

Hématopoïèse et vieillissement

Pascal CHAIBI

Service de Médecine Interne – Gériatrie du Professeur Piette

Hopital Charles Foix

Ivry sur Seine



Hématopoïèse normale (1)

Cellules sanguines Très différenciées

Pas capacité de division cellulaire

Peu de capacité de synthèse protéique

Mais en nombre constant

Durée de vie limitée

Polynucléaires neutrophiles quelques heures

Plaquettes quelques jours (6 à 8)

Globules rouges 3 mois

**Phénomène de renouvellement des cellules sanguines =
hématopoïèse**

Hématopoïèse et vieillissement

Hématopoïèse normale (2)

Hématopoïèse remplacement continu et régulé des cellules sanguines

Continu : processus fonctionnel de la vie intra-utérine à la mort

Régulé : doit assurer l'homéostasie à l'état de base

Adaptation et réactivité du système aux situations pathologiques, aux stress

Identification des phénomènes de régulation

Hématopoïèse normale (3)

Volumes de production hématopoïèse (situation de base)

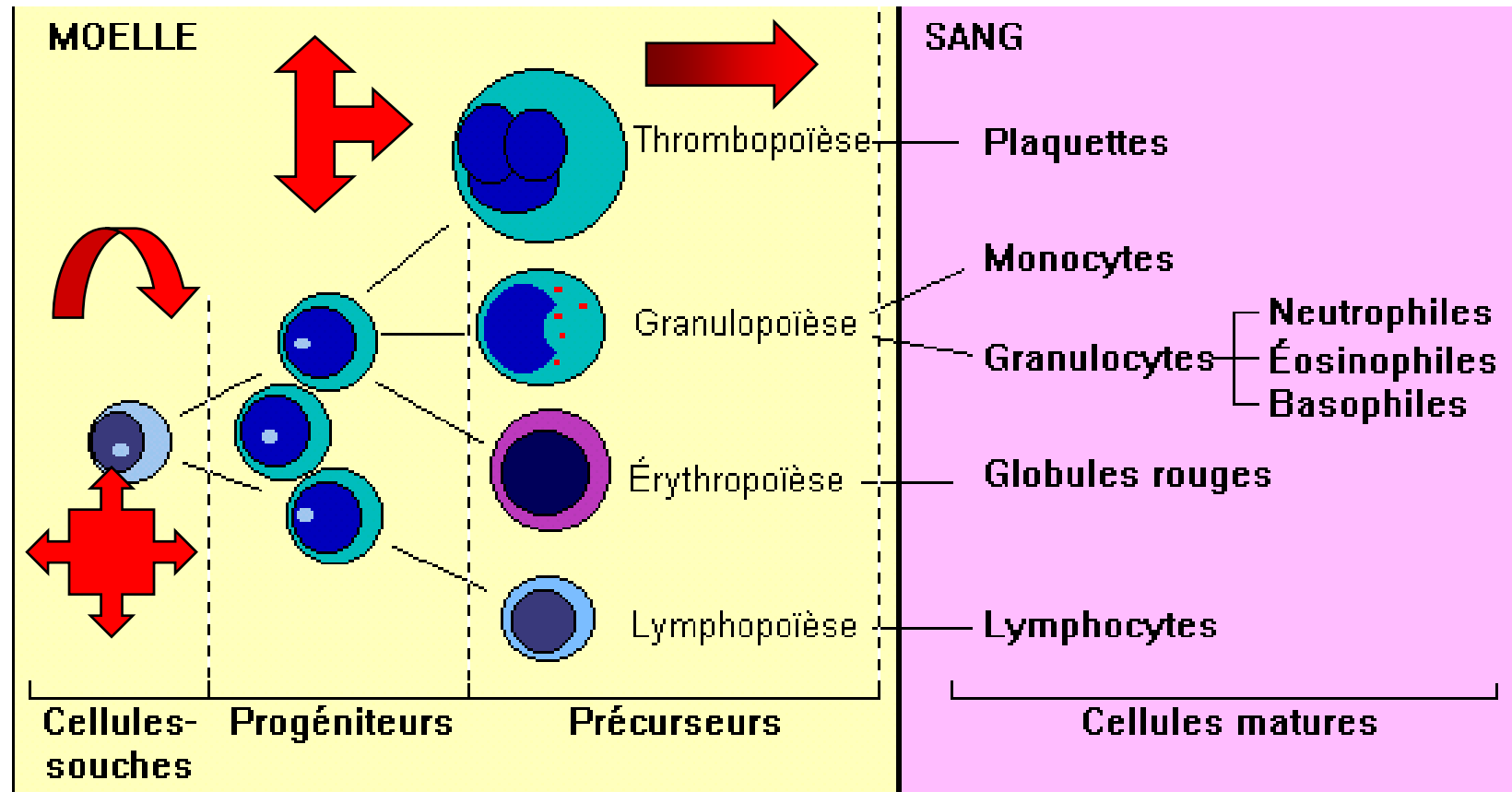
10^{13} cellules/ jour

2 millions de globules rouges par seconde

Usine de production : cellules souches hématopoïétiques

Moelle osseuse : se met en place 4^o au 6^o mois vie foetale
dans tous les os jusqu'à 5 ans
puis os courts et plats (sternum, côtes, vertèbres et os iliaques)

Les compartiments de l'hématopoïèse

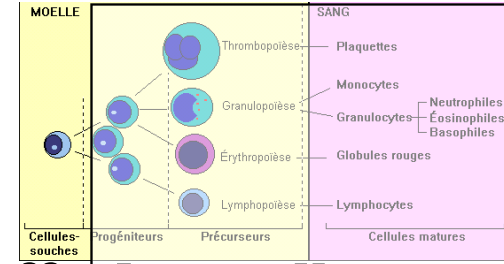


Renouvellement
Totipotence

Engagement
Prolifération

Différenciation
Maturation

Les cellules souches hématopoïétiques



Auto - renouvellement : pérennité activité médullaire; greffe de moelle

Totipotence : peuvent donner toutes les lignées hématopoïétiques

Cultures in vitro difficiles : milieu liquide, > 1 mois

Cellules qui donnent en culture à long terme des colonies où sont présentes toutes les lignées myéloïde et lymphoïde

CFU-S chez la souris; CFU-bl chez l'homme

Localisées dans la moelle osseuse mais peuvent passer transitoirement dans le sang (mobilisation par chimiothérapie)

Ne représentent que 0,01 à 0,05 % des cellules médullaires

Pas de caractéristiques morphologiques particulières

Possèdent des marqueurs antigéniques de surface : immunophénotype

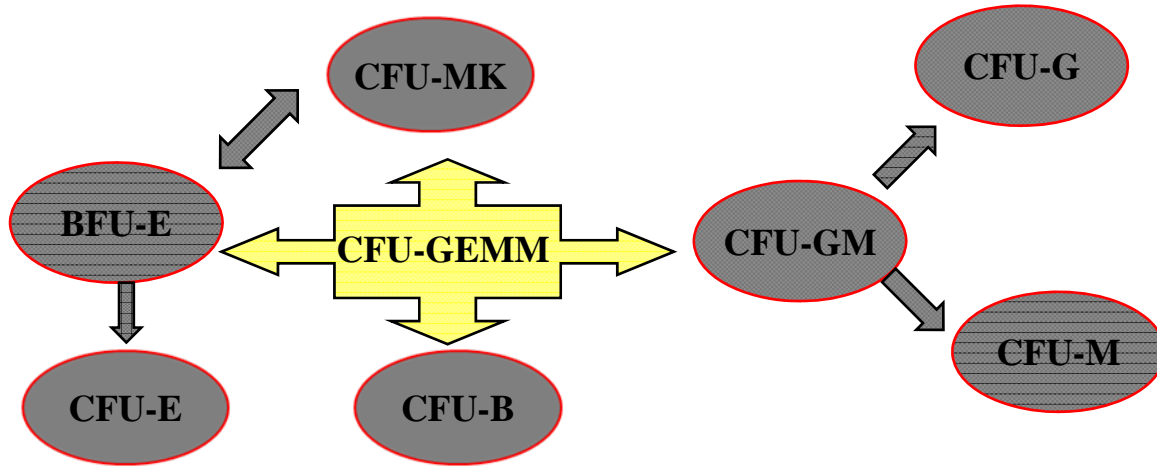
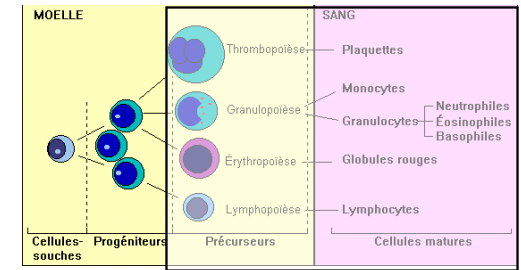
CD 34 + CD 33 – HLA-DR faible

Les progéniteurs hématopoïétiques

Perte de la capacité d'autorenouvellement

Capacité importante de **prolifération**

Différentiation : engagement progressif et irréversible dans une lignée



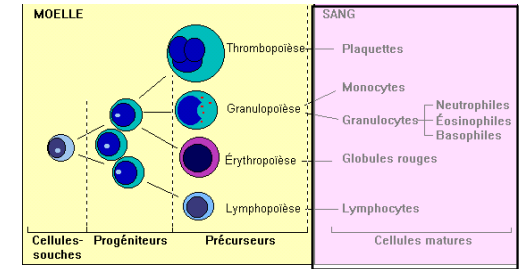
Non identifiables par cytologie

Représentent seulement 0,1 % des cellules médullaires

Possèdent des marqueurs antigéniques de surface : immunophénotype

CD 34 + CD 33 + HLA-DR +

Les précurseurs médullaires



Précurseurs Identifiables en cytologie

Pas autorenouvellement, engagés de manière irréversible dans une lignée

Étape de **prolifération** : du précurseur à la cellule mature, 3 à 5 mitoses

Dernière étape hématopoïèse : phase de **maturation**

Modifications spécifiques

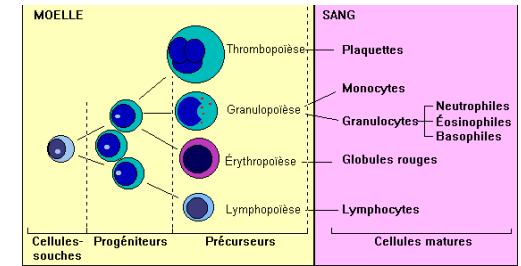
polylobulation noyaux myéloblastes

granulations cytoplasmiques

hémogloblinisation cytoplasme

antigènes membranaires caractéristiques

Les cellules sanguines matures



Assurent des fonctions essentielles à l'organisme

Oxygénation tissulaire

Lutte anti-infectieuse

Protection endothéliale et anti-hémorragique

Matures et fonctionnelles lors de leur passage sanguin

Pool de réserve médullaire pour réactivité rapide de la moelle en cas d'événement aigu (polynucléaires neutrophiles)

Différenciation post-médullaire seulement pour les monocytes (acquisition propriétés et phénotype macrophagiques lors de leur passage tissulaire)

CSF de promotion : le facteur Steel

**Hypothèse d'un CSF actif aux temps précoces de l'hématopoïèse
sur la cellule souche primitive
stimulant sa survie et son autorenouveaulement**

Facteur Steel **isolé dans des modèles murins**
synthétisé par le stroma médullaire
diffusible et lié aux membranes

Animaux mutants pour gène F Steel : tableau aplasie médullaire

Equivalent humain : SCF (stem cell factor)

Par ailleurs action de **synergie avec autres CSF (EPO +++)**
différenciation mastocytaire

Facteurs de croissance hématopoïétique multipotents

CSF actifs sur les cellules souches et les progéniteurs

Favorisent la survie et la différenciation

Interleukine-3 **synthèse extra médullaire (lymphocytes T, mastocytes et cellules gliales)**

induit une prolifération des progéniteurs

favorise une différenciation de toutes les lignées (sauf érythroblastique)

GM-CSF **synthèse par les monocytes, les fibroblastes**
synthèse par les lymphocytes T et les cellules endothéliales (après activation par IL-1)
active prolifération CFU-GEMM

Facteurs de croissance hématopoïétique restreints

CSF spécifiques d'une lignée progéniteurs engagés; précurseurs

Applications thérapeutiques + + +

**Erythropoïétine (EPO) synthèse par rein (hypoxie); la moelle osseuse
action tardive différenciation érythroblastique
indispensable in vitro pousse érythroblastique**

**G-CSF synthèse par les fibroblastes, les monocytes et les cellules épithéliales
différenciation et activation de la lignée granuleuse**

Thrombopoïétine (TPO) action différenciation mégacaryocytaire

Interleukine-5 synthèse par les lymphocytes T; différenciation éosinophiles

M-CSF action sur la lignée monocyttaire

peu différenciant; favorise la survie et l'activation des monocytes

synthèse par les fibroblastes; les monocytes (régulation autocrine)

catabolisé par les monocytes/macrophages (auto régulation terminale)

Régulation de l'hématopoïèse normale

Micro-environnement médullaire

Constitué par

- * les cellules du stroma médullaire** Fibroblastes, cellules endothéliales
Cellules épithéliales, macrophages
Adipocytes, cellules dendritiques
- * Matrice extracellulaire** Collagène I et III
Protéoglycanes

Rôle dans l'hématopoïèse illustré par

- * Aplasie médullaire dans déficit murin en facteur Steel (stromal)**
- * Organisation spontanée des cultures de moelle hématopoïétique à long terme**
 - Couche stromale profonde**
 - Couche adhérente au stroma (cellules souches)**
 - Phase libre : progéniteurs engagés; précuseurs**

Micro-environnement médullaire

Coopération intercellulaire pour phénotype tissulaire

Sécrétion des CSF (sauf IL-3)

Faible à l'état de base

Inductible (IL-1, TNF, endotoxine) (adaptation hématopoïèse)

Régulation paracrine

Facteurs membranaires probables (interactions cellules-cellules)

Sécrétion molécules inhibitrices TNF β , TGF β , IL – 10, P-sélectine

Rôle de la matrice extracellulaire

Réseau de soutien tissulaire, mais pas seulement

Homing médullaire des cellules hématopoïétiques (interaction antigènes matrice molécules d'adhésion)

Activation ? Concentration des CSF (protéoglycanes)

Régulation de l'hématopoïèse normale: Autres facteurs

Facteurs vitaminiques nécessaires synthèse ADN (B12, folates)

Facteurs hormonaux implications connues surtout dans érythropoïèse (facilité étude)

Insuline, IGF1 et IGF2

Potentialisation de l'EPO

Hormone de croissance(GH) Erythropoïèse

Dexaméthasone, cortisone

Stimulation formation colonies érythroïdes

Potentialisation G et M

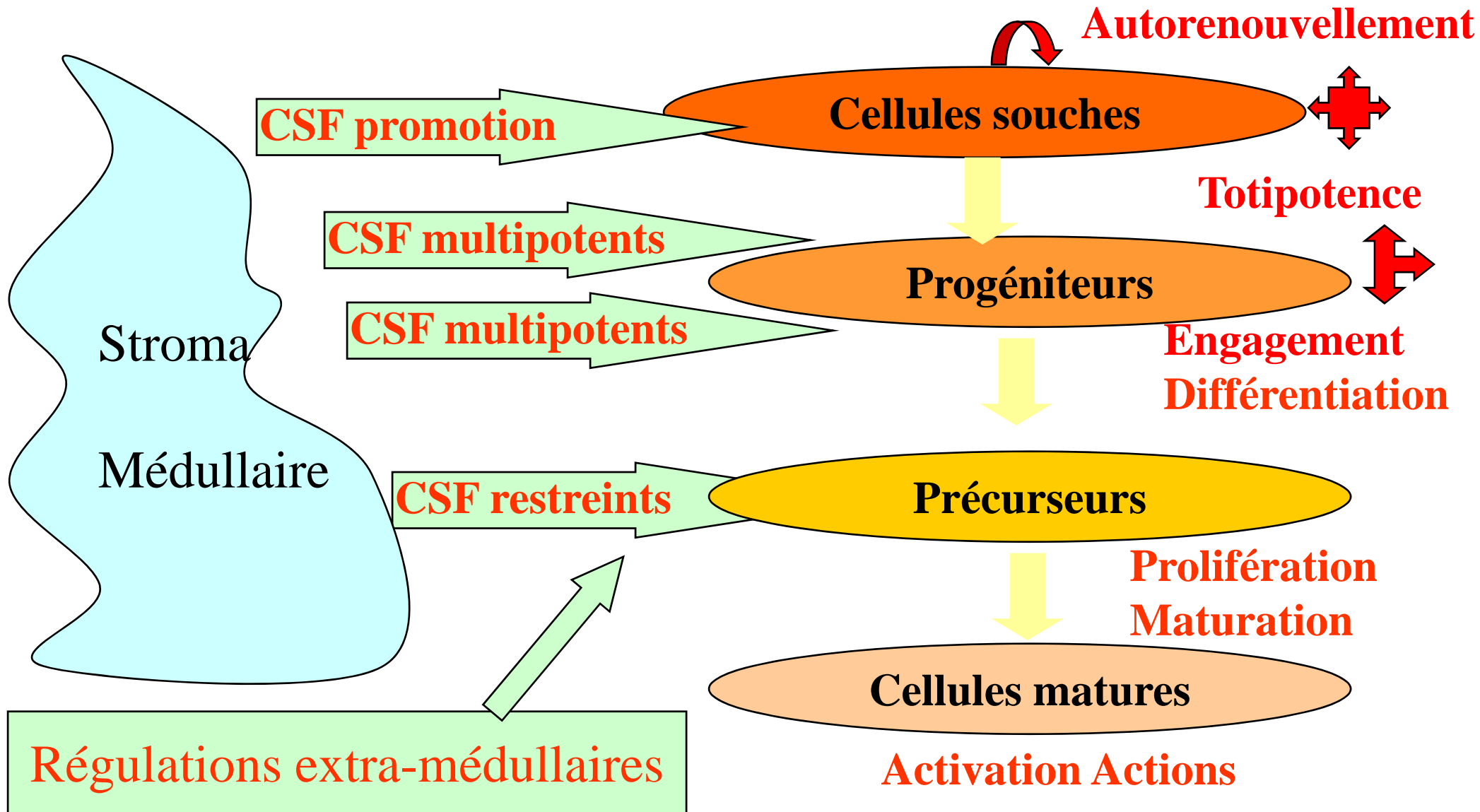
Hormones thyroïdiennes

Potentialisation érythropoïèse

Androgènes

CFU-S : mise en cycle

Schéma général de l'hématopoïèse normale



Modifications de l'hématopoïèse au cours du vieillissement

Hématopoïèse et vieillissement : constatations cliniques (1)

A l'état de base

Pas d'anémie de la sénescence

Renouvellement érythrocytaire plus rapide ?

Proportion de Low Density Erythrocytes plus élevée

Taux de réticulocytes x 2 (tout en restant < 100 000)

Pas de diminution populations leucocytaires

Pas de modification majeure des fonctions des polynucléaires neutrophiles

Adhérence, chimiotactisme

Phagocytose, bactéricidie

Réponse CSF

Hématopoïèse et vieillissement : constatations cliniques (2)

Situations de « stress hématologique »

Neutropénie lors infections graves

Toxicité hématologique plu importante des chimiothérapies

Echec prise de greffe de moelle si donneurs de moelle âgés

Leucémies et myélodysplasies

Facteurs environnementaux (effet cohorte)

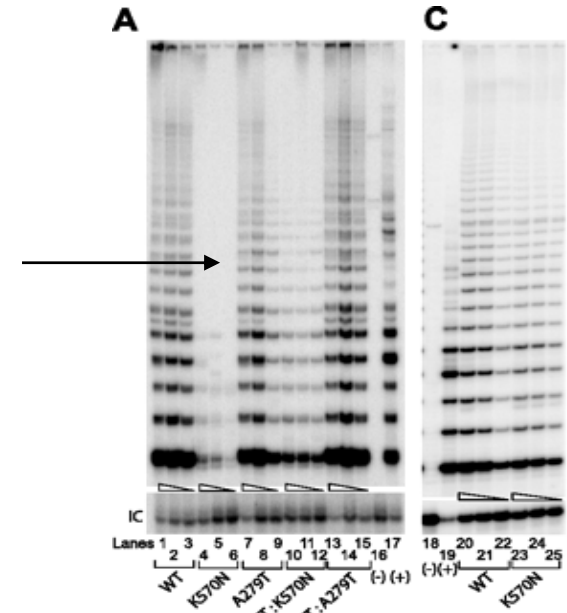
**Profil phénotypique particulier et spécifique de ces hémopathies
chez les sujets âgés**

Déficits hématologiques dans le cadre d'un vieillissement prématuré

1- Dyskératoses congénitales (autosomique dominante) et rares aplasies acquises : mutations dans le complexe télomérase-ribonucléoprotéine (hTERC, hTERT, dyskérine (X) = haploinsuffisance

2- Ataxie-Télangiectasie (autosomique récessif): mutation gène ATM (protection contre le stress oxydatif et rôle maintien télomères)

3- Défauts de réparation ADN? Syndromes progéroïdes et progéria.....



(Blood, janv 2007)

Hématopoïèse et vieillissement : constatations expérimentales

Contenu médullaire à l'état de base

- * Cellularité médullaire : données discordantes; difficultés mesure**
- * Proportion de cellules souches (évaluée sur fraction CD 34 +)**
Proportion de progéniteurs (évaluée sur CFU-GM)
Inchangées avec l'âge du donneur sain
- * Fraction de cellules CD 34 + circulante diminue avec l'âge**

Stress hématologiques

- * Etudes dans modèles murins**
- * Stimulation érythropoïèse par phlébotomie; par hypoxie**
- * Réponse diminuée et surtout retardée chez les animaux âgés**

Hématopoïèse et vieillissement : qu'est-on en droit d'attendre?

Modifications hématopoïèse liées au vieillissement

Pas d'influence sur état de base

Réponse diminuée en situation de stress

Sensibilité accrue stress mineurs ?

Rôle dans hémopathies malignes ?

Hématopoïèse et vieillissement : difficultés d'étude

Modèle « idéal » : moelle osseuse humaine in vivo

Modèles d'étude réels

In vivo, modèles murins

Etude in vitro moelle humaine : fractions de moelle surtout

Etude in vitro de cellules souches circulantes (CD 34 +)

**Etudes in vitro : cultures dans des conditions optimales de
pousse in vitro, sans rapport avec les conditions intra
médullaires in vivo**

Etude facteurs de croissance ou cytokines :

- dosages plasmatiques (rapport avec taux médullaires?)**
- effet de doses pharmacologiques**

Modifications des cellules souches (1)

Reconstitution hématopoïétique

Pool cellules souches hématopoïétiques

(difficultés étude; phénotype CD 34+ - CD33-)

- * Plus élevé chez individus âgés (x 5 chez animaux âgés)**
- * Mais échec de prise de greffe x 4 (expériences animales; clinique humaine)**

Expérience de reconstitution compétitive

- Animaux syngéniques; 2 donneurs simultanés, âge différent; marqueurs cytogénétiques; reconstitution à long terme**
 - Progéniteurs au moins aussi nombreux animaux âgés**
- * Reconstitution à long terme moins bonne donneurs âgés**

Modifications des cellules souches (1 bis)

Reconstitution hématopoiétique

Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells

Ying Liang, Gary Van Zant, and Stephen J. Szilvassy

BLOOD, 15 AUGUST 2005 • VOLUME 106, NUMBER 4

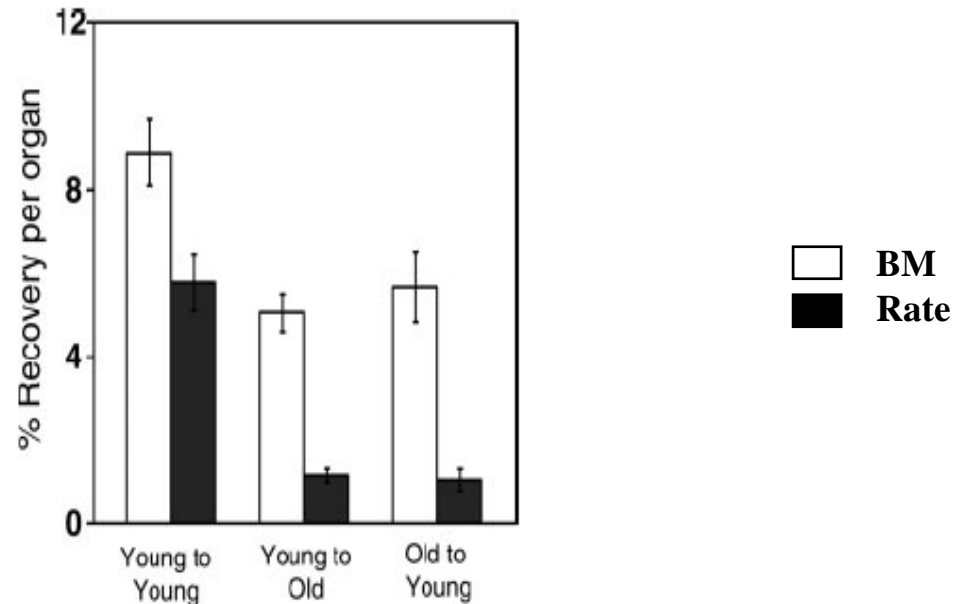


Figure 1. Reduced homing capacity of HPCs with donor and recipient age.

Défaut homing dû à des modifications des cellules souches (old to young) et du microenvironnement médullaire ((young to old)

Modifications des cellules souches (2)

Cellules souches en cycle (S/G2/M)

- * Très faible pourcentage de manière physiologique**
 - * Proportion de cellules souches en cycle augmente avec l'âge**
 - * Il existe, in vitro, une corrélation inverse entre le pourcentage de cellules souches en cycle et la durée vie des cultures de CSH**
 - * Rôle éventuel dans la survenue de mutations oncogéniques ?
(accidents du cycle cellulaire)**
- Plus grande fréquence des anomalies cytogénétiques moelle osseuse des sujets âgés**

Modifications des cellules souches (3)

Auto renouvellement (1)

Capacité limitée autorenouvellement

Excède la durée de vie

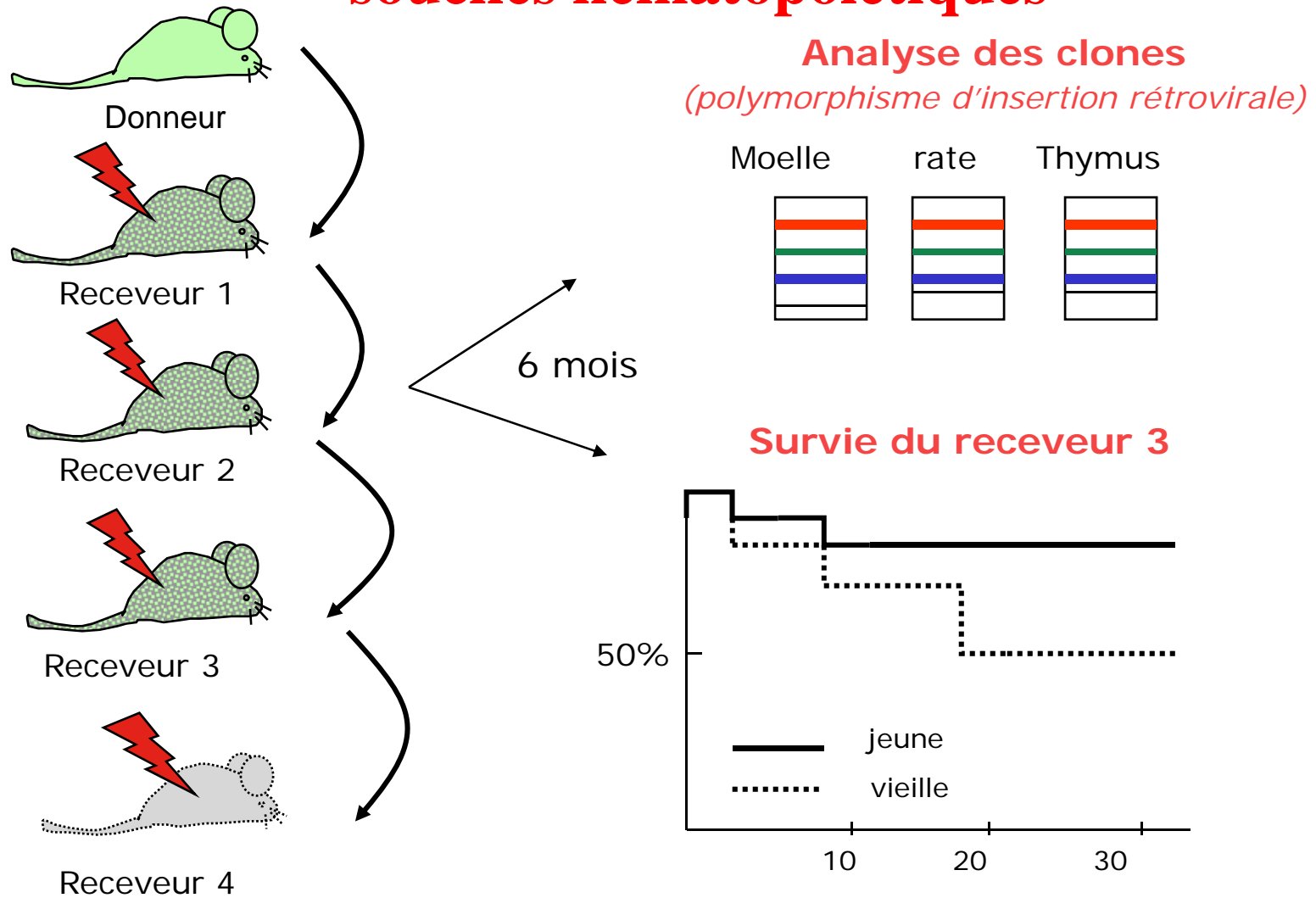
Greffes en série (in vitro, modèles animaux)

- * Epuisement après nombre limité de greffes
- * Epuisement dû surtout à une perte de la capacité d'autorenouvellement des CSH
- * Si donneur âgé, nombre significativement plus faible de greffes

Etudes par toxicités répétées (chimiothérapies)

- * moins concluantes
- * Rôle majeur de l'intensité des stress hématopoïétiques
- * Effet âge de l'animal « écrasé » par la chimiothérapie

Epuisement de la capacité de reconstitution des cellules souches hématopoïétiques



Situation expérimentale in vitro très différente de la situation in vivo

Modifications des cellules souches (4)

Auto renouvellement (2)

Région télomérique

Région hautement répétitive extrémités des chromosomes

Rôle protection fusion; activité exonucléasique

Perte quelques dizaines de paires de bases à chaque division

Sénescence cellulaire répllicative

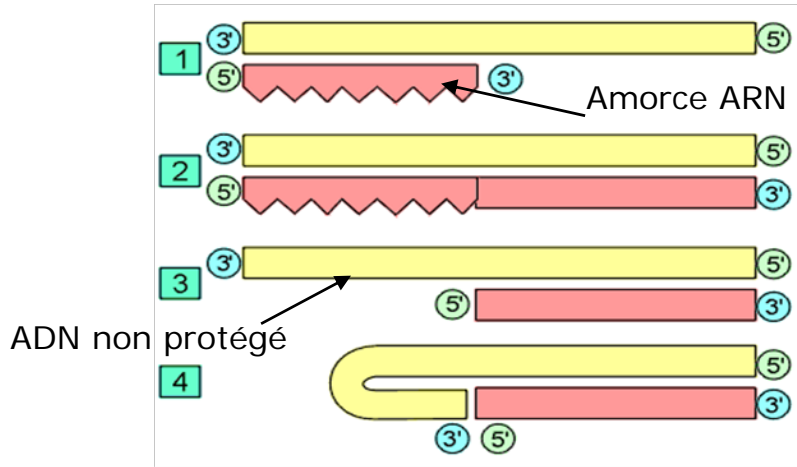
Raccourcissement progressif des télomères

**Longueur inversement proportionnelle histoire répllicative antérieure
proportionnelle potentiel résiduel répllication**

Raccourcissement critique : sénescence répllicative

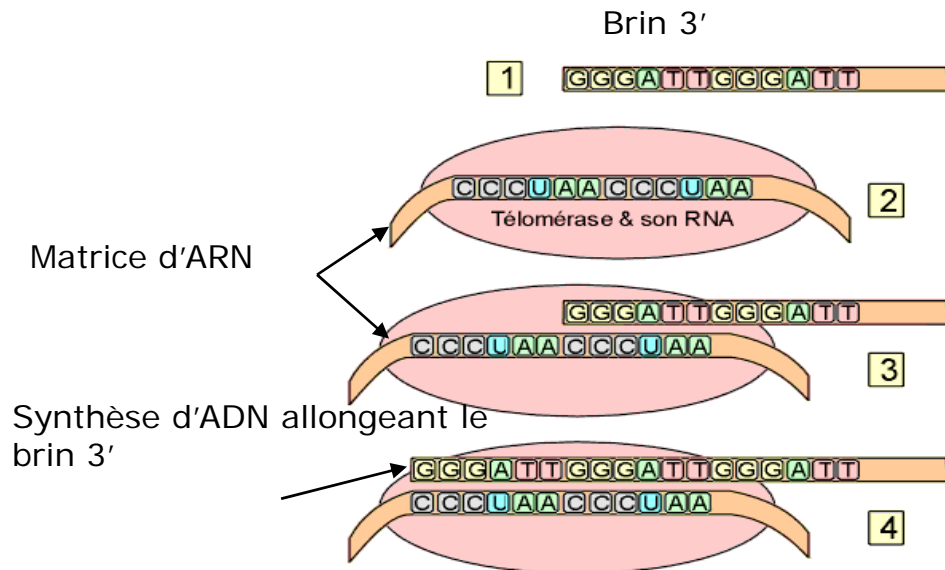
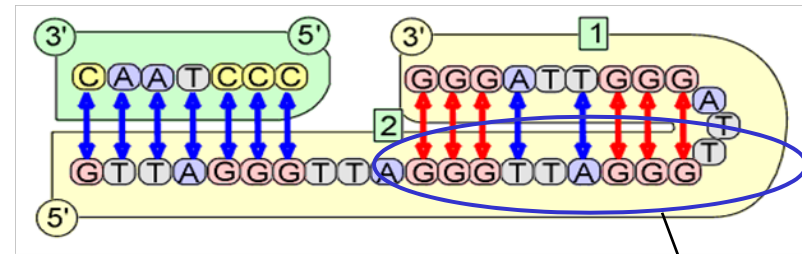
Arrêt de division, modifications cellulaires morphologiques et fonctionnelles

Activité de la télomérase



Raccourcissement des télomères au cours des divisions

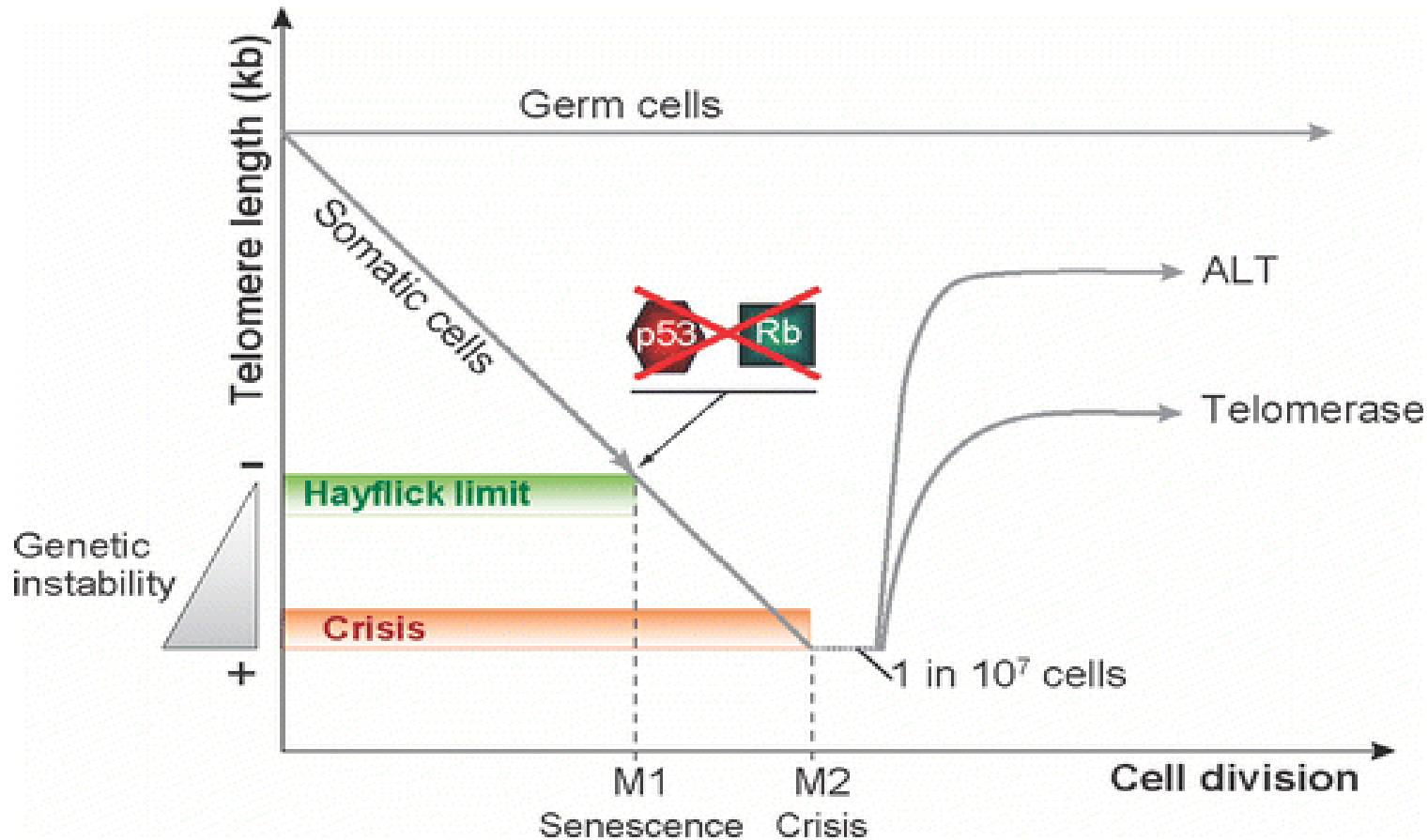
recourbement du fragment 3' protégeant l'extrémité du chromosome



Intervention de la télomérase

= allongement de extrémités des chromosomes

Sénescence répllicative



Stewart SA, Weinberg RA. 2006.

Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22:531–57

Modifications des cellules souches (5)

Auto renouvellement (3)

Protection des télomères par activité enzymatique de type télomérase

- * cellules germinales (intégrité transmission patrimoine génétique)**
- * cellules souches (CSH, cellules cryptiques intestinales ...)**

Dans les CSH expression faible télomérase à l'état de base

expression télomérase induite par la prolifération

La protection par la télomérase des cellules souches hématopoïétiques est incomplètement efficace

Raccourcissement des télomères fonction de

âge individu

stress hématopoïétiques antérieurs

Rôle de ce raccourcissement télomérique dans la diminution capacité d'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques ?

Modifications des cellules souches (6)

Anomalies qualitatives : études de clonalité

Le chromosome X est porteur d'un certain nombre de gènes connus
Chez la femme, dans chaque cellule, inactivation aléatoire d'un des 2 chromosomes X

Chez les femmes hétérozygotes pour un des gènes (par exemple gène codant pour G6PD) portés par X, on peut étudier le profil d'expression des 2 allèles dans un tissu

Profil normal 1/1 chez hétérozygotes

Modifications des cellules souches (7)

Anomalies qualitatives : études de clonalité

Etudes inactivation X femmes hétérozygotes (par exemple pour G6PD)

Profil tissulaire (fibroblastes) normal (1/1) femmes âgées

Dans les cellules hématopoïétiques, on trouve un profil oligoclonal
(10/1) < 2 % chez les sujets jeunes
20 à 25 % chez les plus de 60 ans

Hypothèses

- * réduction du pool de CSH (*voir supra*)**
- * avantage de survie conféré par un des 2 allèles (peu probable car observé pour des gènes portés par X différents)**

Hématopoïèse oligoclonale (peu de cellules souches « efficaces »)

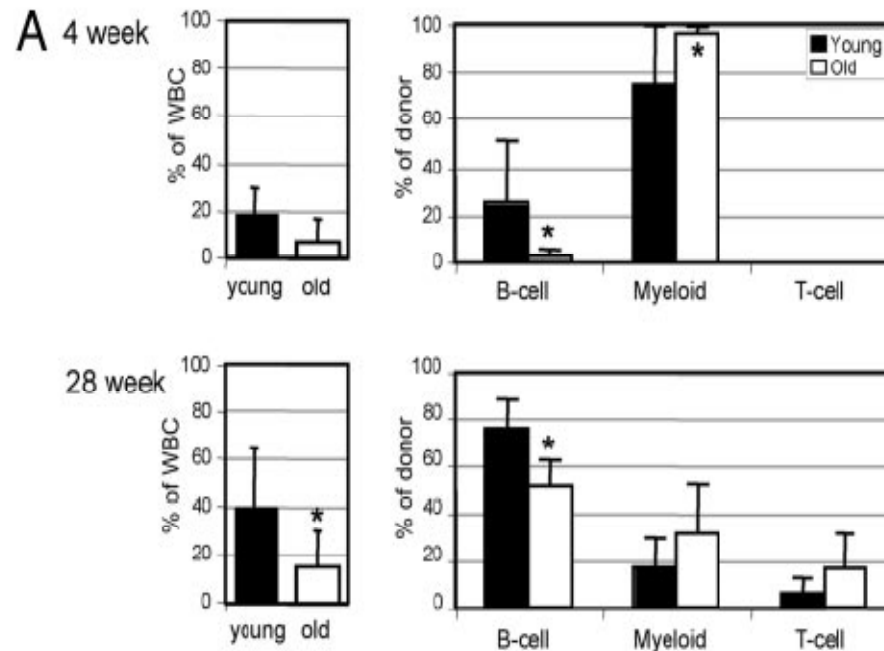
- * baisse réactivité moelle**
- * rôle dans hématopoïèse maligne**

Modifications des cellules souches

Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging

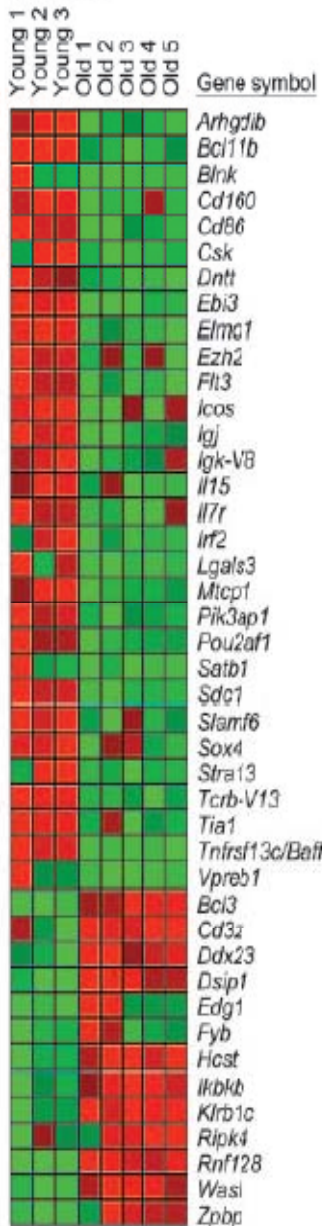
PNAS | June 28, 2005 | vol. 102 | no. 26

Derrick J. Rossi^{††}, David Bryder^{††}, Jacob M. Zahn[§], Henrik Ahlenius^{*}, Rebecca Sonu[§], Amy J. Wagers[¶], and Irving L. Weissman^{*‡¶}



Reconstitution moins efficace de la lymphopoïèse : rôle dans la baisse d'efficacité du système immunitaire

B Lymphoid



Modifications des cellules souches expression génique

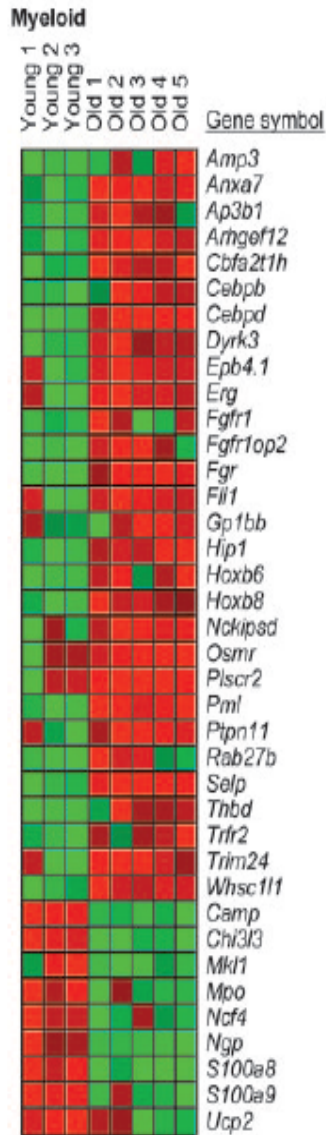
PNAS | June 28, 2005 | vol. 102 | no. 26

Expression gènes dans cellules souches étudiée par
technique microarray

Gènes surexprimés en rouge

Cellules souches souris âgées : sous expression des
gènes impliquées dans la lymphopoïèse

Modifications des cellules souches expression génique



Gènes surexprimés en rouge

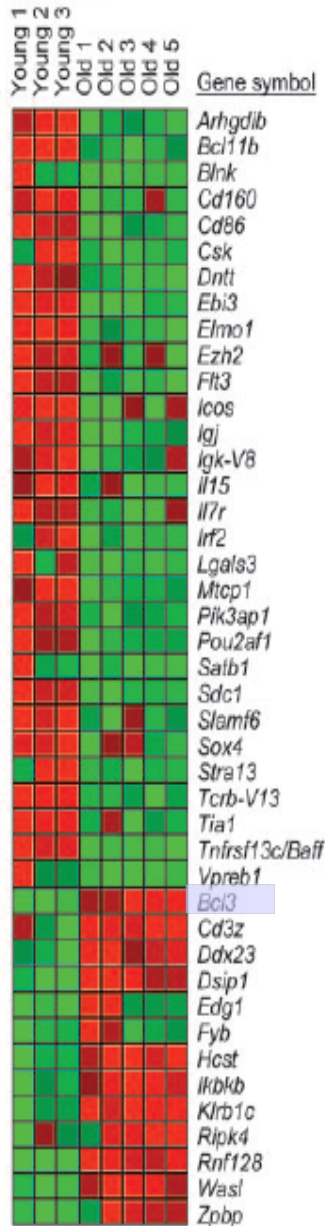
Cellules souches souris âgées : sur expression des gènes impliquées dans la myélopoïèse

Modifications des cellules souches

expression génique

PNAS | June 28, 2005 | vol. 102 | no. 26

B Lymphoid



Myeloid



5 % des gènes surexprimés dans les cellules souches des souris âgées sont des gènes impliqués dans la leucémogénèse

Myéloblastique : Aml, Erg, ETO, Fgfrf, Pml

Lymphoblastique : Bcl3, Pbx1, Maf

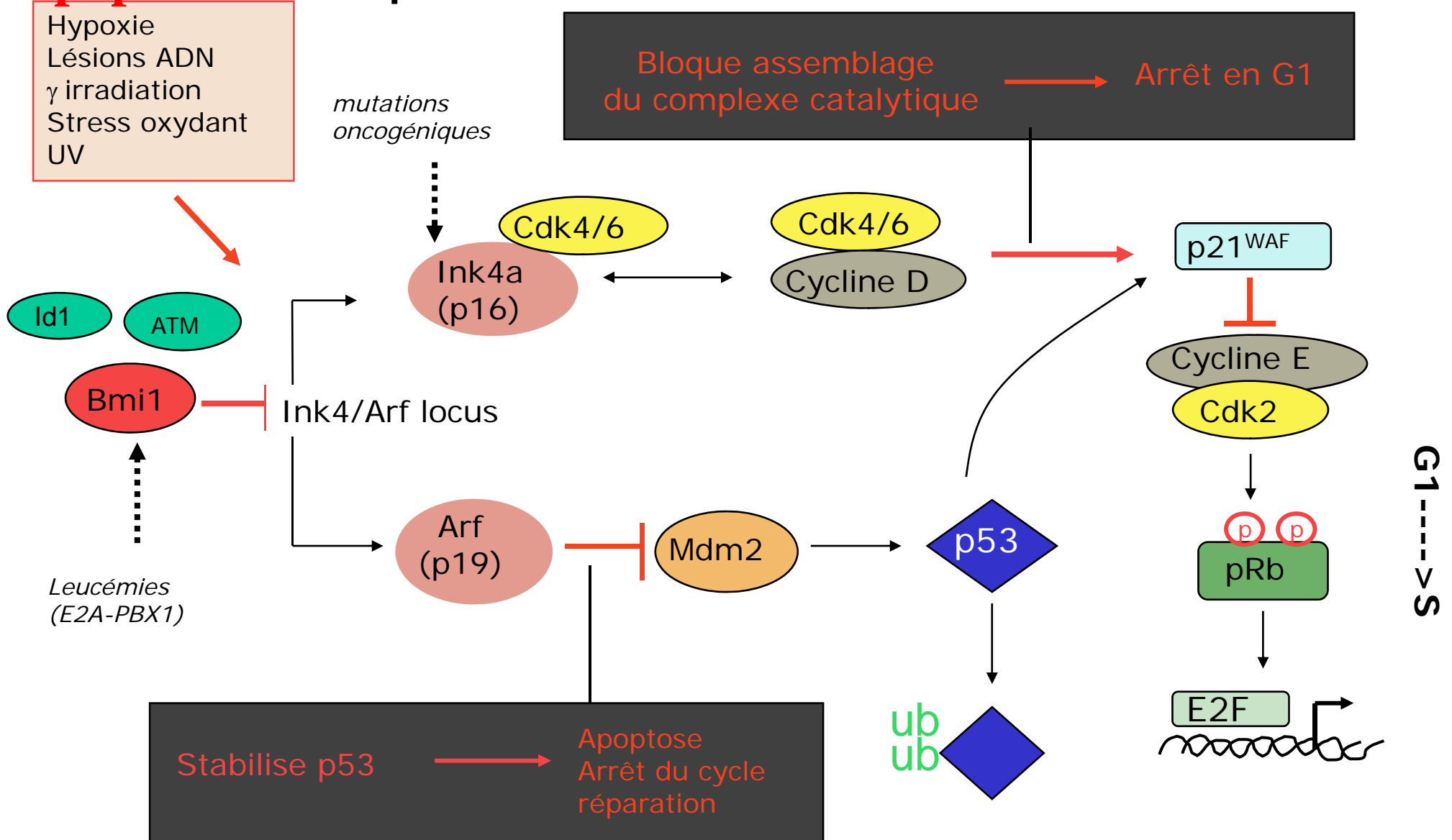
Modifications des cellules souches expression génique et apoptose

Contradiction apparente

- **Stabilité du nombre de cellules souches hématopoïétiques**
- **Augmentation du pourcentage de cellules souches en cycle**
- **Moindre efficacité en termes d'autorenouvellement et de prolifération**

Modifications des cellules souches : expression génique et apoptose

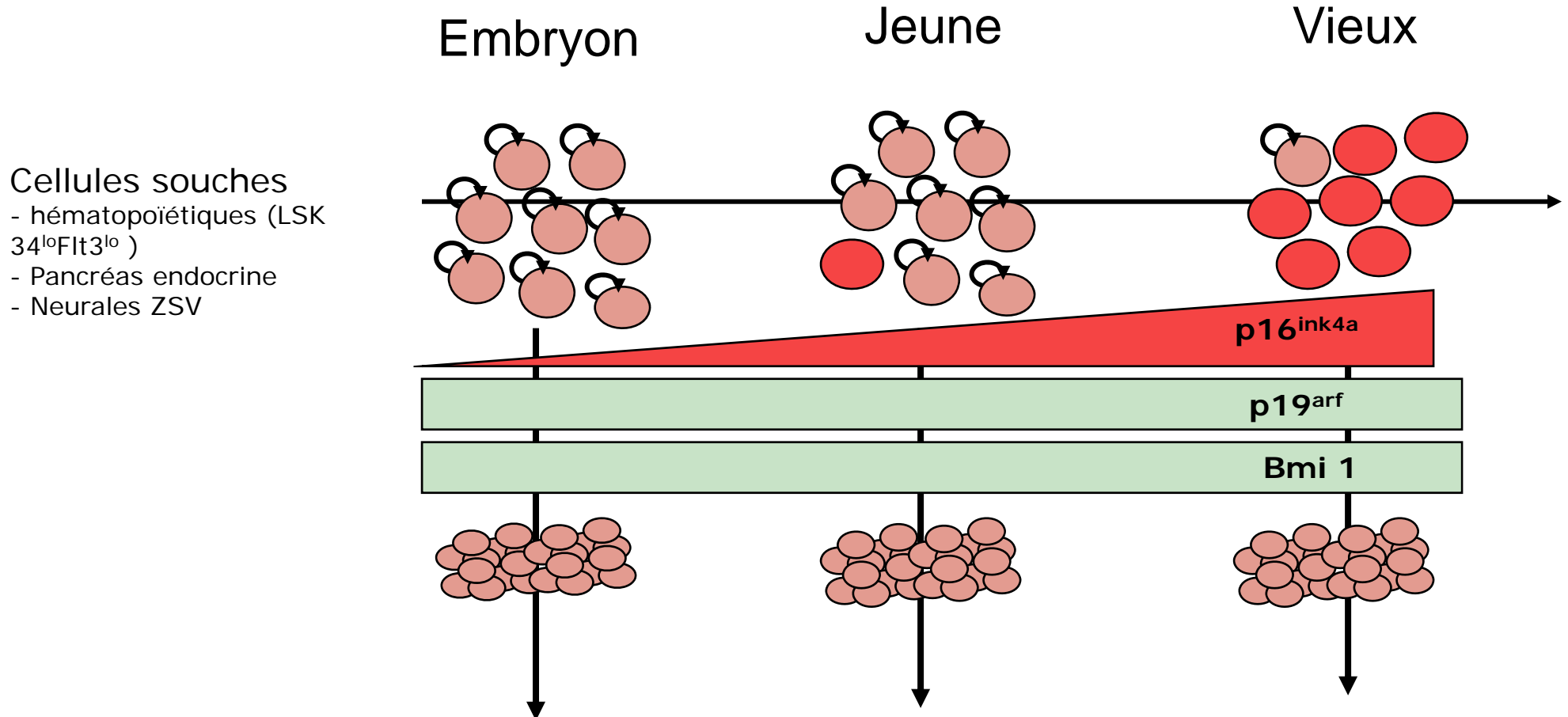
Les protéines du locus INK4a/Arf



Modifications des cellules souches : expression génique et apoptose

Expression de p16^{ink4a} dans les cellules souches au cours de la vie

Augmentation apoptose médullaire au cours du vieillissement ?



Modifications des progéniteurs hématopoïétiques au cours du vieillissement (1)

Etude sur moelle donneur volontaire

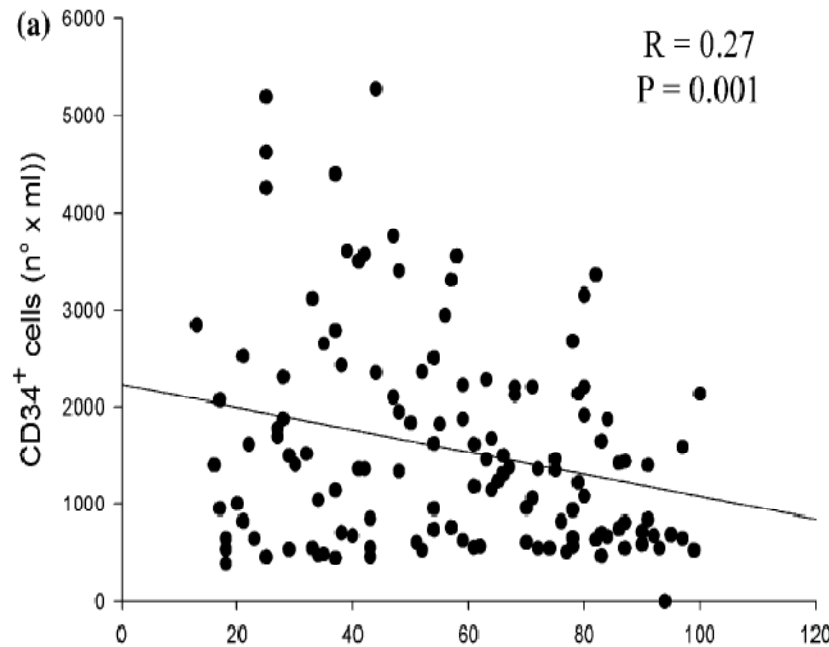
- **Augmentation exponentielle du nombre de progéniteurs, estimé sur les CFU-GM, avec l'âge**
- * **Mais moindre capacité de réplication (capacité à donner une 2^o colonie après repiquage d'une cellule de CFU-GM)**
- * **Ce phénomène débute dès la naissance (comparaison sang de cordon – moelle adulte jeune)**
- * **Peut-être atteint-il un point critique chez les sujets âgés ?**

Modifications des progéniteurs hématopoïétiques au cours du vieillissement (2)

Age- and gender-related alterations of the number and clonogenic capacity of circulating CD34⁺ progenitor cells

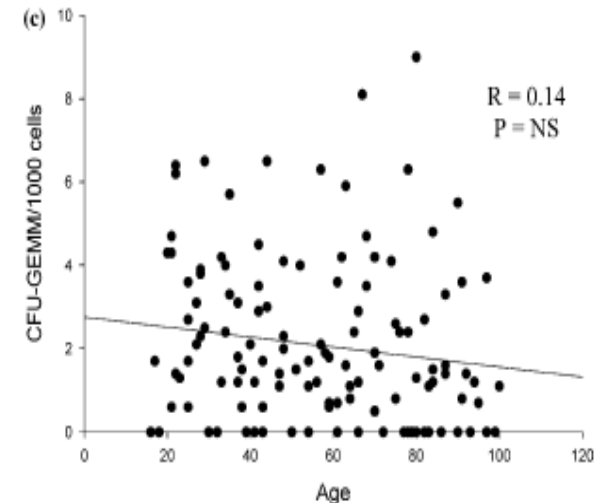
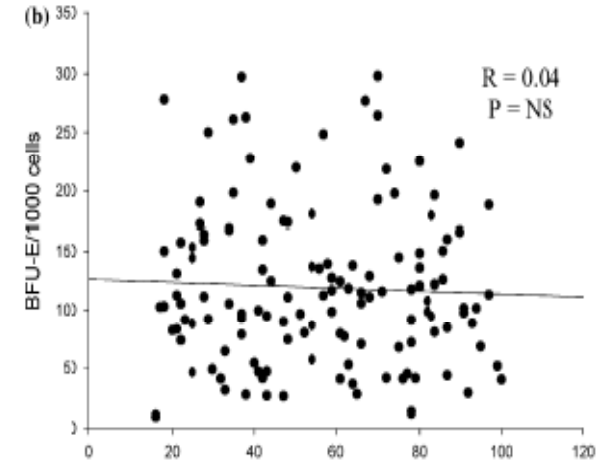
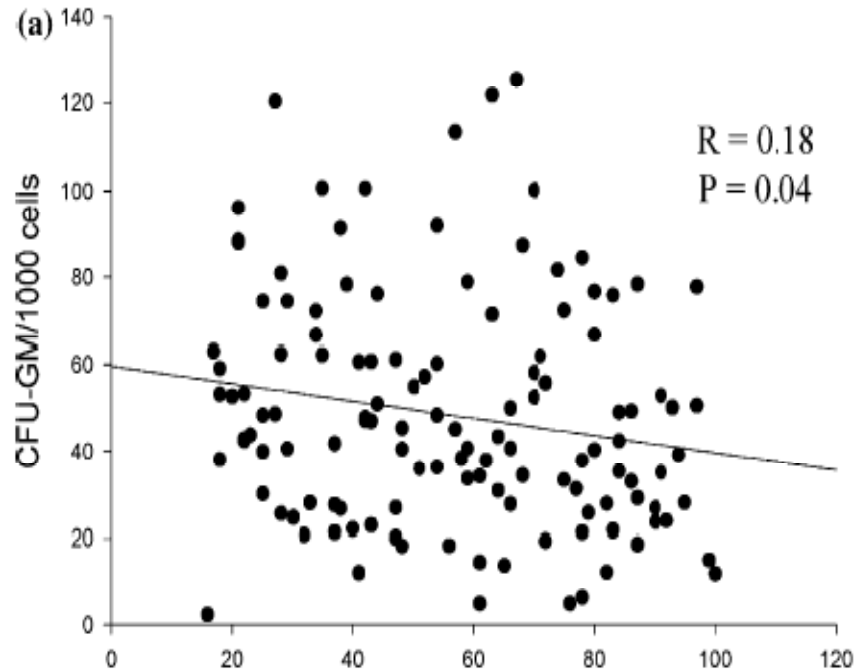
Biogerontology (2005) 6:185–192
DOI 10.1007/s10522-005-7954-5

130 healthy subjects (80 females and 50 males) ranging in age from 16 to 100 years.



* Signification CD 34 + circulants

Modifications des progéniteurs hématopoïétiques au cours du vieillissement : clonogénicité(3)



Signification : diminution de capacité ou de sensibilité aux CSF?

Modifications des progéniteurs hématopoïétiques au cours du vieillissement (2)

Etudes de la sensibilité aux CSF

- * Mobilisation de CFU-GM par G-CSF**
- * Volontaires sains (in vivo, humains)**
- * Diminution de la sensibilité G-CSF (même effet, doses x 2) chez les sujets âgés**

Hypothèses physiopathologiques

- * Moindre expression des récepteurs au G-CSF**
- * Modification affinité des récepteurs au G-CSF pour leur ligand**
- * Défaut de transduction du signal**

Autres CSF ?

Rôle dans le retard de réponse hématopoïétique lors des stress

Modifications du stroma médullaire et de la production de CSF au cours du vieillissement (1)

Expérience murine de greffe de moelle croisée

- * Echec greffe donneur âgé chez animal jeune : modifications des CSH**
- * Echec greffe donneur jeune chez animal âgé : modifications du stroma**

Sécrétion des CSF en situation clinique

- * Taux G-CSF infection sévère**
- * Taux EPO anémie (à fonction rénale égale et même étiologie d'anémie)**

Résultats équivalents dans les groupes d'âge

Mais ces dosages plasmatiques ne reflètent qu'imparfaitement les concentrations médullaires (or la régulation de l'hématopoïèse par les CSF est paracrine bien plus qu'endocrine)

Etude in vitro de la sécrétion G, GM et M-CSF

- * Culture fibroblastes médullaires**
- * Sécrétion spontanée faible, non différente selon l'âge du donneur sain**
- * Sécrétion induite par IL-1 significativement plus faible chez donneurs âgés**

Modifications du stroma médullaire et de la production de CSF au cours du vieillissement (2)

Modifications des facteurs inhibant l'hématopoïèse

- * Augmentation au cours du vieillissement production $\text{TNF } \alpha$
susceptible induire apoptose des progéniteurs hématopoïétiques**
- * Augmentation au cours du vieillissement production IL-10
inhibition prolifération progéniteurs et précurseurs
inhibition production GM-CSF par stroma
inhibition croissance lignée érythrocytaire**
- * Augmentation au cours du vieillissement production P-sélectine
inhibition prolifération des cellules $\text{CD } 34+$**

Modifications du stroma médullaire et de la production de CSF au cours du vieillissement (2)

Modifications des facteurs croissance non hématopoïétiques

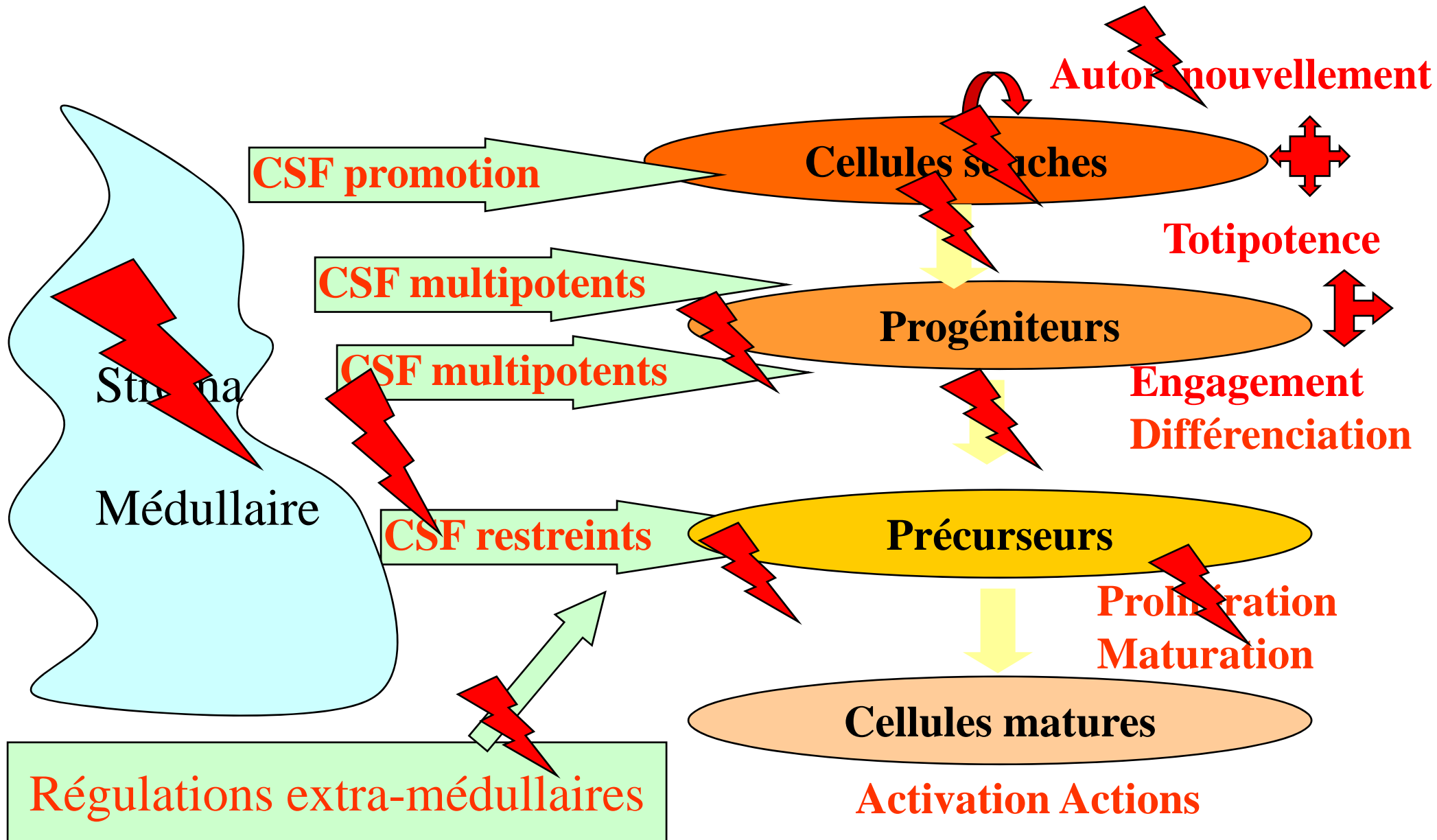
- * Diminution au cours du vieillissement IGF1**
- GH**
- androgènes**

Modification du profil de production des CSF

- * Augmentation de production IL-6, IL-3 (facteurs de prolifération (% CSH en cycle) et de différenciation)**
- * Augmentation de production de PGE2, TNF (F inhibiteurs)**
- * Diminution de production de GM-CSF**

Restauration in vitro d'un profil de production des CSF comparable à celui des animaux jeunes par adjonction de DHEAS dans le milieu

Schéma général de l'hématopoïèse normale



Hématopoïèse et vieillissement : constatations physiopathologiques

Cellules souches hématopoïétiques

- * Conservation du pool total**
- * Diminution de leur capacité d'autorenouvellement**
- * Anomalies qualitatives (cellules en cycle, oligoclonalité)**

Progéniteurs

- * Altération de leurs capacités d'amplification et de différenciation**
- * Moindre sensibilité aux CSF**

Micro environnement médullaire

- * Moindre capacité de production de CSF stimulant l'hématopoïèse**
- * Production augmentée de facteurs inhibant l'hématopoïèse**
- * Homing moins efficace (échec prise de greffe)**

Modifications de l'hématopoïèse liées au vieillissement

Conclusions

Pas d'influence sur état de base

** Modifications subtiles, pas faillite globale*

Réponse diminuée en situation de stress

** Réactivité diminuée à tous les niveaux*

Sensibilité accrue stress mineurs ?

** Possible, arguments insuffisants*

Rôle dans hémopathies malignes ?

** Probable, augmentation activité mitotique des CSH et profil oligoclonal*