

Menu du cours

- Hiérarchie de l'hématopoïèse
- Sites de l'hématopoïèse embryonnaire et adulte
- Méthodes pour étudier l'hématopoïèse
- Régulation de l'hématopoïèse
- Utilisation des cellules souches hématopoïétiques en clinique
- Vaisseaux sanguins et lymphatiques
- La coagulation sanguine et les plaquettes

Hématopoïèse

Du grec “hémato” et “poiesis”,
littéralement faire du nouveau sang

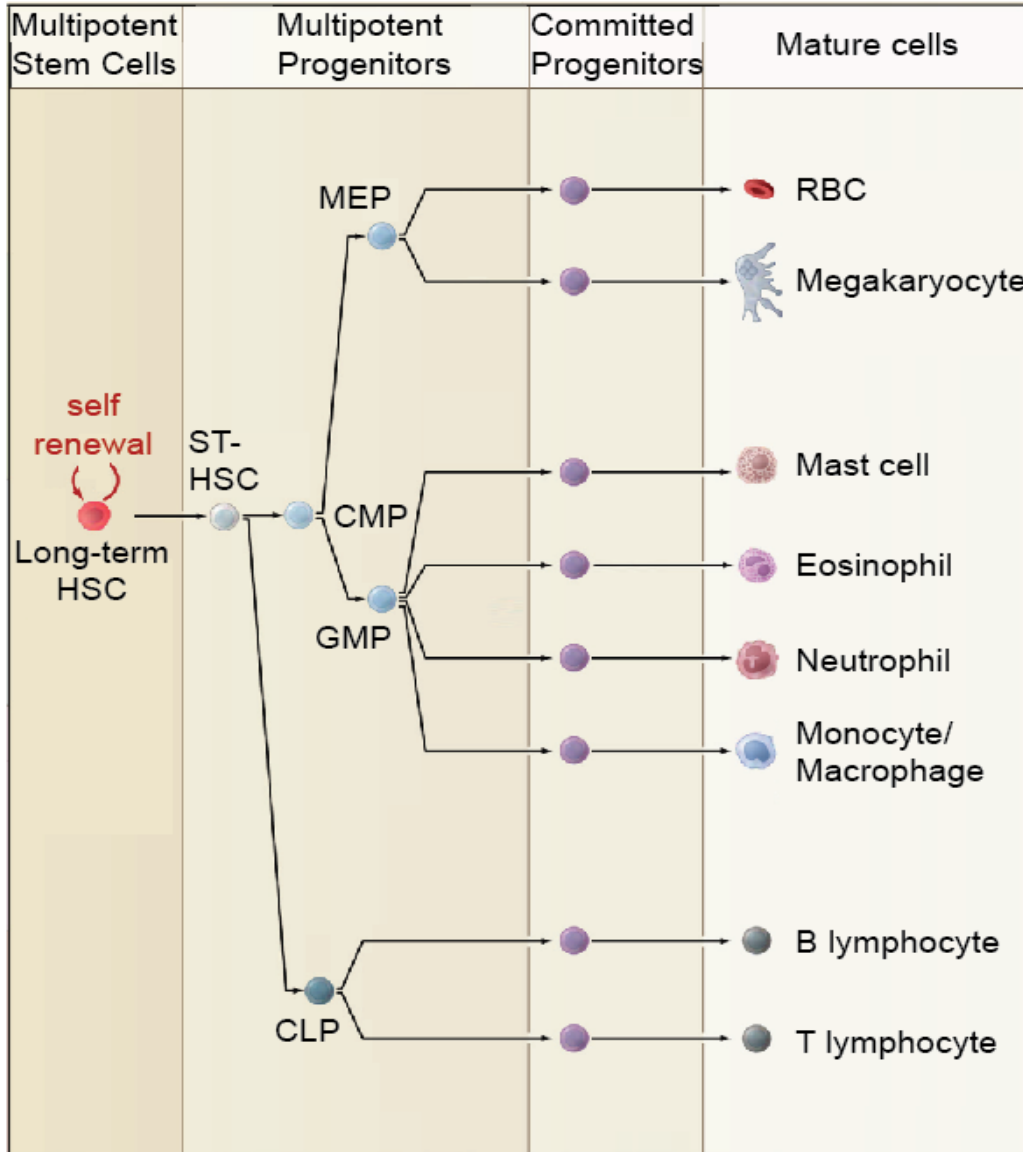
Environ $5 \cdot 10^{11}$

Cellules sanguines produites chaque jour

→ > 5 millions par seconde !

>98%: globules rouges et plaquettes

Vue "Classique" de l'hématopoïèse



HSC: Hematopoietic stem cell

ST-HSC: Short-term HSC

CLP: Common lymphoid progenitor

CMP: Common myeloid progenitor

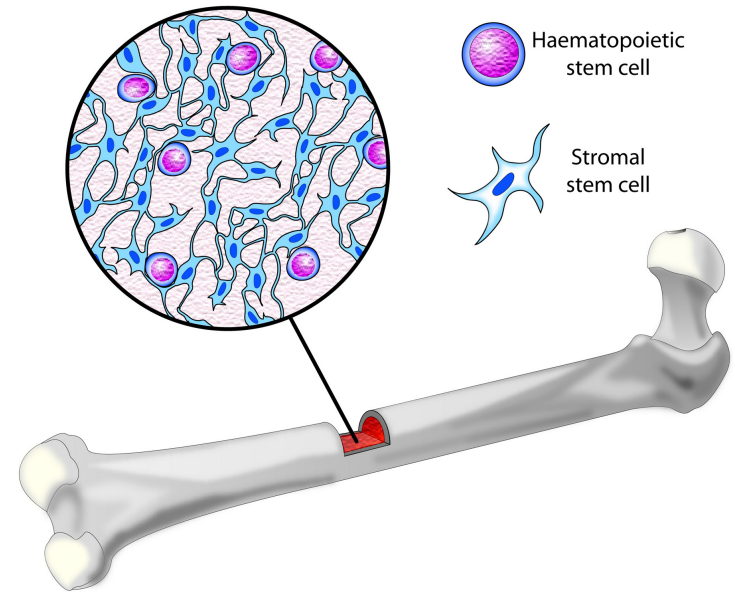
GMP: Granulocyte/Monocyte progenitor

MEP: Myeloerythroid progenitor

RBC: Red blood cell

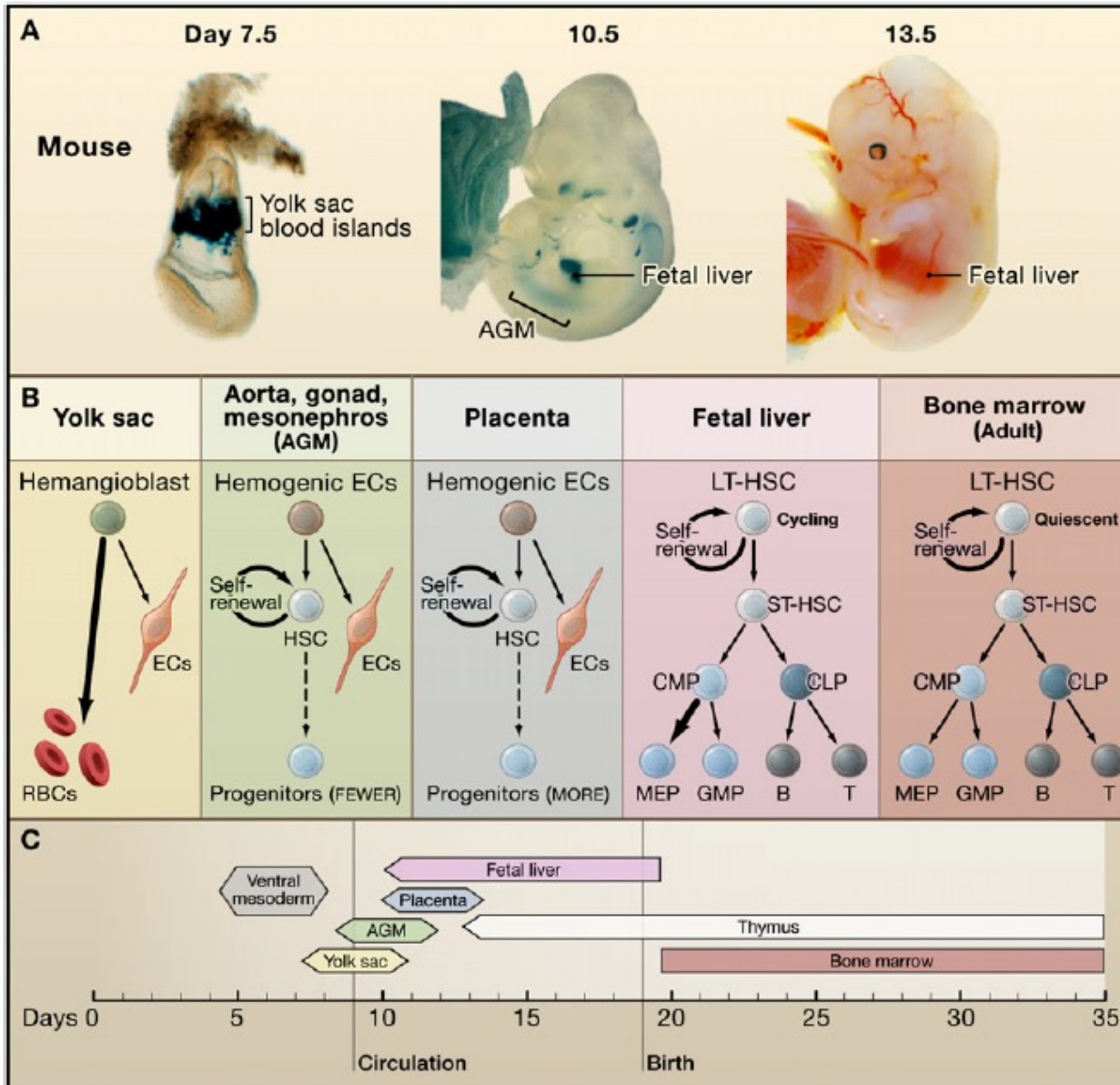
Où trouve-t-on des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) ?

1. Dans la moëlle osseuse
2. Dans le sang
3. Dans le cordon ombilical et le placenta
4. Dans le système hématopoïétique foetal



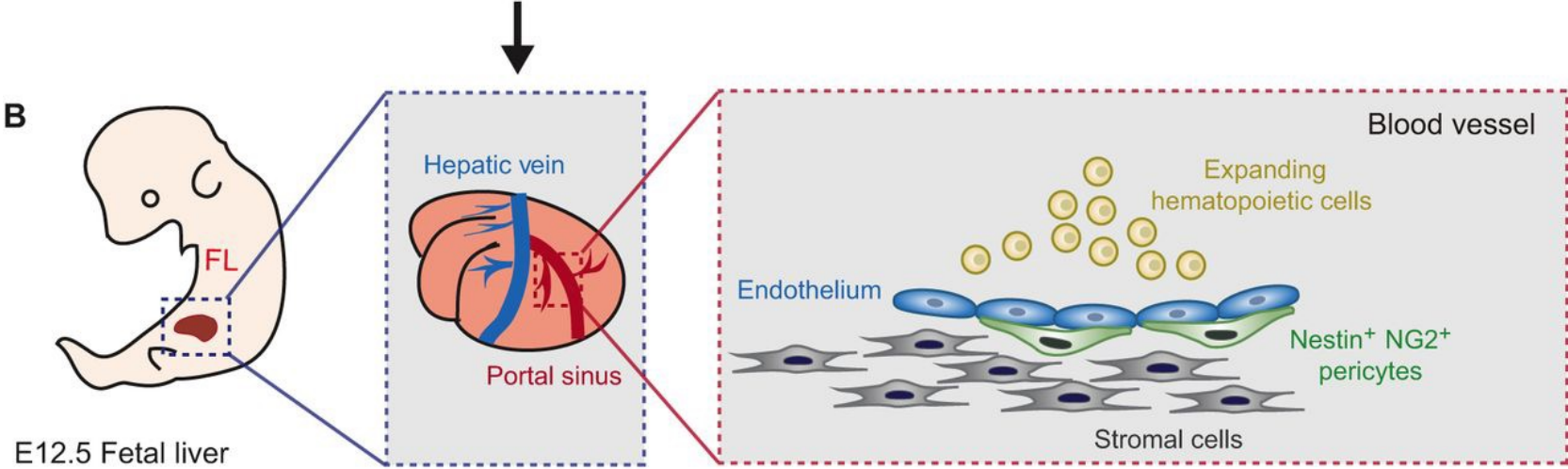
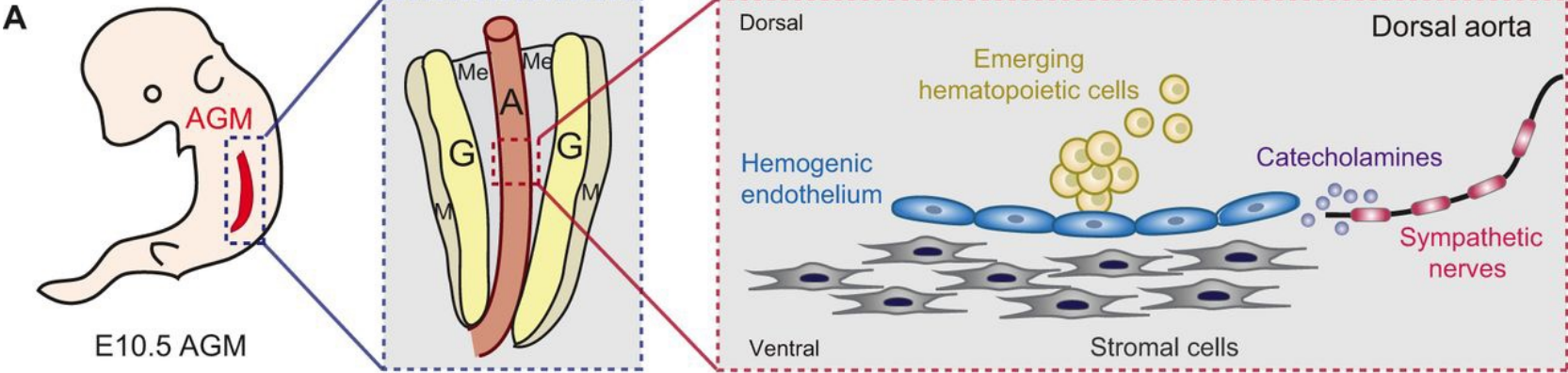
Placenta et cordon ombilical

Hematopoïèse pendant le développement (souris)



EC: endothelial cells
Yolk sac: sac vitellin

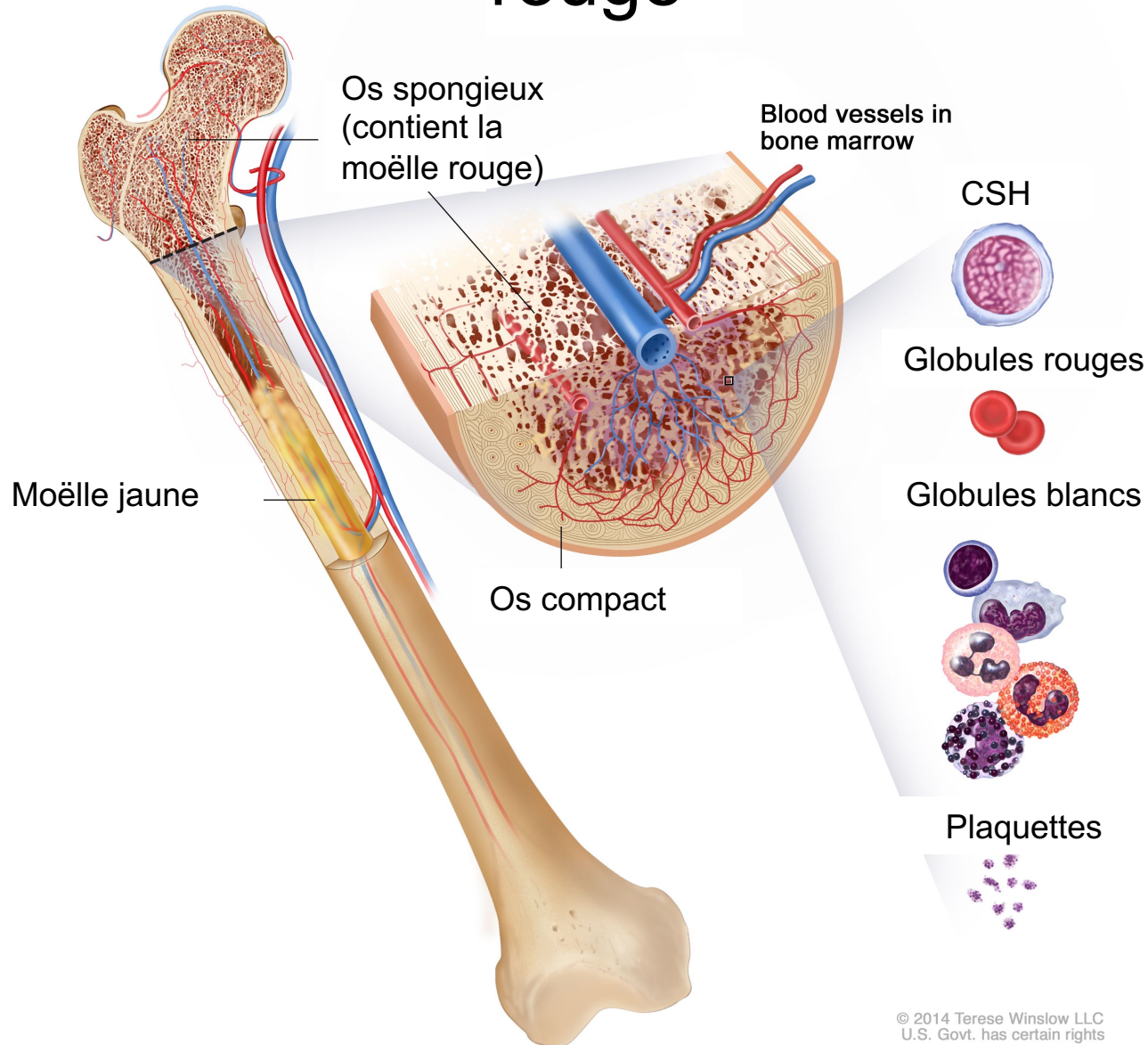
Niche des CSH embryonnaires



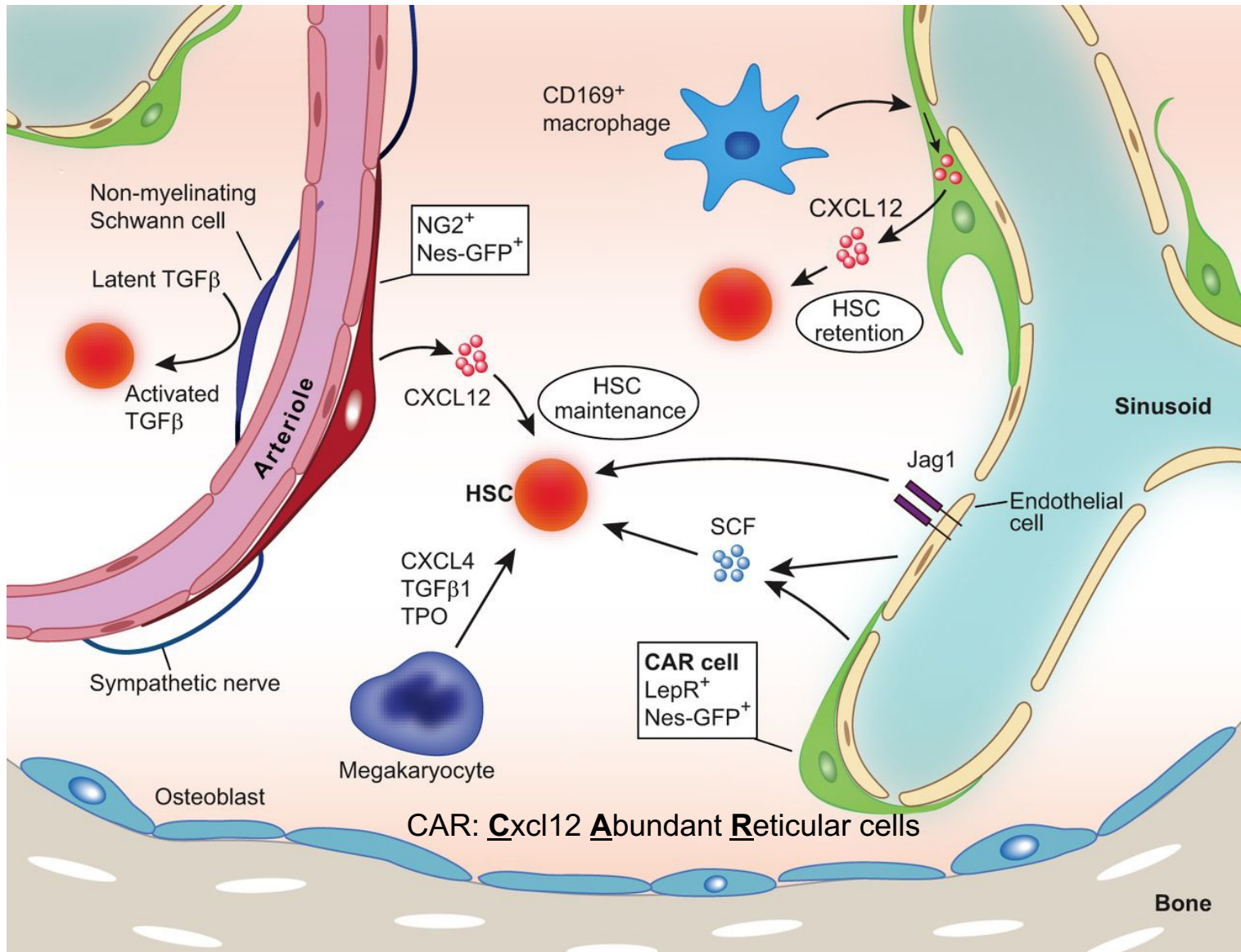
E15.5 Fetal spleen

E17.5 Fetal bone marrow

Hématopoïèse adulte: dans la moëlle osseuse rouge

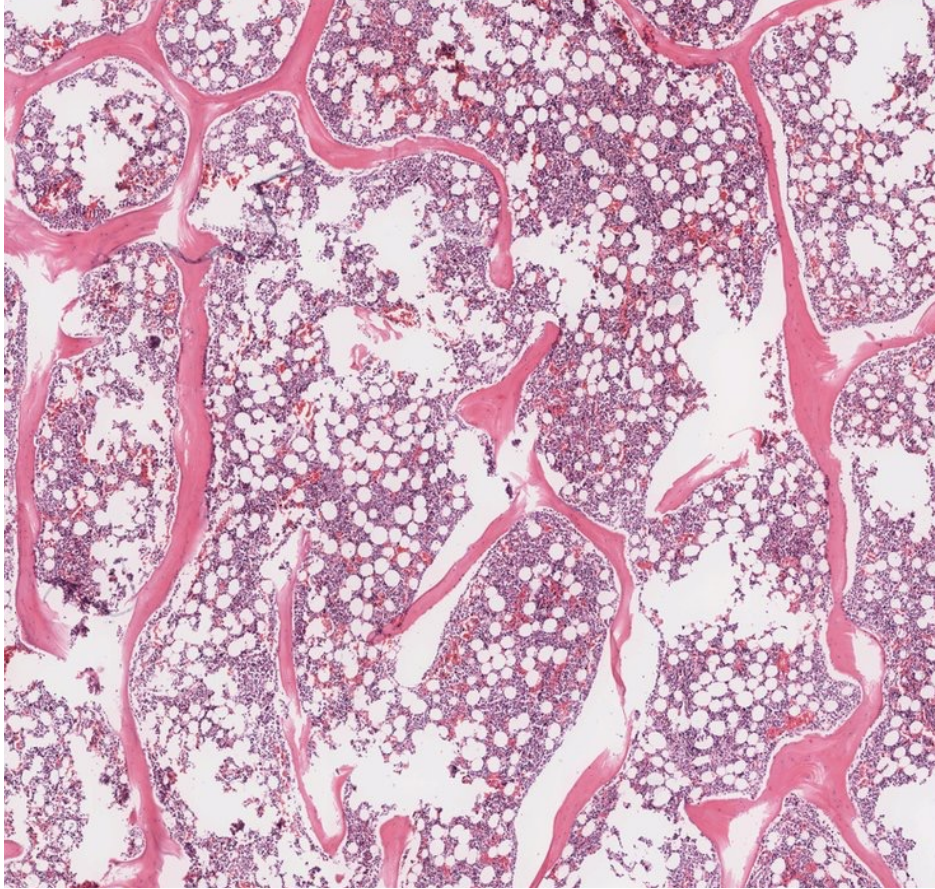


Niche des CSH adultes

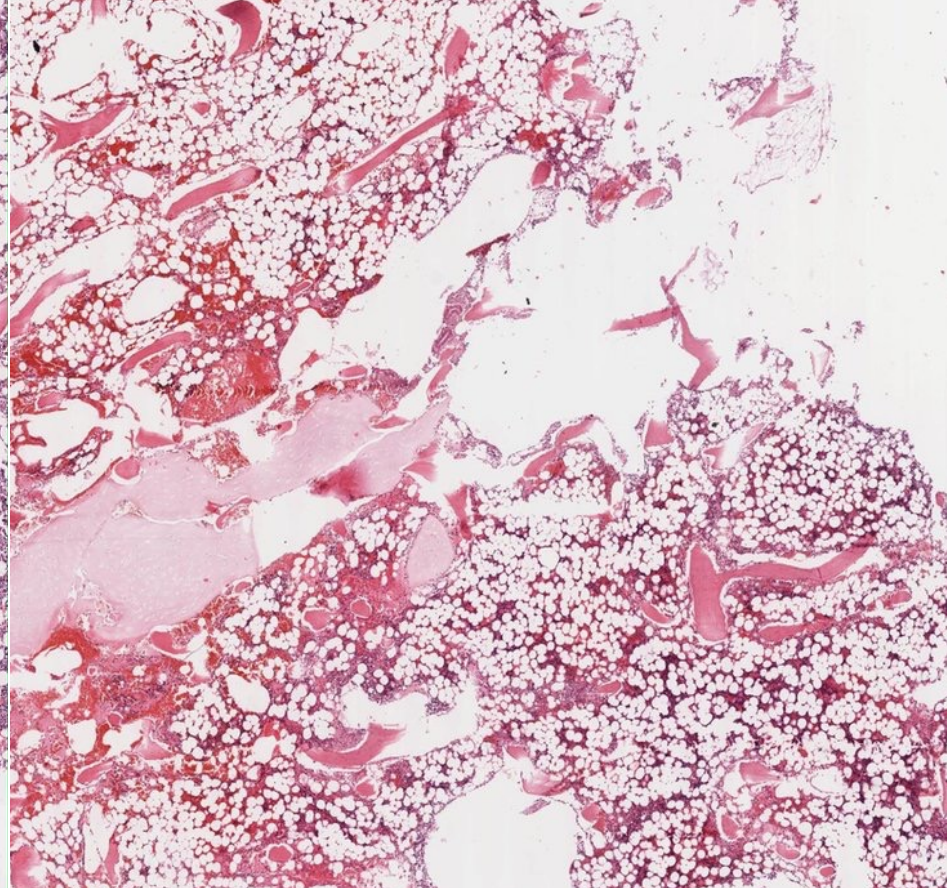


Histologie de la moëlle osseuse

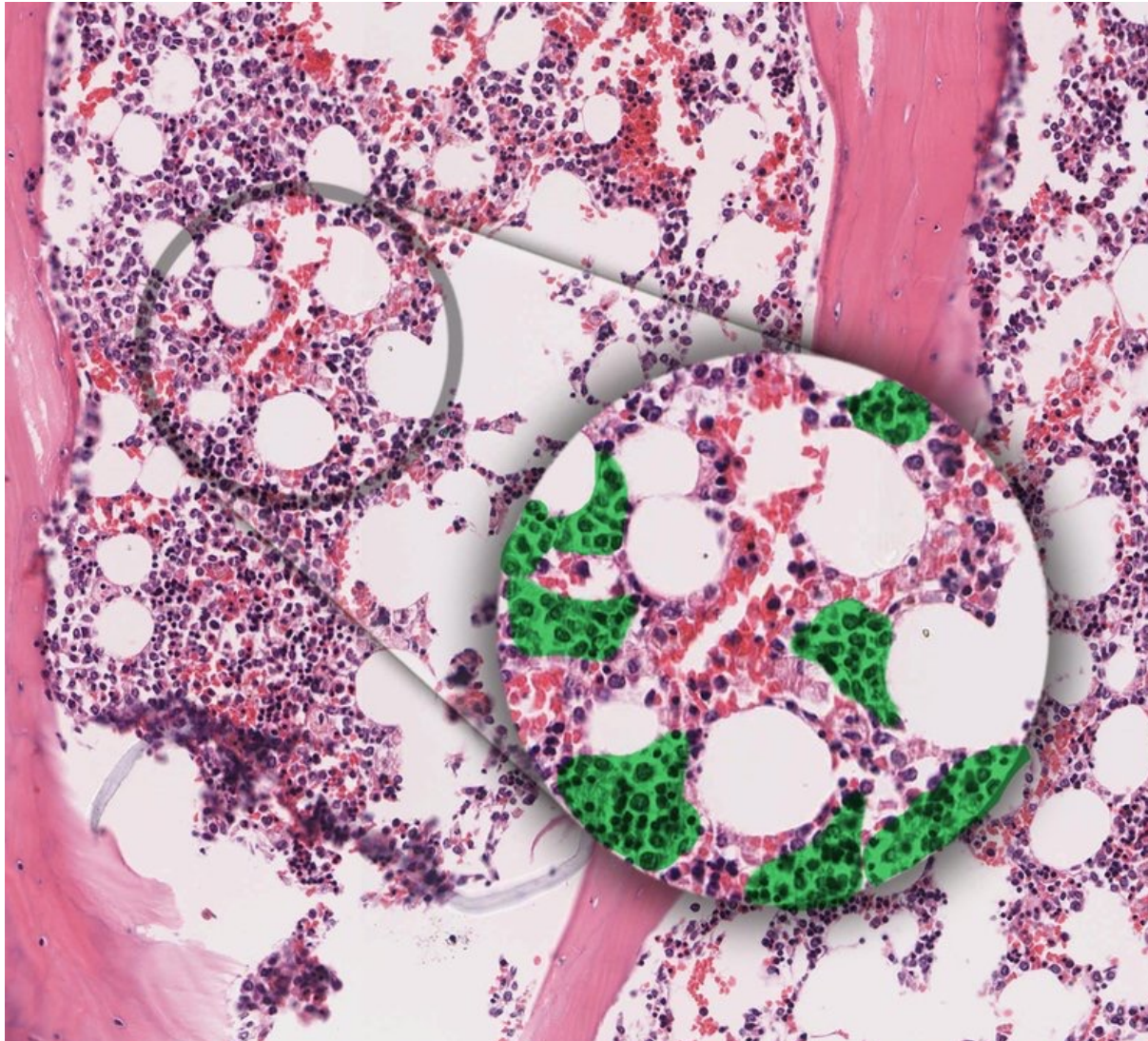
Moëlle rouge



Moëlle jaune



La moëlle rouge de plus près

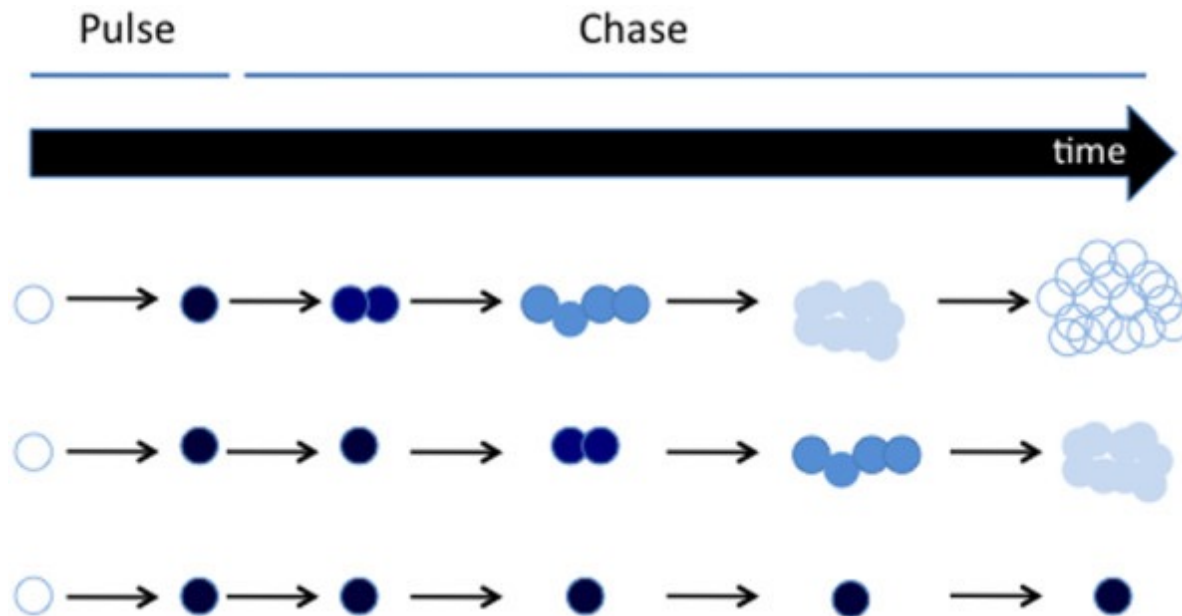


En vert: cordons
hématopoiétiques

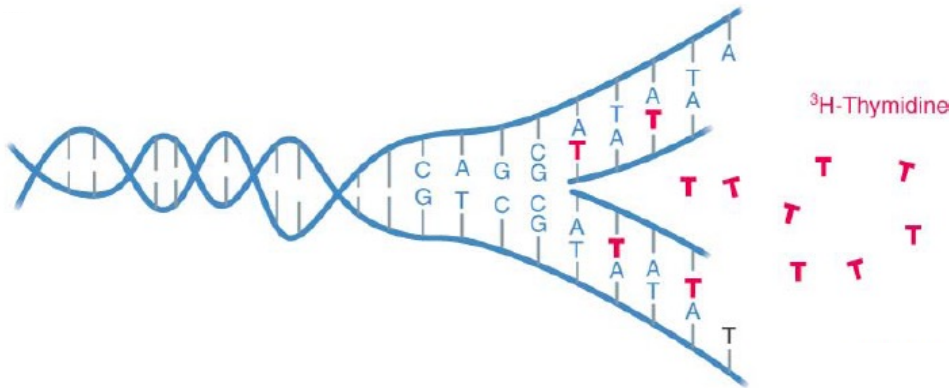
Comment peut-on trouver des
CSH dans la moëlle osseuse ?

Les CSH comme “Label Retaining Cells”

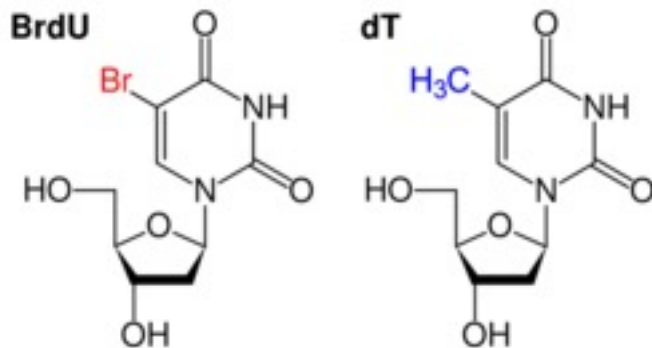
- Les CSH se divisent très rarement
- Si on marque leur ADN, les CSH devraient garder ces marqueurs plus longtemps que des progéniteurs plus avancés (dilution des marqueurs par division) ou des cellules différenciées (sortent de la moëlle/durée de vie limitée)



Comment marquer l'ADN des cellules ?



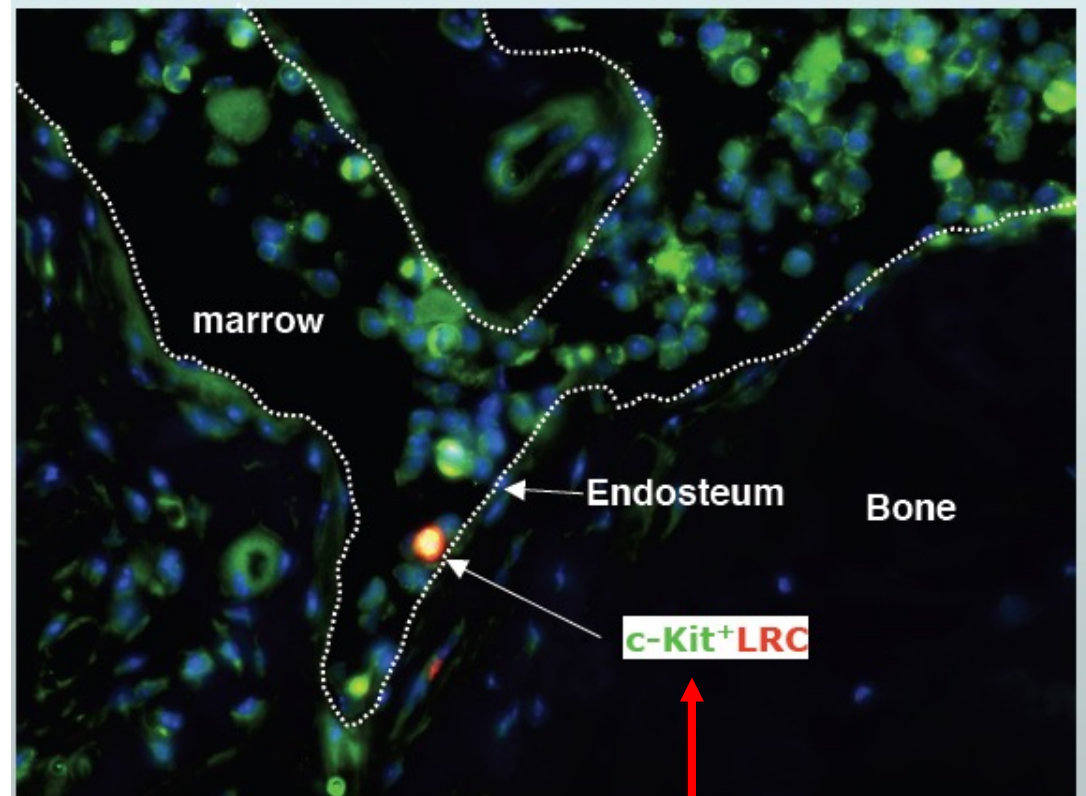
³H Thymidine: Radioactif
→ Détection: (autoradiographie)



BrdU
→ Détection: avec un anticorps

Identification des CSH dans la moëlle osseuse

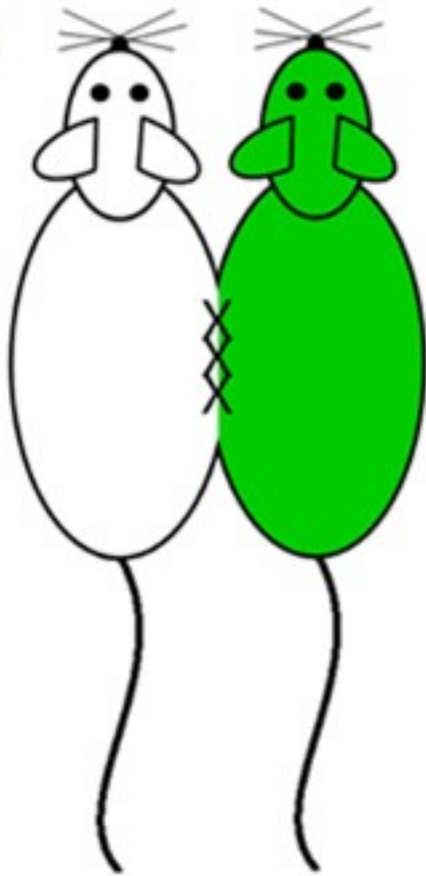
c-Kit: marqueur de CSH
DAPI: marque les noyaux



BrdU c-Kit DAPI

1/5 est une CSH

Les CSH circulantes



Très rares

Preuve de leur existence: connexion de la circulation sanguine de 2 souris = parabiose: les CSH d'une souris passent chez l'autre souris et y produisent des cellules sanguines

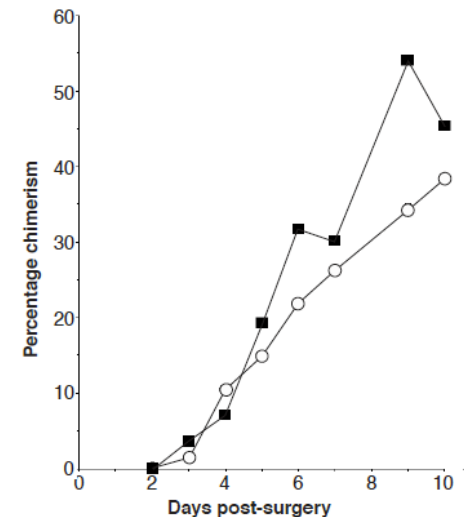


Fig. 1. Rapid establishment of cross circulation after parabiosis. Peripheral blood chimerism of parabiotic mice was determined by CD45 allo-type analysis. Data were obtained by flow cytometry and are plotted as the percentage of partner-derived blood leukocytes for a representative pair. ■, CD45.1 cells in CD45.2 partner; ○, CD45.2 cells in CD45.1 partner.

Comment étudier l'hématopoïèse ?

- In vivo
- Utilisation du FACS / Essai de formation de colonies in vitro
- Analyse de cellules individuelles:
 - RNA-seq
 - Barcoding

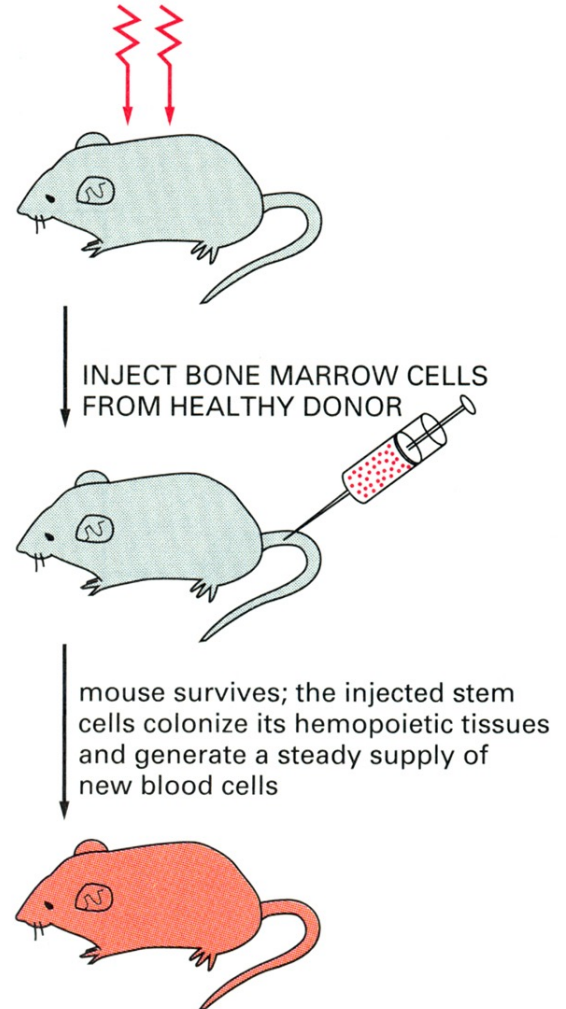
Reconstitution de la moëlle osseuse

(1) Gold standard pour prouver qu'une cellule (ou des populations de cellules) a une activité de cellule souche

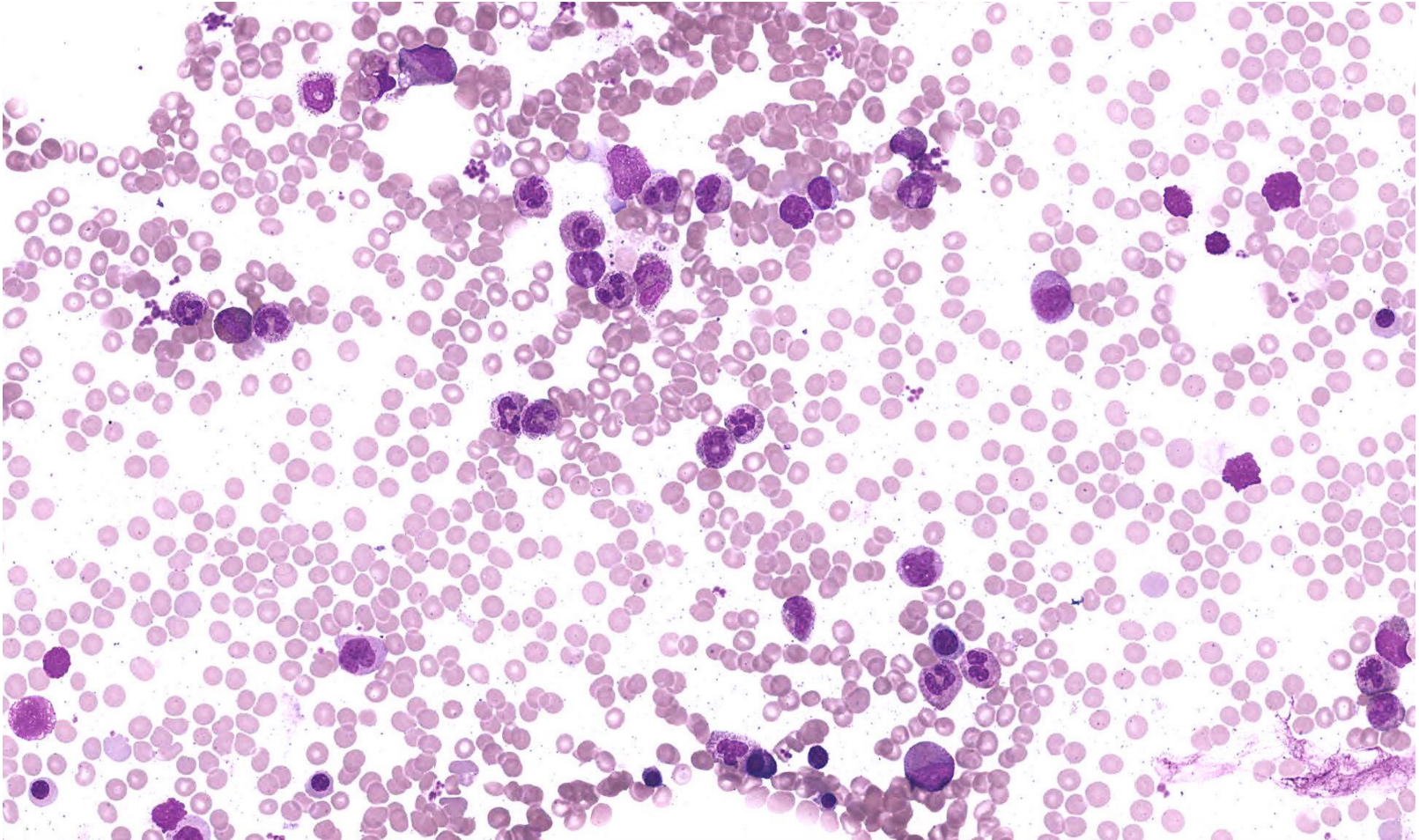
(2) Technique cruciale qui:

- A permis d'identifier les CSH
- Permet d'étudier le potentiel de cellules qui portent une mutation spécifique pour former les lignées du sang

x-irradiation halts blood cell production; mouse would die if no further treatment were given



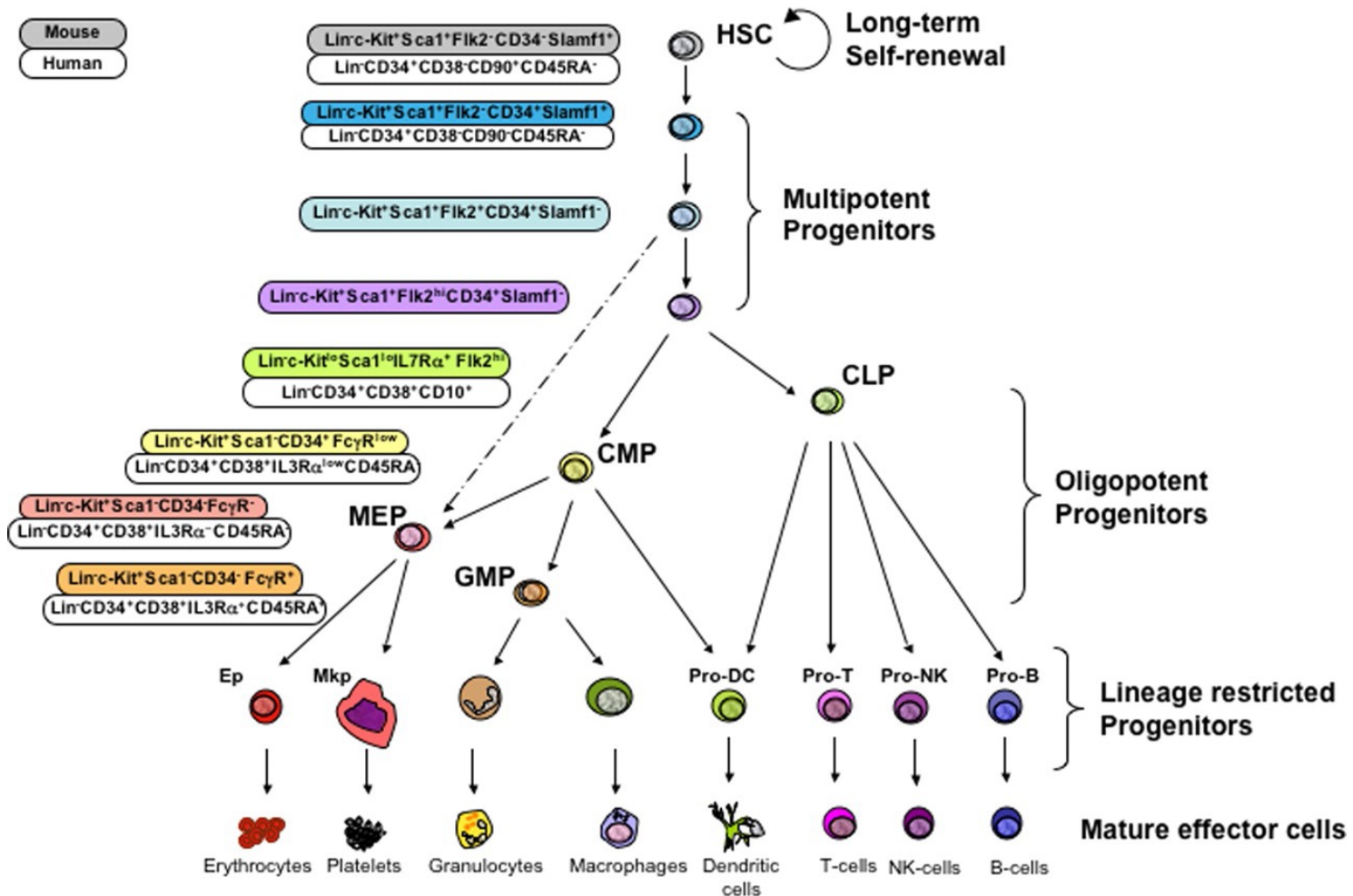
La moëlle osseuse contient un mélange de cellules hétérogènes



Les CSH constituent environ 0.01% des cellules de la moëlle osseuse
→ Comment les purifier ?

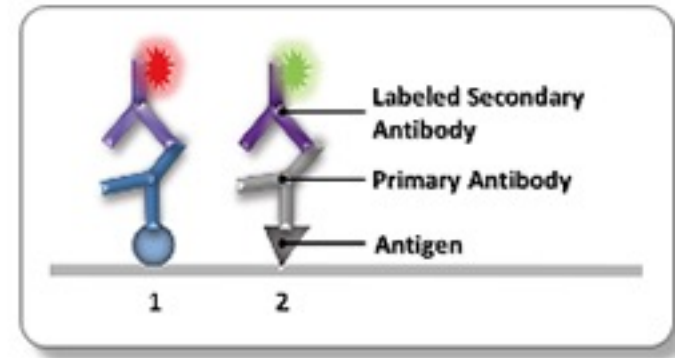
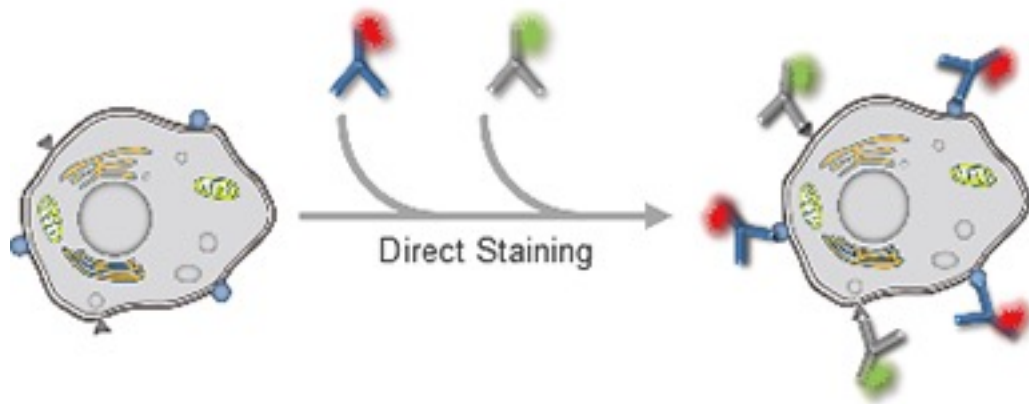
Les CSH et les cellules progénitrices ont des marqueurs de surface spécifiques

Hematopoietic Hierarchy



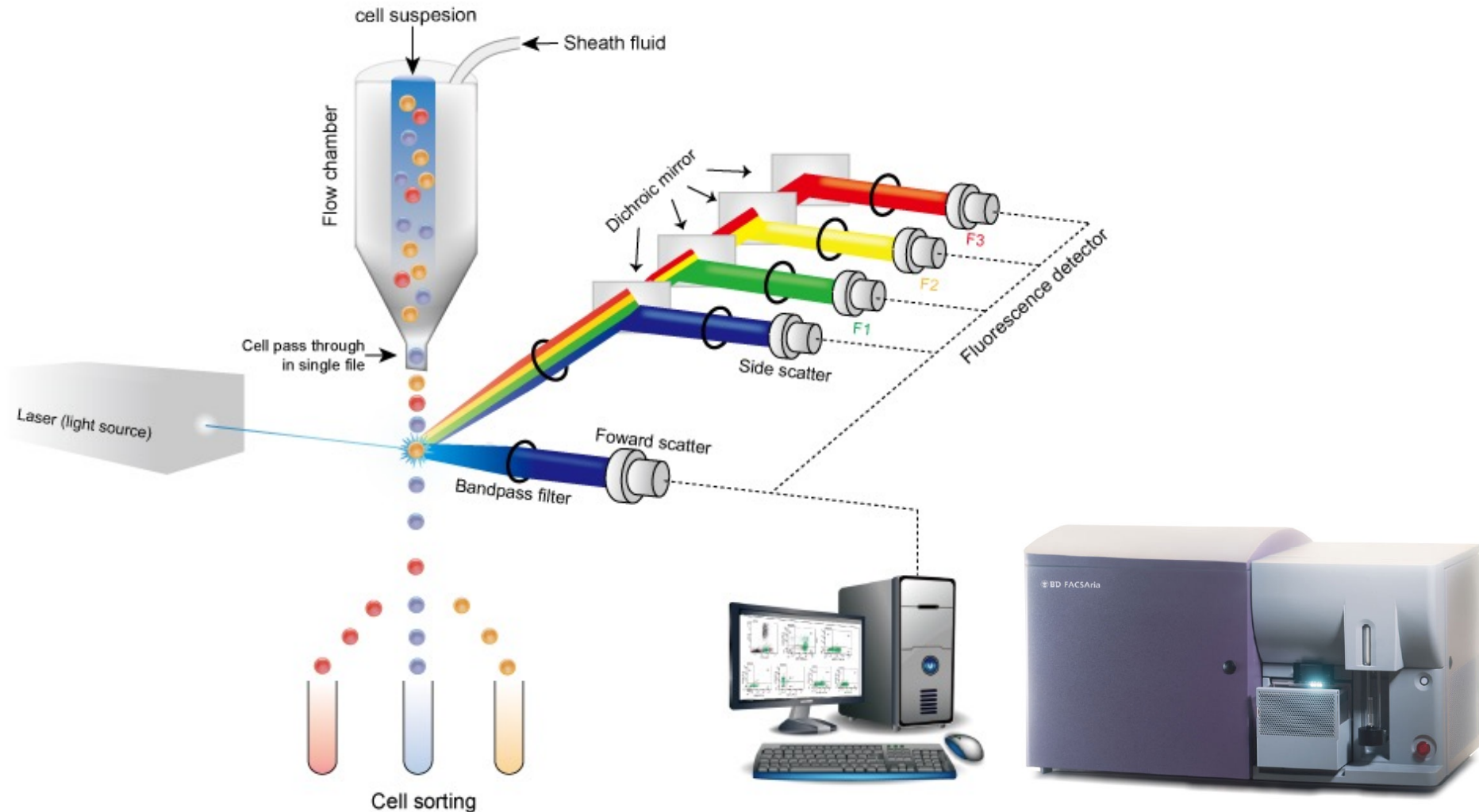
Marquage de populations cellulaires spécifiques

→ Utilisation de combinaisons d'anticorps pour marquer des protéines de surface spécifiques à chaque type de cellules



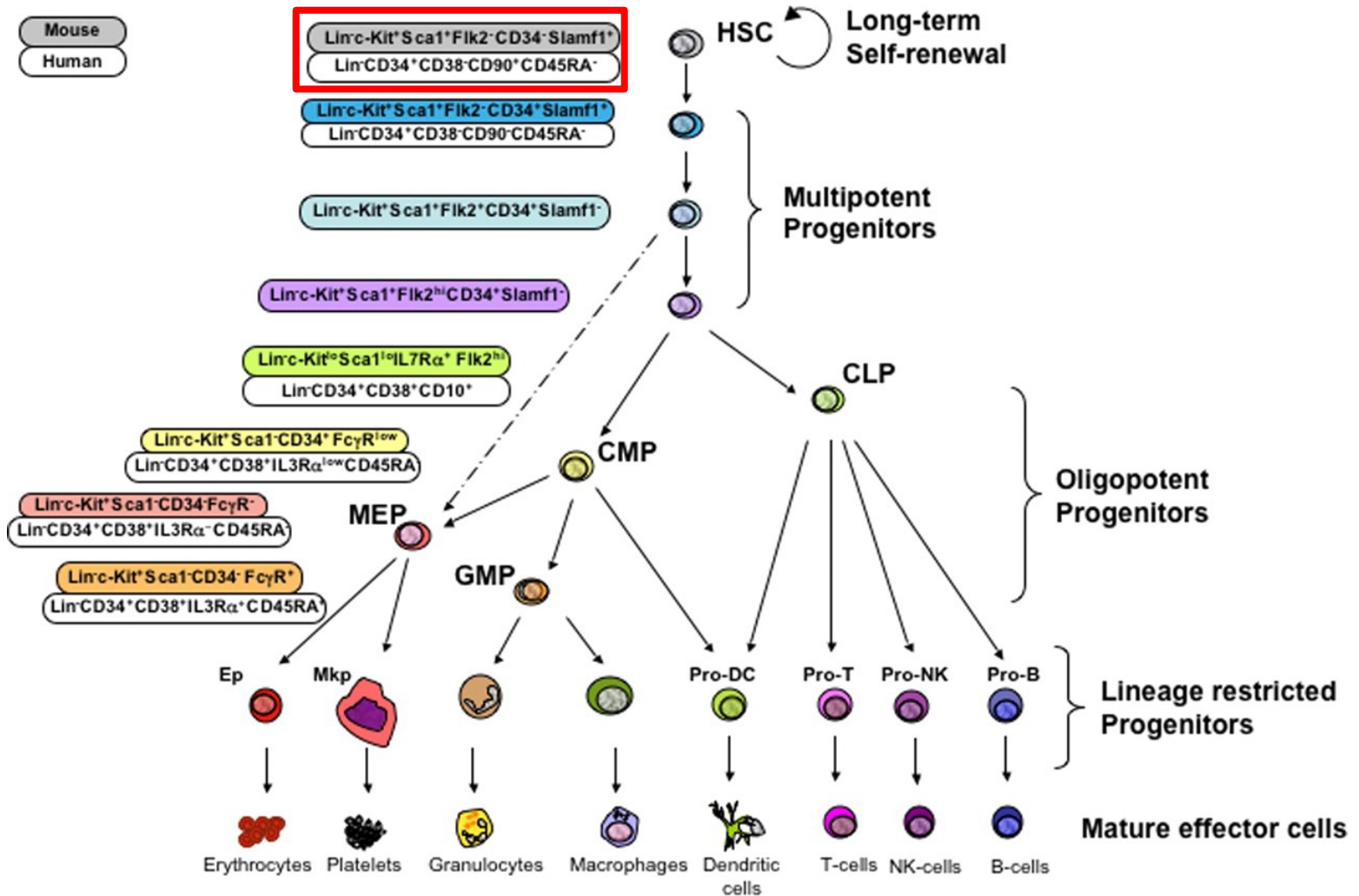
<https://www.sinobiological.com/category/fcm-facs-dual-staining>

Ces marqueurs de surface peuvent être utilisés pour purifier différents types cellulaires



Purification de CSH

Hematopoietic Hierarchy



On peut ensuite tester le potentiel des cellules purifiées

Science

Copyright © 1996 by the American Association for the Advancement of Science

Volume 273(5272)

12 July 1996

pp 242-245

Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell

[Reports]

Osawa, Masatake*; Hanada, Ken-ichi; Hamada, Hirofumi; Nakauchi, Hiromitsu**

M. Osawa and H. Nakauchi, Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences and Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba, Tsukuba Science-City, Ibaraki 305, Japan.

K.-i. Hanada and H. Hamada, Department of Molecular Biotherapy, Cancer Chemotherapy Center, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo 170, Japan.

*Present address: KIRIN Pharmaceutical Research Laboratory, Gunma 371, Japan.

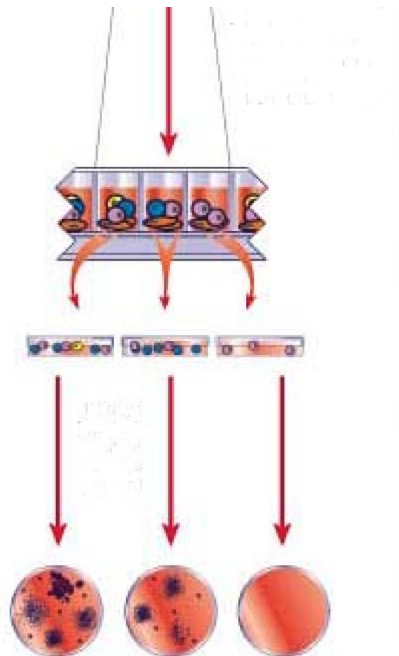
**To whom correspondence should be addressed.

In vitro: Colony forming unit-culture (CFU-c)

→ Quantification du nombre de progéniteurs et de leur potentiel *in vitro*

Mélange de cellules

(moëlle osseuse, sang)



Etape 1

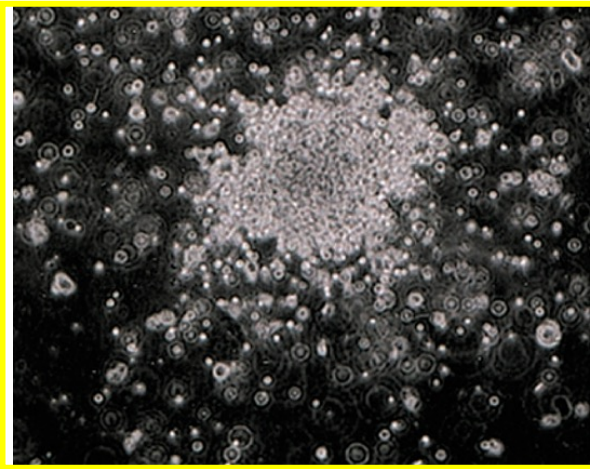
Transfert des cellules sur une culture de méthylcellulose contenant des cytokines (IL3, IL6, Epo, SCF)

Etape 2 (12 jours plus tard)

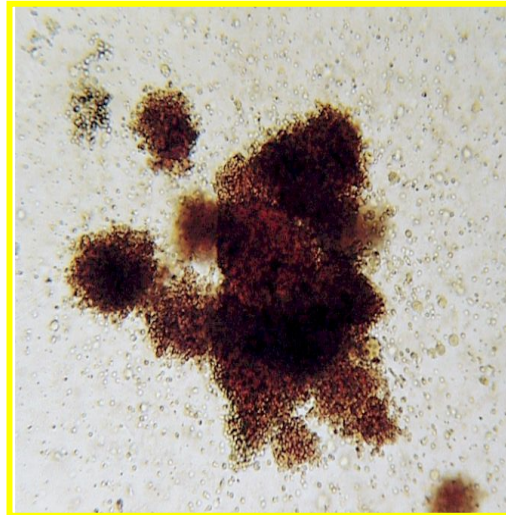
Compter et examiner les colonies

In vitro: Colony forming unit-culture (CFU-c)

- Permet d'étudier des colonies dérivées de CSH et de cellules plus différenciées *in vitro*.
- Permet d'estimer la taille, le nombre de cellules et leur morphologie



CFU-G



CFU-E

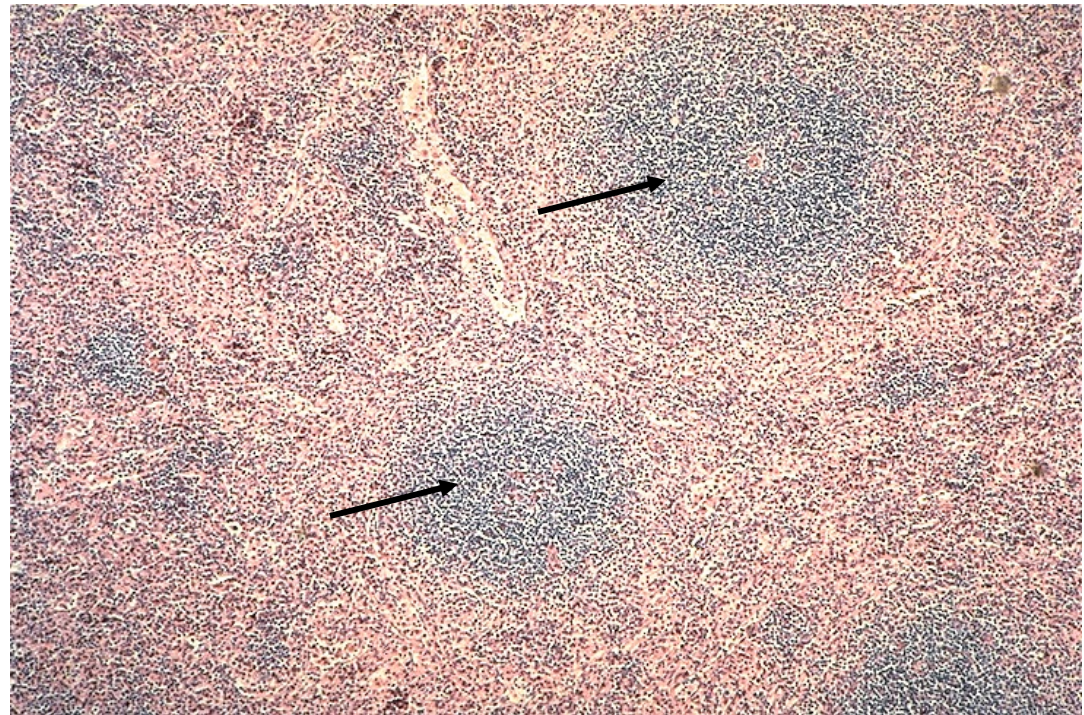
- * CFU-E (colony-forming unit-erythroid)
- * CFU-G (colony-forming unit-granulocyte)
- * CFU-M (colony-forming unit-macrophage)
- * CFU-GM (colony-forming unit-granulocyte/
macrophage)
- * CFU-GEMM (colony-forming unit-granulocyte/
erythroid/macrophage/megakaryocyte)

In vivo: analyse de CFU dans la rate

Permet de quantifier les CSH à court terme/progéniteurs (après 8 jours) ou les CSH à long terme (après plusieurs semaines) *in vivo*.



Rate avec des nodules
(Clonaux)

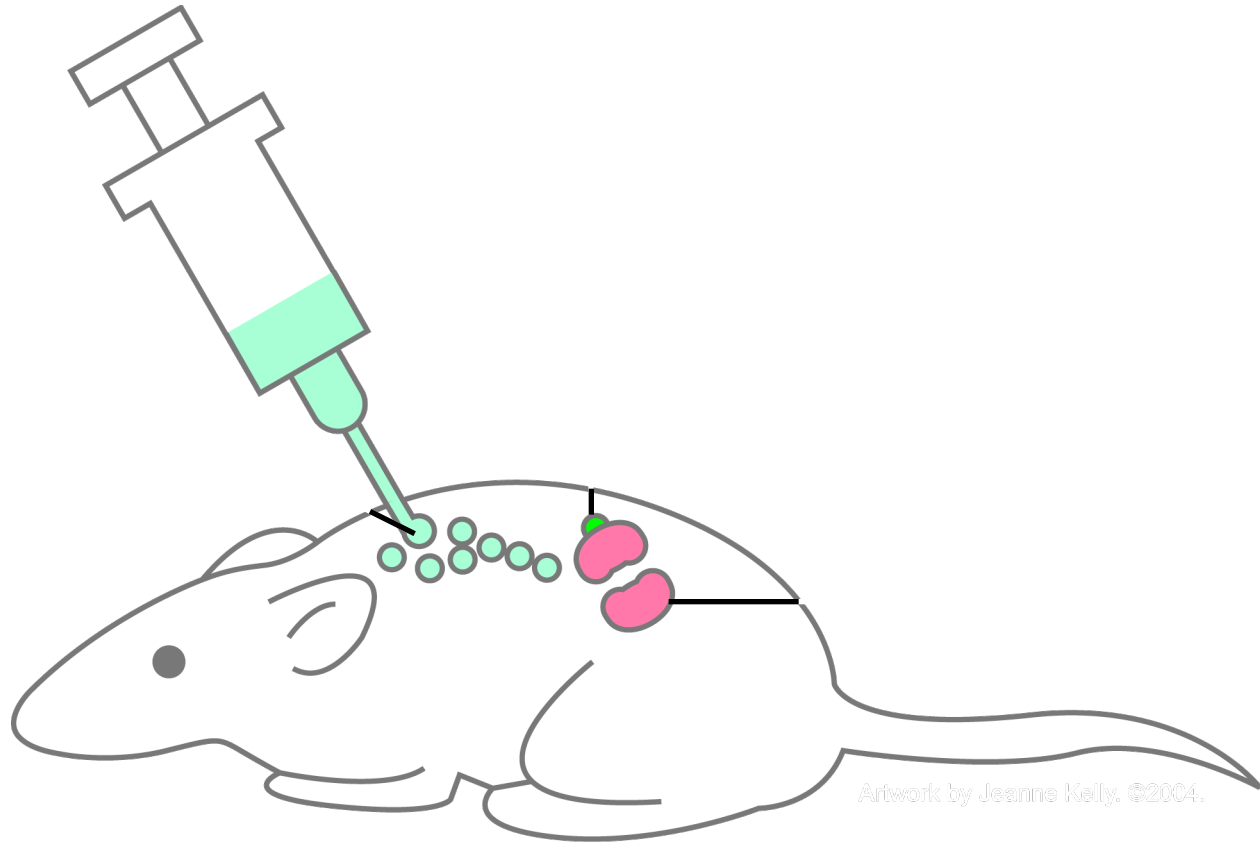


Section de rate fixée, notez les CFU

Fin de la 1^{ère} partie

Comment analyser la fonction des
CSH **humaines** in vivo ?

La souris SCID-hu



Artwork by Jeanne Kelly. ©2004.

Il est possible d'avoir une différenciation de cellules T et B humaines in vivo, en transplantant des CSH et des tissus immunitaires humains

La souris SCID-hu

J. McCune and I. Weissman, Science, 1988

→ Souris immunodéficente transplantée avec des éléments du système immunitaire humain:

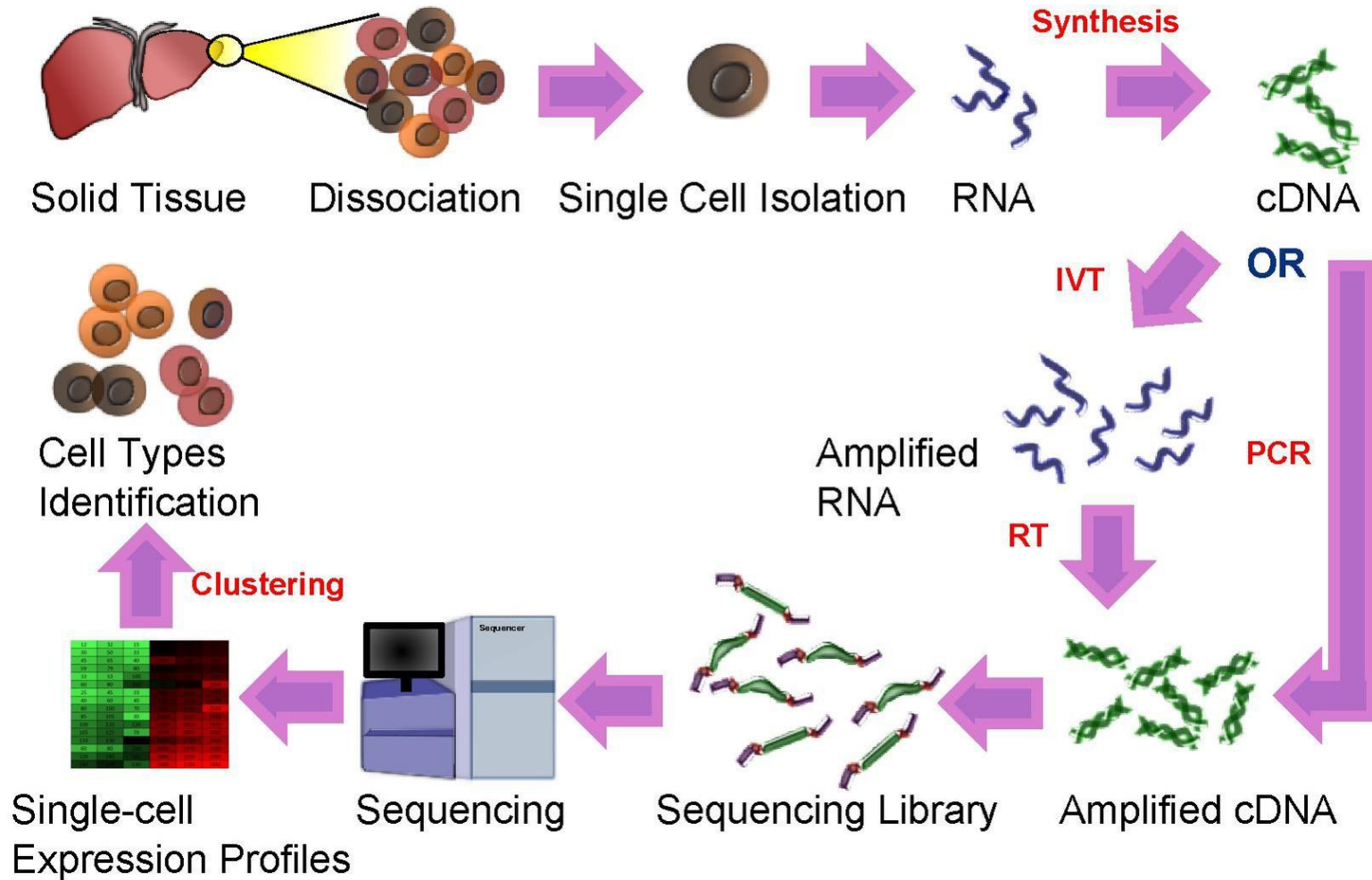
Les souris ne peuvent pas réarranger leurs récepteurs aux antigènes dans les lymphocytes B et T en différenciation (pas d'anticorps ni de réponse immune cellulaire)

SCID: **S**evere **C**ombined **I**mmuno-**D**eficiency

→ En greffant un foie humain foetal, des noeuds lymphatiques ou un thymus chez ces souris, la différenciation des CSH humaines peut être étudiée in vivo

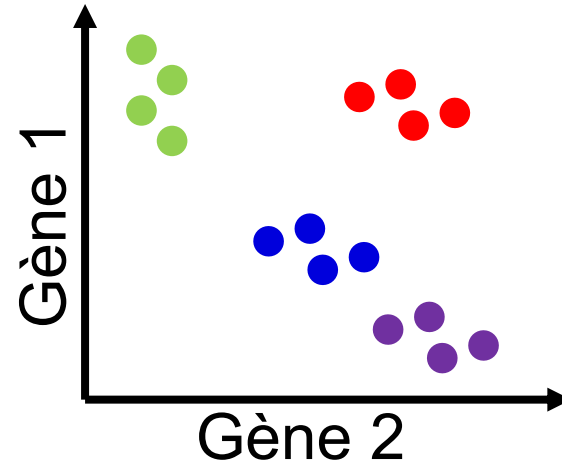
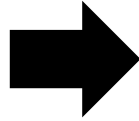
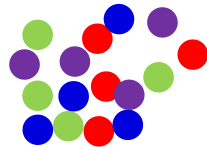
Analyse de cellules individuelles

Single Cell RNA-seq



Analyse des données

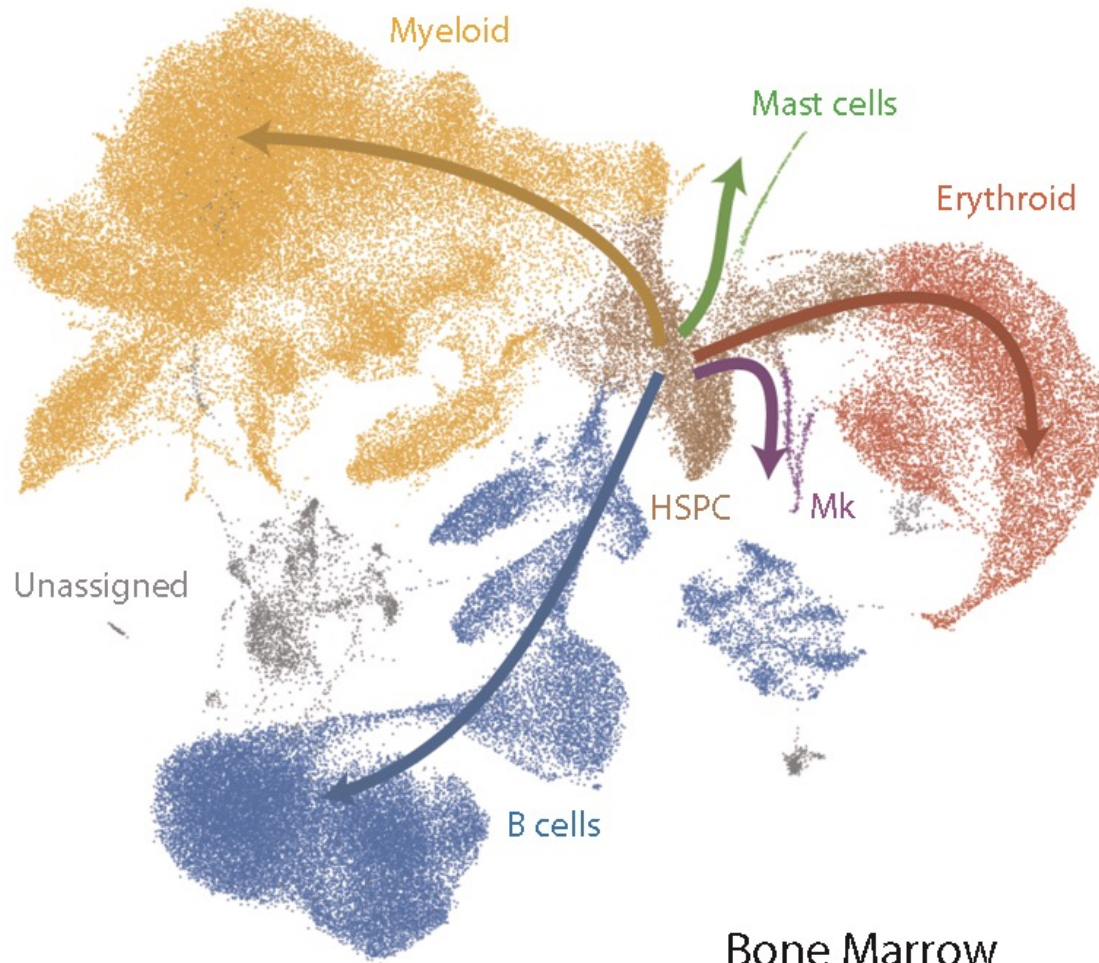
Population de cellules



...Comment représenter ces cellules sur une diagramme de $> 20'000$ dimensions ?

→ On utilise des méthodes statistiques de **réduction de dimensionnalité**, qui permettent de positionner les cellules sur un diagramme en 2 dimensions en fonction de la **similarité de leur transcriptome**

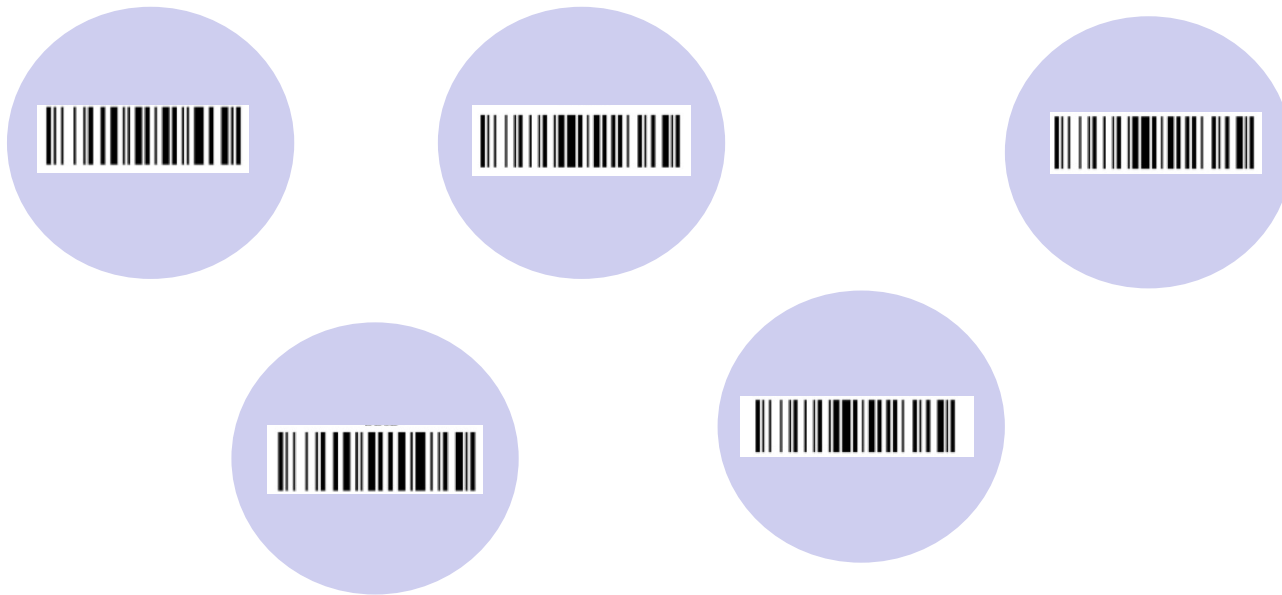
Analyse de dizaines de milliers de cellules hématoïétiques par single cell RNA-seq



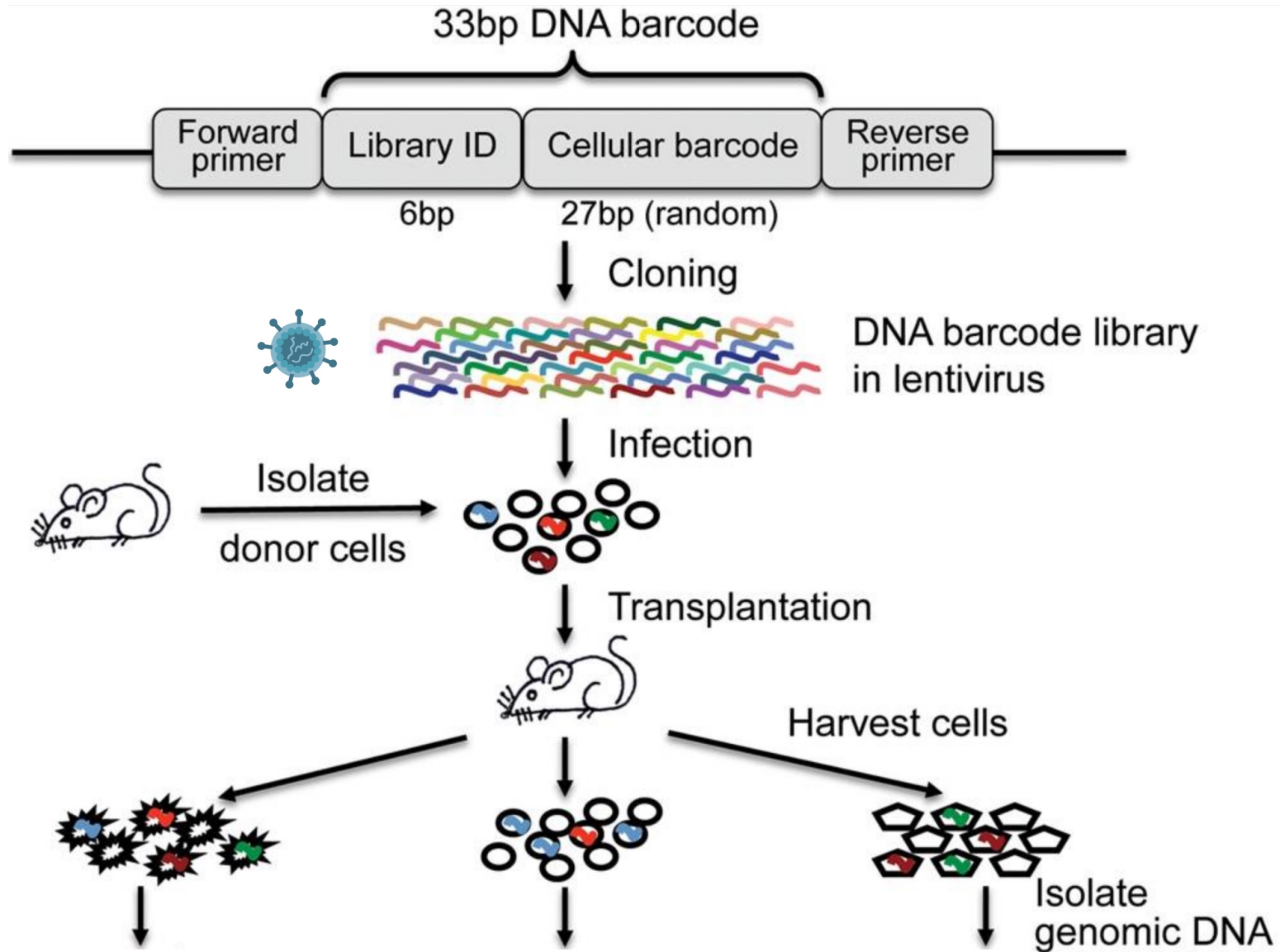
Bone Marrow
Human Cell Atlas

Analyse du potentiel des CSH par barcoding

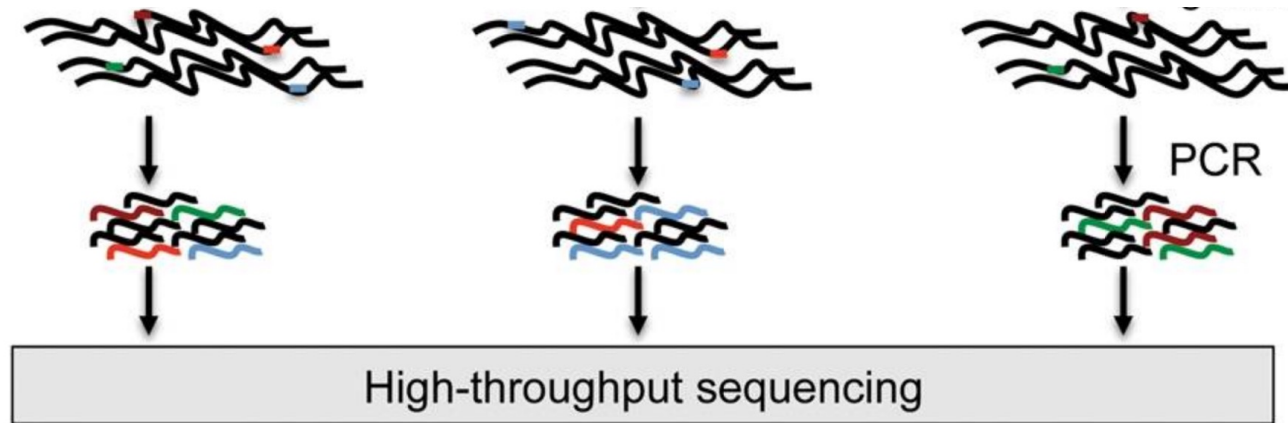
Principe: insérer **dans le génome** de chaque CSH une **séquence d'ADN artificielle différente = code barre**



Analyse du potentiel des CSH par barcoding

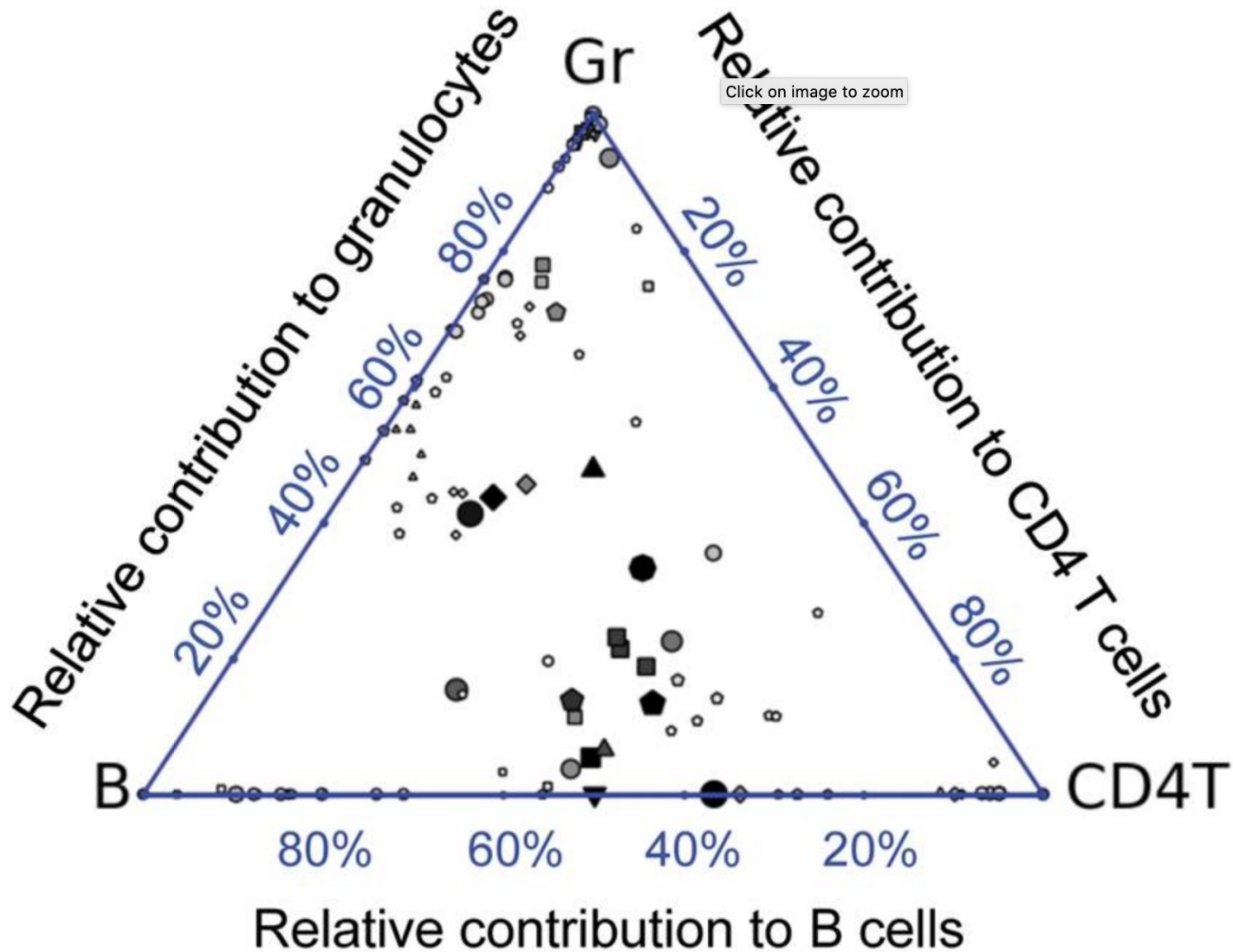


Analyse du potentiel des CSH par barcoding

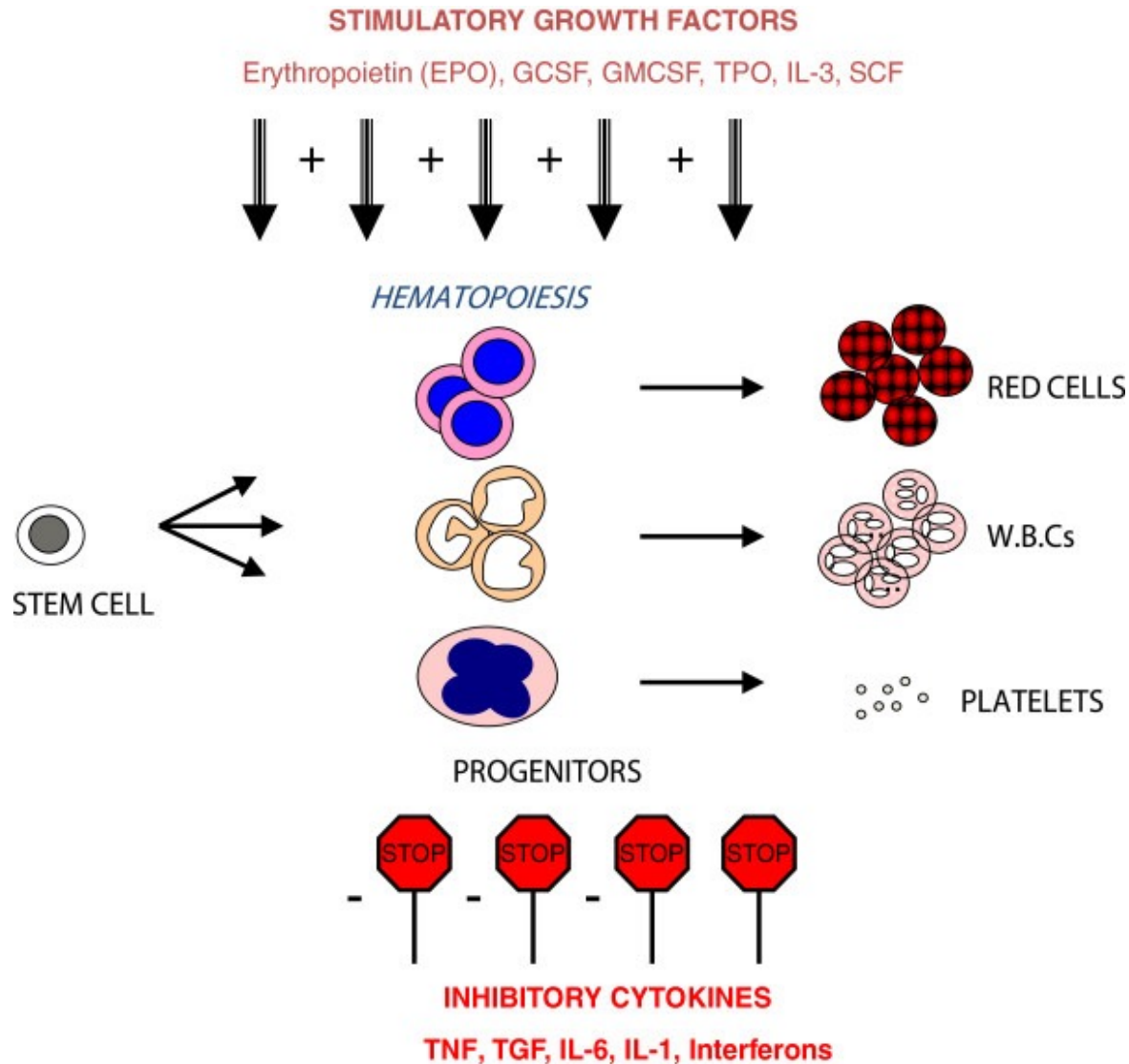


→ On peut quantifier la **représentation** de chaque code barre dans **différents types de cellules du sang**

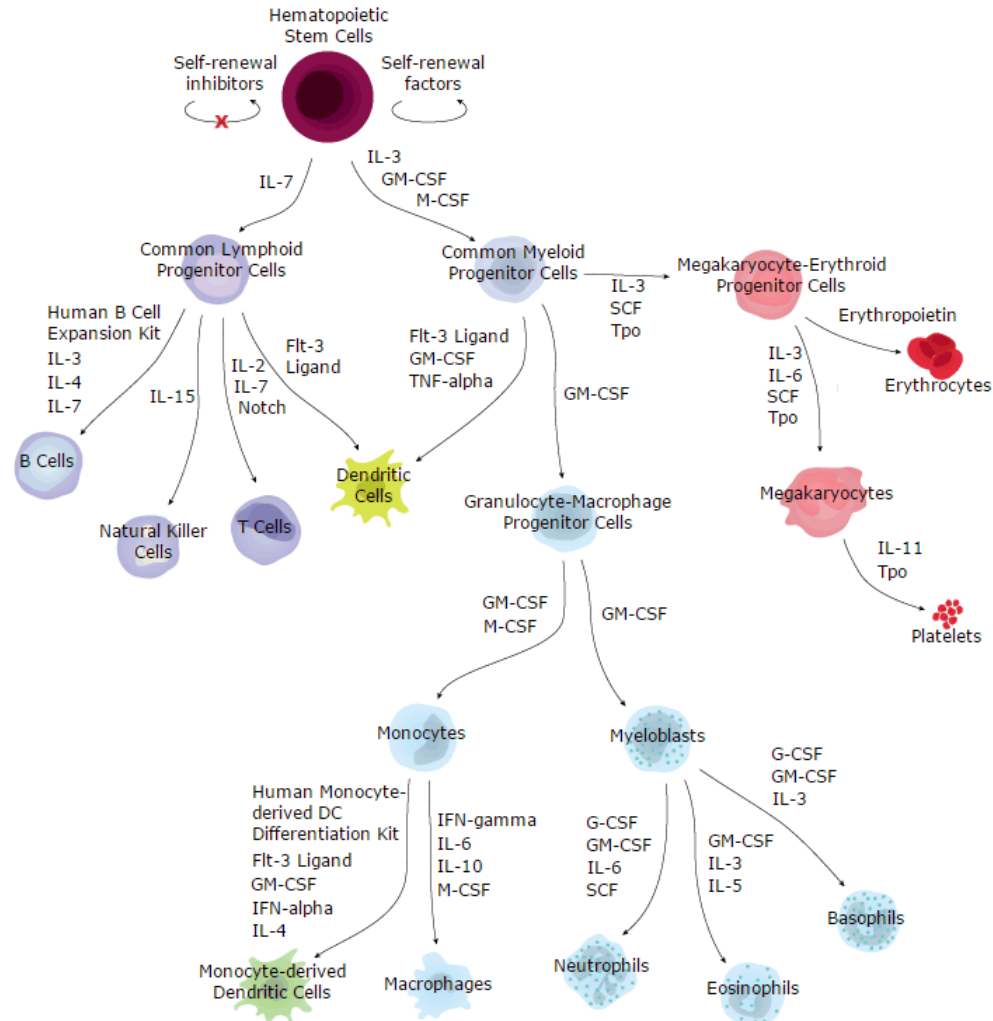
Analyse du potentiel des CSH par barcoding



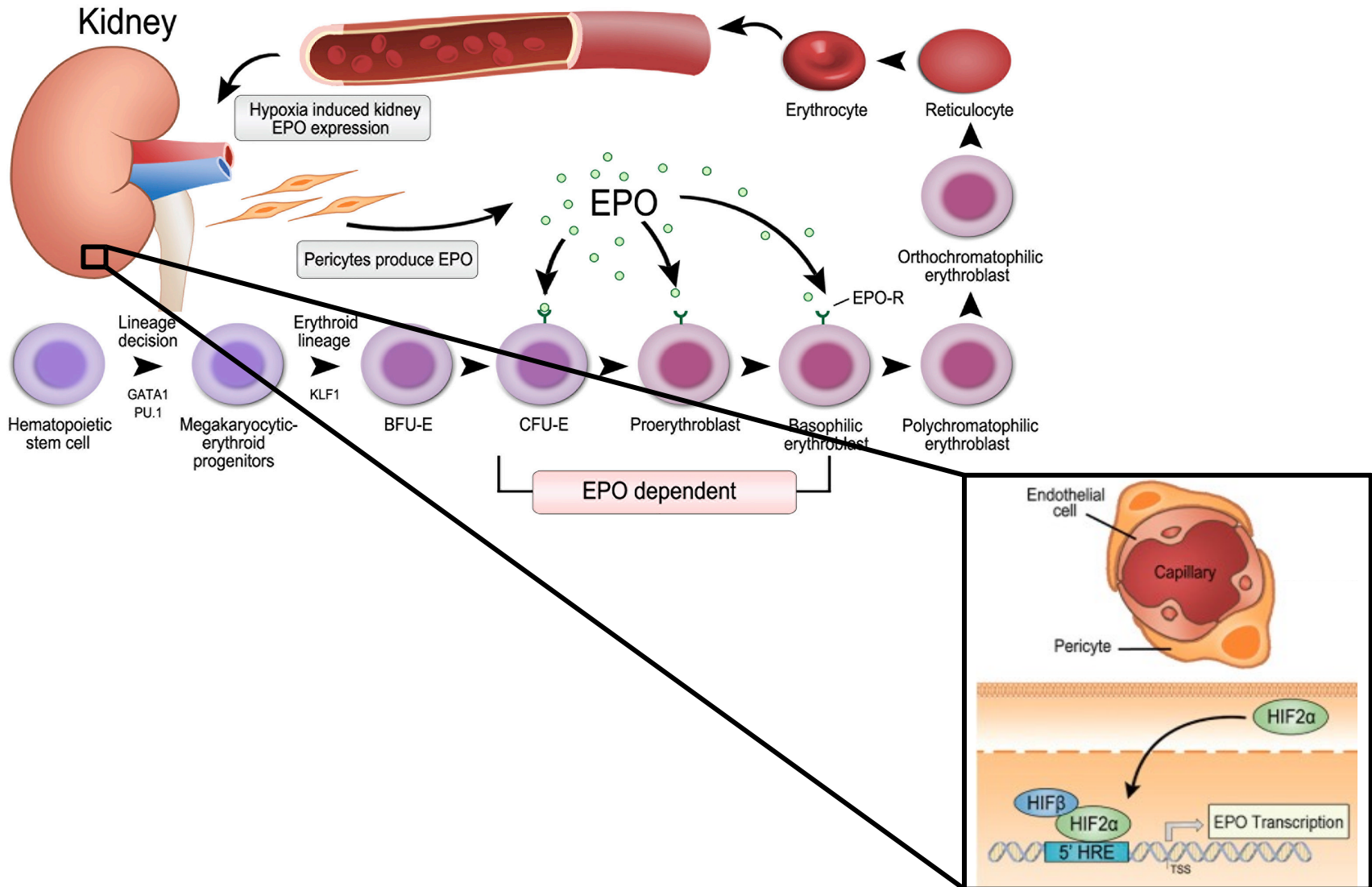
Régulation de l'hématopoïèse



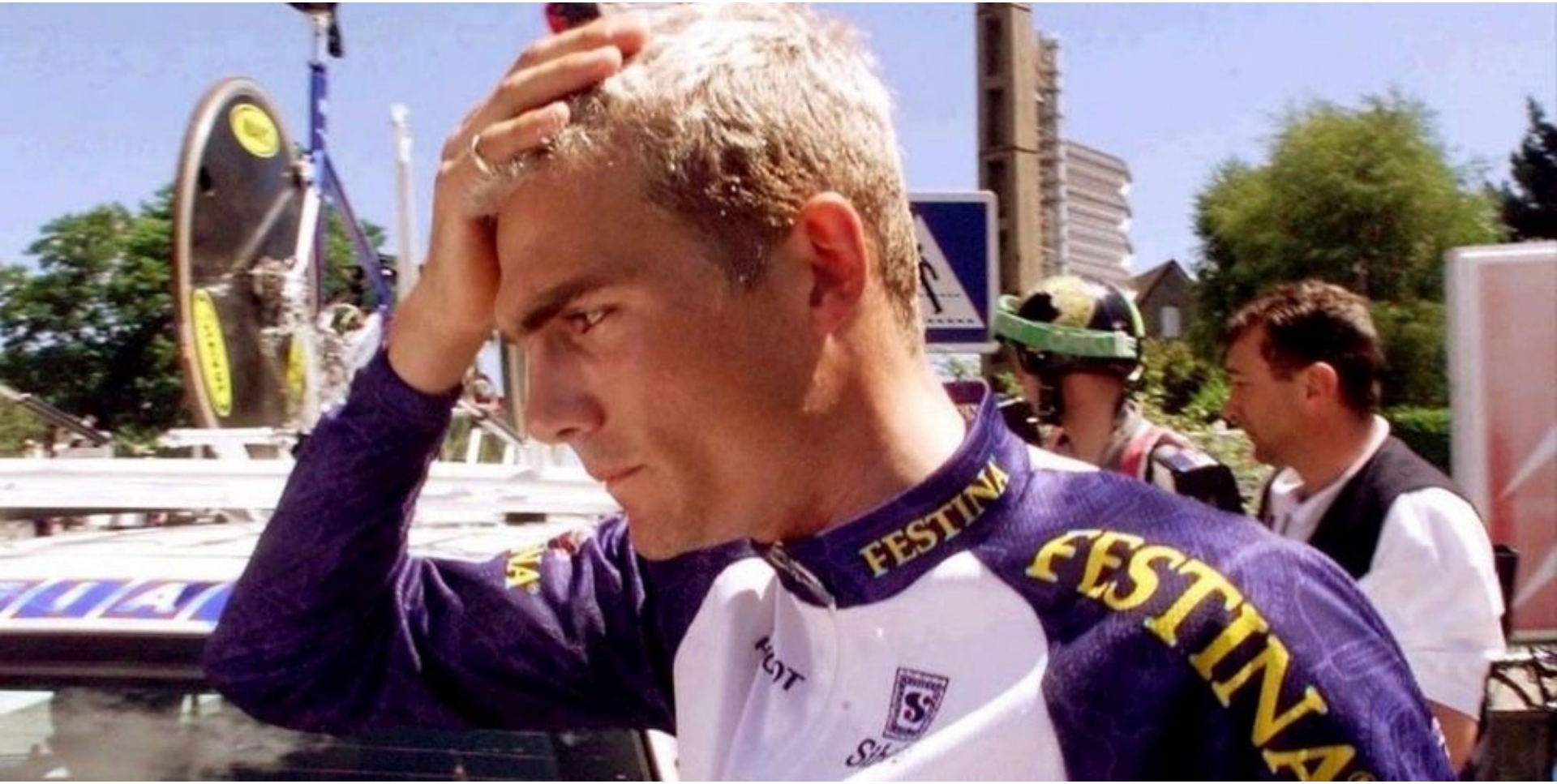
Différentes cytokines agissent à différents niveaux de l'hématopoïèse



L'érythropoïétine est synthétisée par le rein en réponse à une hypoxie

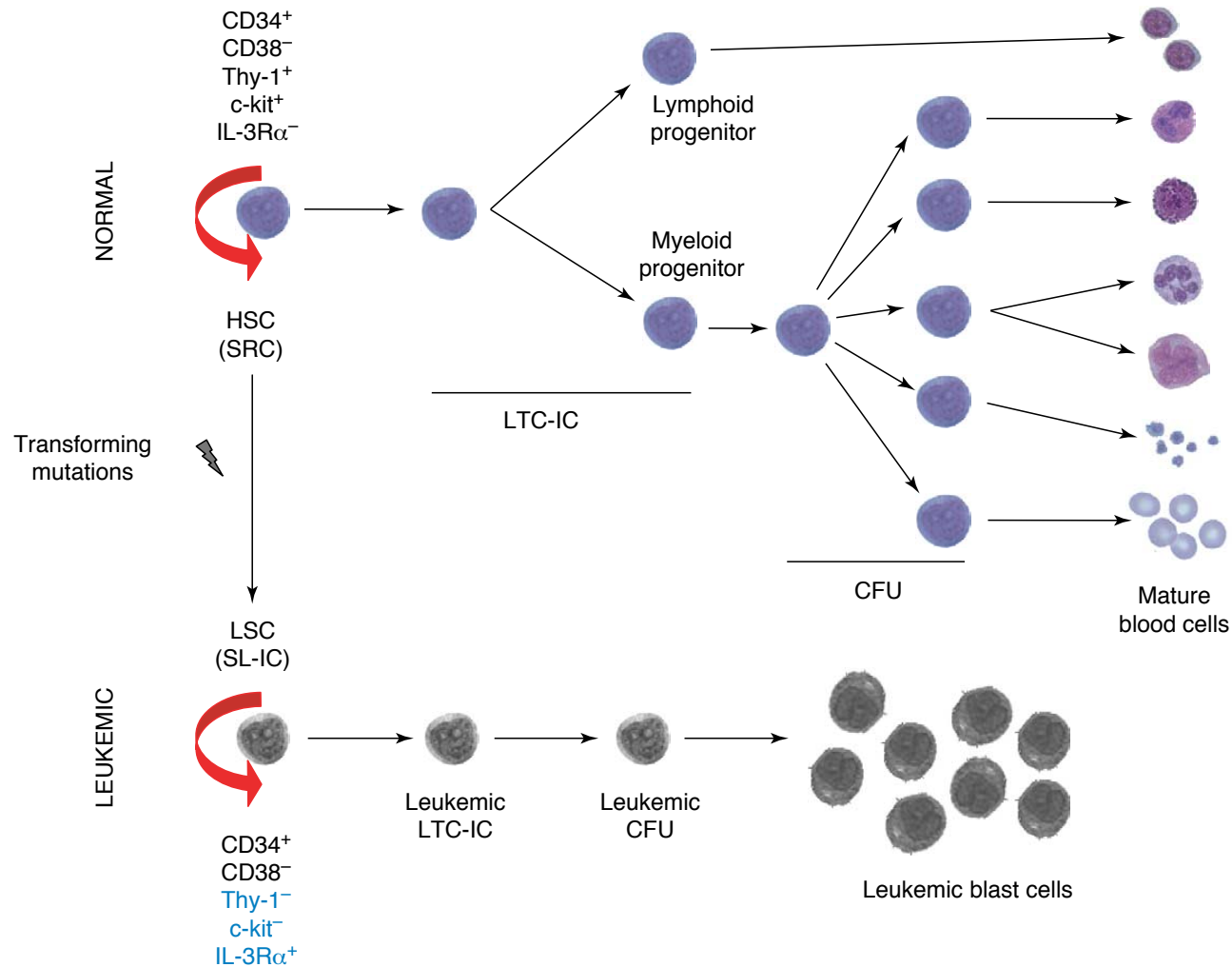


Dans les années 90: scandale de dopage à l'EPO



Richard Virenque, apprenant son exclusion du tour de France en 1998

Dérégulation pathologique de l'hématopoïèse: leucémie myéloïde



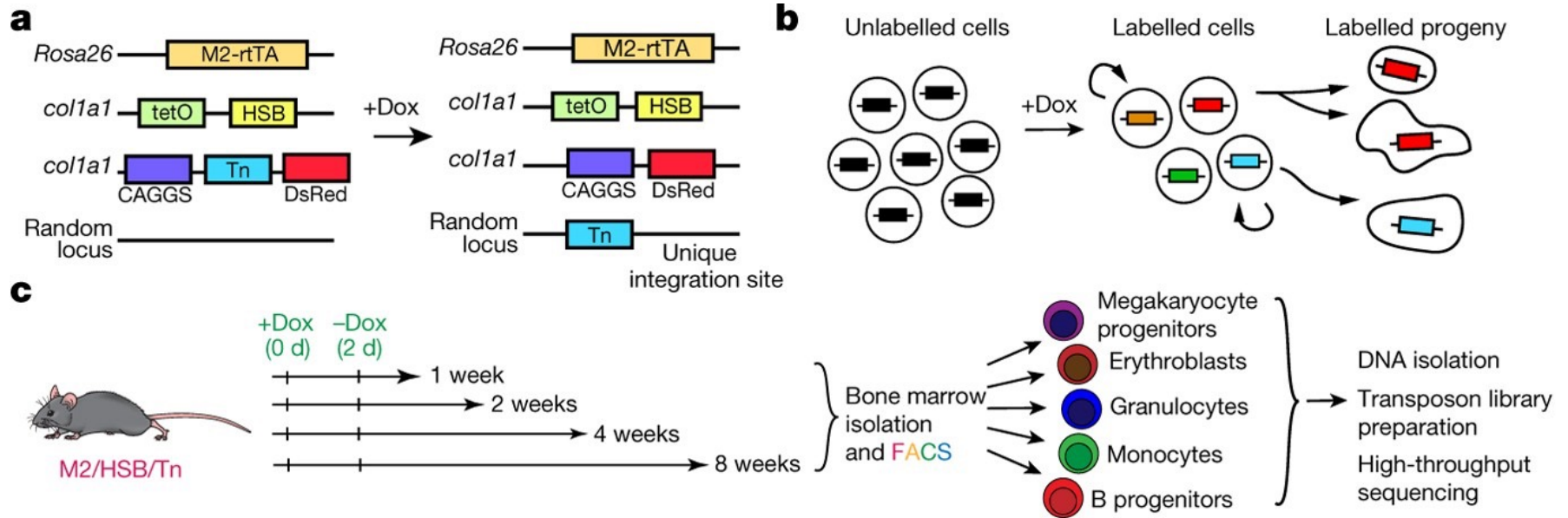
CSH en homéostasie vs en transplantation

Les tests fonctionnels classiques des CSH se font par transplantation

Des CSH prélevées (donc **potentiellement « stressées »**) injectées dans un **animal dont le système hématopoïétique est détruit**

→ Est-ce que la fonction mesurée des CSH dans ces conditions reflète vraiment leur rôle normal ?

Comment mesurer la fonction homéostatique des CSH ?



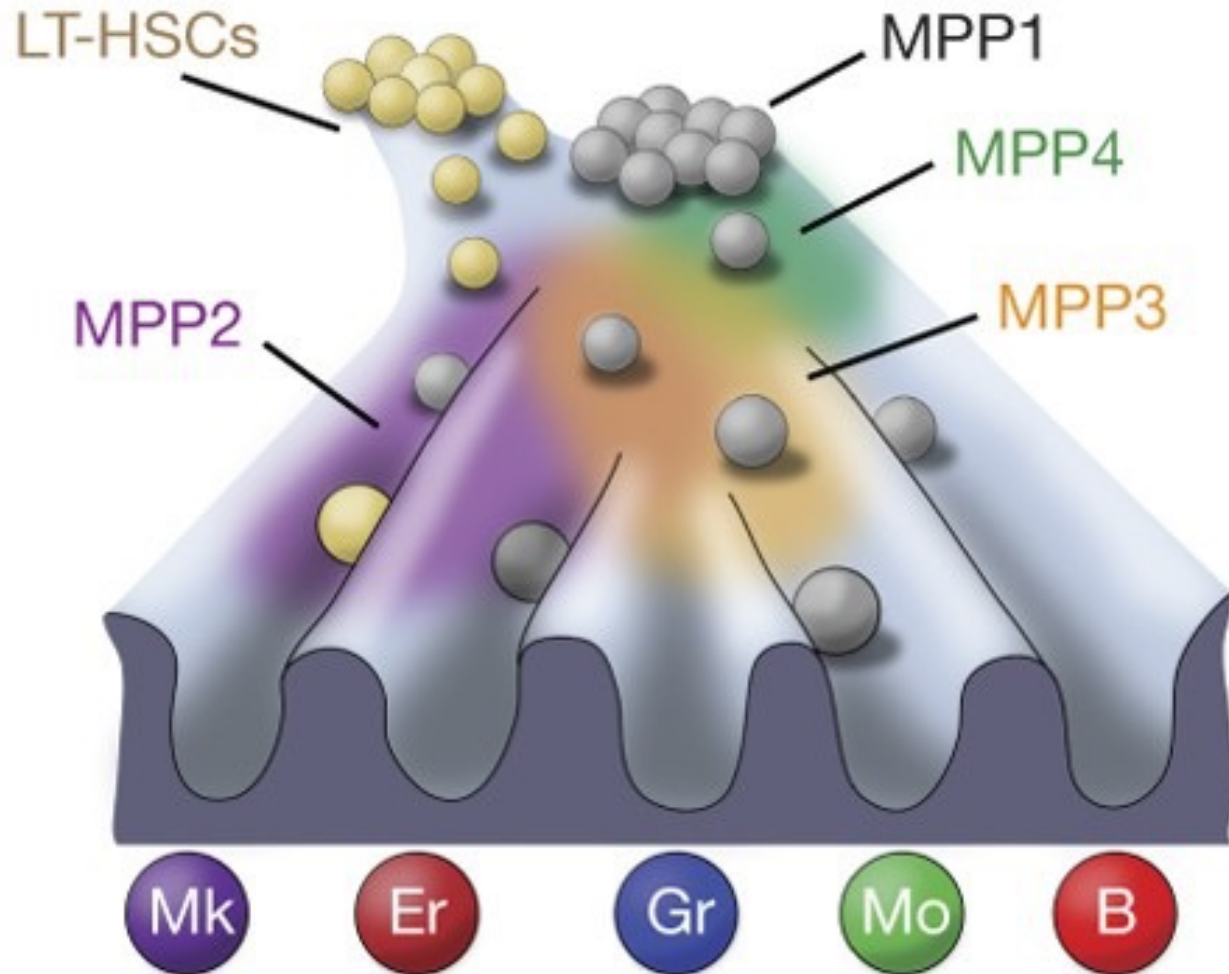
M2-rtTA: facteur de transcription activé par la doxycycline

tetO: promoteur auquel le M2-rtTA activé se lie pour activer la transcription

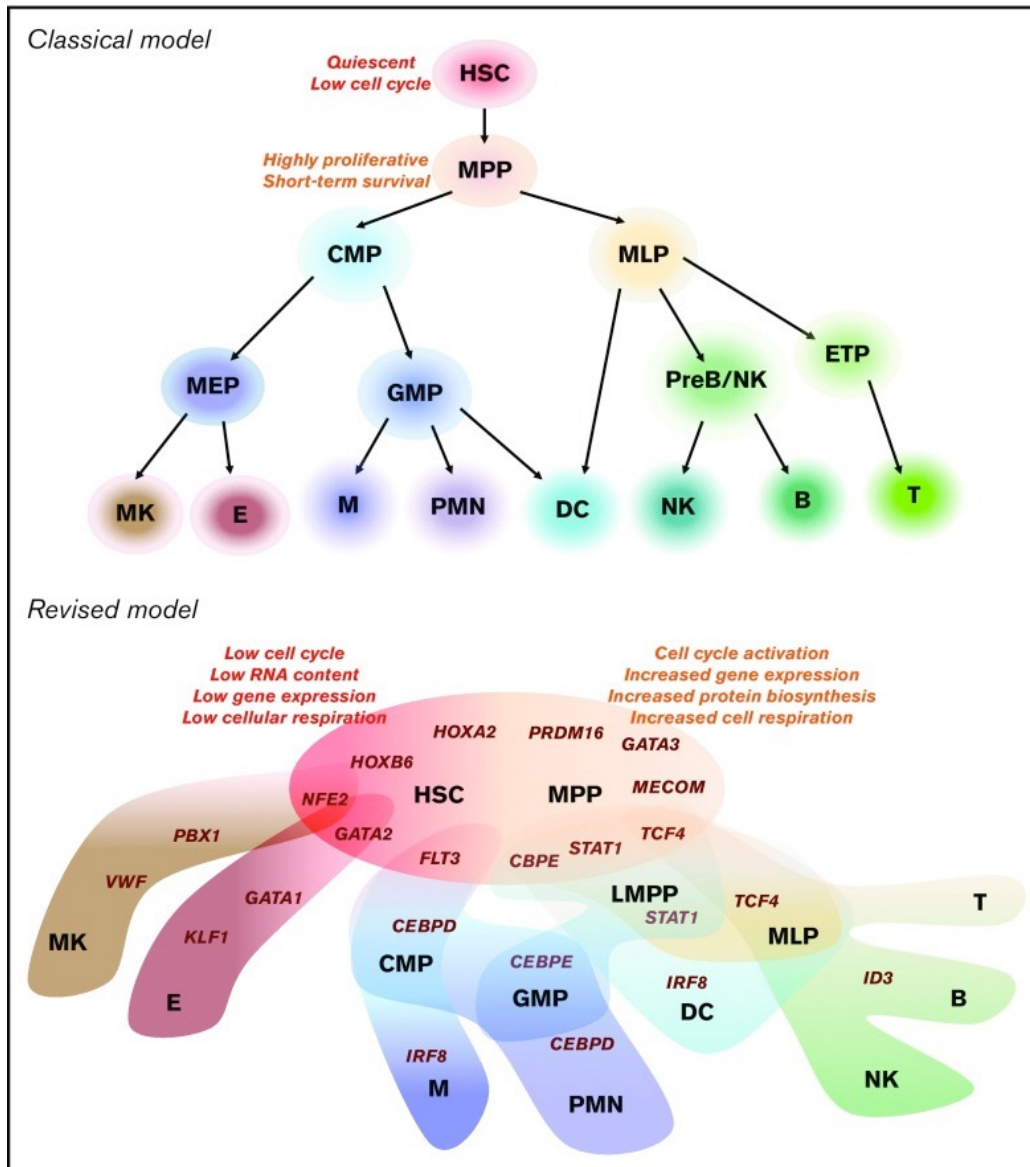
HSB: **H**yperactive **S**leeping **B**eauty = Transposase

Tn: Transposon qui saute d'un endroit à l'autre dans le génome quand HSB est présente

Cette analyse montre que les megacaryocytes sont directement issus des CSH



Vision classique vs révisée de l'hématopoïèse



HSC: Hematopoietic stem cell
MPP: Multipotent hematopoietic progenitors
CMP: Common myeloid progenitor
MLP: Multi-lymphoid progenitor
ETP: Early thymic progenitor
GMP: Granulocyte-macrophage progenitor
MEP: Megakaryocyte/Erythroid progenitor
M: Macrophage
PMN: Polymorphonuclear neutrophils
DC: Dendritic cells

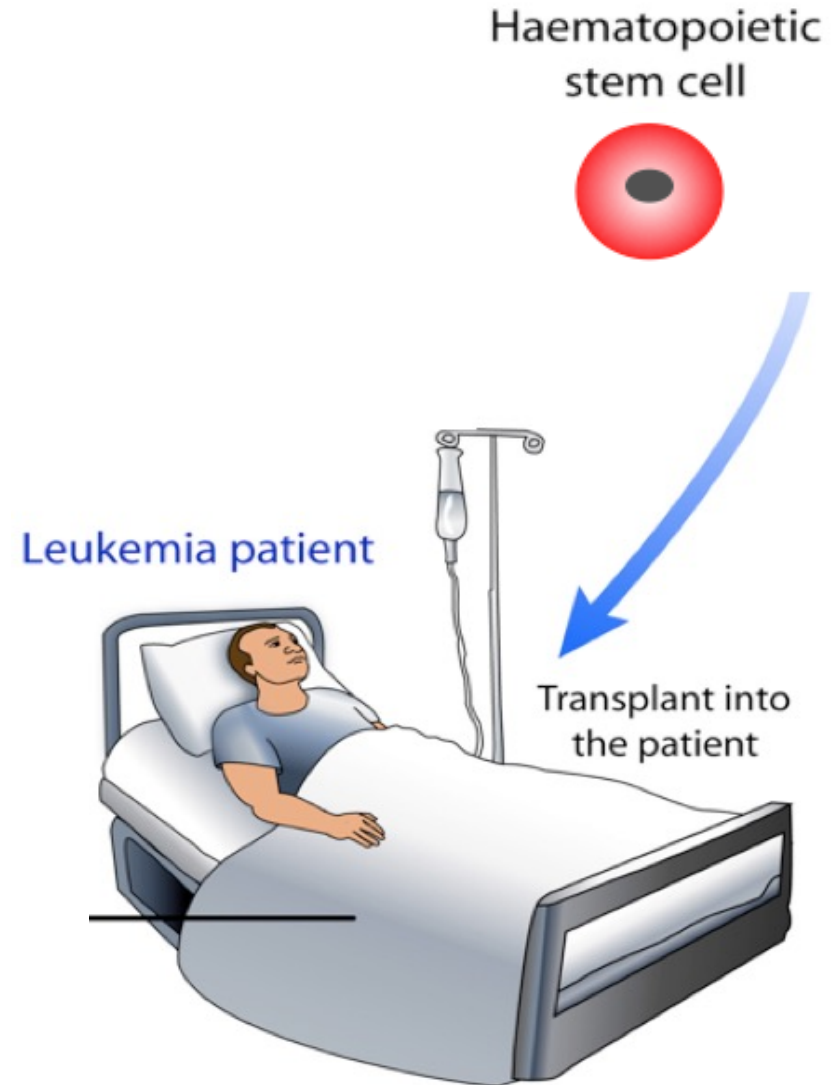
Fin de la 2^{ème} partie

Applications thérapeutiques des CSH

Transplantation de CSH pour traiter la leucémie

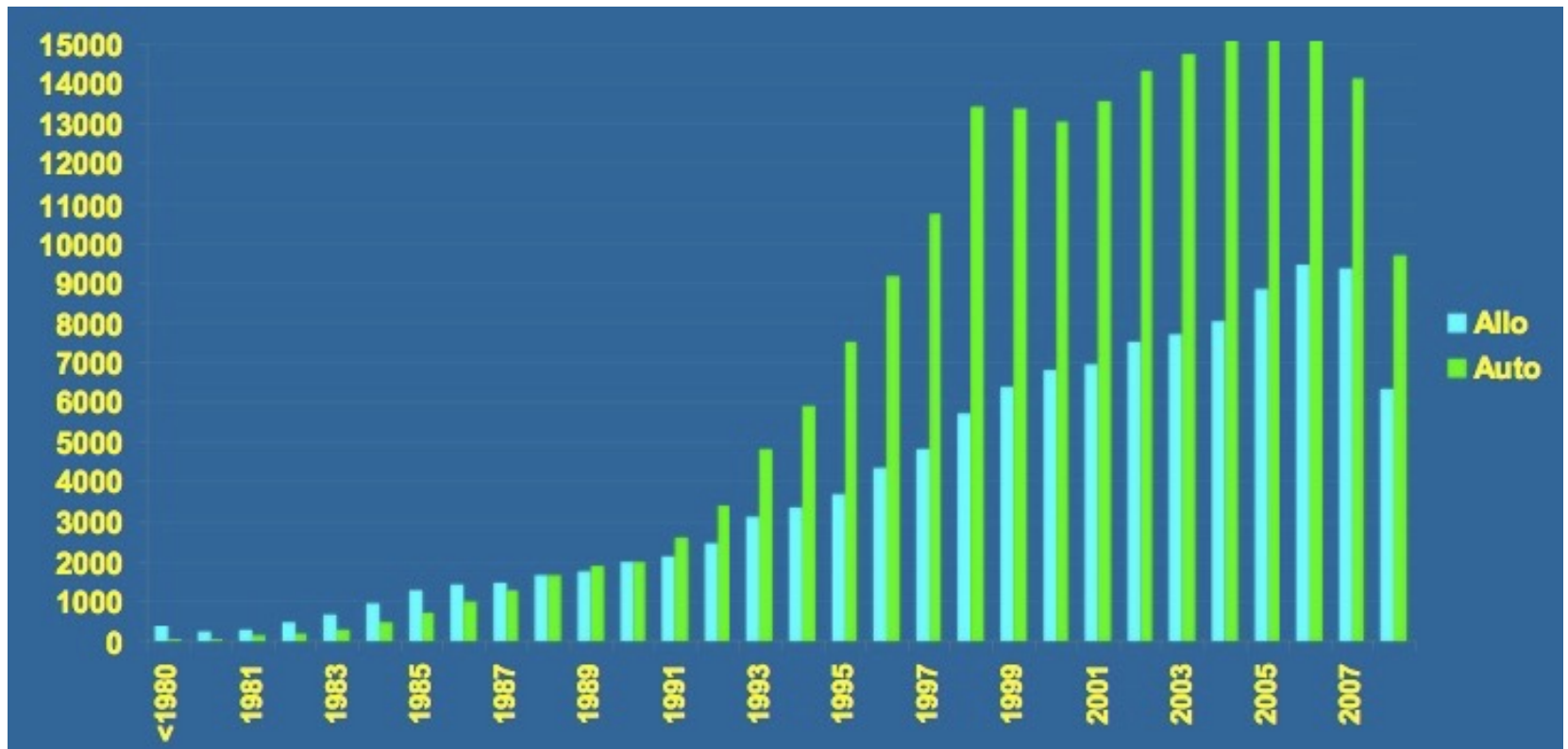


E. Donnall Thomas, Prix Nobel 1990

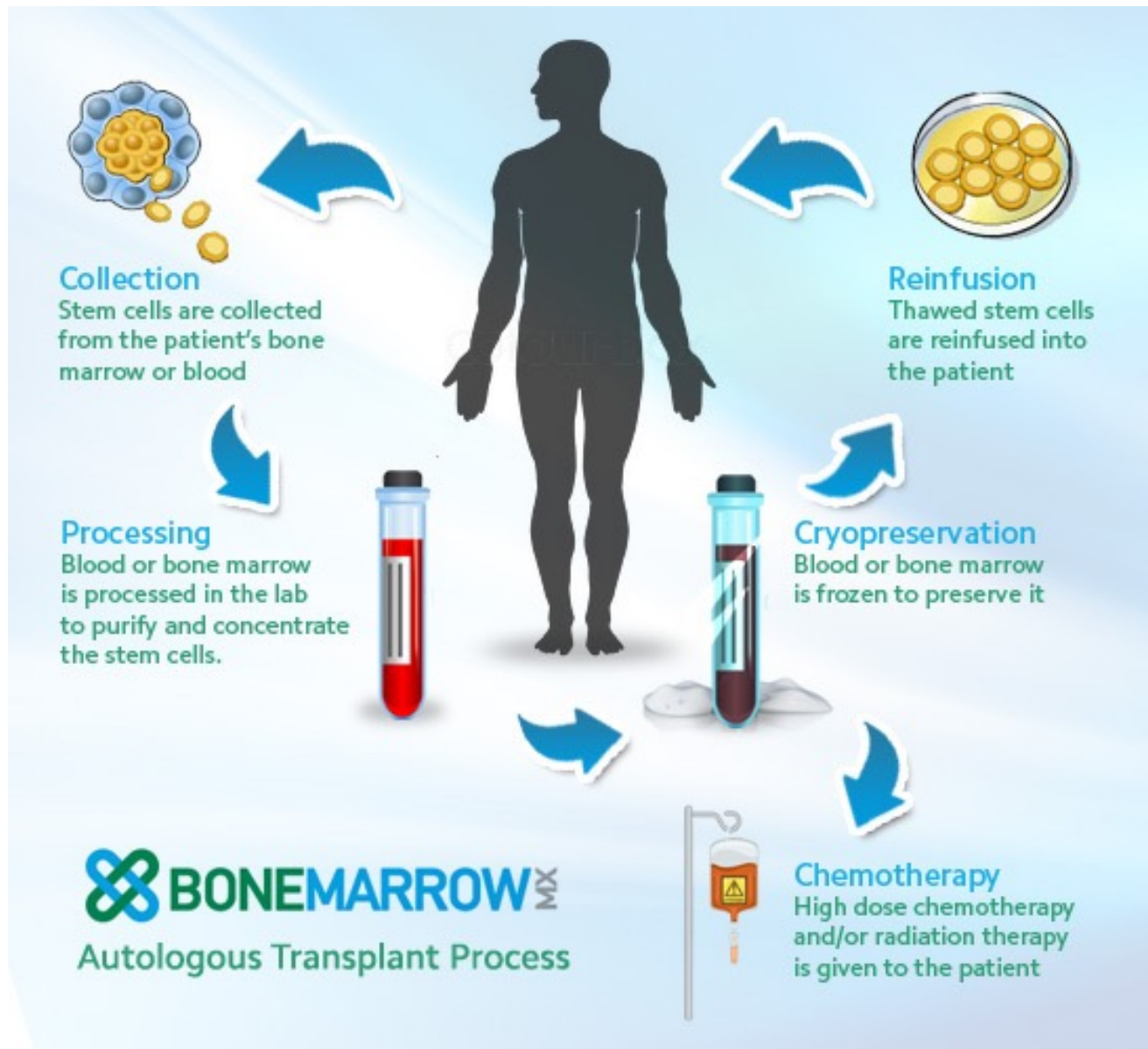


Transplantation de CSH

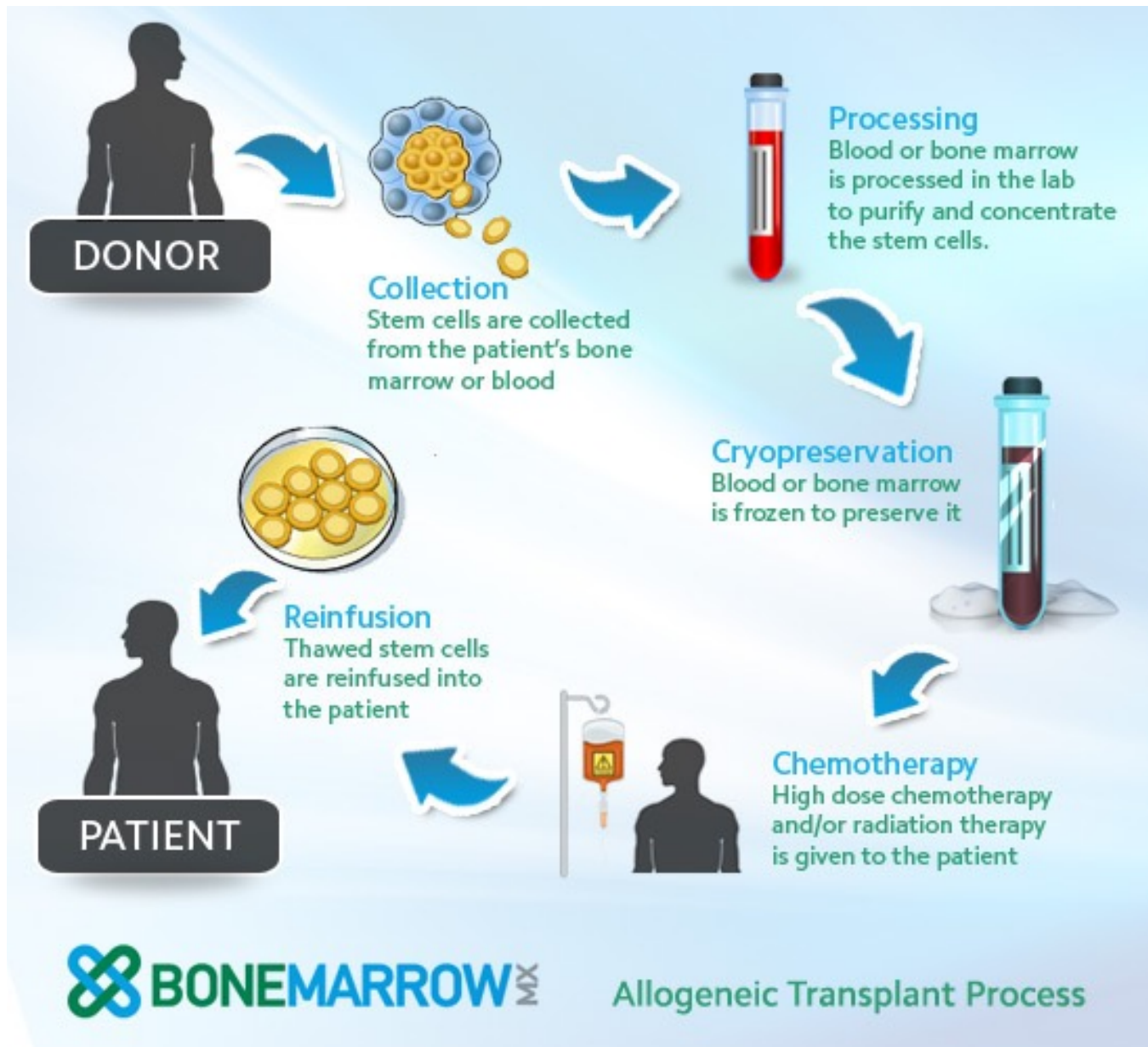
Nombre de transplantations de CSH en Europe:
Aujourd'hui: > 40'000 par année en Europe)



Transplantation autologue de CSH



Transplantation allogénique de CSH



Avantage de la purification de CSH pour applications cliniques

- Transplantation allogénique: évite la maladie aiguë ou chronique du greffon contre l'hôte en éliminant les cellules T immunoréactives de la greffe
- Transplantation autologue: Purification des CSH de patients cancéreux et réintroduction ultérieure après radiothérapie ou chimiothérapie → peu de risque de restitution des cellules cancéreuses au patient !

Autres applications cliniques de la transplantation de CSH

1. Traiter les effets toxiques d'une chimiothérapie à forte dose + / - radiothérapie lors d'un traitement de cancer (autologue ou allogénique)
2. Corriger un trouble sanguin grave congénital ou acquis en remplaçant le système hématopoïétique du patient par celui du donneur (allogénique)
3. Augmenter le contrôle d'une maladie maligne par des mécanismes effecteurs allo-immuns de la réaction du greffon contre l'hôte (allogénique)
4. Réinitialiser le système immunitaire pour abolir l'auto-immunité (autologue ou allogénique)

Transplantation de CSH: Donneurs et Compatibilité

- Human Leukocyte Antigen (HLA, = MHC humain) (A, B, C, DR, DQ)
- 1^{er} choix: famille → 25% de chances de compatibilité
- 2^{ème} choix: donneurs enregistrés (5 millions de personnes) → 40% de chances de compatibilité
- Sources de CSH:
 - Sang après traitement avec la cytokine G-CSF pour recruter des CSH
 - Aspiration de moëlle osseuse
 - Sang du cordon ombilical

Que se passe t'il après la greffe ?

- 2-3 semaines pour que la greffe prenne
- Reconstitution des globules rouges, plaquettes et cellules de l'immunité innée (1 mois)
- Immunité des lymphocytes B (1-2 ans)
- Immunité des lymphocytes T (jusqu'à 5 ans)

→ Risque prolongé d'infection aux virus et champignons

Complications de la greffe de CSH

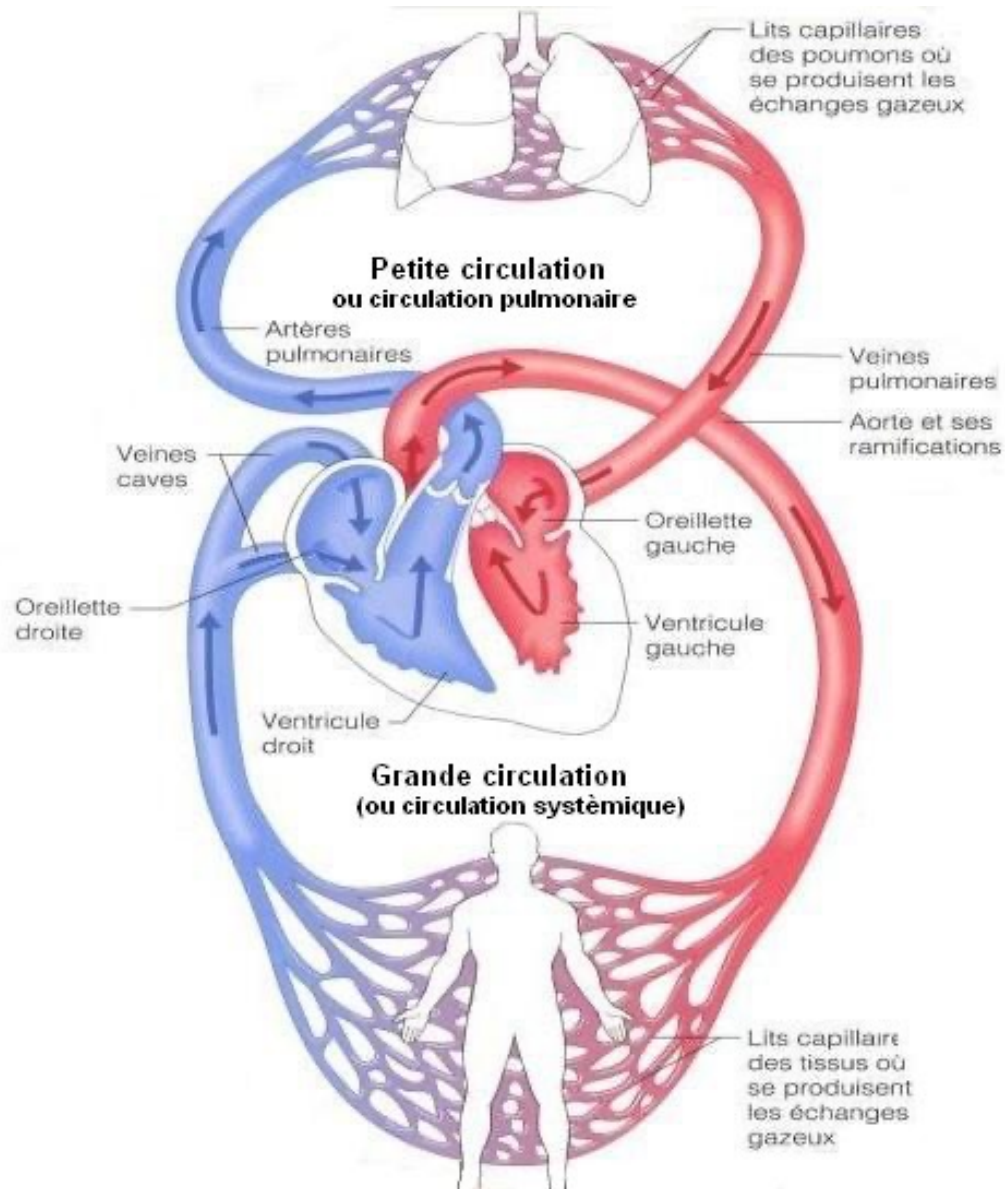
- Echech de la greffe/rejet
- **Attaque de l'hôte par la greffe: 20-50% des cas**
→ Maladie inflammatoire initiée par les lymphocytes T du donneur qui reconnaissent le patient comme étranger. Corrèle avec le mismatch HLA.

Peut être bénéfique aussi: Greffe contre la leucémie: les lymphocytes T du donneur attaquent les cellules cancéreuses résiduelles

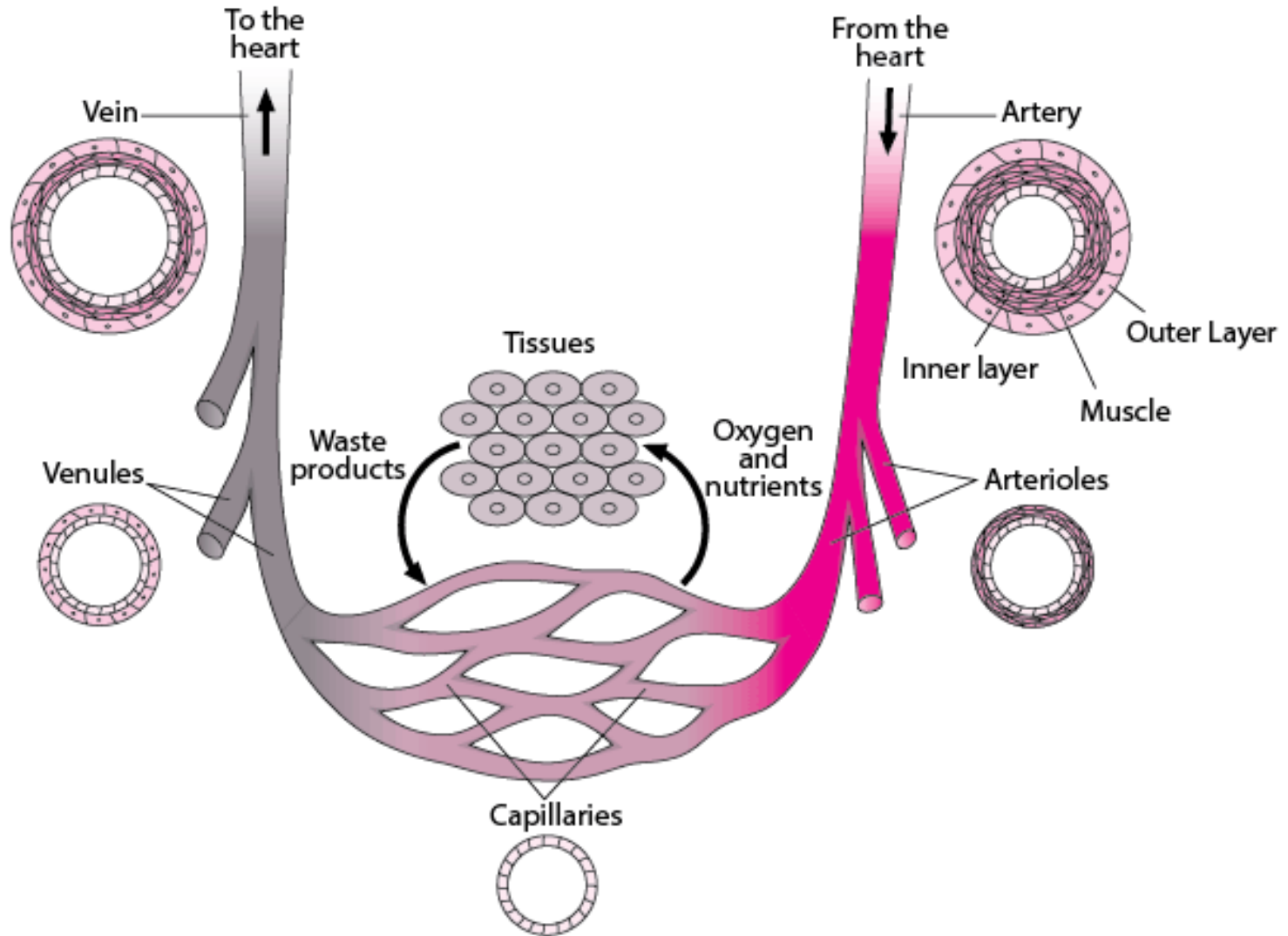
- Infections causées par l'immunosuppression

Circulation sanguine et hémostasie

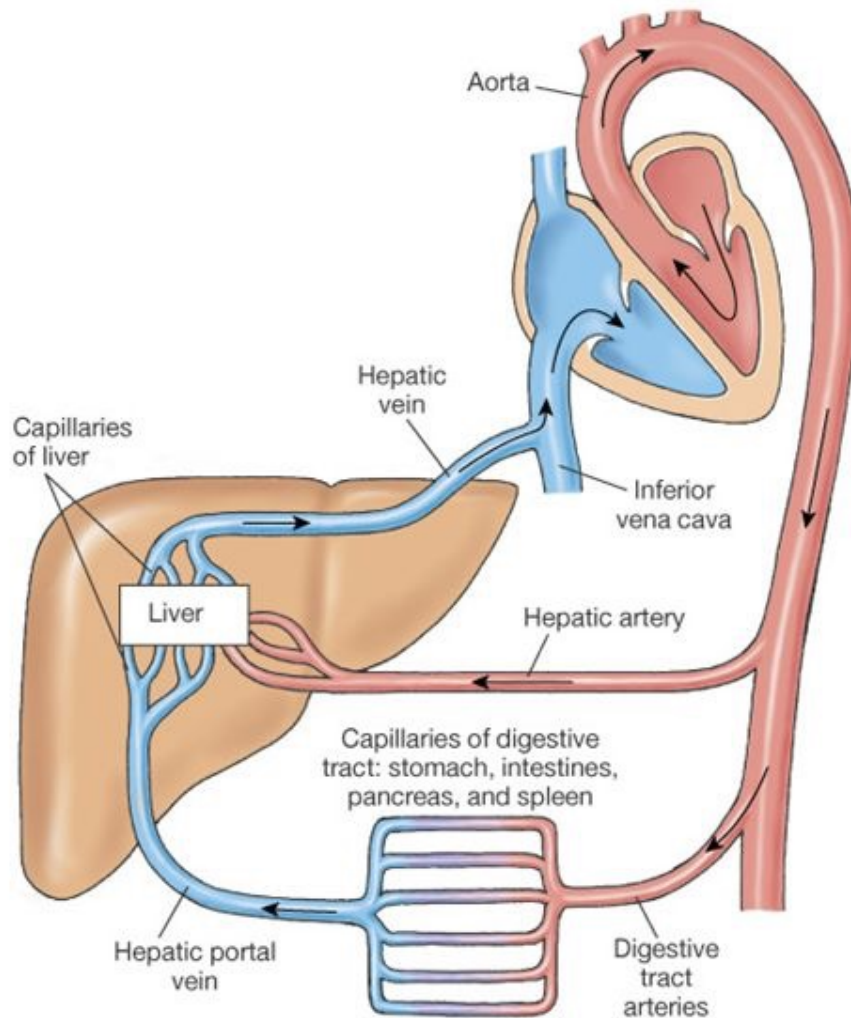
Circulation sanguine



Types de vaisseaux sanguins



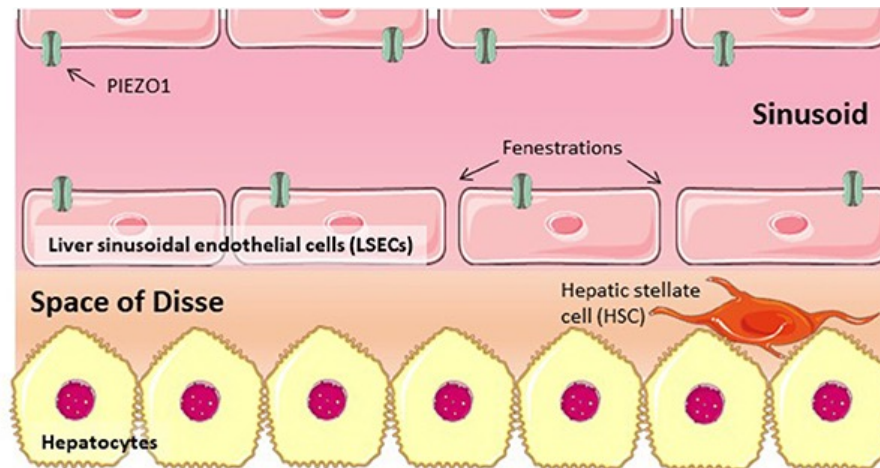
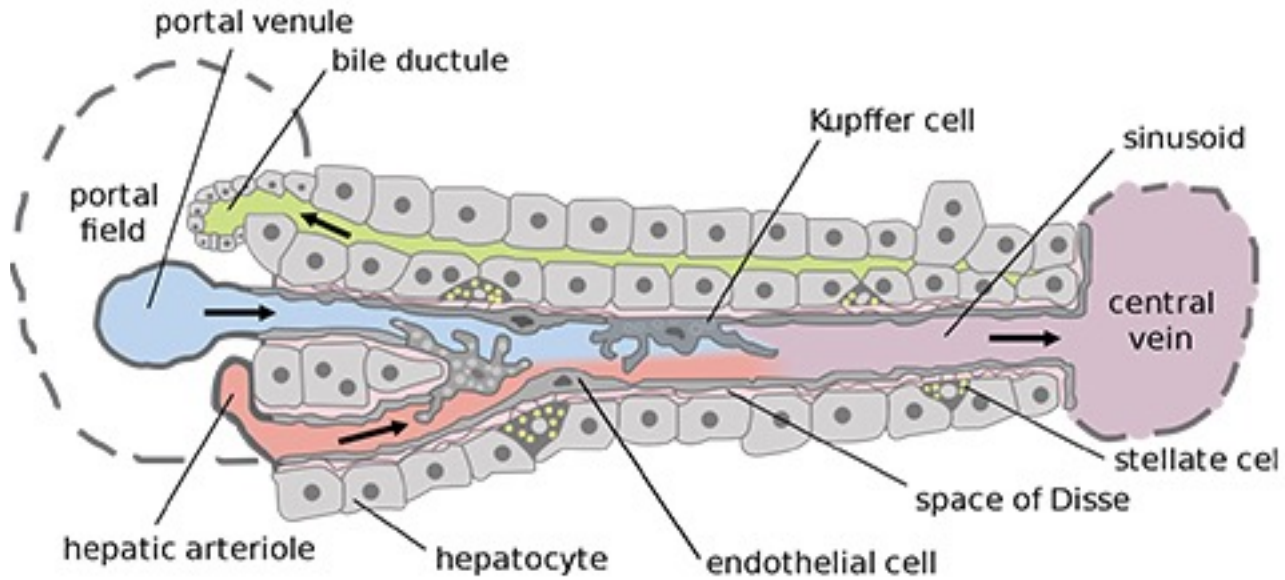
Le foie



- Reçoit le sang des intestins puis le remet en circulation
- Rôle majeur dans le métabolisme des lipides et des glucides

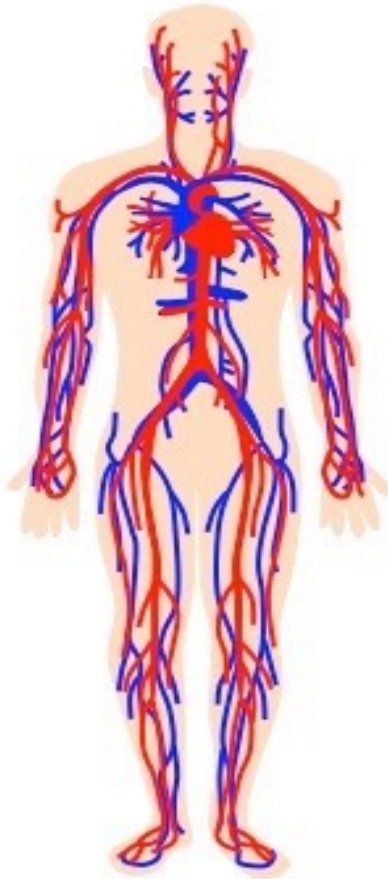
Figure 21-19: The hepatic portal system

Détails de la circulation du foie

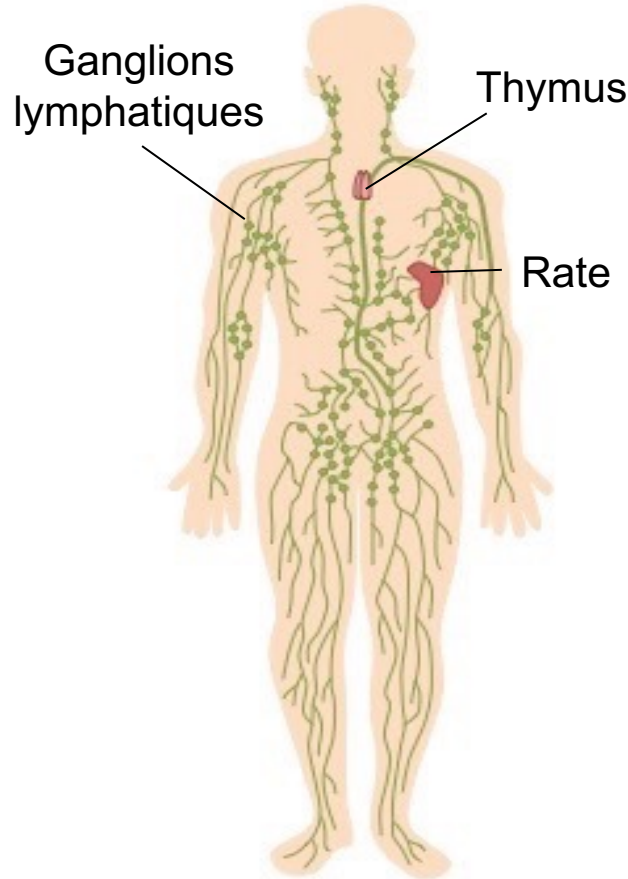


Systeme lymphatique

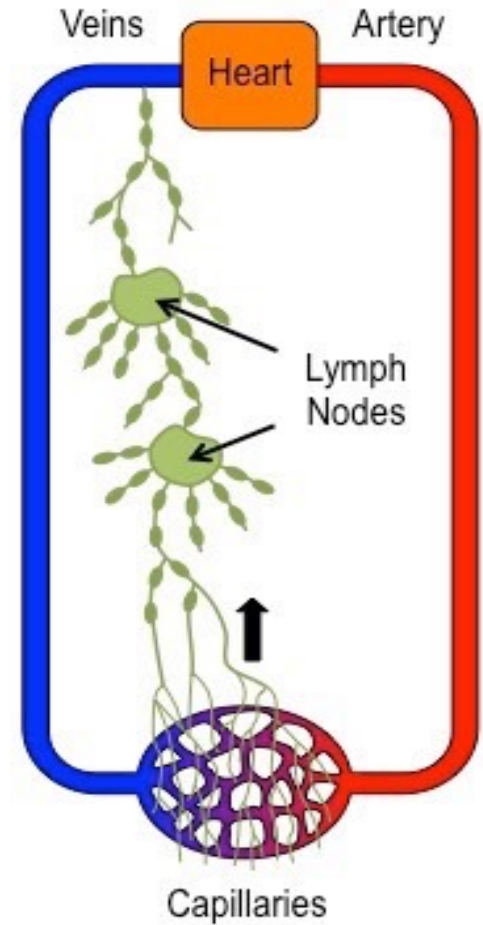
Circulatory System



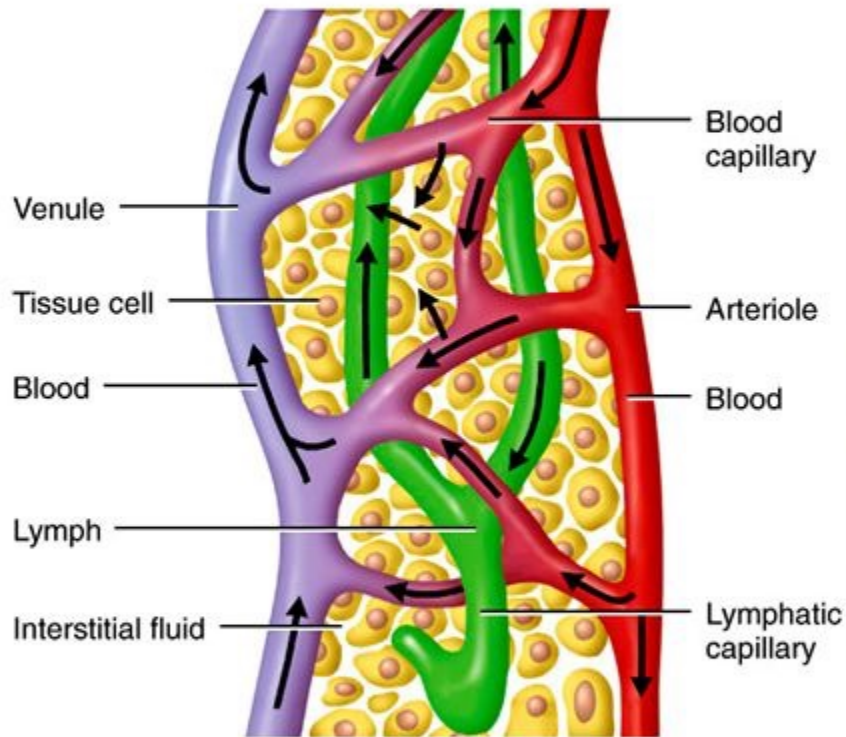
Lymphatic System



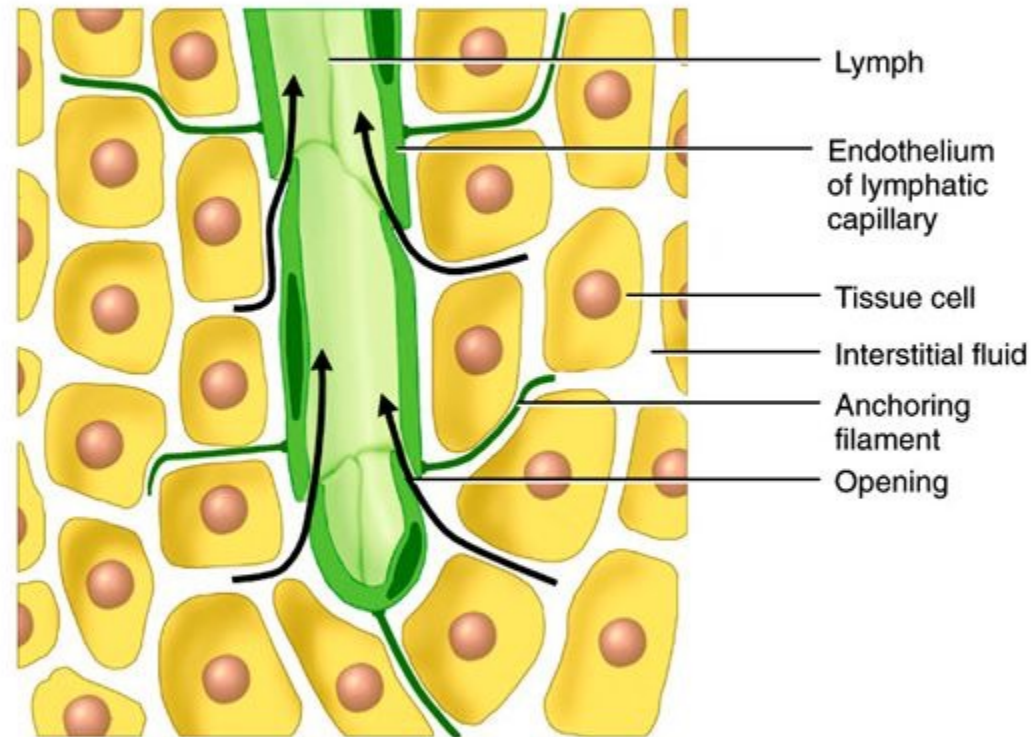
Inter-relationship between systems



Collection de fluide extracellulaire par la circulation lymphatique



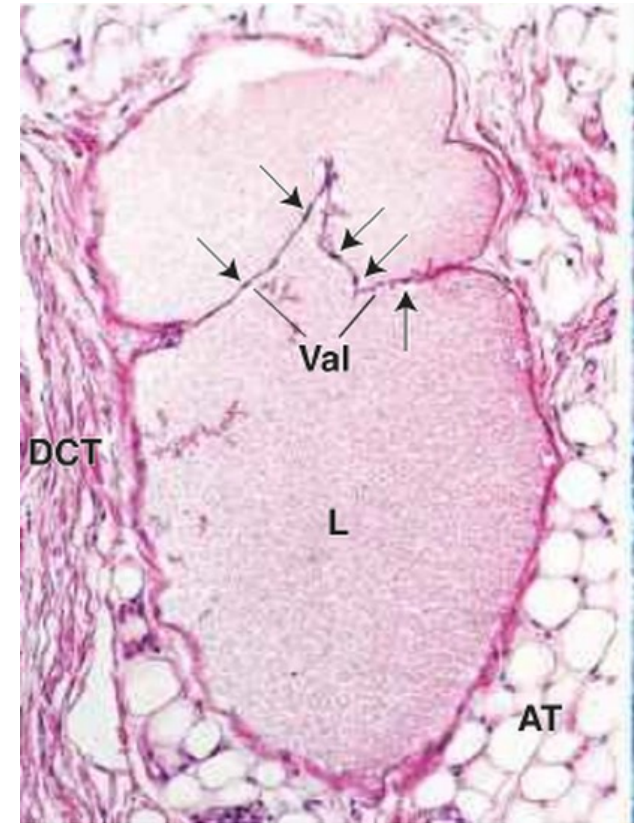
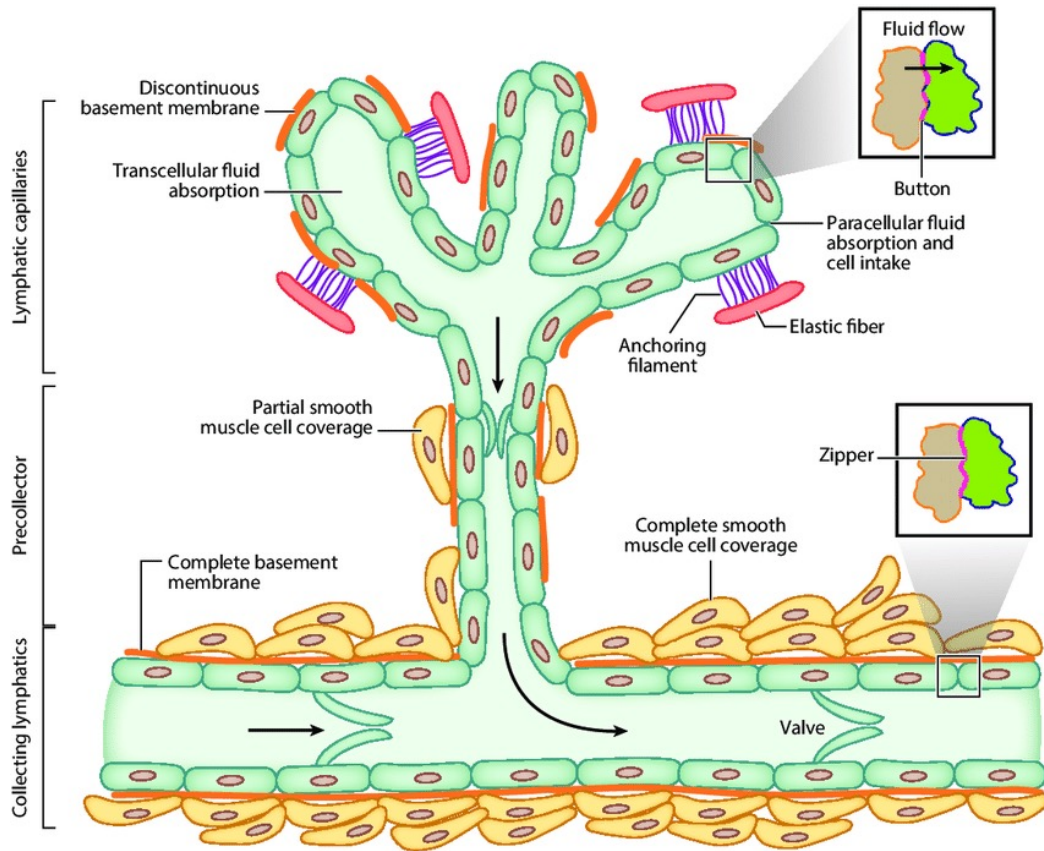
(a) Relationship of lymphatic capillaries to tissue cells and blood capillaries



(b) Details of a lymphatic capillary

Figure 16.02 Tortora - PHA 11/e
Copyright © John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

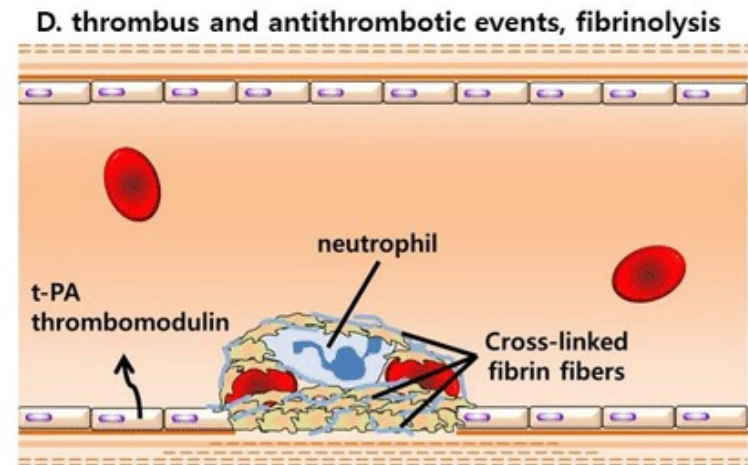
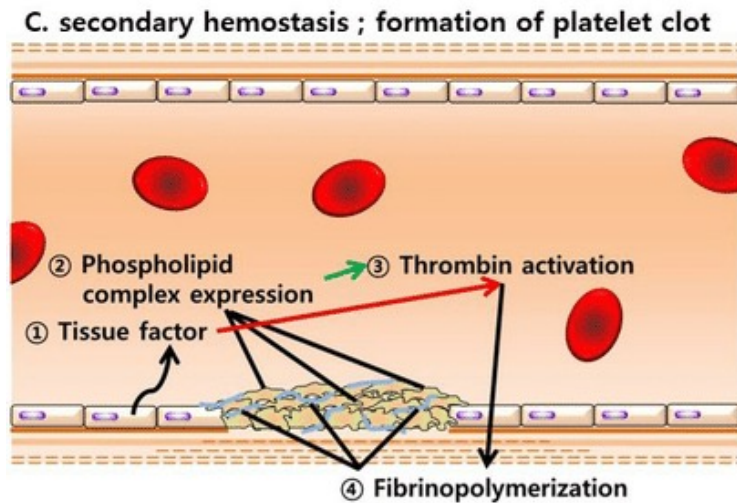
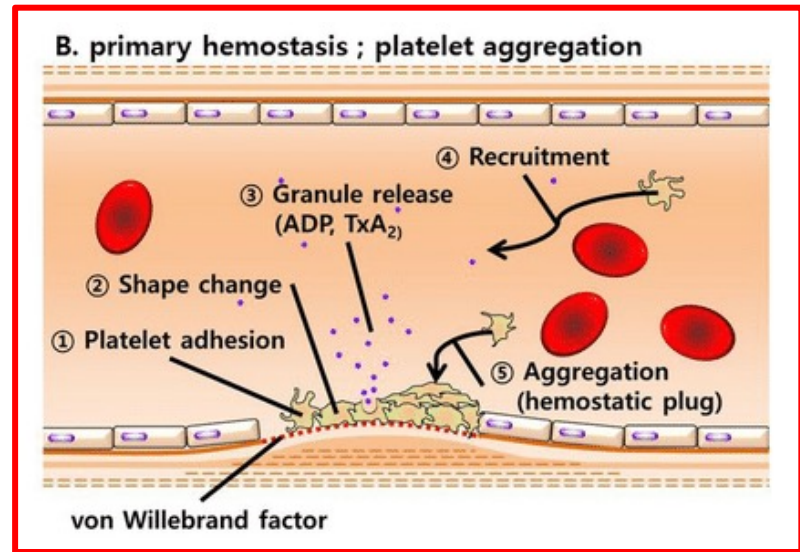
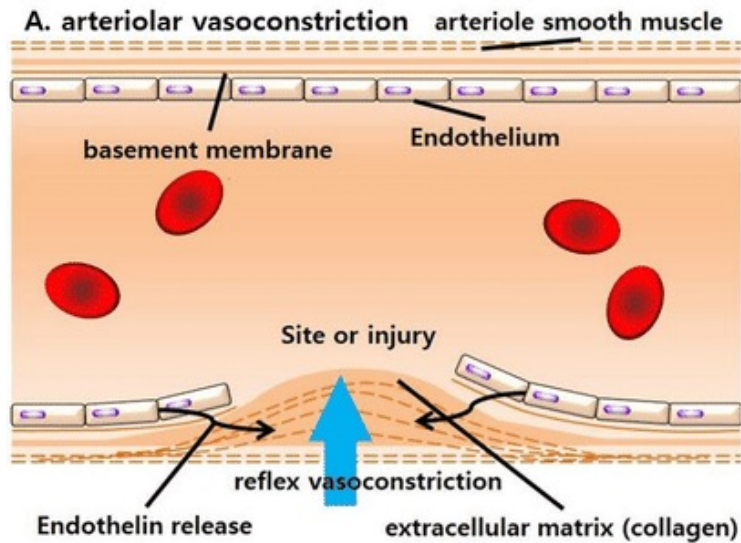
Pas de pompe, mais des valves dans les grands vaisseaux lymphatiques



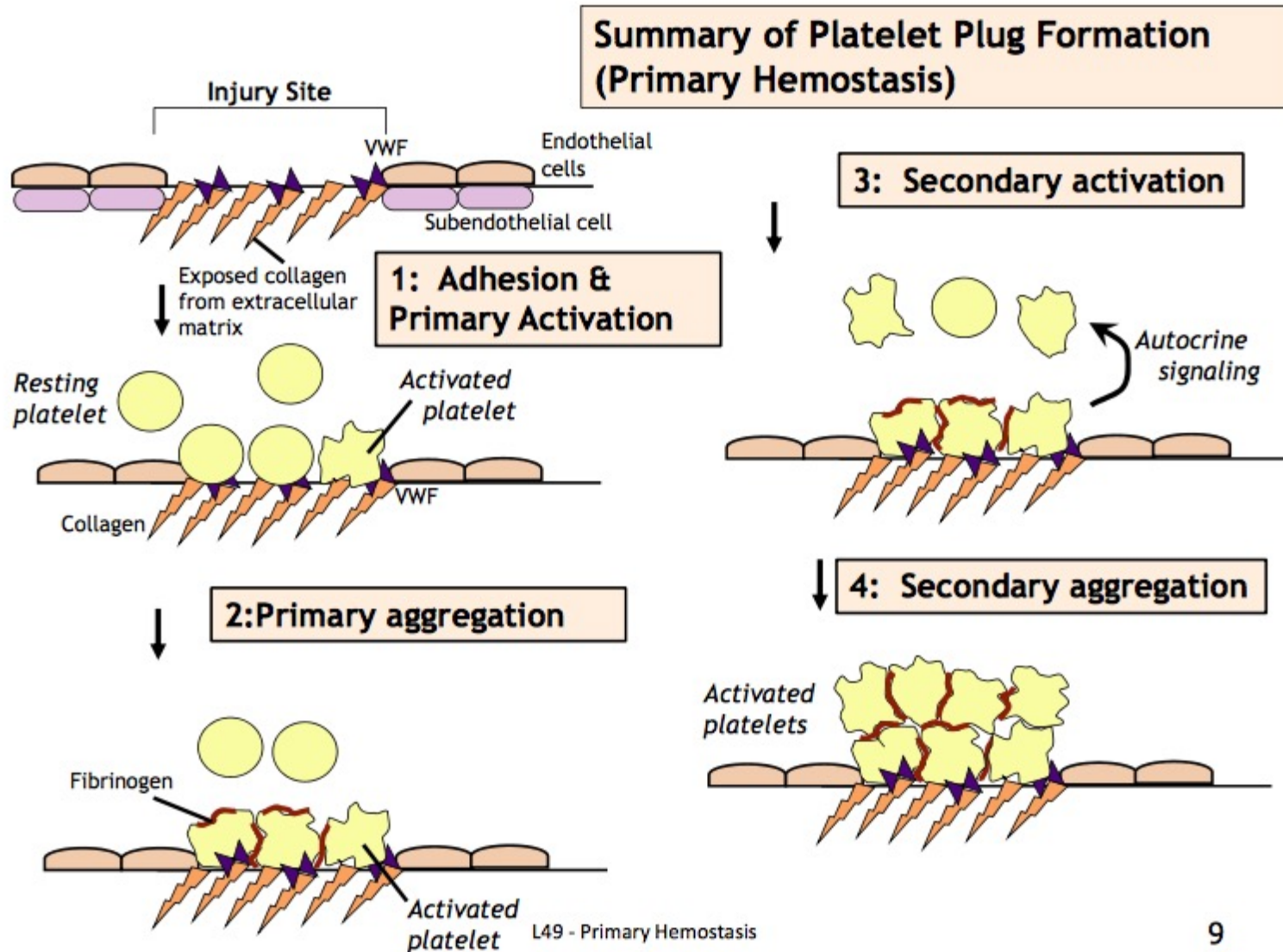
Jiang et al., Ann. Rev. In Phys. 2018

<https://cardiovascularsystemud.weebly.com/the-histology.html>

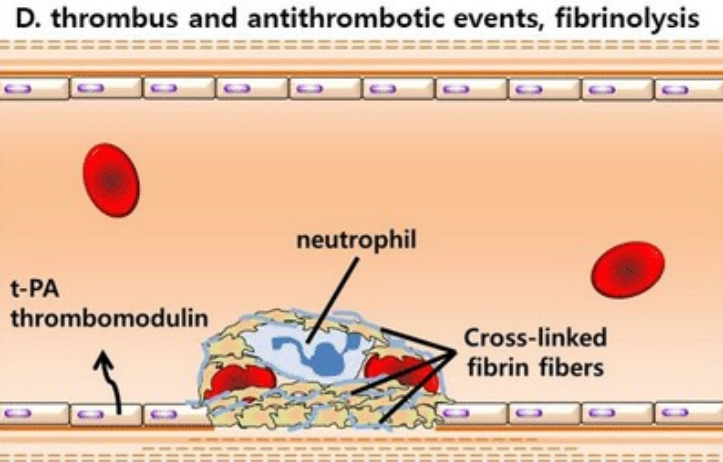
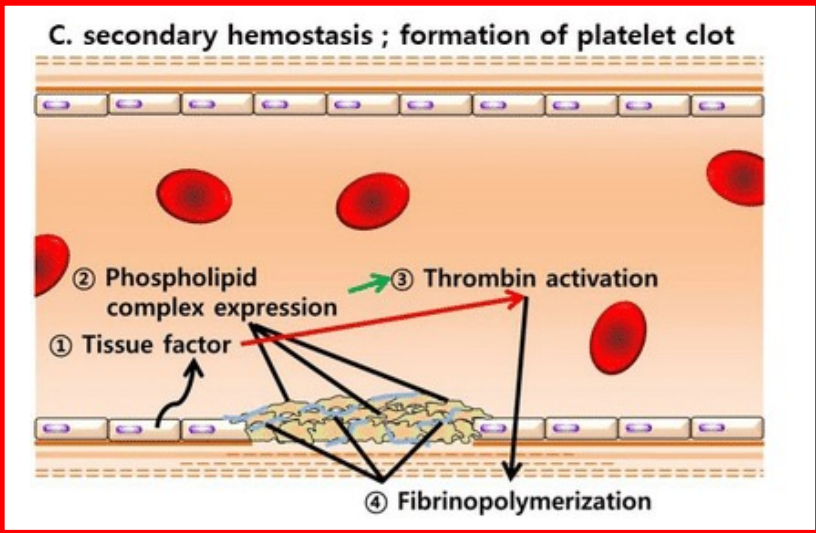
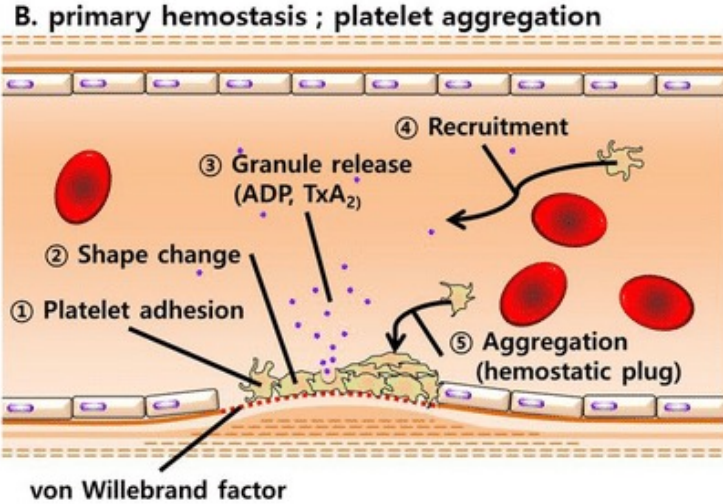
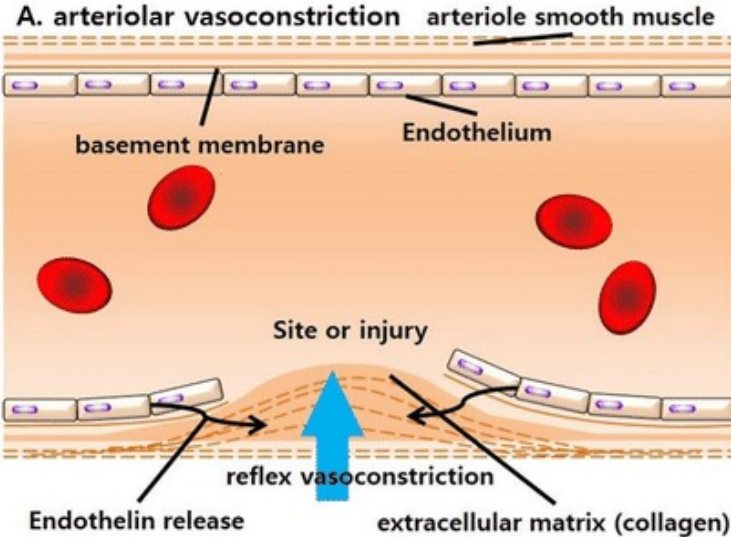
Formation d'un caillot sanguin - hémostasie



Formation d'un bouchon plaquettaire



Formation d'un caillot sanguin - hémostasie



Cascade de coagulation

- Implique 12 (I-XII) protéines circulantes appelées **facteurs de coagulation**, qui vont générer une **cascade protéolytique** pour aboutir à la **polymérisation de fibrine**
- Le plus souvent initiée par le Facteur VII qui quitte la circulation sanguine lors d'une lésion, et entre en contact avec le « Tissue Factor » qui est exprimé sur les fibroblastes et les leucocytes.
- Formation d'un complexe activé et début de la cascade de coagulation

Autre initiation possible: conversion de facteur XII en facteur XIIa.

Cascade de coagulation

