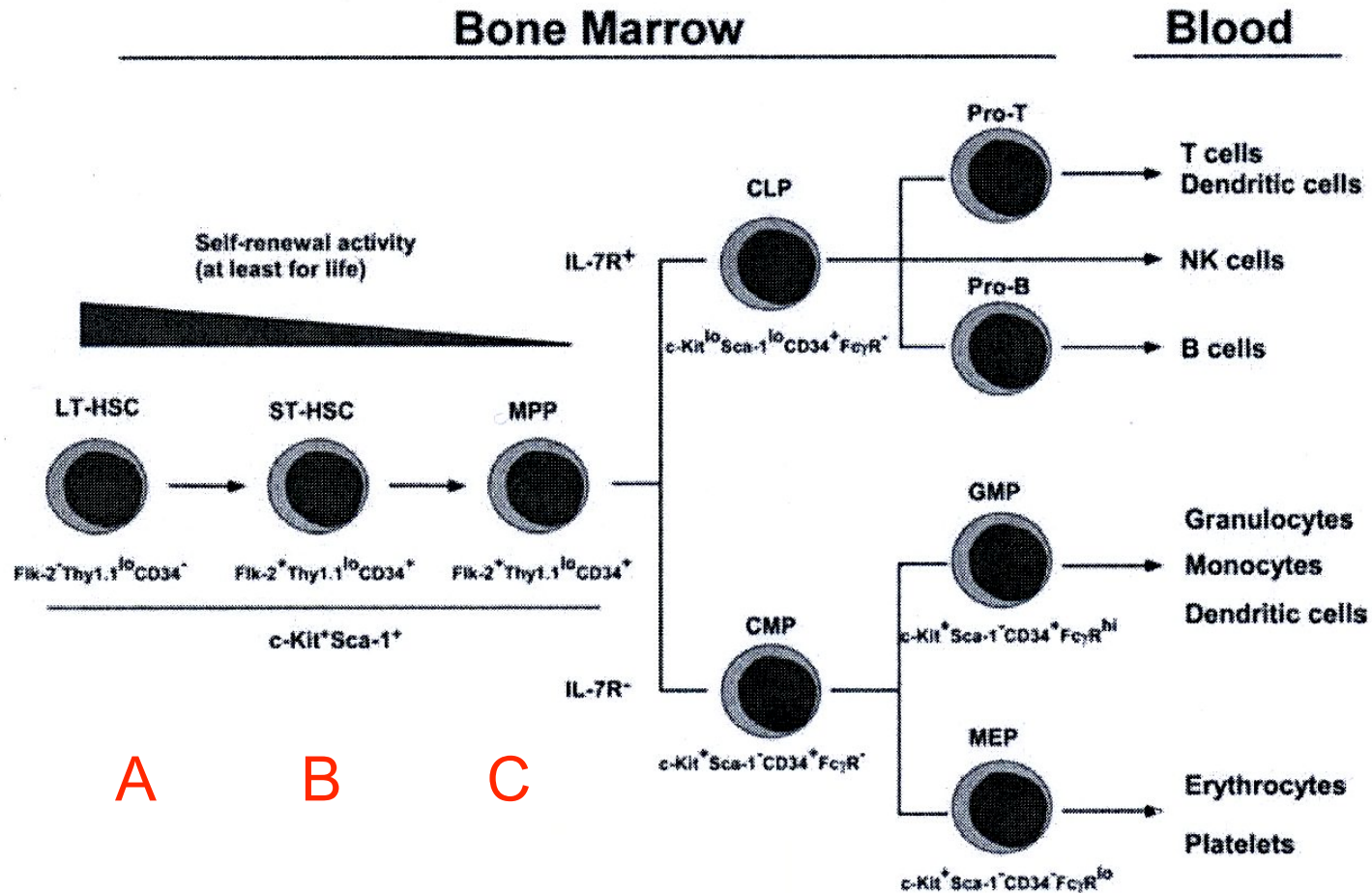
Les cellules A (Mac1⁻ CD4⁻ CKIT⁺ Sca 1⁺ Thy1⁺ LIN⁻) : véritables CSHs,

—————→ seule population capable d'**autorenewement**

et de **reconstituer** définitivement les territoires hématopoïétiques

d'une souris irradiée (production de toutes les cellules du sang)

Compartiments hématopoïétiques



A

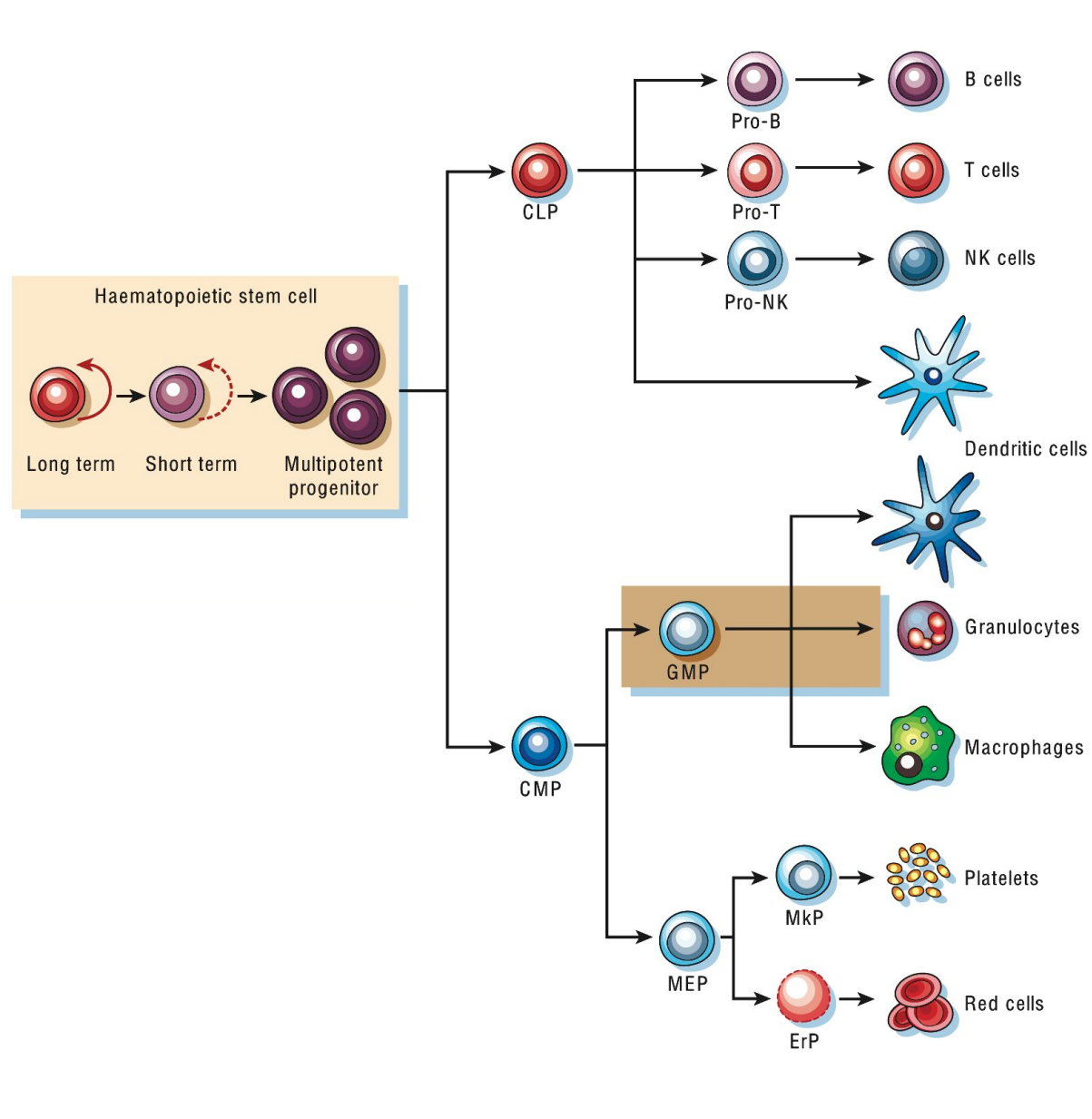
B

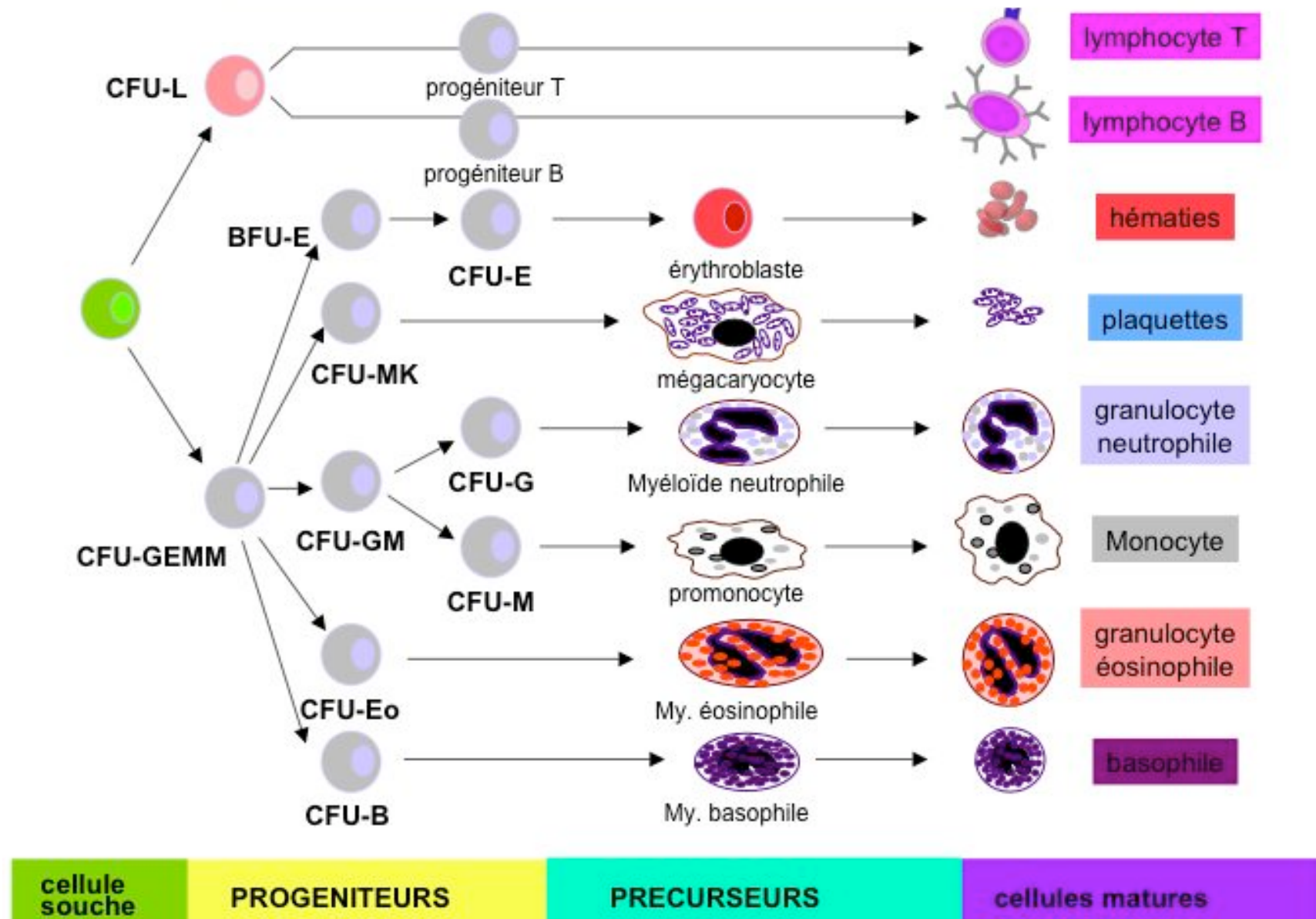
C

Cellules souches

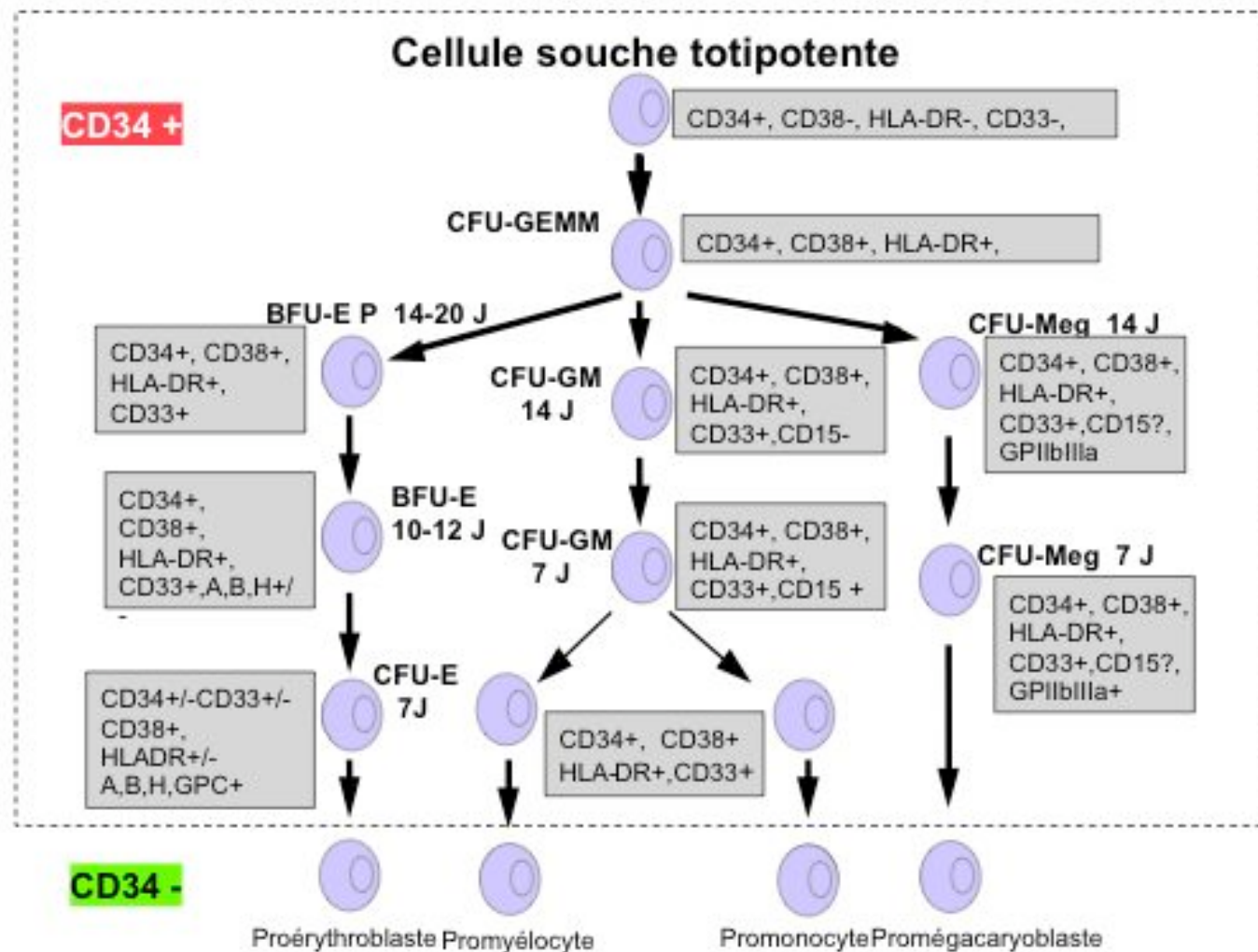
Progéniteurs

Cellules matures

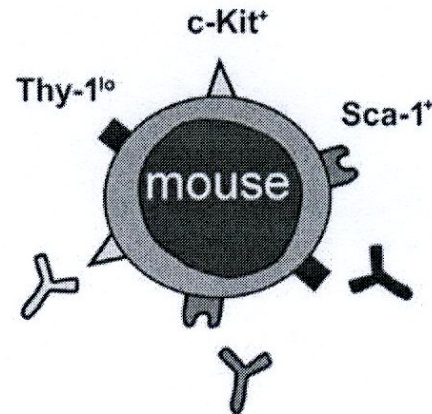




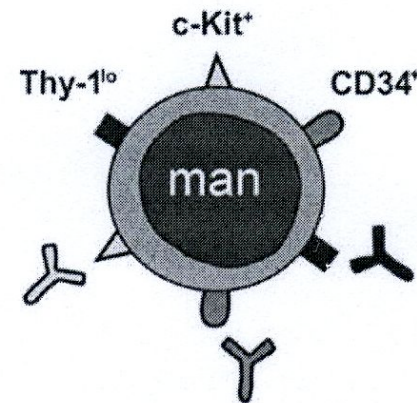
CD34 marqueur des CSHs humaines



Phénotype des CSH de la moelle osseuse



Negative for:
B220
CD3,4,8
Mac-1
Gr-1
Ter 119



Negative for:
CD10
CD14
CD15
CD16
CD19
CD20

Cellules KTLS

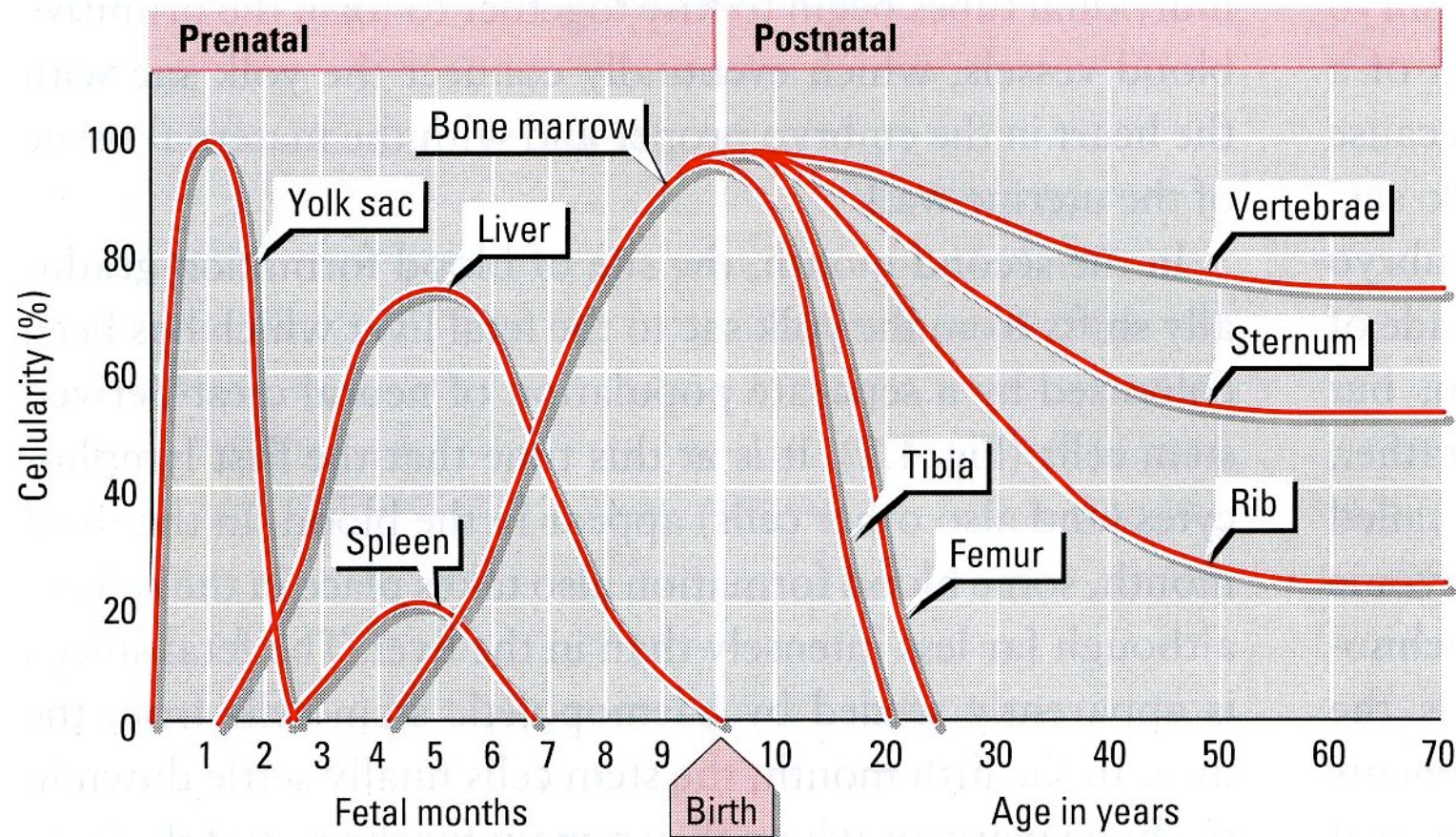
Lin-CD34⁺CD38-THy1^{+/-} Kit⁺

Lin-Sca1⁺Kit⁺THy1^{+/-}CD34-CD48-CD150⁺

IV. Les territoires hématopoïétiques

Territoires où se déroule l'hématopoïèse

→ Variation au cours du développement

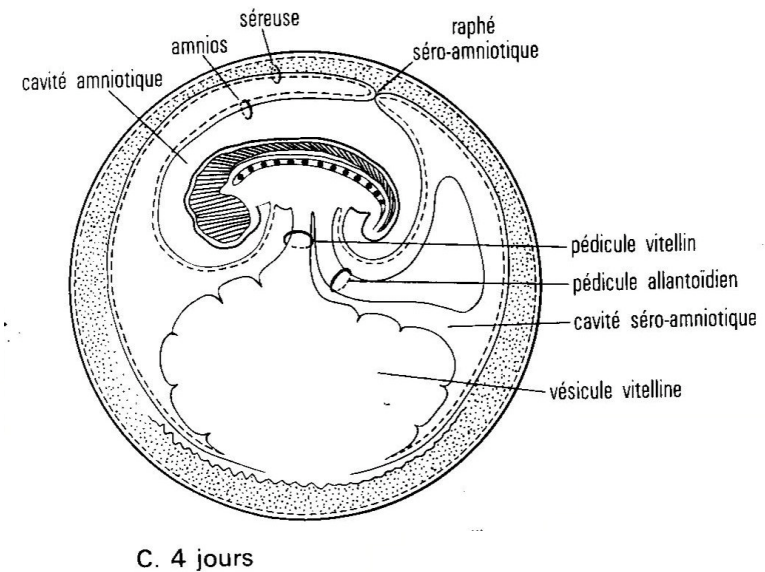
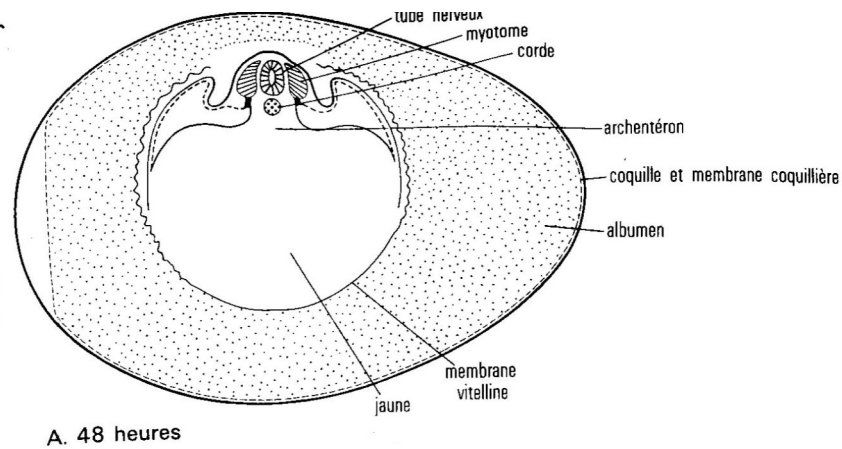


Où sont générées les CSH chez l'embryon?

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

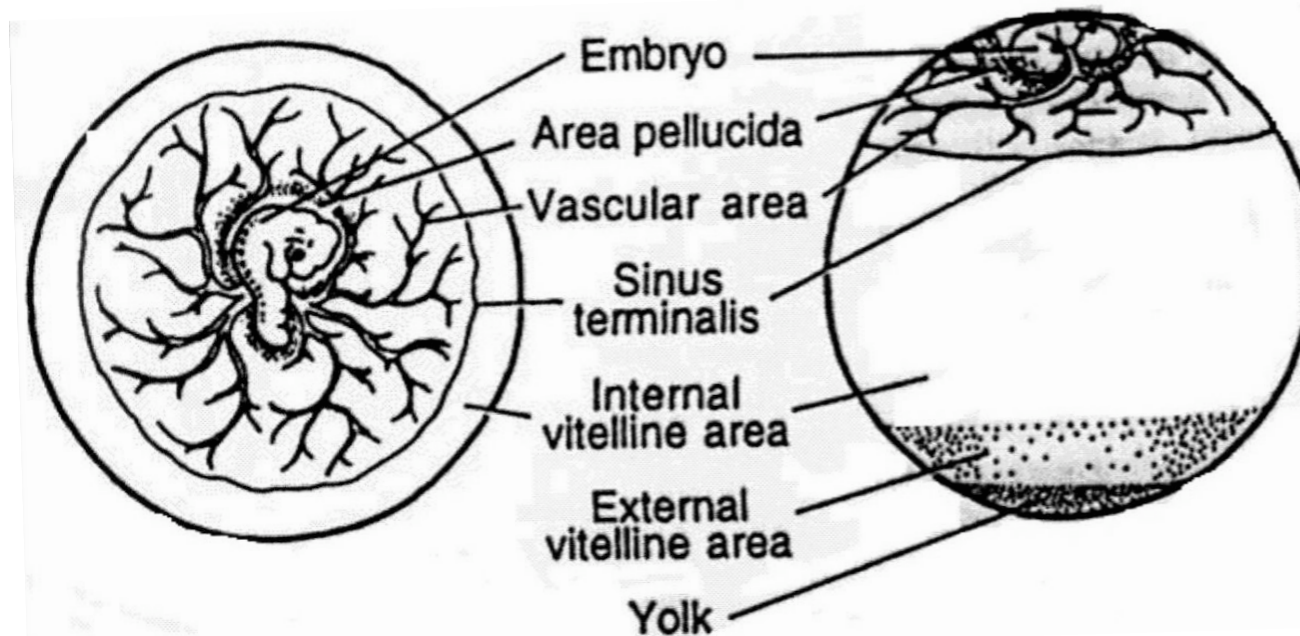
Œufs d'oiseaux deux régions:

→ blanc d'œuf (l'albumen) 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)





Ilots sanguins 1,5j



Vaisseaux sanguins, 2,5j

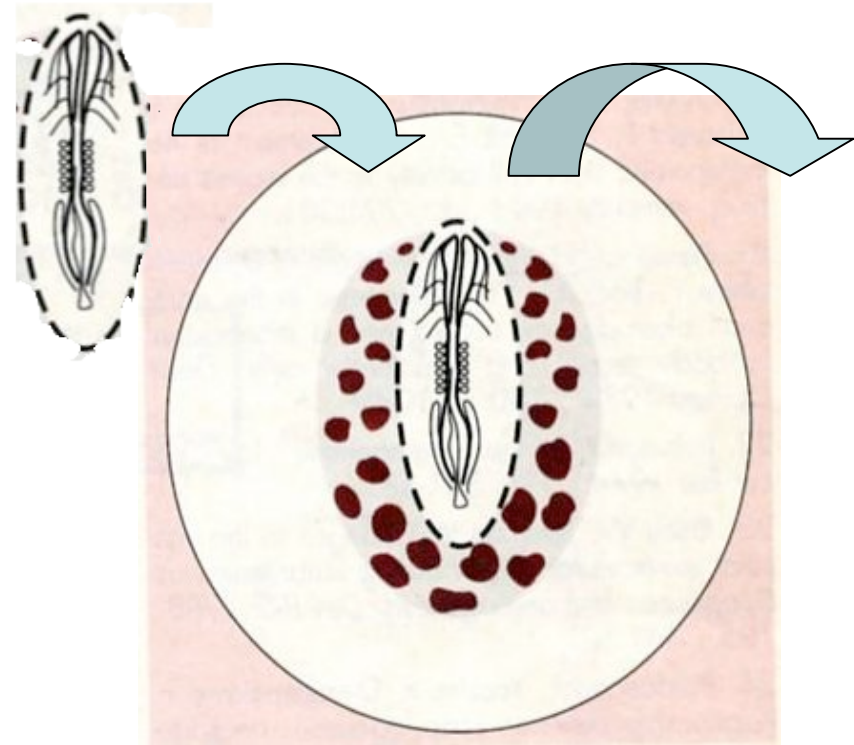
**D'où proviennent les CSH responsables
de la formation de ces premiers globules rouges ?**

————→ Aire embryonnaire ou extra-embryonnaire ?

Utilisation des greffes caille-poulet (chimères)

ESPECE	noyaux des lymphocytes	noyaux des cellules épithéliales
POULET		
CAILLE		

Caille



Poulet

Observations des coupes au microscope :

→ 7 ème jour : GR de type poulet

→ 10ème jour : GR et lymphocytes de type caille

2 sites de production de CSH qui se succèdent :

- **Sac vitellin** : **hématopoïèse primitive**

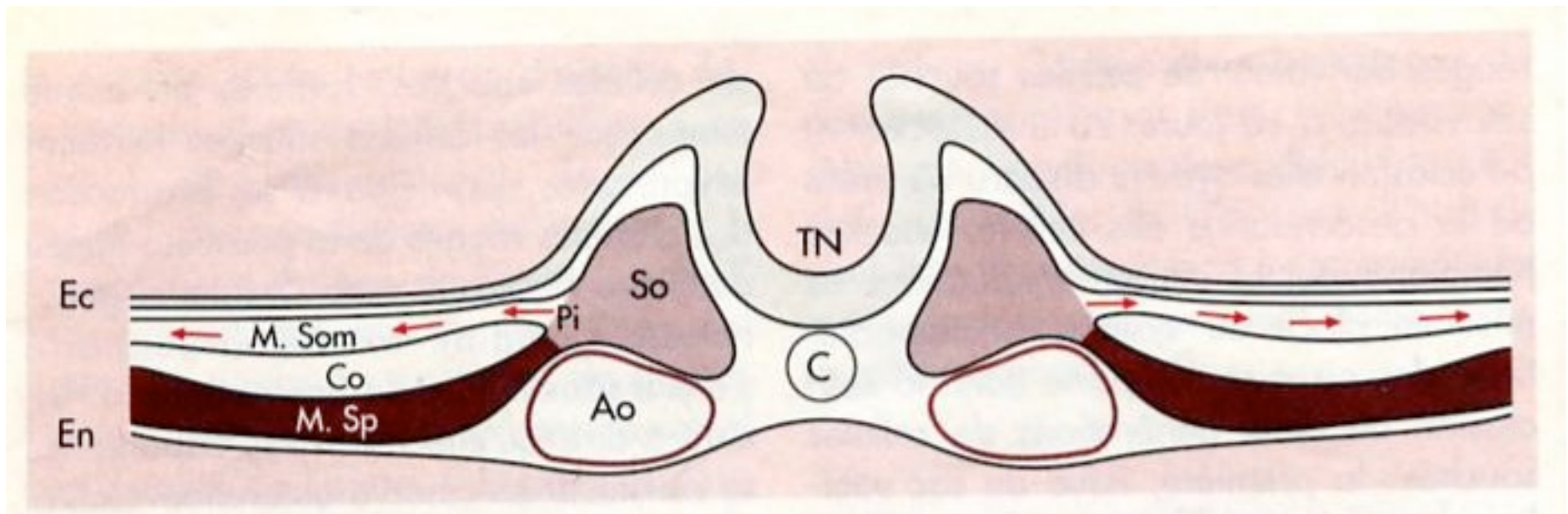
- **Embryon** qui donne les CSH qui colonisent les organes
hématopoïétiques (foie fœtal, thymus)

→ **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)

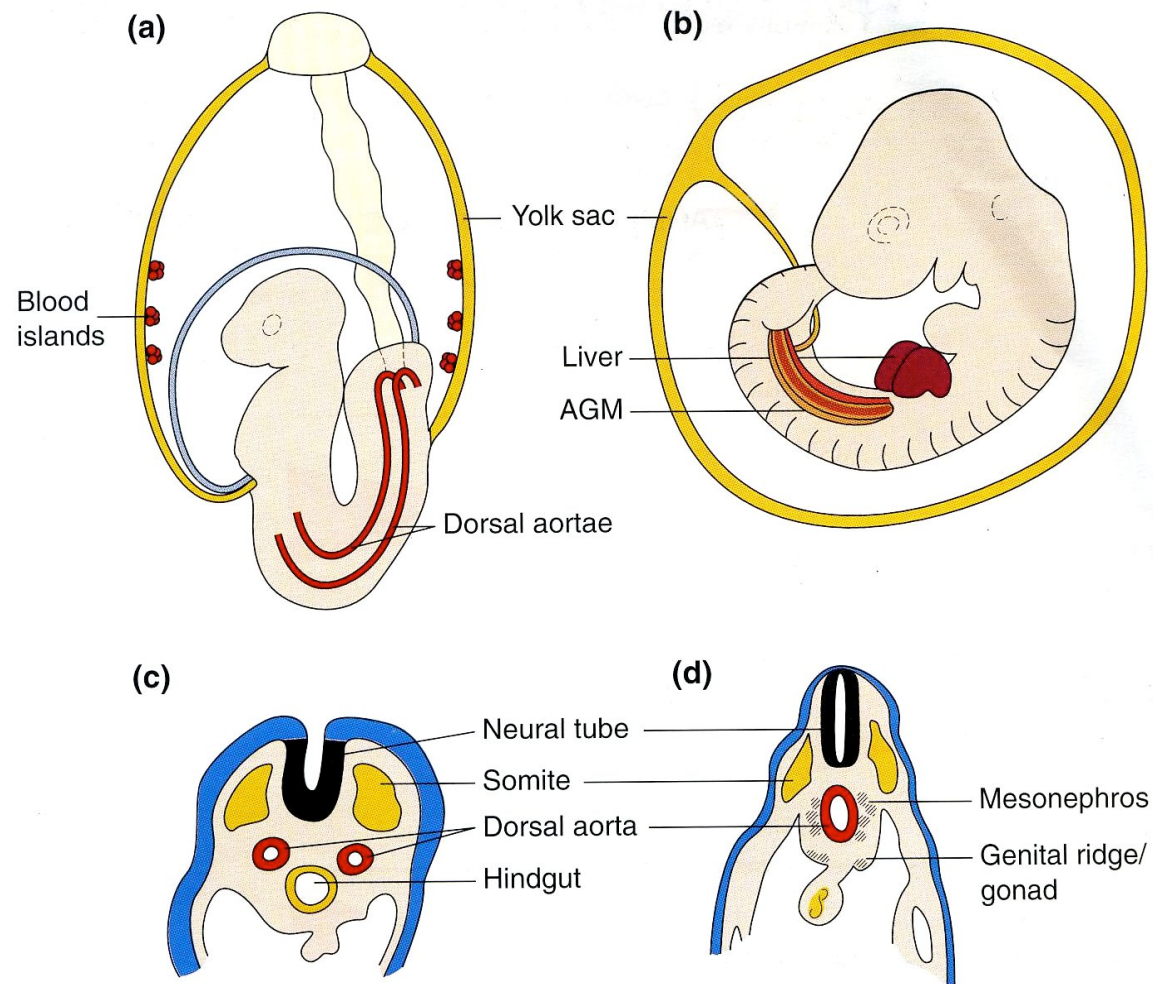


Expériences chez la souris réalisées par A. Cumano :

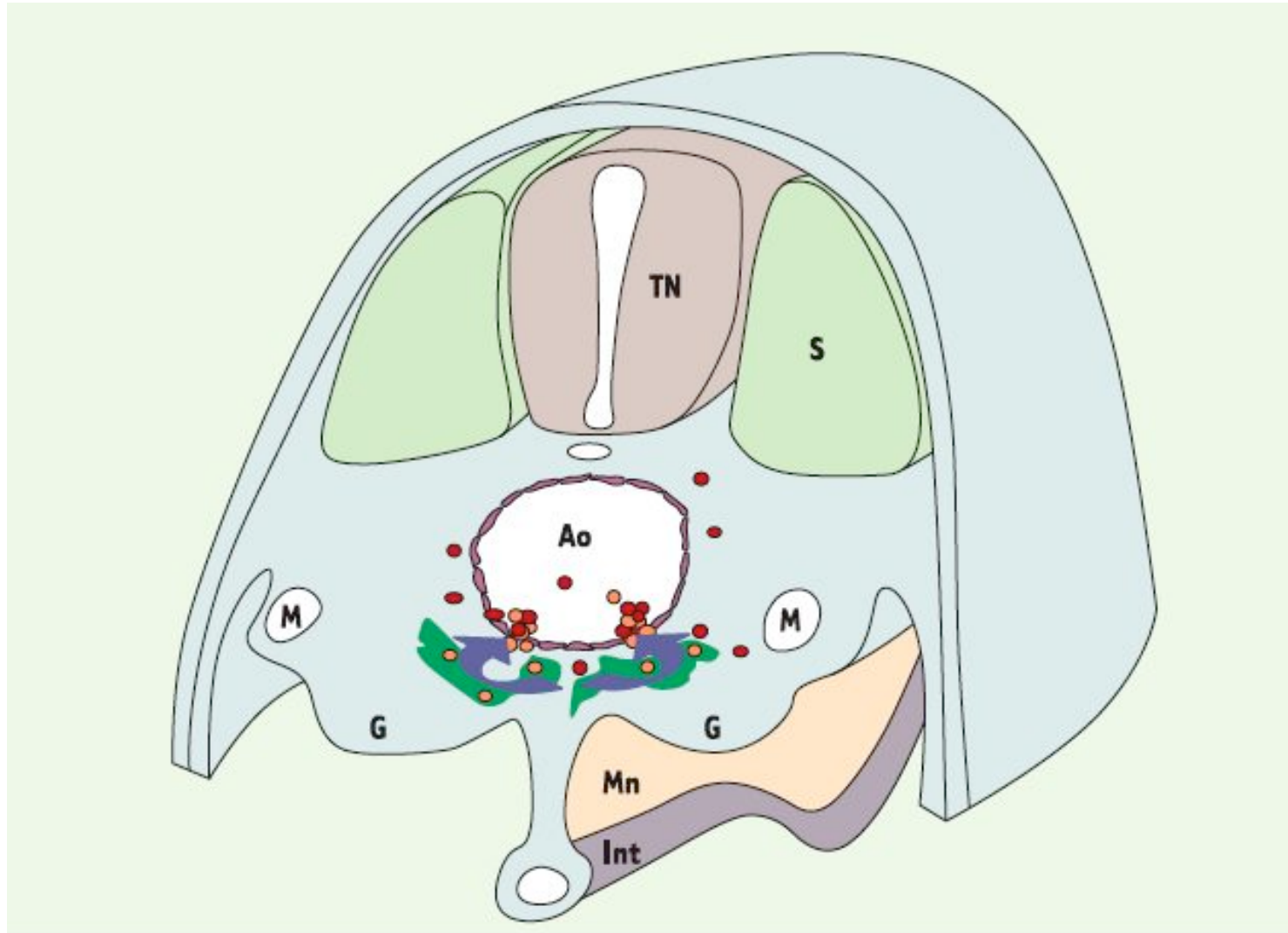
Mêmes successions d'événements chez les mammifères
avec deux territoires de production des CSH chez l'embryon

————→ Sac vitellin et AGM

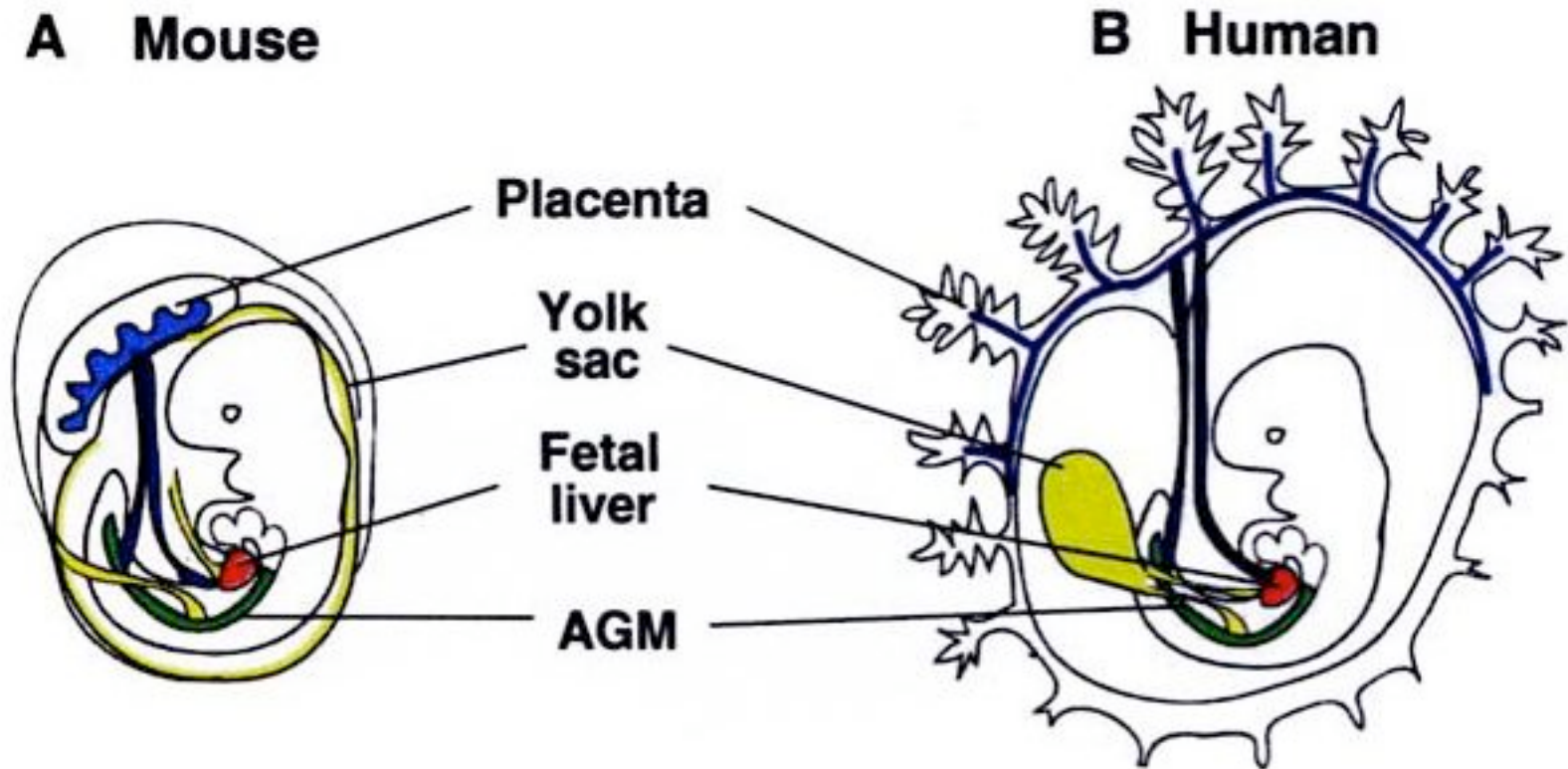
Les territoires de production des CSH chez l'embryon de souris



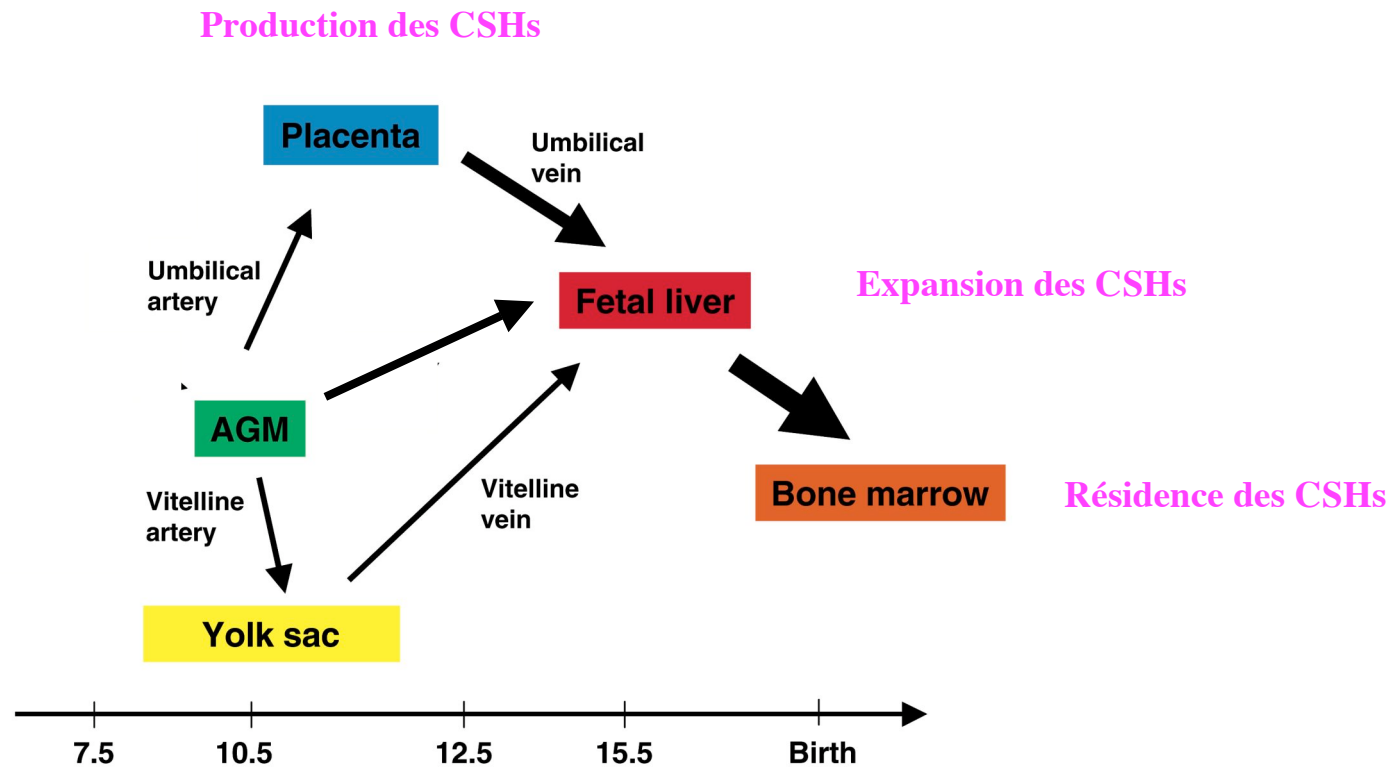
Les CSH de l'aorte

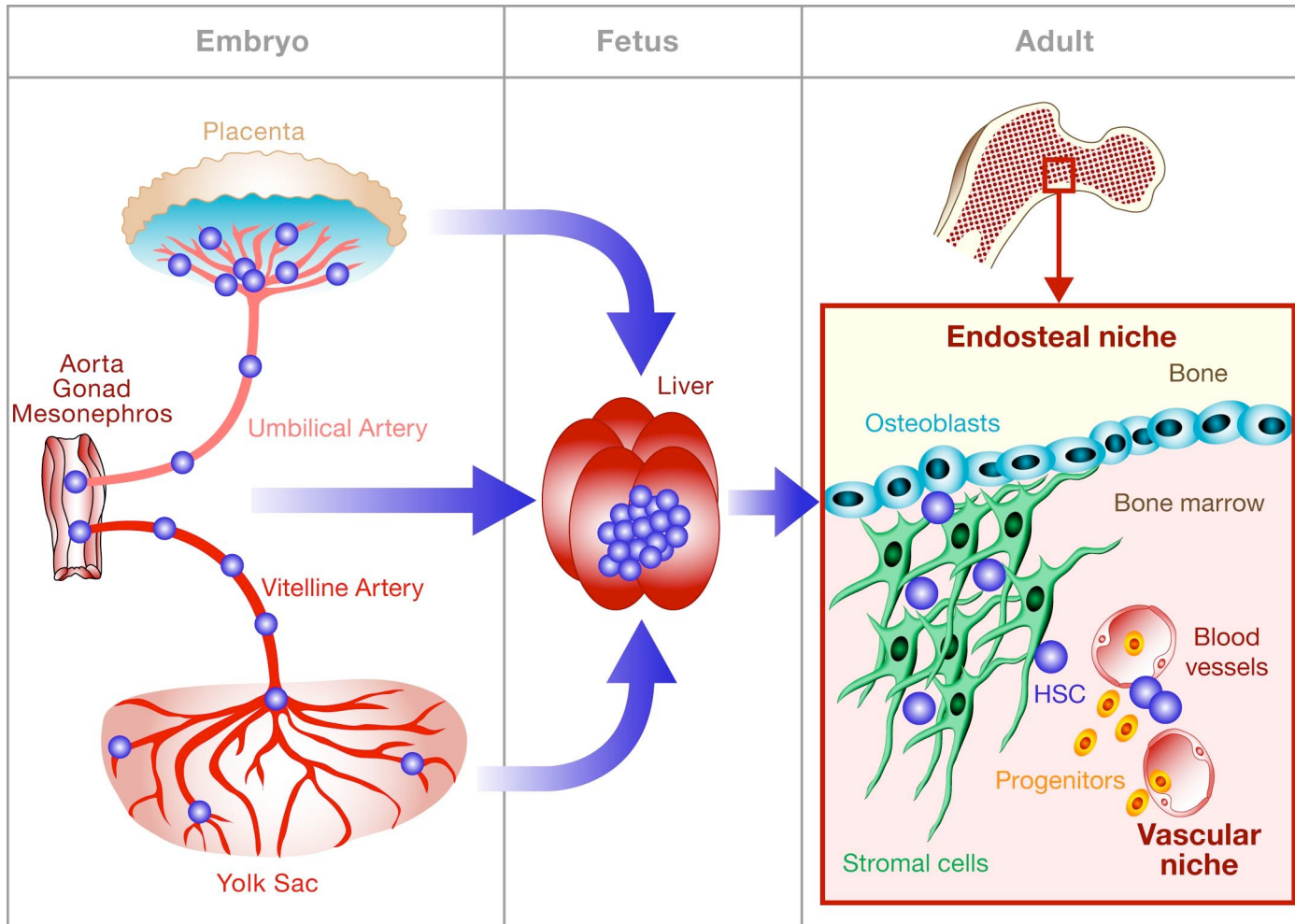


Le placenta : nouveau site de production des CSH embryonnaires



Succession de territoires hématopoïétiques au cours de l'ontogenèse





V. Régulation de l'hématopoïèse

1/ Facteurs extrinsèques

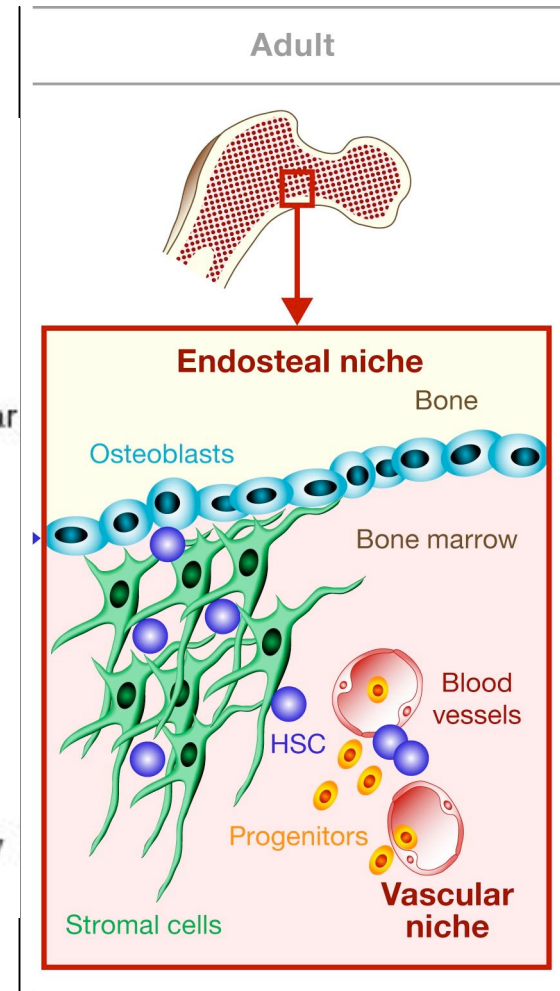
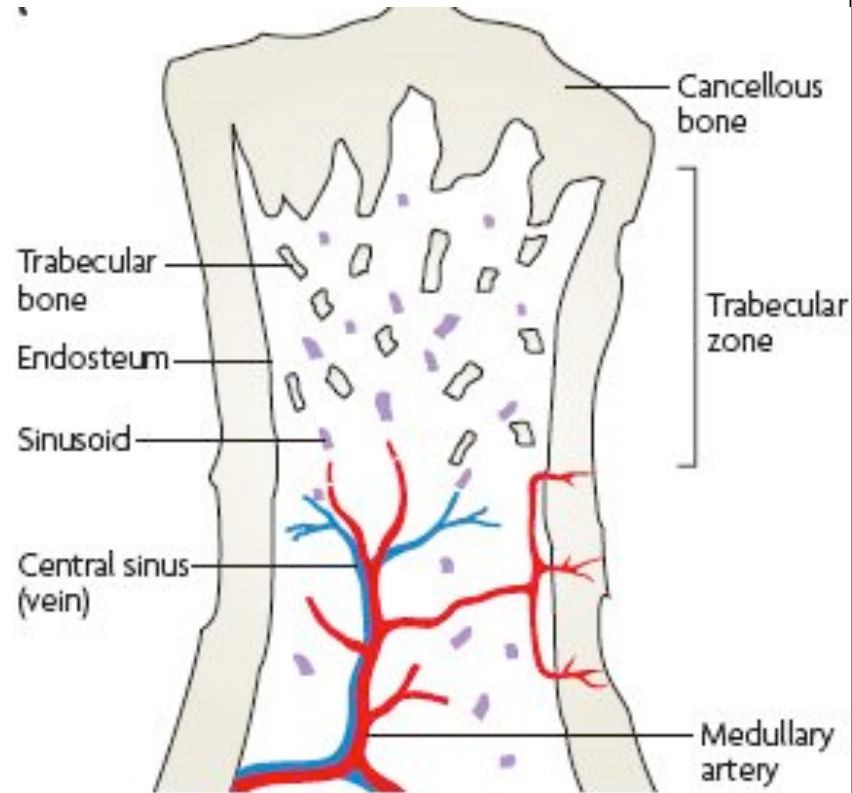
a/ rôle du microenvironnement

→ niche hématopoïétique :

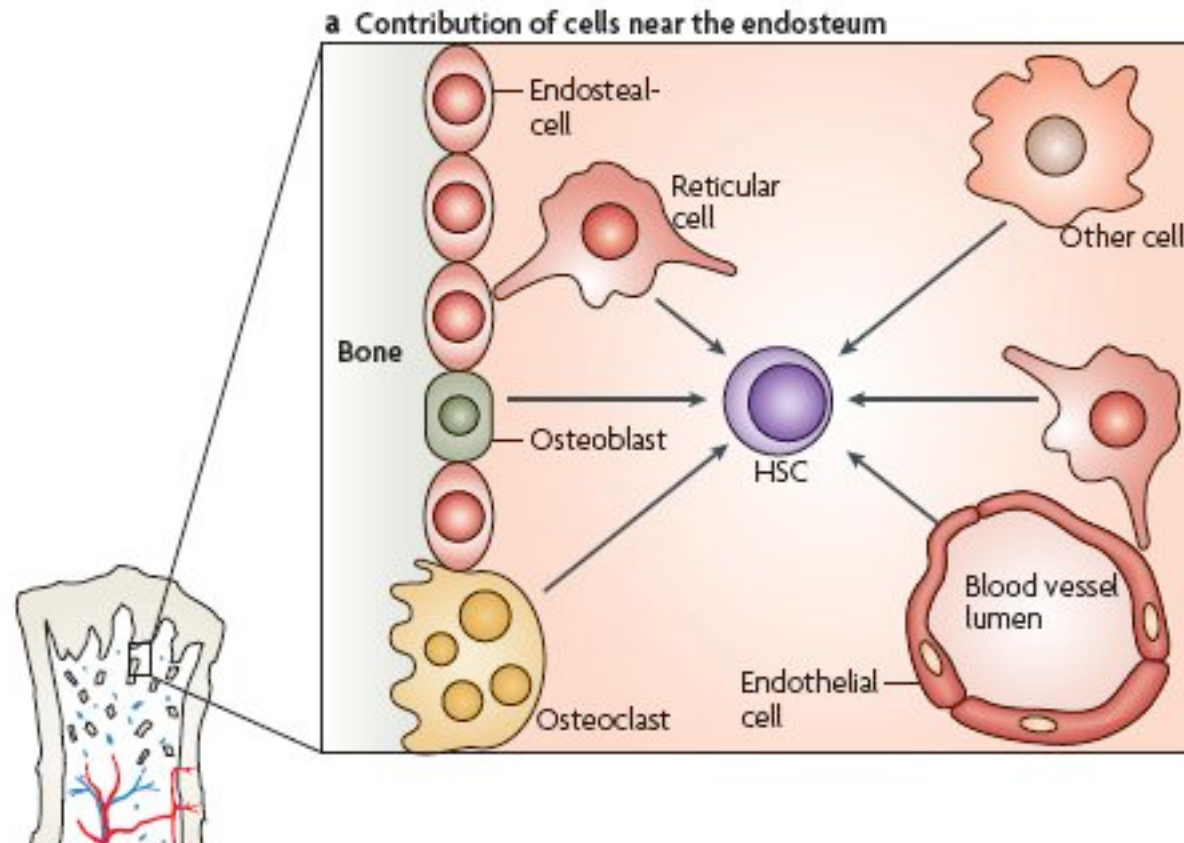
Dans moelle osseuse

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

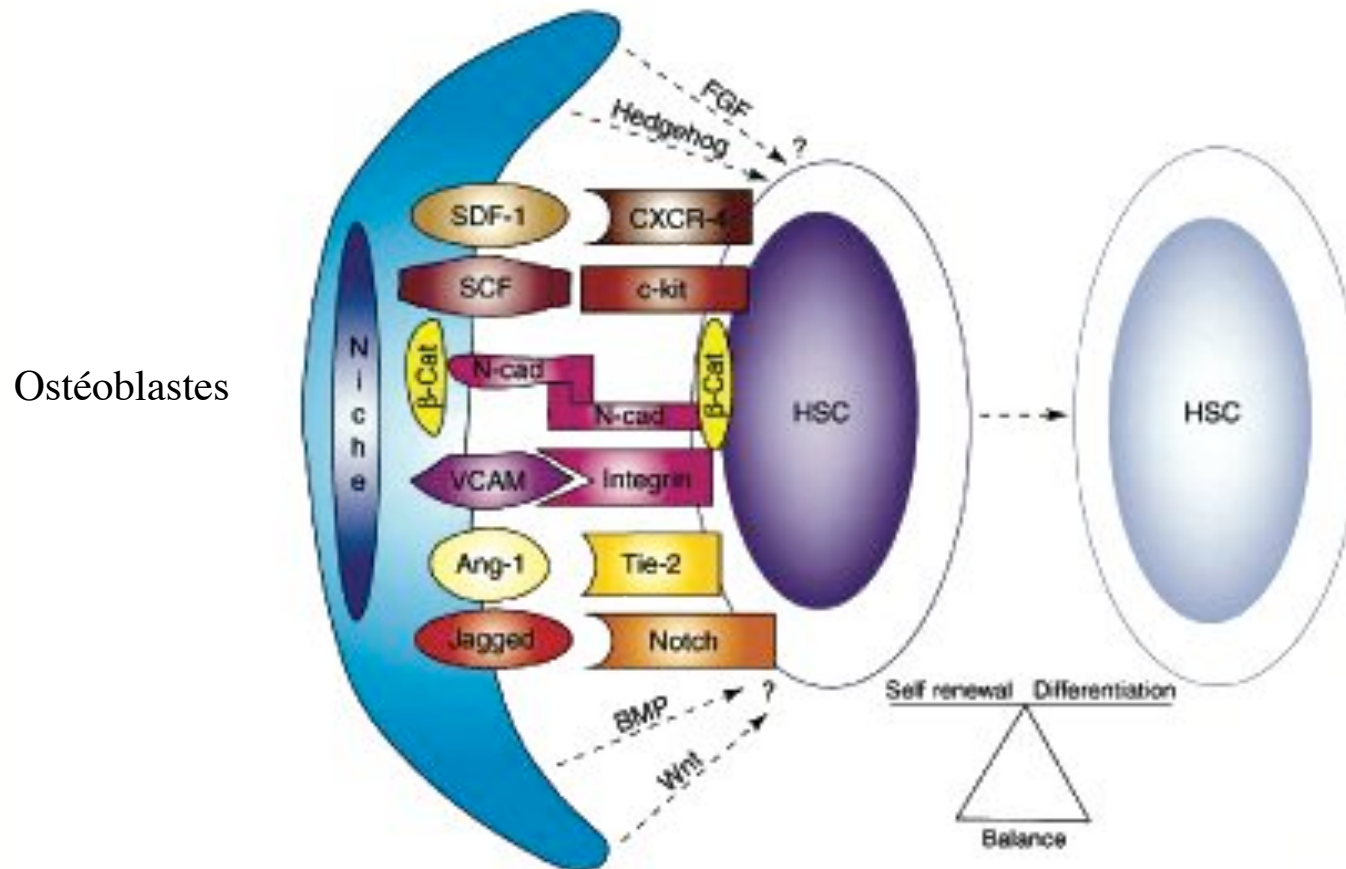
Les niches hématopoïétiques dans la moelle osseuse



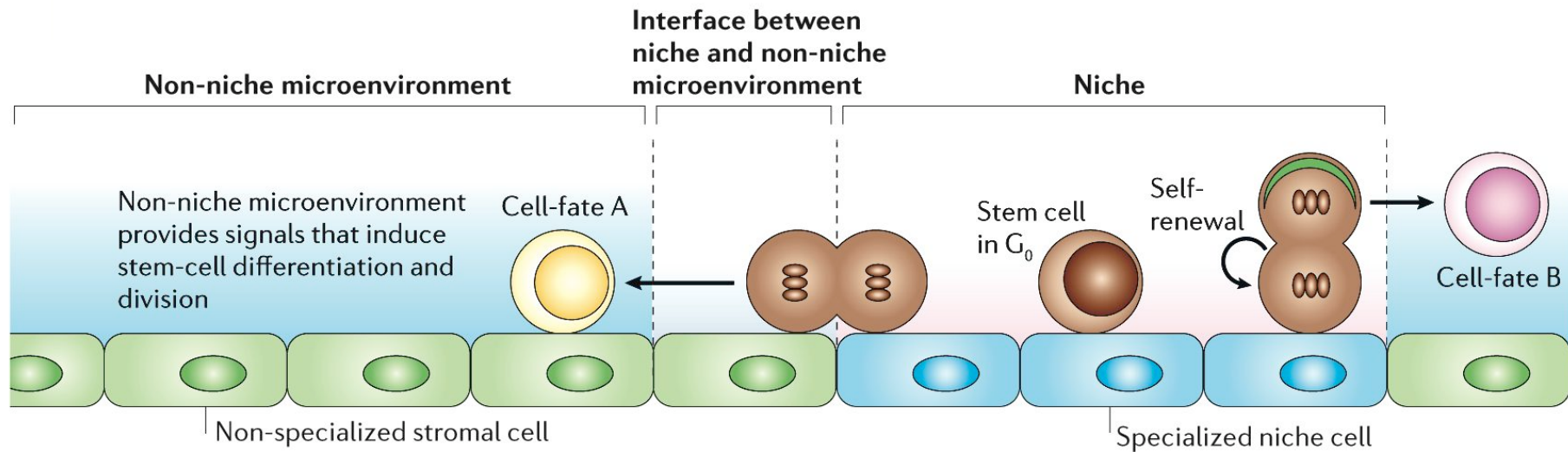
Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans la biologie des CSH

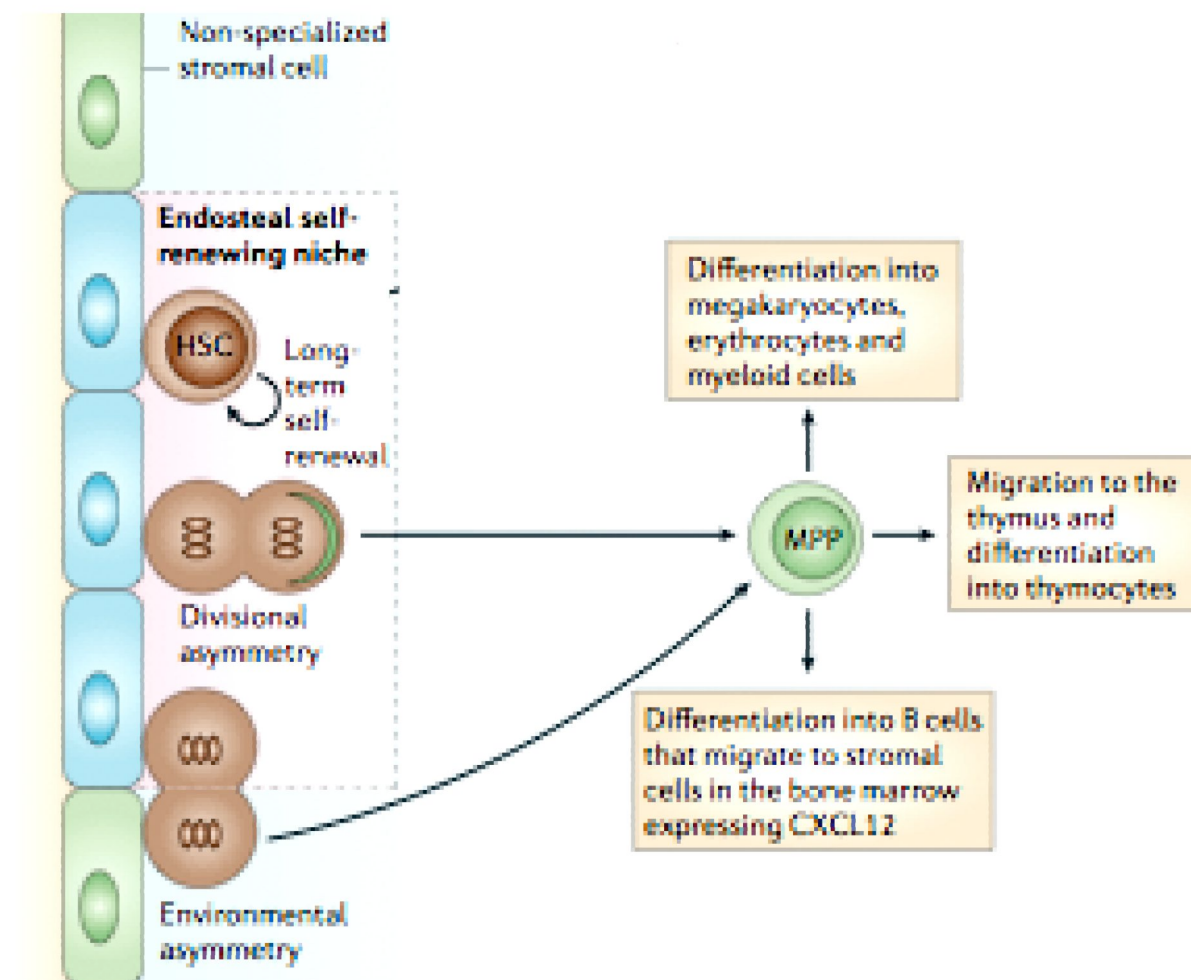


Les interactions niche hématopoïétique-CSH

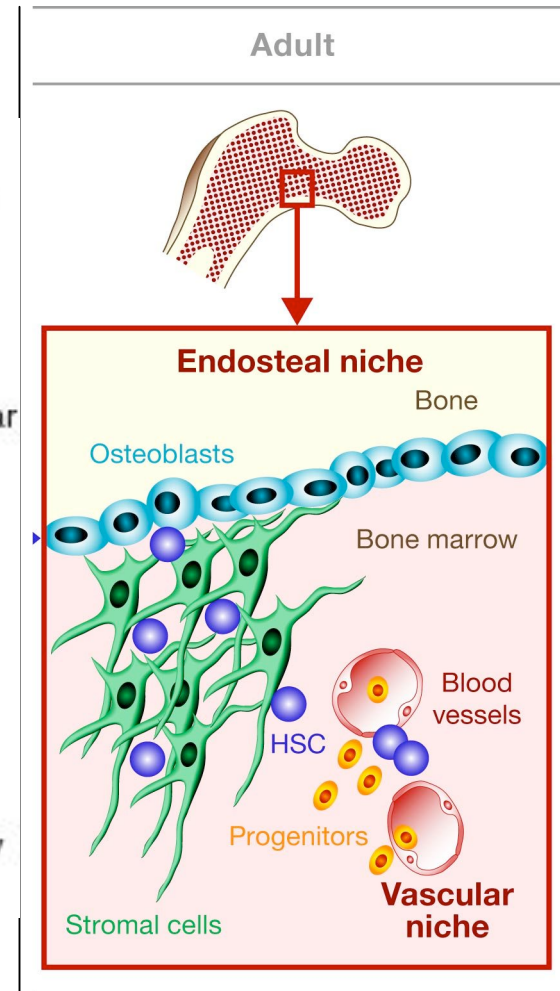
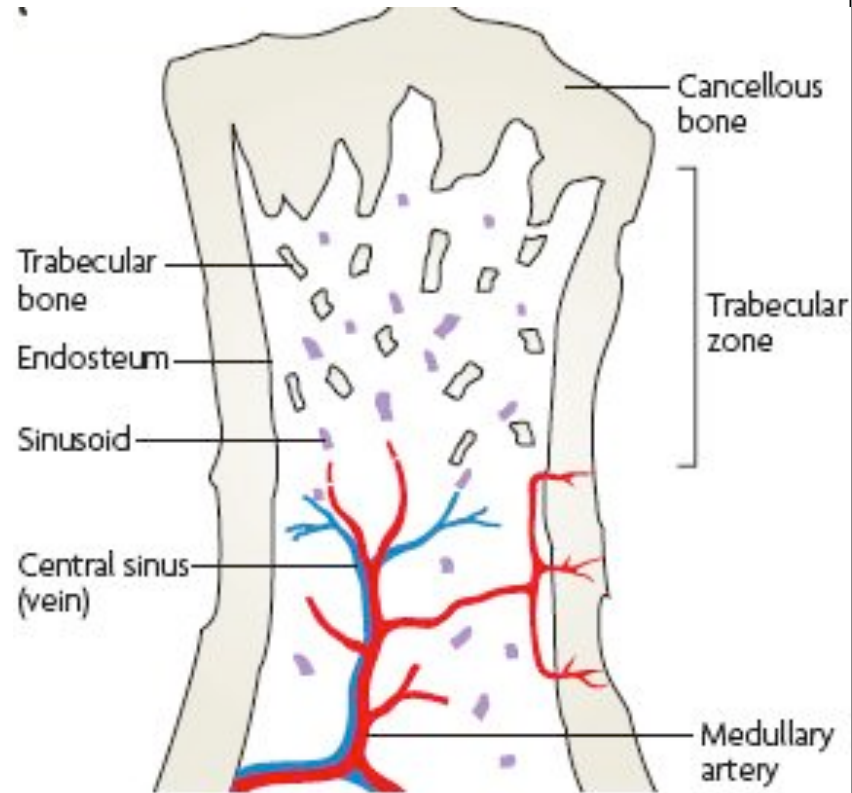


Implication de la niche dans la quiescence et l'auto-renouvellement des CSH

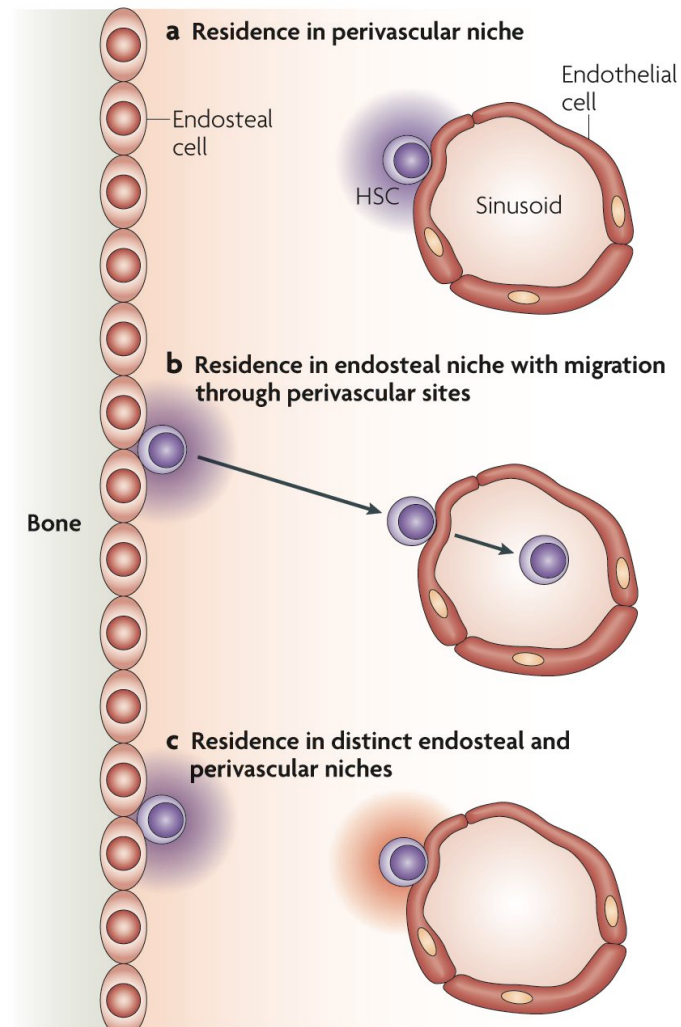




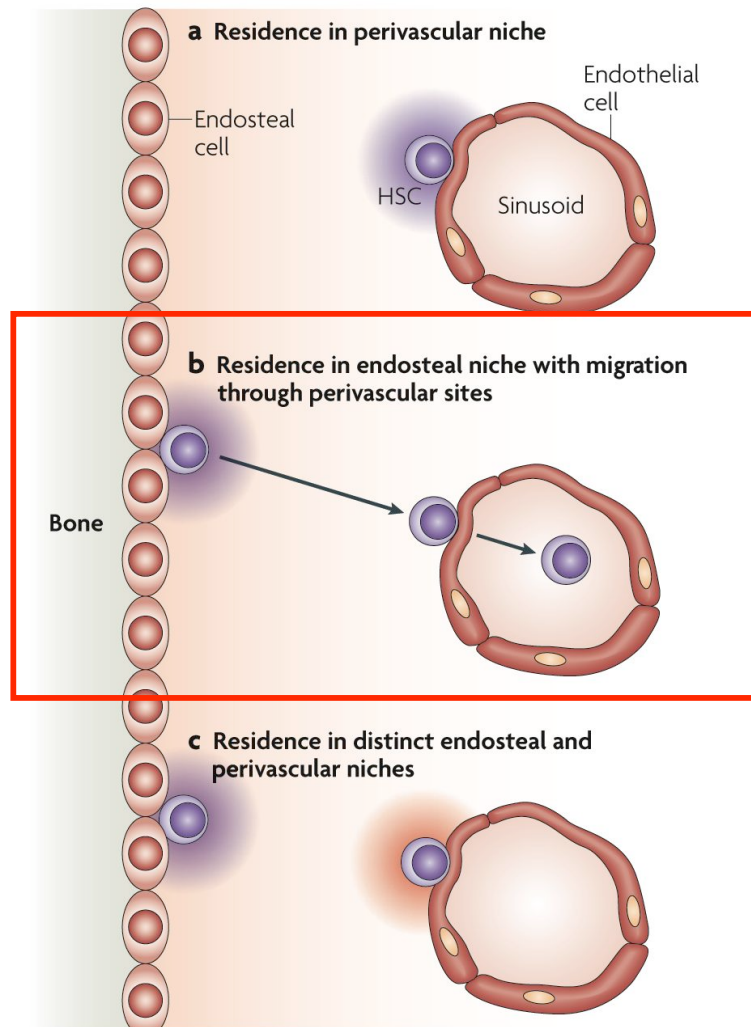
Les niches hématopoïétiques dans la moelle osseuse

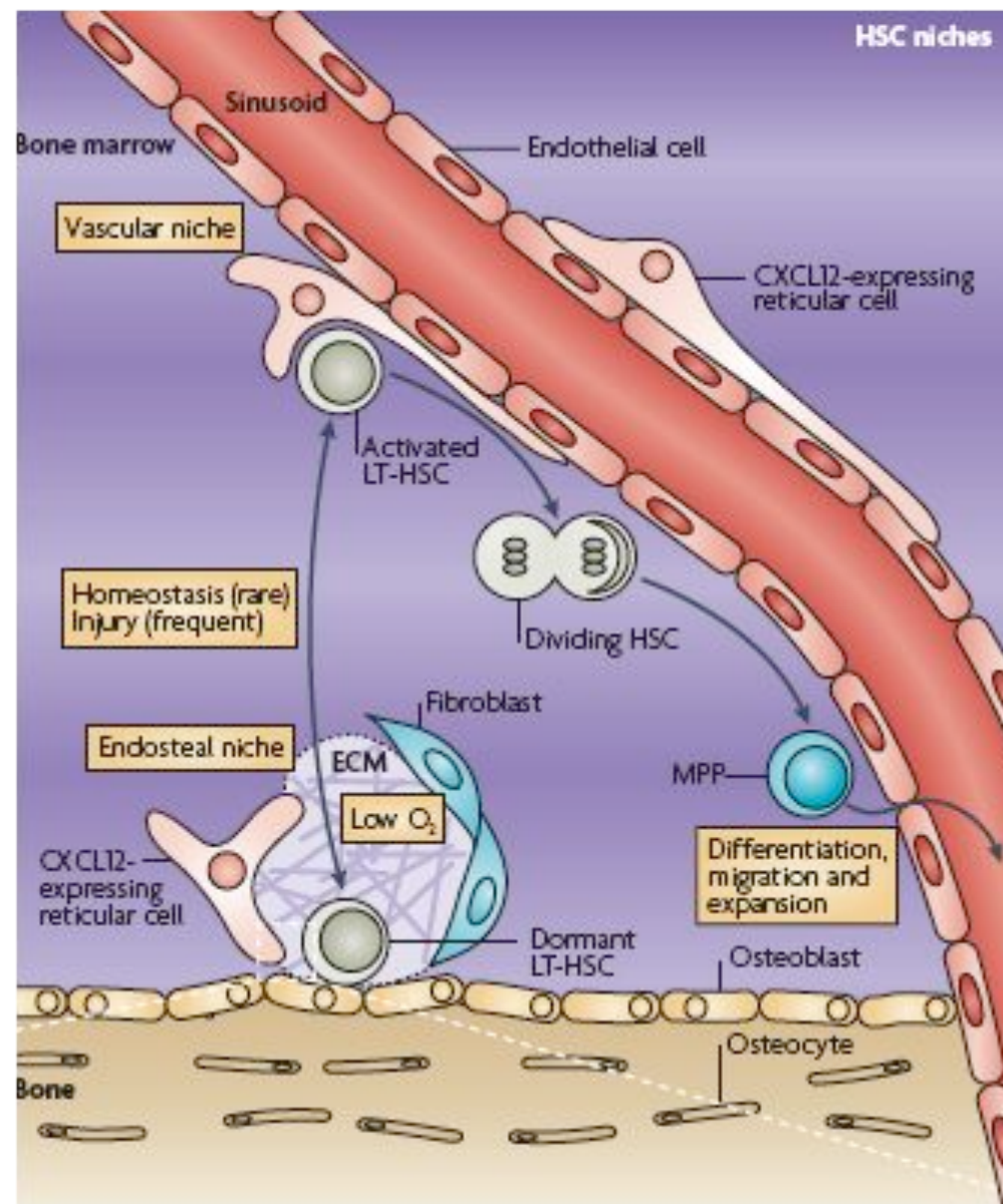


Hypothèses sur l'existence d'une niche périvasculaire



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)

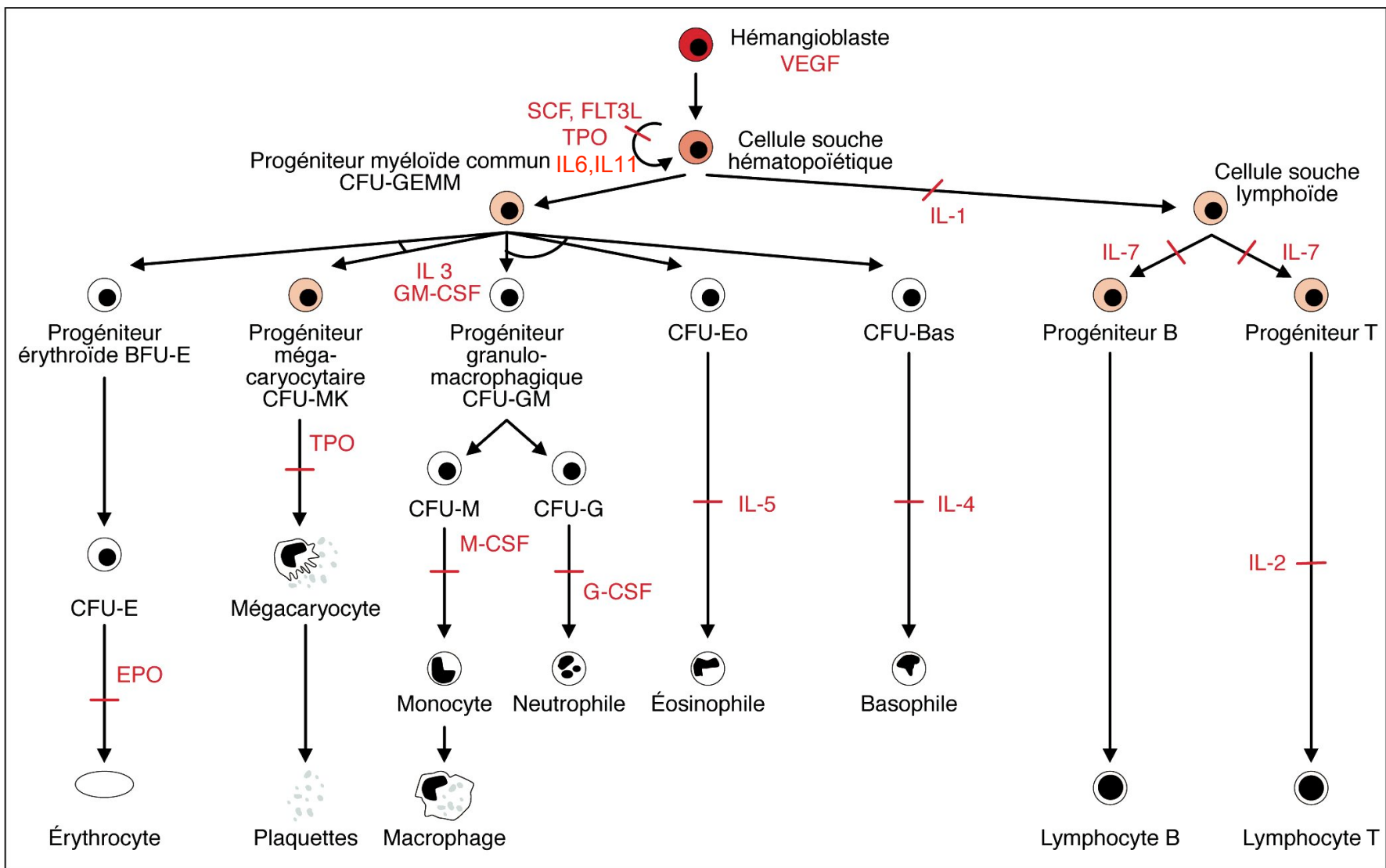
Facteurs multipotents: IL3, GM-CSF (prog. myéloïdes)
IL7 (prog. Lymphoïdes)

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



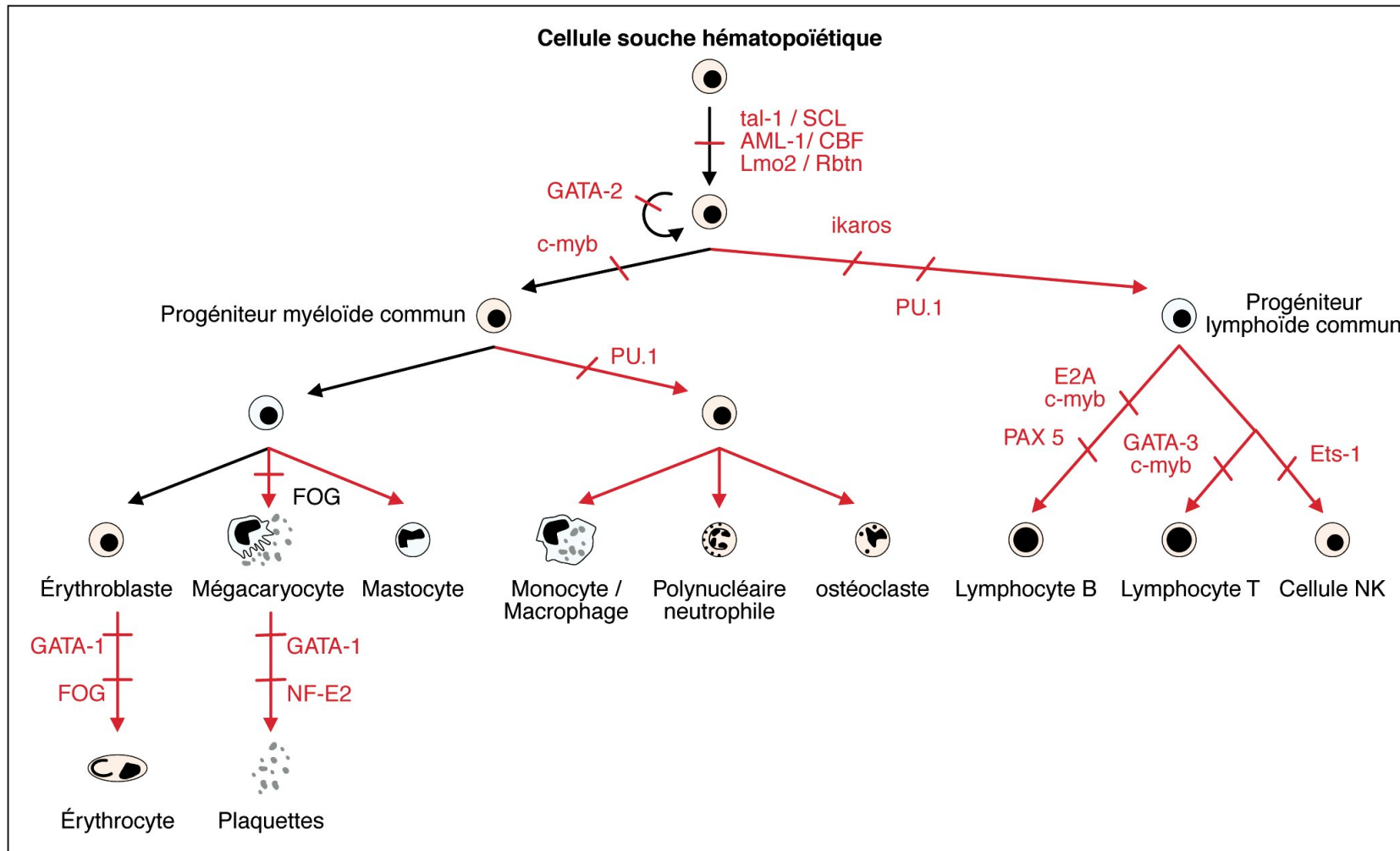
2/ Facteurs intrinsèques

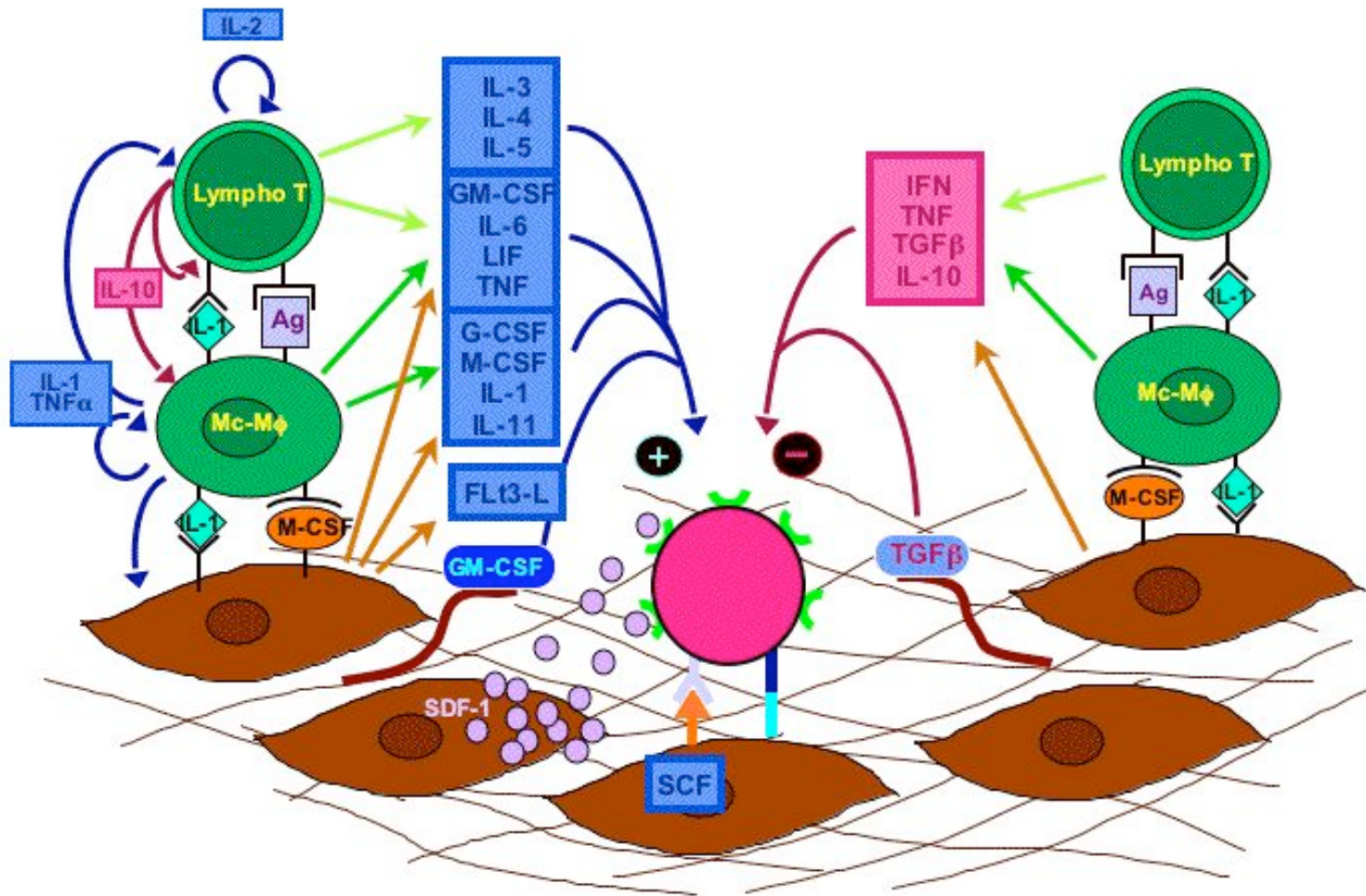
Les facteurs de transcription: Permettent l'expression de gènes codant les protéines nécessaires à la fonction des cellules.

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

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

Les facteurs de transcription

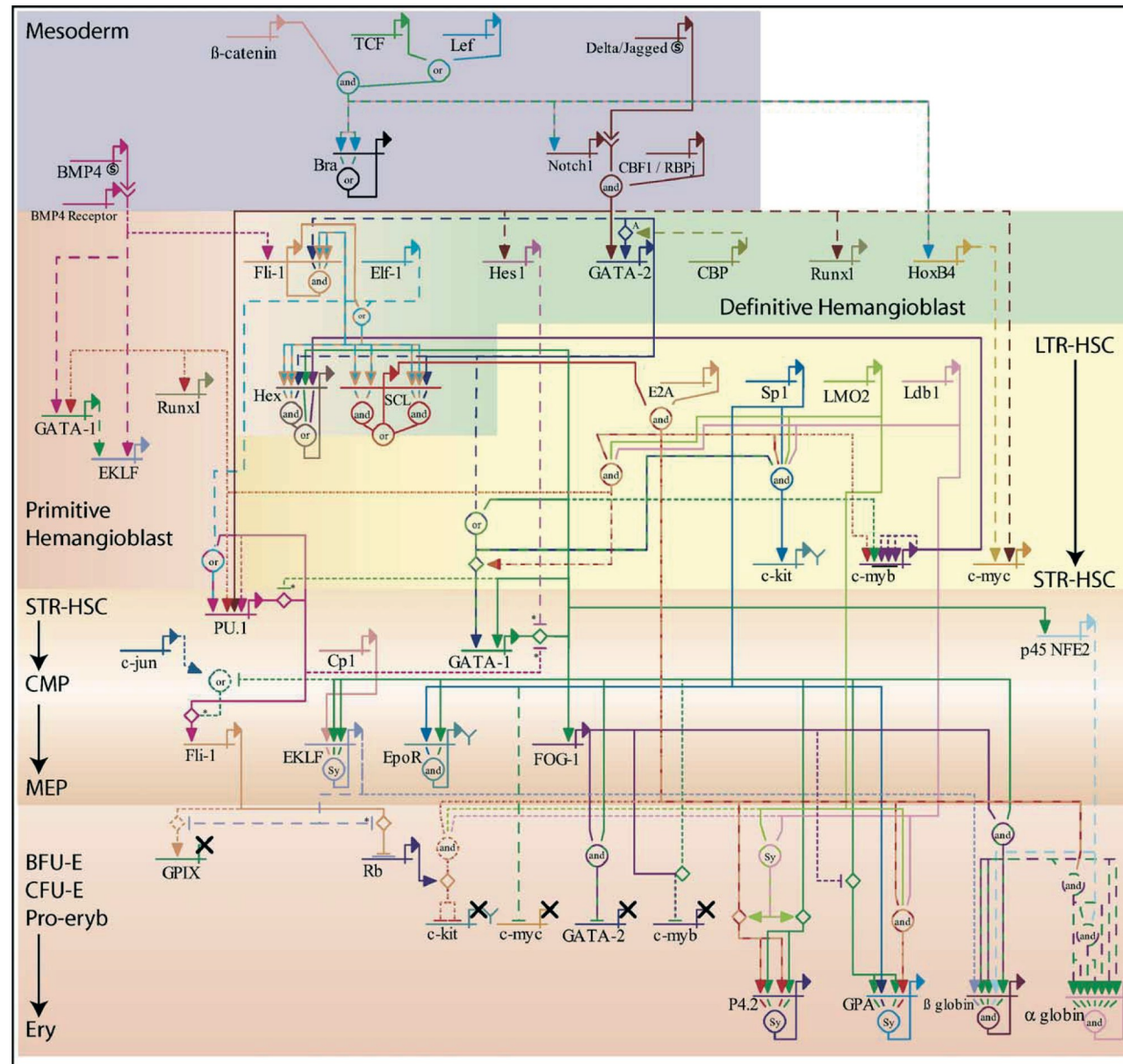




Les CSH doivent intégrer l'ensemble des signaux pour :

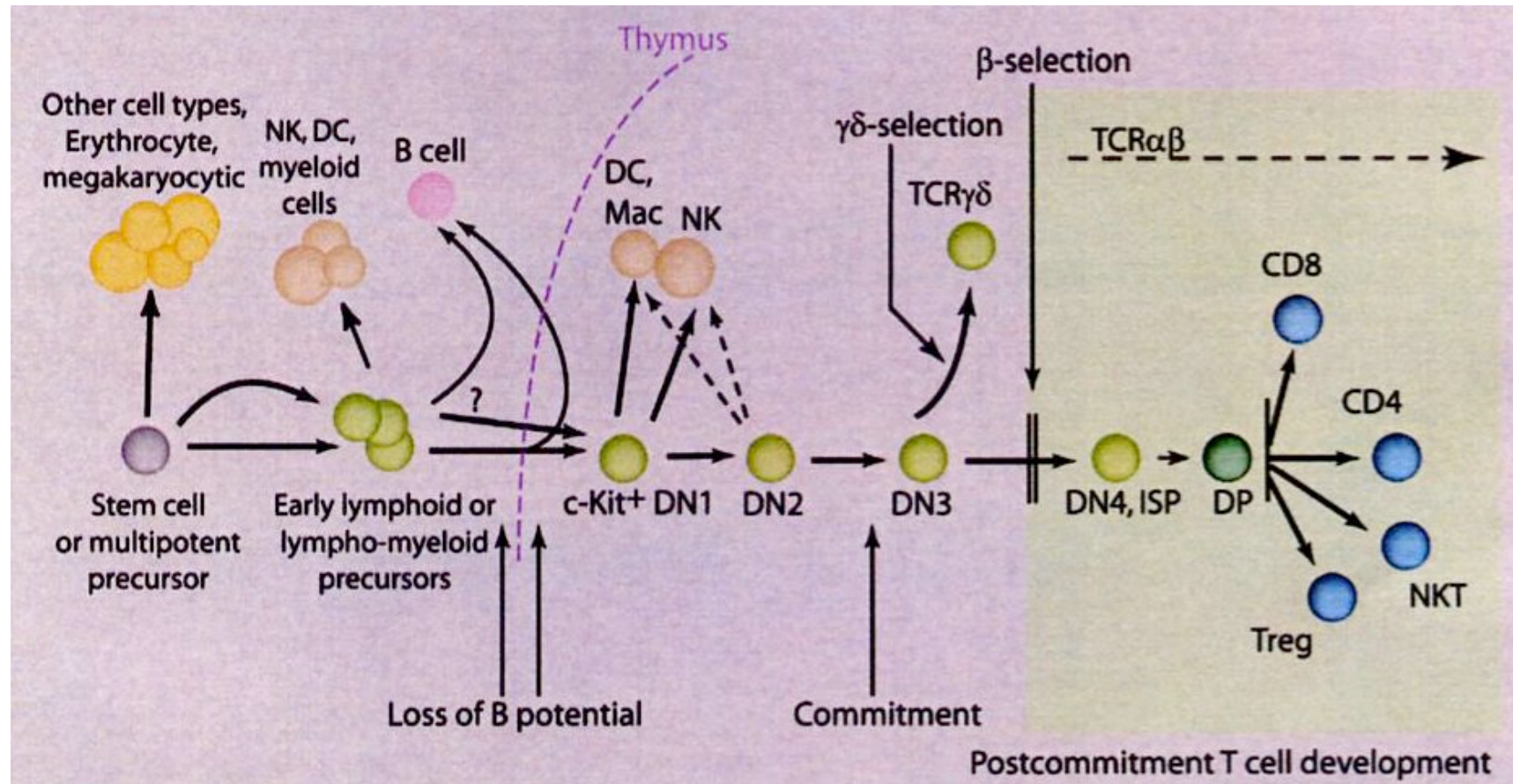
- Survivre ou mourir
- Se différencier ou s'autorenouveler

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



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

La différenciation intrathymique



DP : CD4⁺CD8⁺

DN : CD4⁻CD8⁻

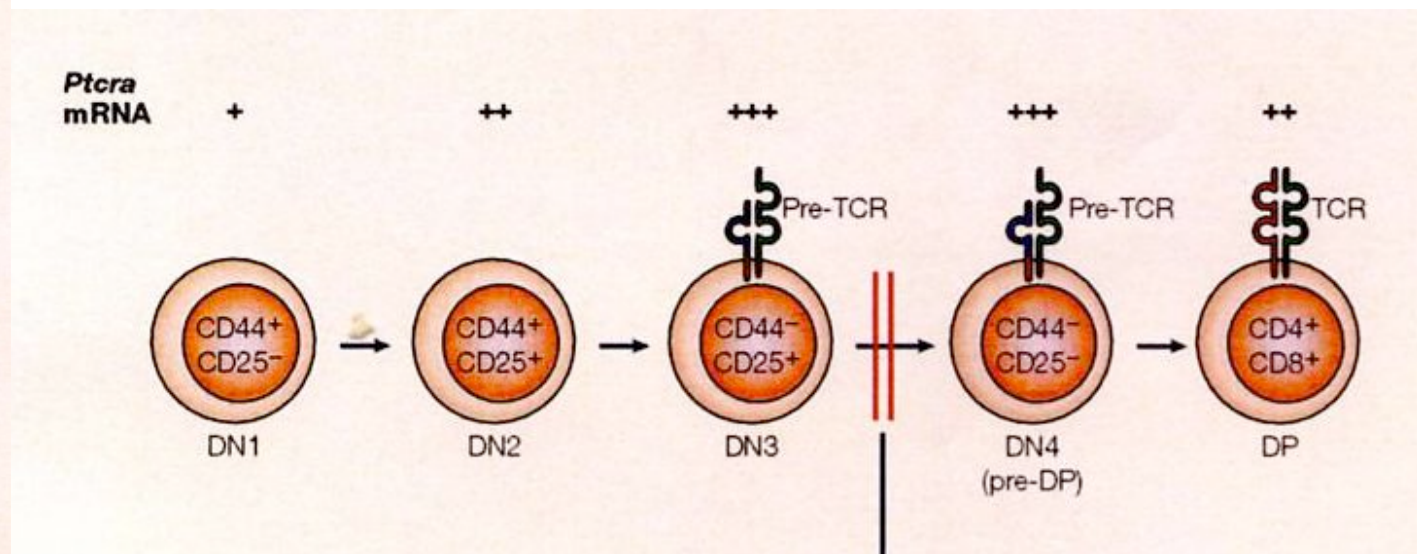
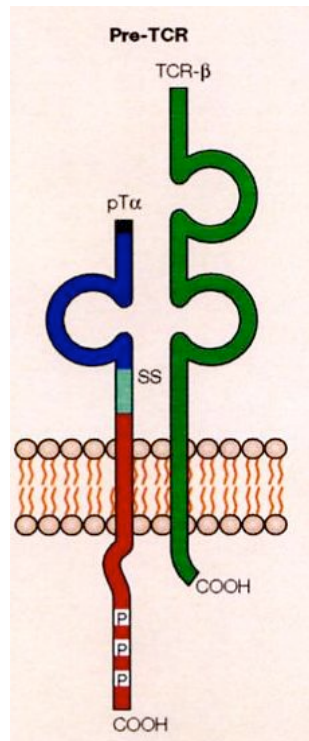
DN1 : CD44⁺CD25⁻

DN2 : CD44⁺CD25⁺

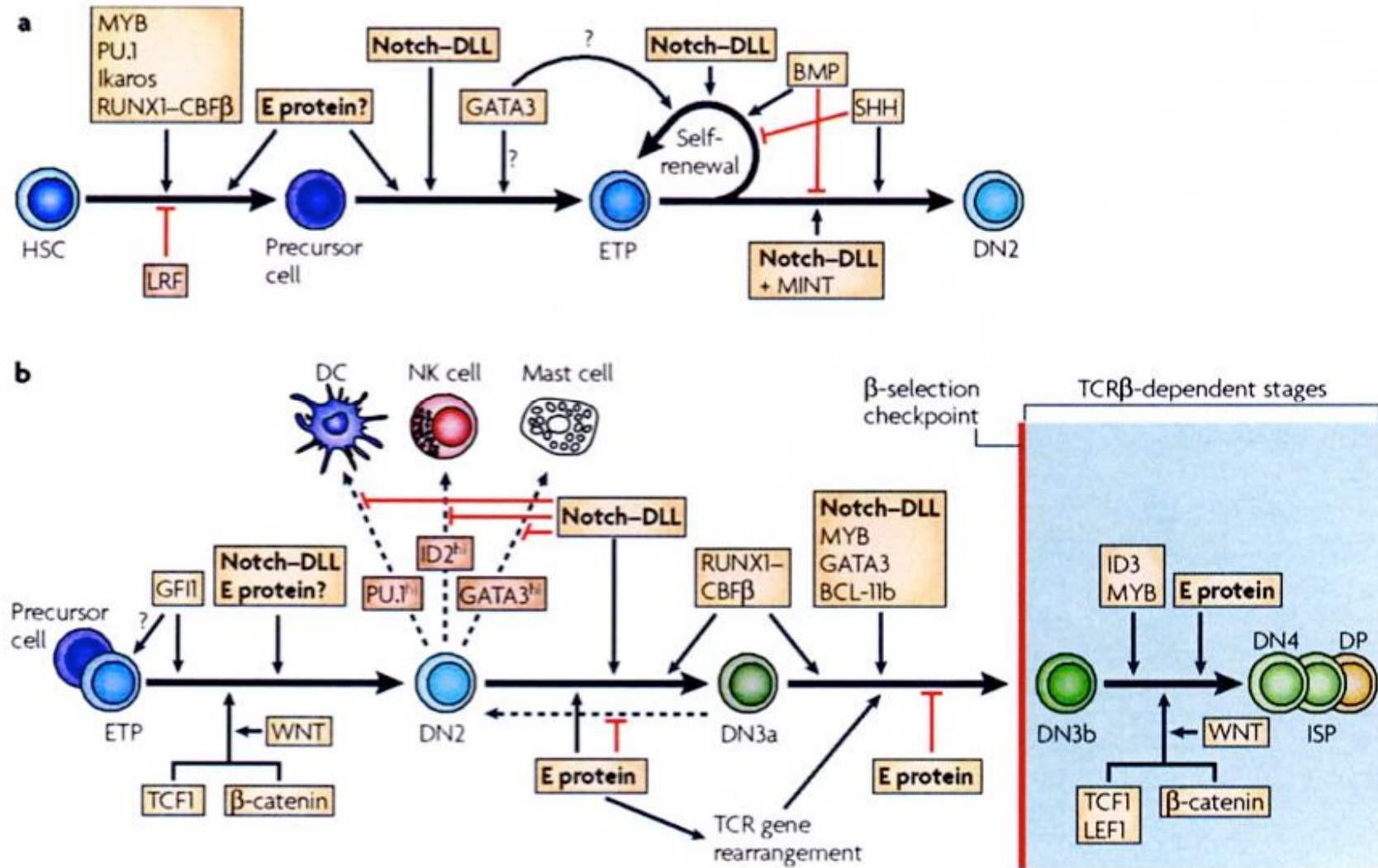
DN3 : CD44⁻CD25⁺

DN4 : CD44⁻CD25⁻

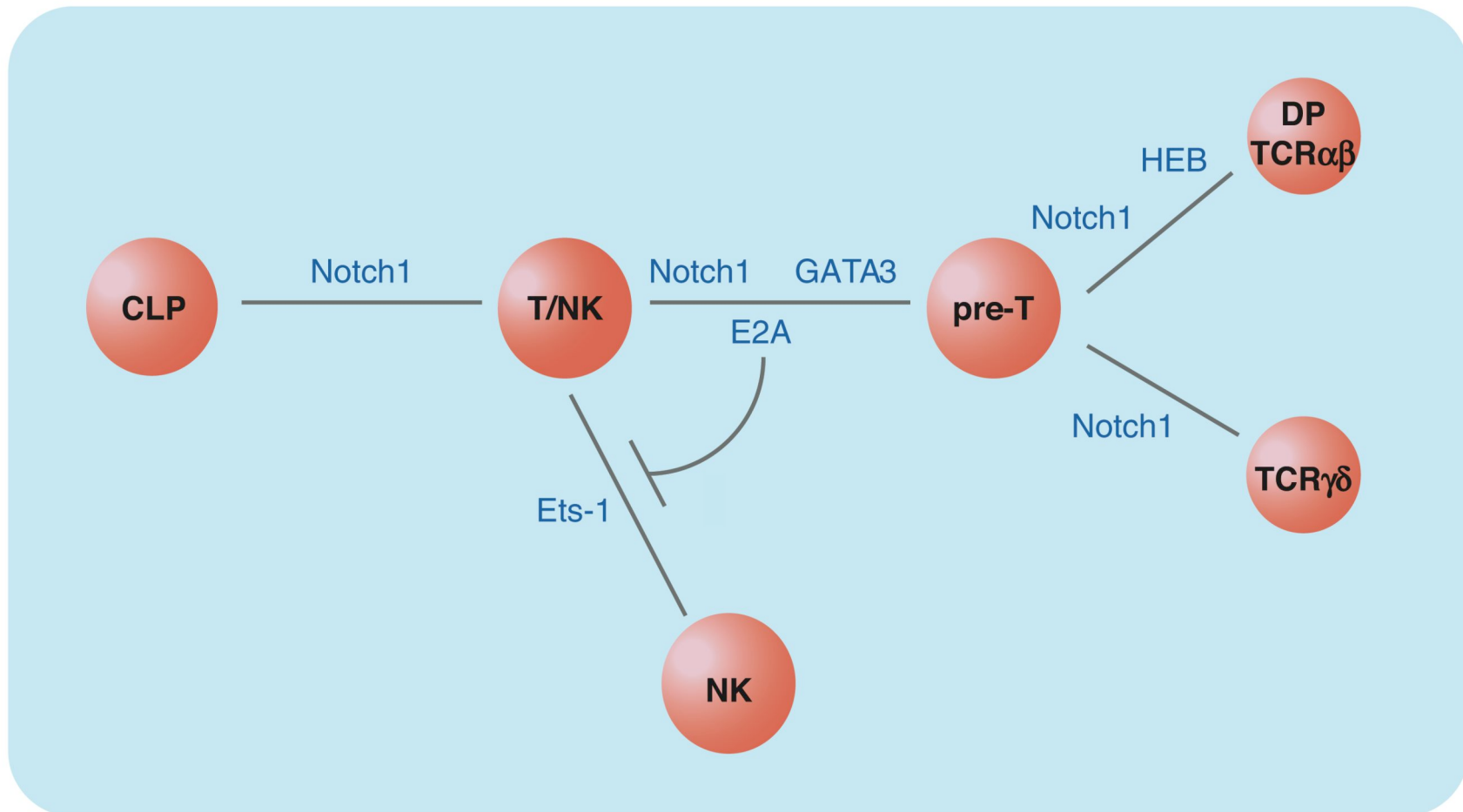
Le pré-TCR, étape clé de la lymphopoïèse T



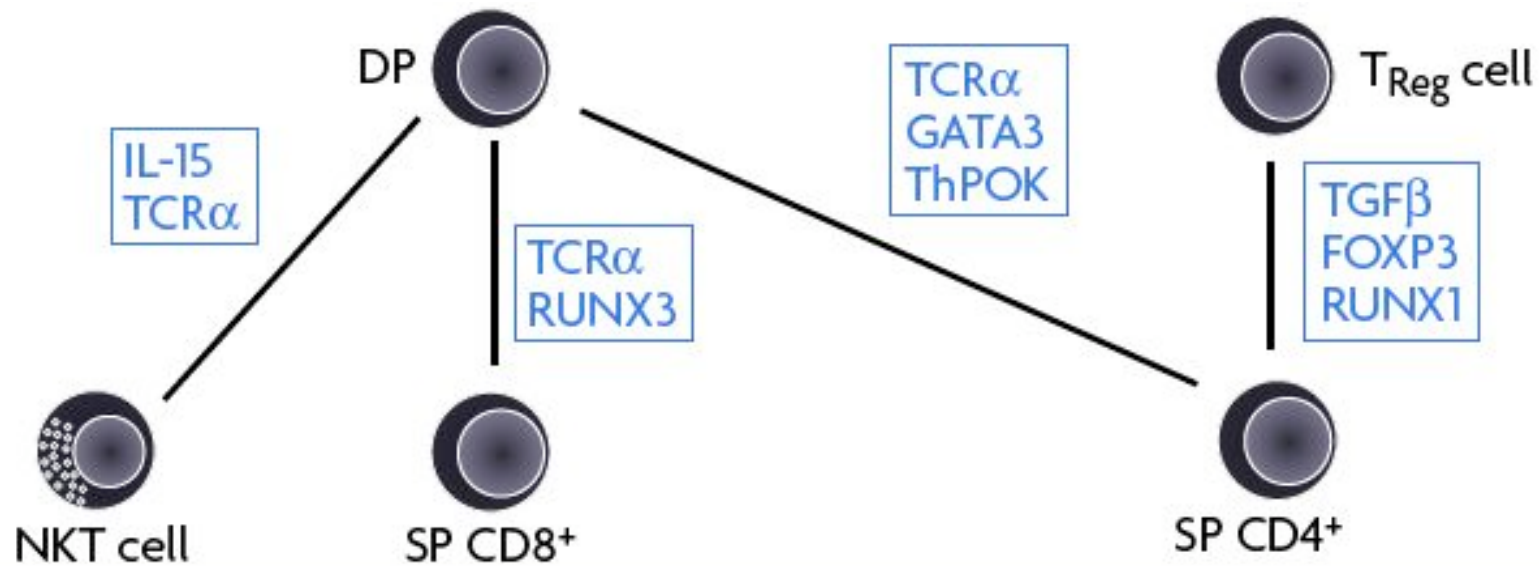
Les facteurs qui régulent la différenciation T

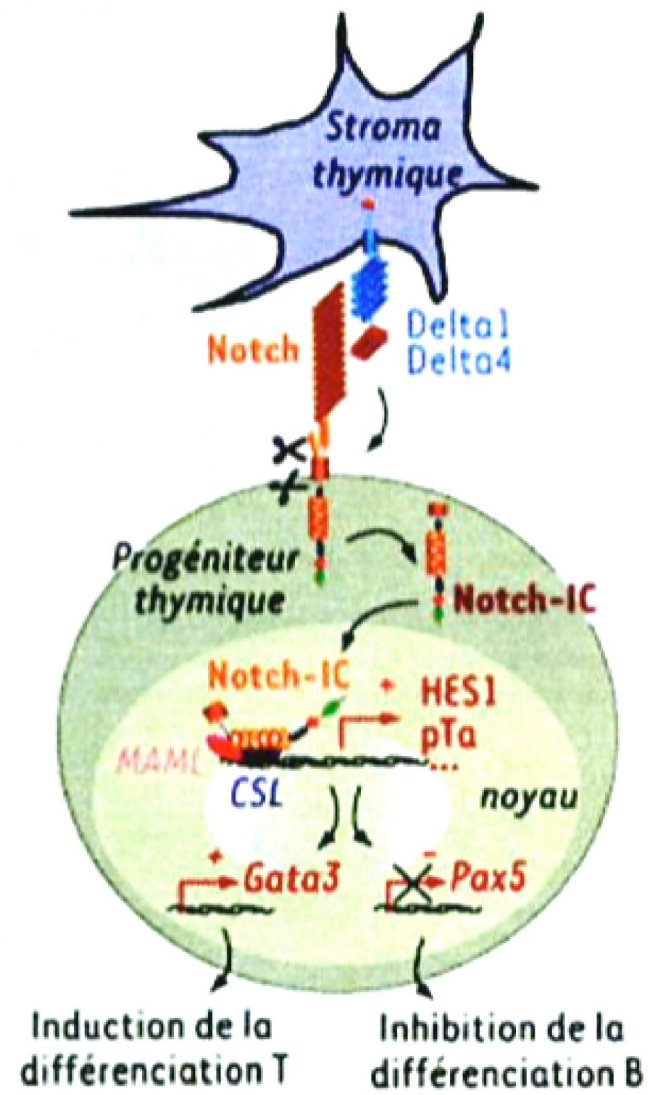


Les facteurs qui régulent la différenciation T (1)

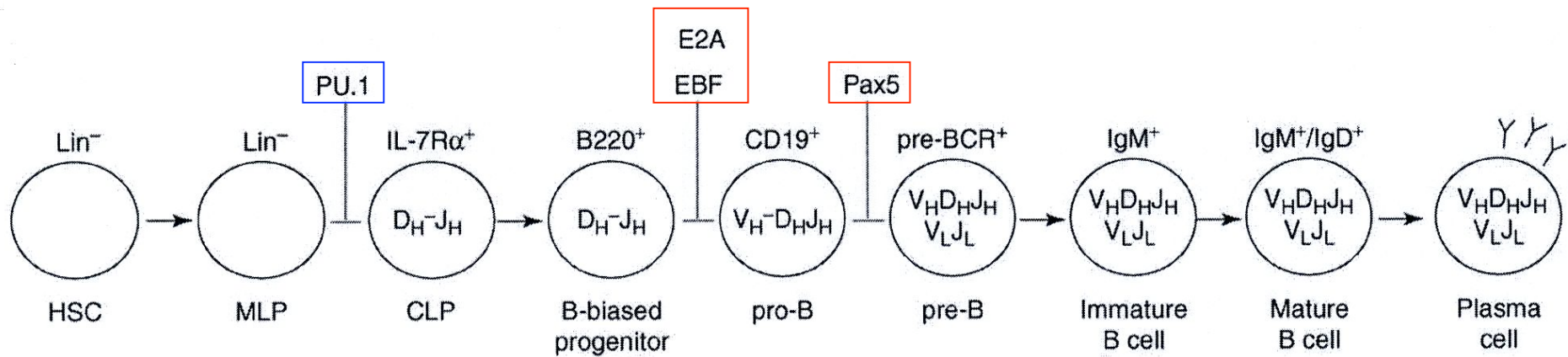


Les facteurs qui régulent la différenciation T (2)





Les facteurs qui régulent la différenciation B



Transcription Factors Active in Lymphocyte Development*

Factor	Class	Targets	Expression	Phenotype of knockout mutant
Multilineage				
CBF α 2 = AML1, PEBP2 α B	Runt	TCR α , β , γ , δ ; RAG1; CD3 ϵ ; CD3 ζ , IgH	Thymocytes, T-cell lines, B-cell lines, myeloid cell lines, pluripotent precursors	Lack of definitive hematopoiesis: all lineages
c-Myb	Myb	TCR γ , δ , CD4, c-kit, Lck, Bcl-2?	Hematopoietic cells, other embryonic tissues	Multilineage fetal hematopoiesis defect
PU.1	Ets Winged helix	IgH, Ig J chain, Ig κ , Ig λ , CD79a	PU.1 mainly in B cells and macrophages, also precursors and early T cells	Prenatal or perinatal death due to macrophage loss; also elimination of B cells and stem cells, early loss, late recovery of T-cell development
Ikaros	Zn finger (Hunchback)	CD3 δ , CD2, CD8 α , TdT, RAG1, Lck proximal?	T cells, thymocytes, early B cells, hematopoietic stem cells; some myeloid precursors	Dominant negative: no lymphoid development (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	TCR α , β , δ ; CD3 ϵ ; CD4, CD8 α , IL-4, IL-13, Lck proximal?	Thymocytes > mature T cells; many nonhematopoietic embryonic cell types	T-cell development blocked during DN $\rightarrow$ DP transition
LEF-1	HMG	Same as TCF-1	Pre-B cells, thymocytes, many nonhematopoietic embryonic cell types	Lack of B-1 B cell lineage; lack of whiskers, hair, teeth; neurological defects; most thymic populations appear OK
Sox-4	HMG	CD2, CD3 ϵ	Thymocytes, gonads, and multiple embryonic tissues	Cardiac malformation, early B developmental defect; also T lineage slowdown
CREB	bZIP (CREB/ATF)	TCR α , β ; CD2, CD8 α	Ubiquitous, also many ubiquitous family members; possible T-cell-specific splice variants	Complete knockout: perinatal death w/lung defect, also selective block of fetal TCR $\alpha\beta$ thymocytes, not other hematopoietic cells; dominant negative from T-cell specific promoter: normal T cell development, inhibited response to activation
GATA-3	Zn finger (GATA)	TCR α , β , δ , CD2, CD8 α	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-/- chimera.
B-Cell "specific"				
E2A (similar target genes possible for HEB or other bHLH)	bHLH class A	RAG1, CD4, CD8 α , TCR γ , IgH, Ig κ , TdT? EBF? Pax5?, cyclin-dependent kinase inhibitor p21	Ubiquitous	E2A knockout: severe B-lineage developmental arrest, slowdown of T-lineage devel due to early defect. E2A/HEB double heterozygotes show similar effects
EBF	EBF/Olf HLH-like	CD79a (Ig α , mb-1), λ 5, VpreB, Pax5?	Olfactory neurons, adipocytes, B-cell precursors	Severe B-lineage developmental arrest
Pax5	Pax Paired, homeo	CD19, λ 5, VpreB, btk kinase, Ig J chain, Vh germline promoters, Ig κ	Central nervous system, B cells	Posterior midbrain abnormal, severe B-lineage developmental arrest, no V-DJ joining
Other				
Ets family	Ets Winged helix	TCR α , β , γ , δ , Bcl2, CD2, CD25, TdT; CD3 ϵ ?, CD4, CD8 α , Lck, perforin, 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 activation