

Hématopoïèse normale et leucémique

Dr Lucile Couronné

DES Hématologie

1 décembre 2020

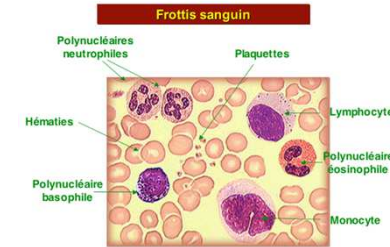
Plan

- Hématopoïèse normale : rappels
- Hématopoïèse normale : nouveaux concepts
- Hématopoïèse leucémique
- Hématopoïèse clonale et CHIP
- Hématopoïèse clonale et hémopathies lymphoïdes

Hématopoïèse normale : rappels

Hématopoïèse

- Ensemble des mécanismes impliqués assurant la **production constante et régulée des diverses cellules sanguines** à partir de la **cellule souche hématopoïétique**
- A lieu dans la **moelle osseuse**

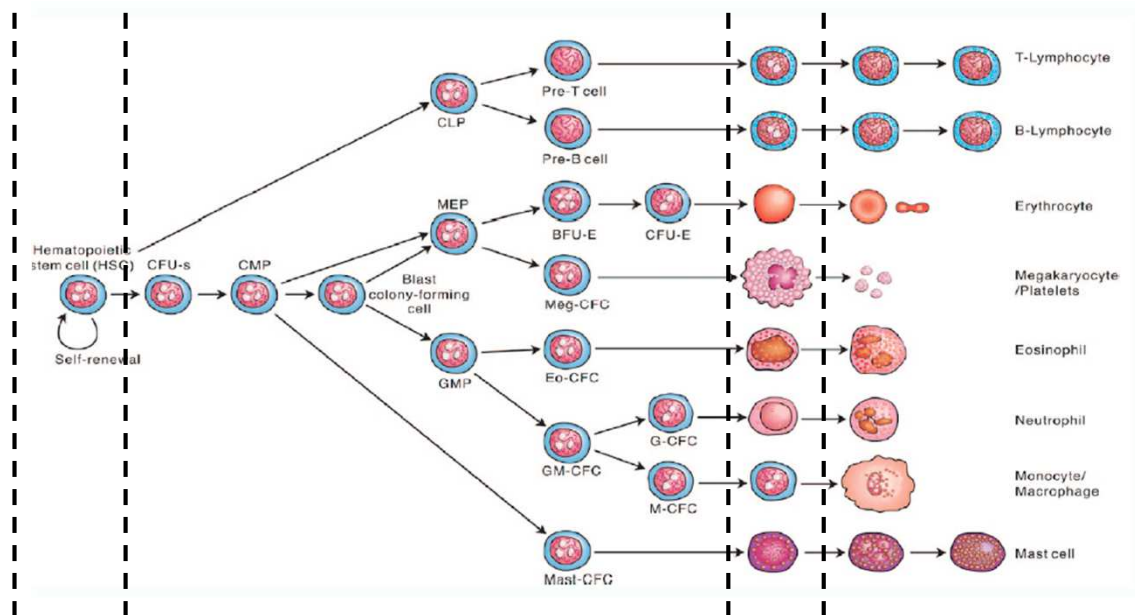


Cellules souches

Progéniteurs

Précurseurs

Cellules matures



10¹² cellules par jour

PROLIFERATION

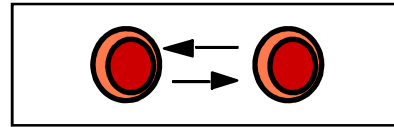
DIFFERENCIATION

Le système hématopoïétique en « chiffres »

Moelle osseuse

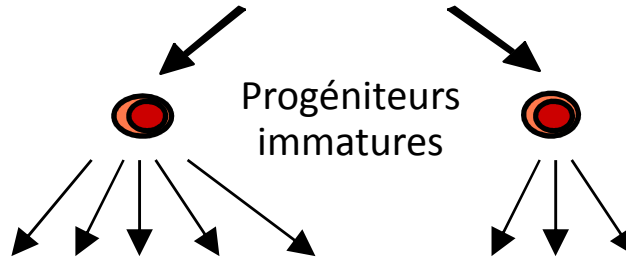
0,0001%

Cellules souches



0,01%

Progéniteurs immatures



<1%

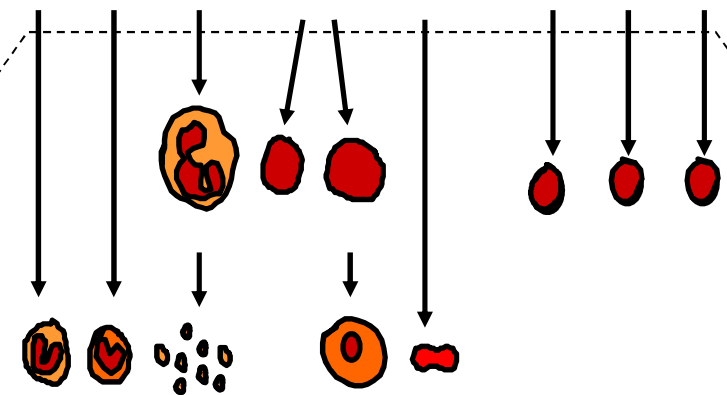
=> CSH et progéniteurs sont rares !

0,5 à 1%

Progéniteurs déterminés



99%

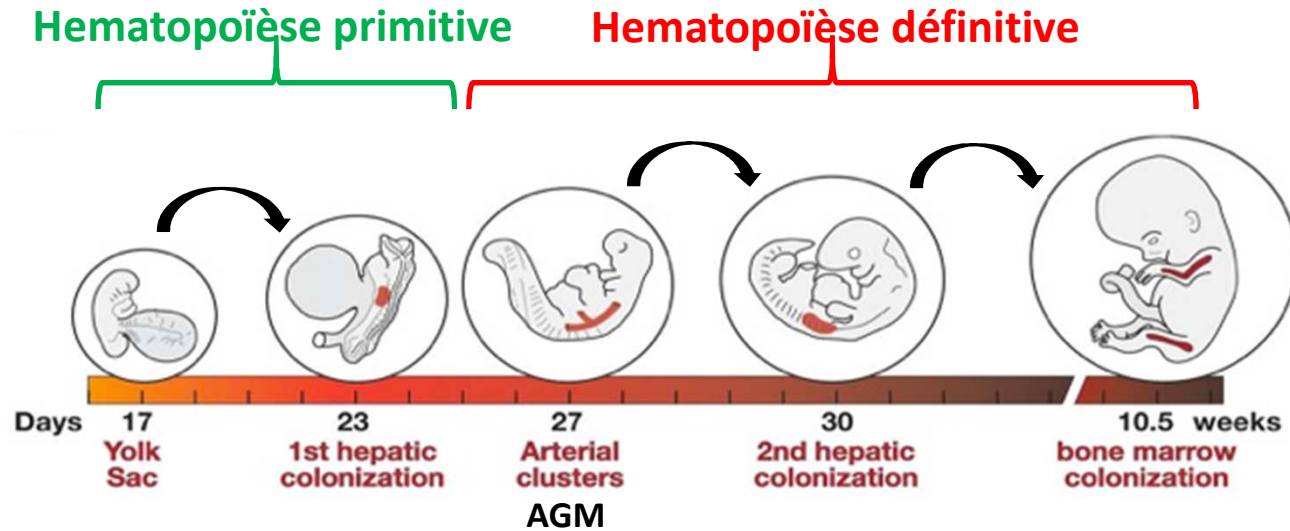


Cellules identifiable morphologiquement

Myéloïdes

Lymphoïdes

Hématopoïèse : lieu de production



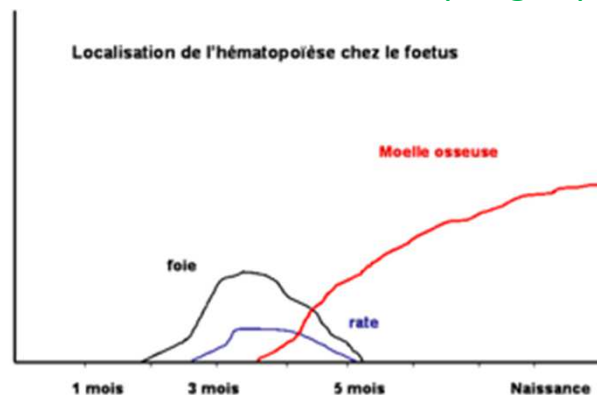
Hémangioblastes

Erythrocytes primitifs
Mégacaryocytes primitifs
Macrophages primitifs

CSH

Cellules myéloïdes
Cellules lymphoïdes

Baron, Blood, 2012



Moelle osseuse = site exclusif de l'hématopoïèse à la naissance et pour toute la vie
(tous les os jusqu'à 4 ans, puis uniquement les os courts et plats : sternum, côtes, bassin, crâne, vertèbres)

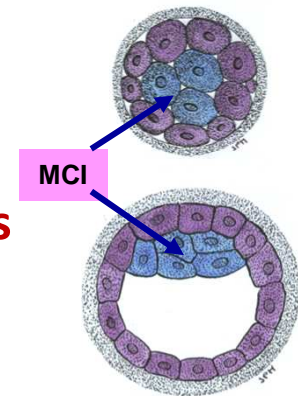
Types de cellules souches

- **Totipotentes** :

↳ Oeuf au stade de pré-compaction (= masse homogène de 4, 8 ou 16 blastomères)
↳ **Cellules trophoblastiques + cellules souches embryonnaires**

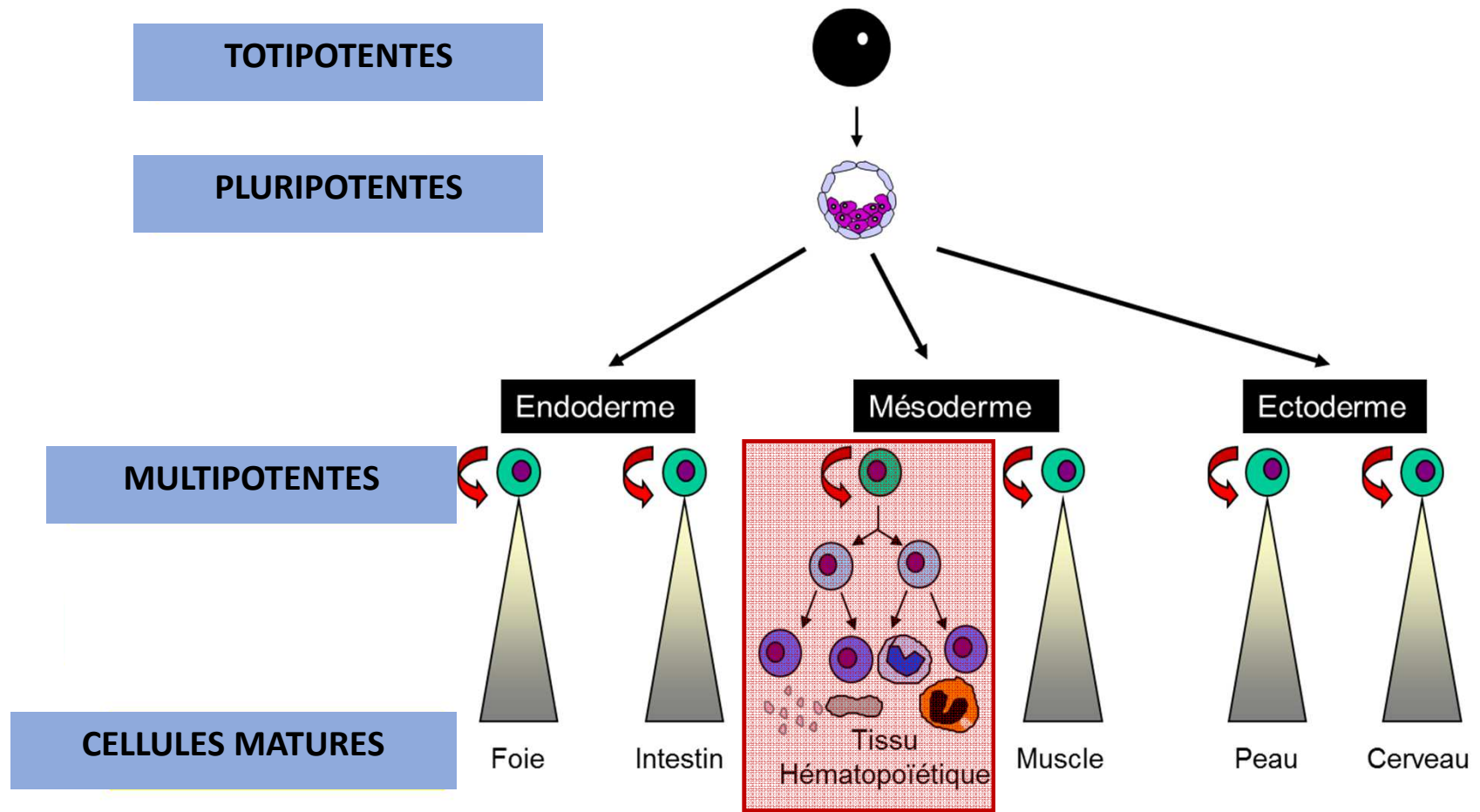
- **Pluripotentes** = **cellules souches embryonnaires (ES)**

↳ Masse cellulaire interne (morula / blastocyste)
↳ **Cellules souches germinales + cellules souches des 3 feuillets embryonnaires**



- **Multi/pauci/unipotentes** = **cellules souches somatiques ou adultes (AS)**

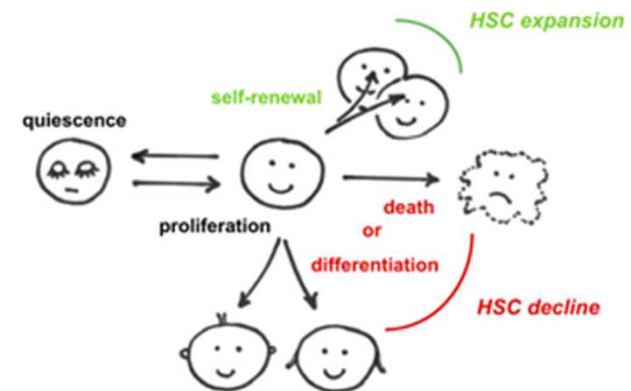
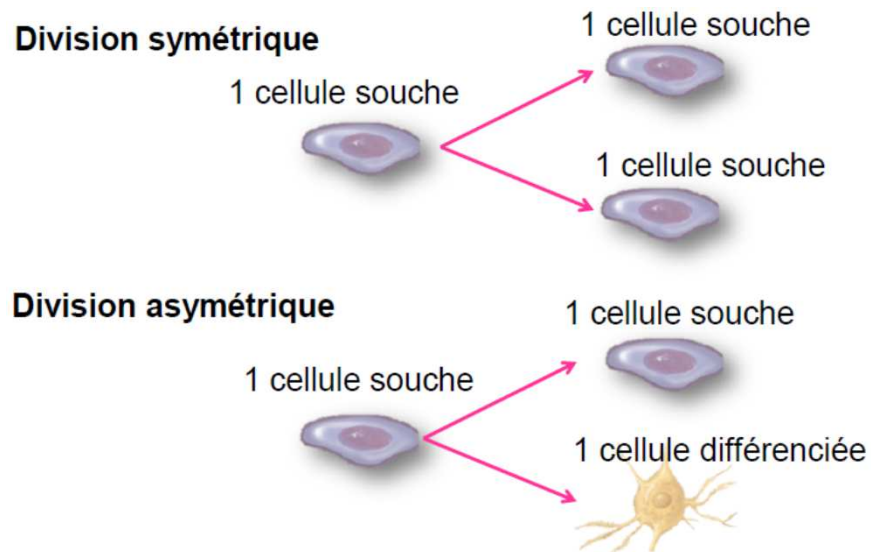
↳ Présentes chez l'embryon et dans les tissus adultes
↳ **Tout/partie des cellules issues d'un des trois feuillets embryonnaires**



Cellule souche hématopoïétique

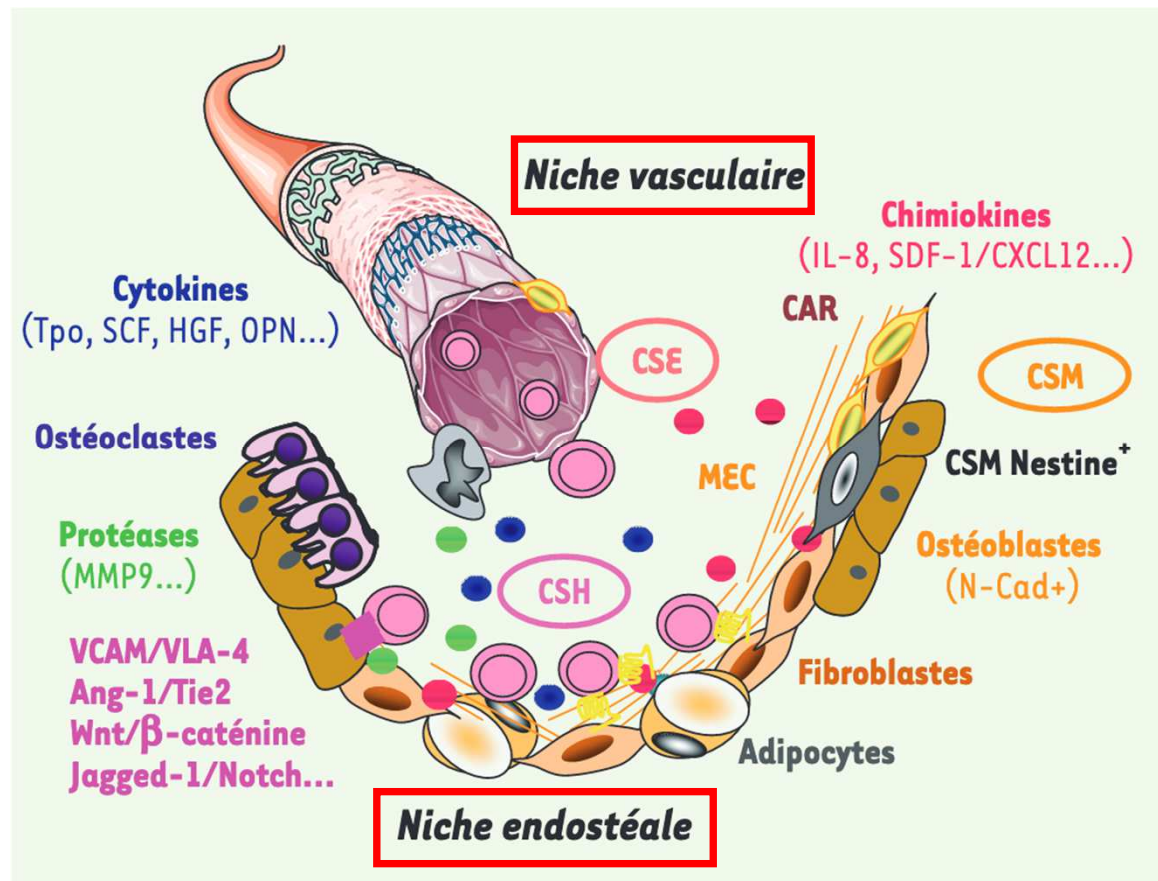
Propriétés des CSH

- **Définition fonctionnelle :**
 - **Auto-renouvellement** (maintien du pool de CSH)
 - **Différenciation** en cellules spécialisées
 - Divisions **symétriques et asymétriques**



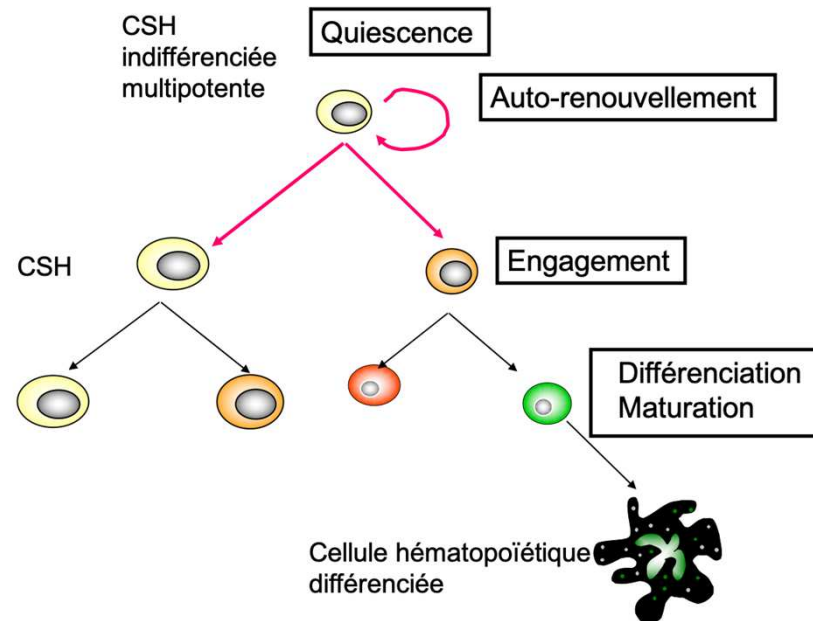
Eaves, Blood, 2015

Niche hématopoïétique



- **Niche endostéale** : maintien des CSH en **quiescence, rétention et maintien du pool**
- **Niche vasculaire** : **mobilisation** des cellules souches de la niche endostéale vers la circulation, **prolifération** et **différenciation** des CSH

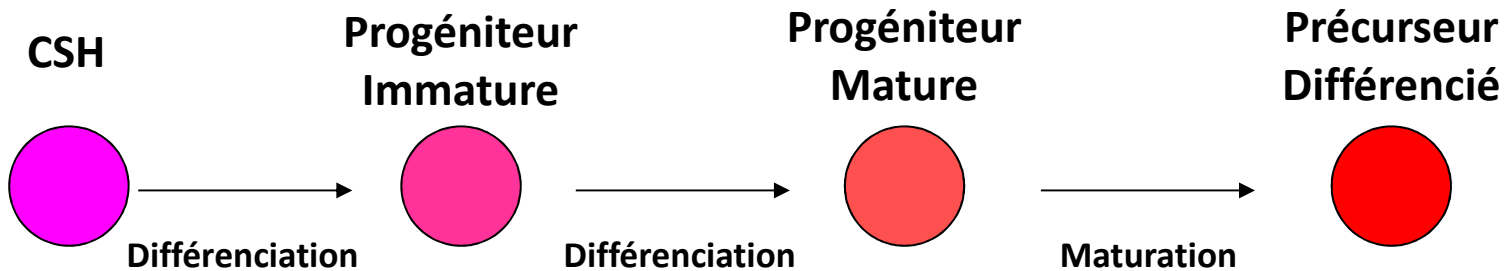
Régulation



- **Facteurs intrinsèques** (propres à la cellule) :
 - Facteurs de transcription
 - Régulateurs épigénétiques
- **Facteurs extrinsèques** (micro-environnement de la niche hématopoïétique) :
 - Interaction directes (cellules-cellules) : couples ligands / récepteurs, molécules d'adhérence
 - Interactions indirectes : cytokines, chemokines, hormones, etc..

Caractérisation des CSH

Caractérisation phénotypique



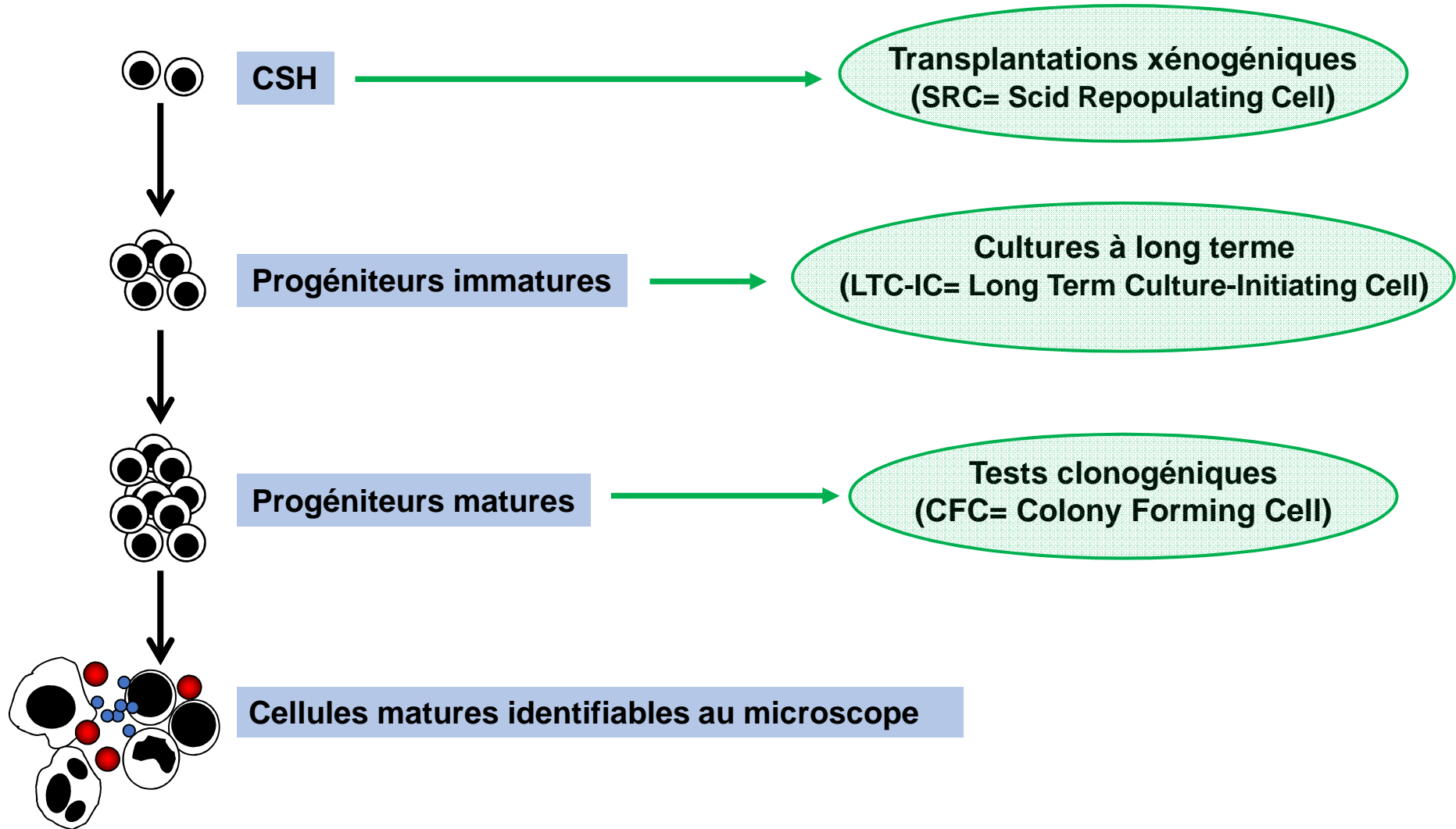
CD34 ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁻
CD38 ⁻	CD38 ⁻	CD38 ⁺	CD38 ⁺
Lin ⁻	Lin ⁻	Lin [±]	Lin ⁺

Lin = ensemble de marqueurs de lignée (B, T, NK, granulo, mono, neutro, érythro, etc....)

- N'expriment **pas de marqueurs de cellules différenciées**
- Mais n'expriment **aucun marqueur qui leur soit spécifique !**

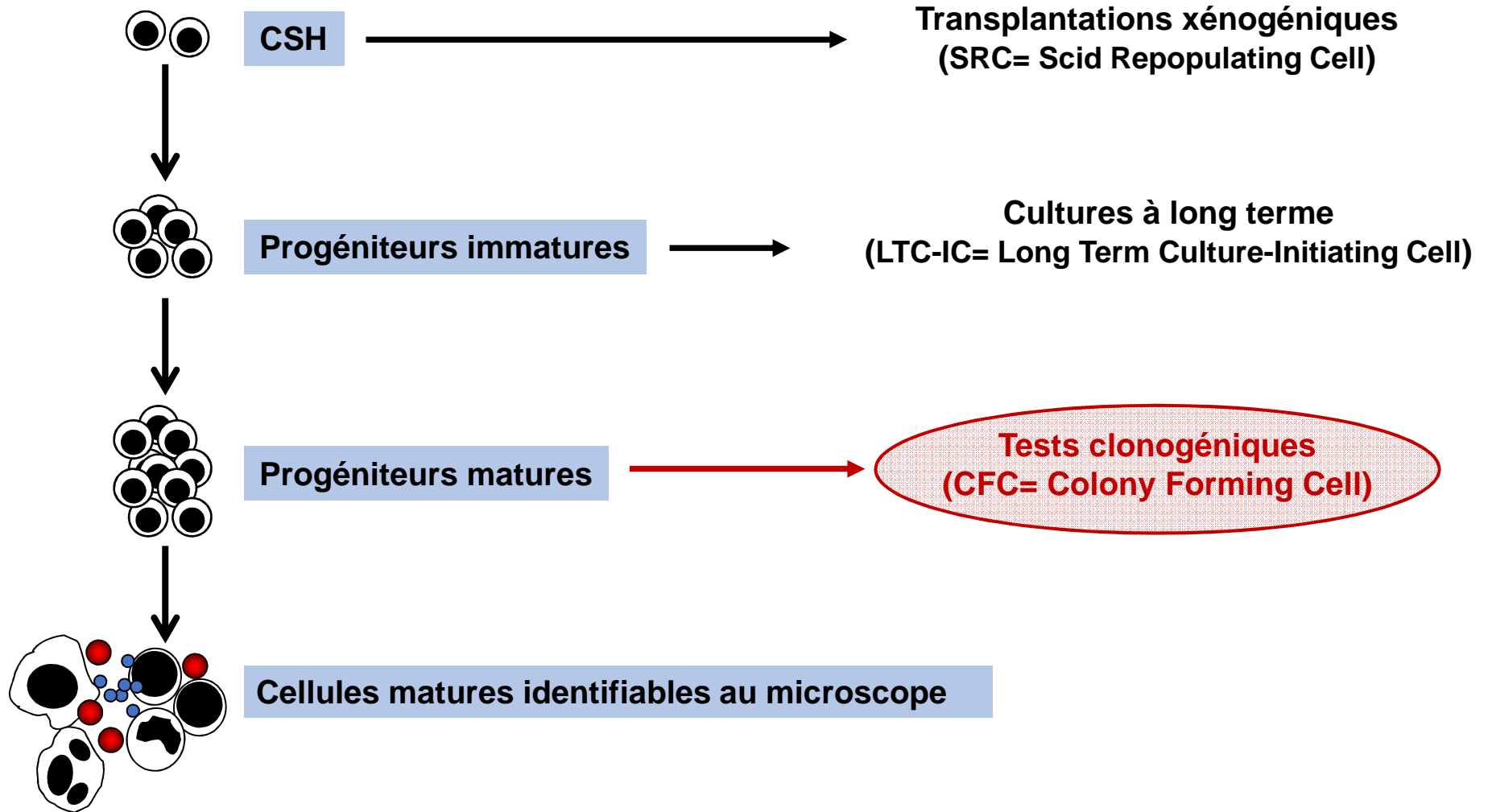
Caractéristiques

Caractérisation fonctionnelle



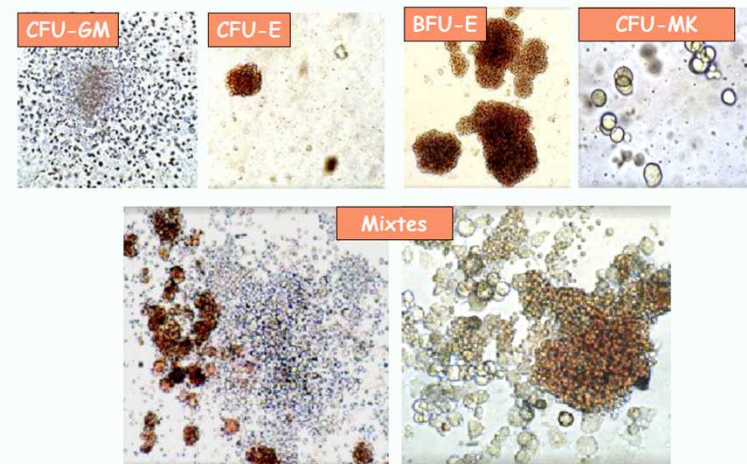
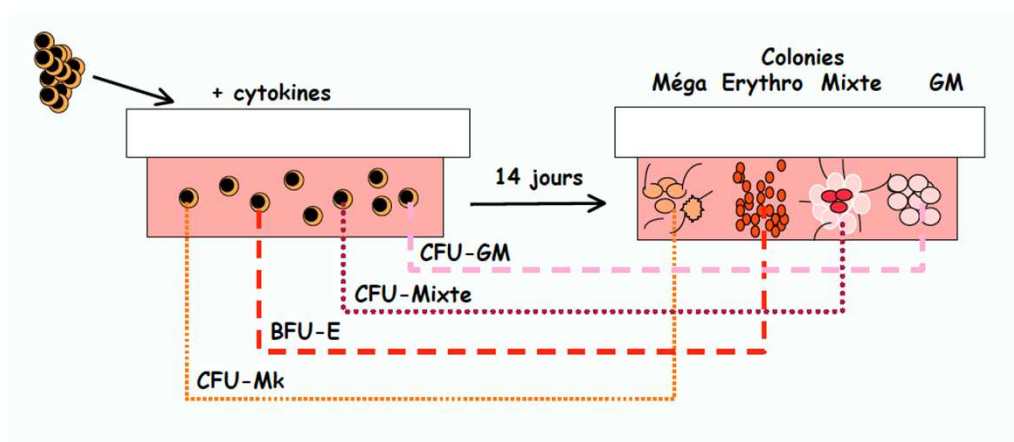
Caractéristiques

Caractérisation fonctionnelle



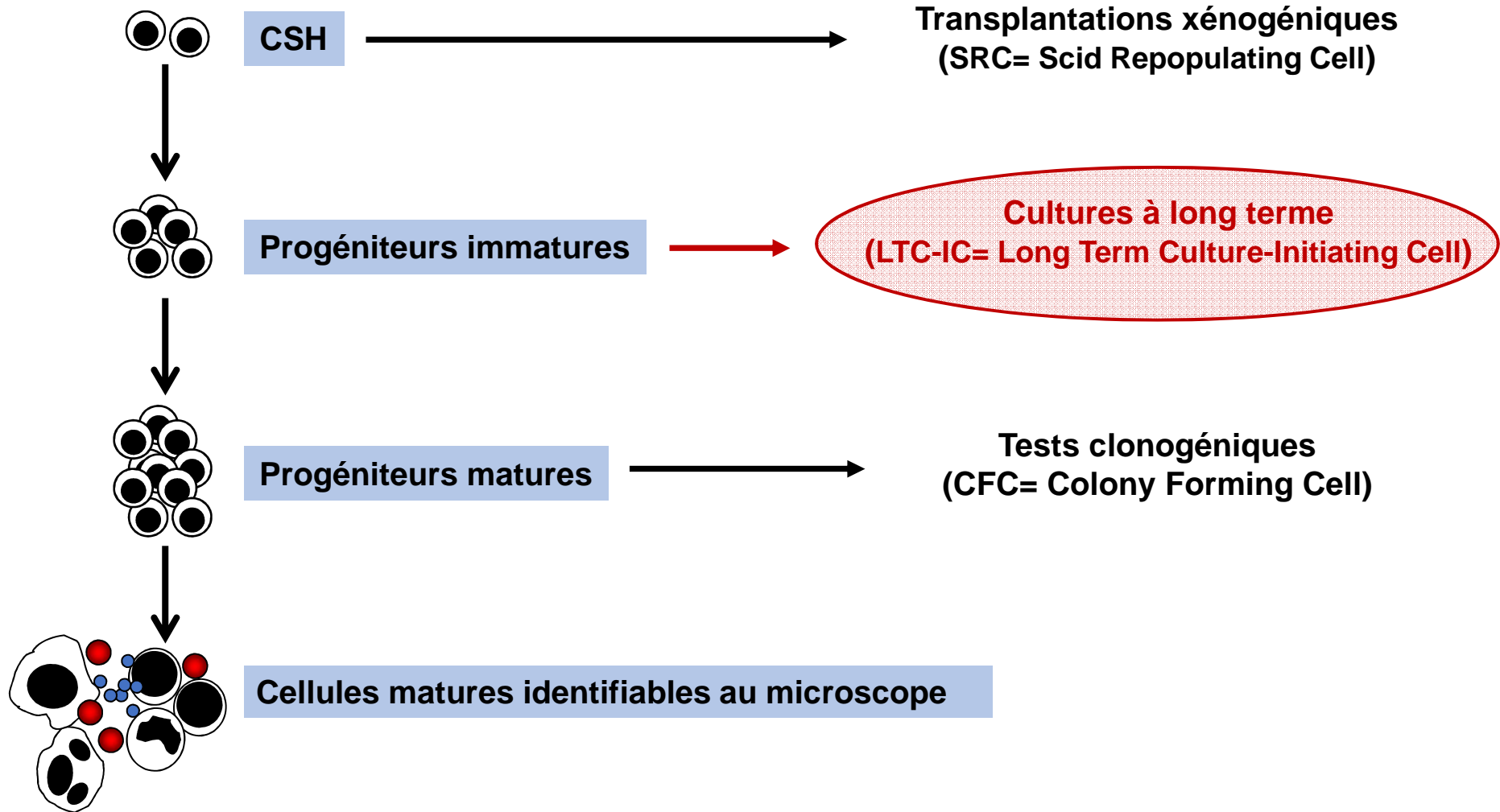
Tests clonogéniques (CFC)

- Méthylcellulose + cytokines
- Milieu semi-solide => immobilisation : **1 colonie provient d'une cellule**
- Culture pendant 14 jours => colonies => mise en évidence **rétrospective de progéniteurs clonogéniques**



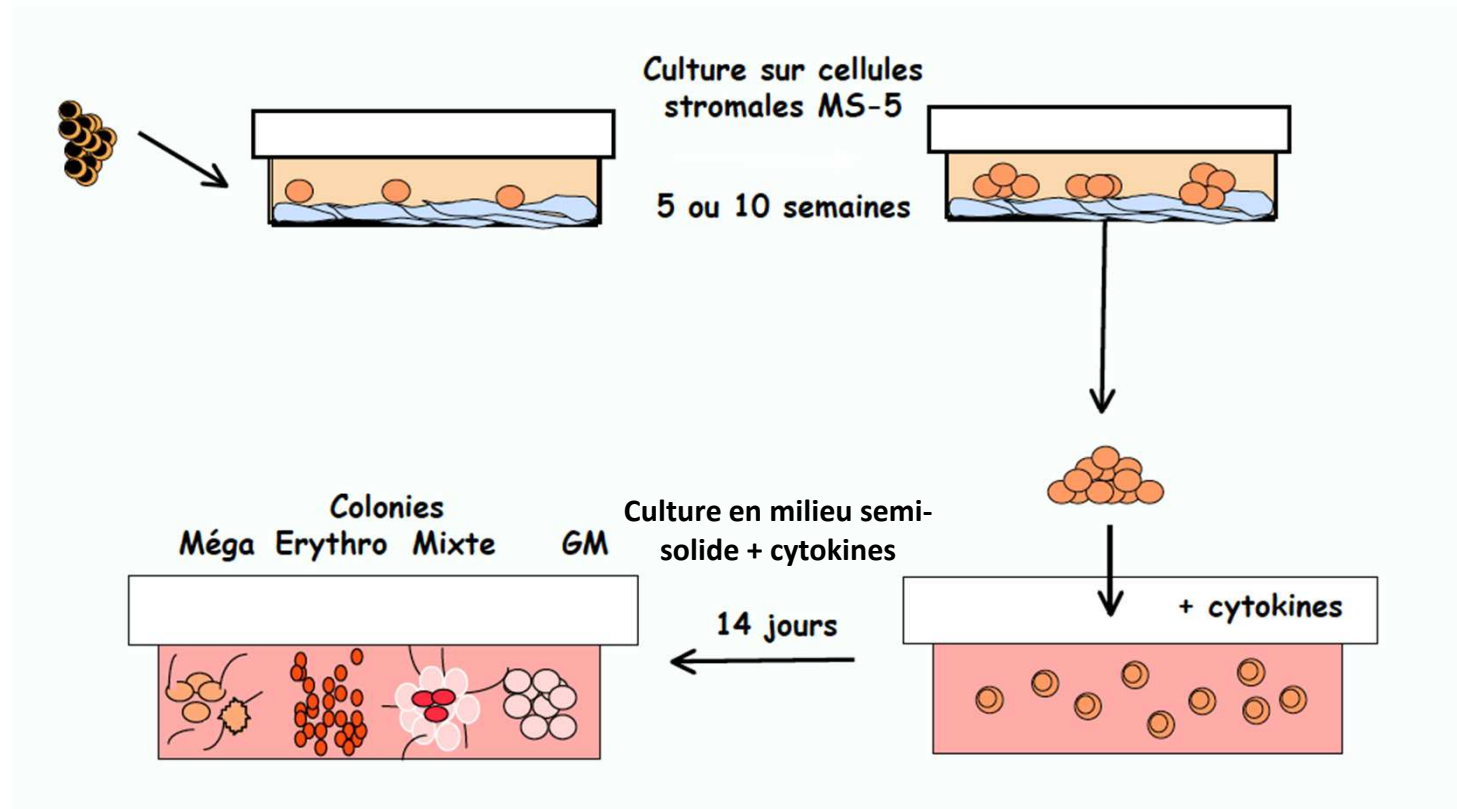
Caractéristiques

Caractérisation fonctionnelle



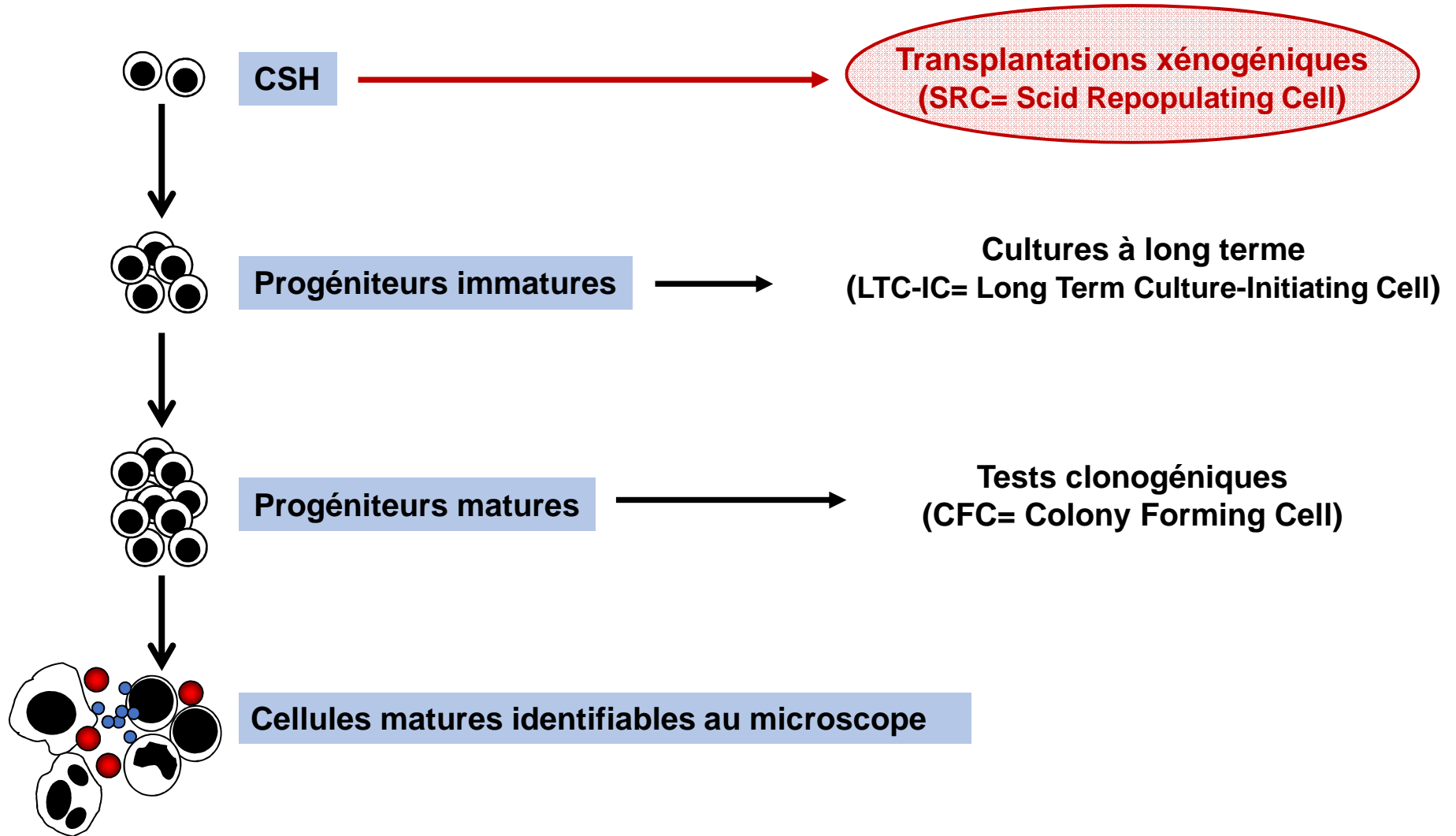
Cultures à long terme (LTC-IC)

- Co-culture sur cellules stromales puis culture en milieu semi-solide avec cytokines



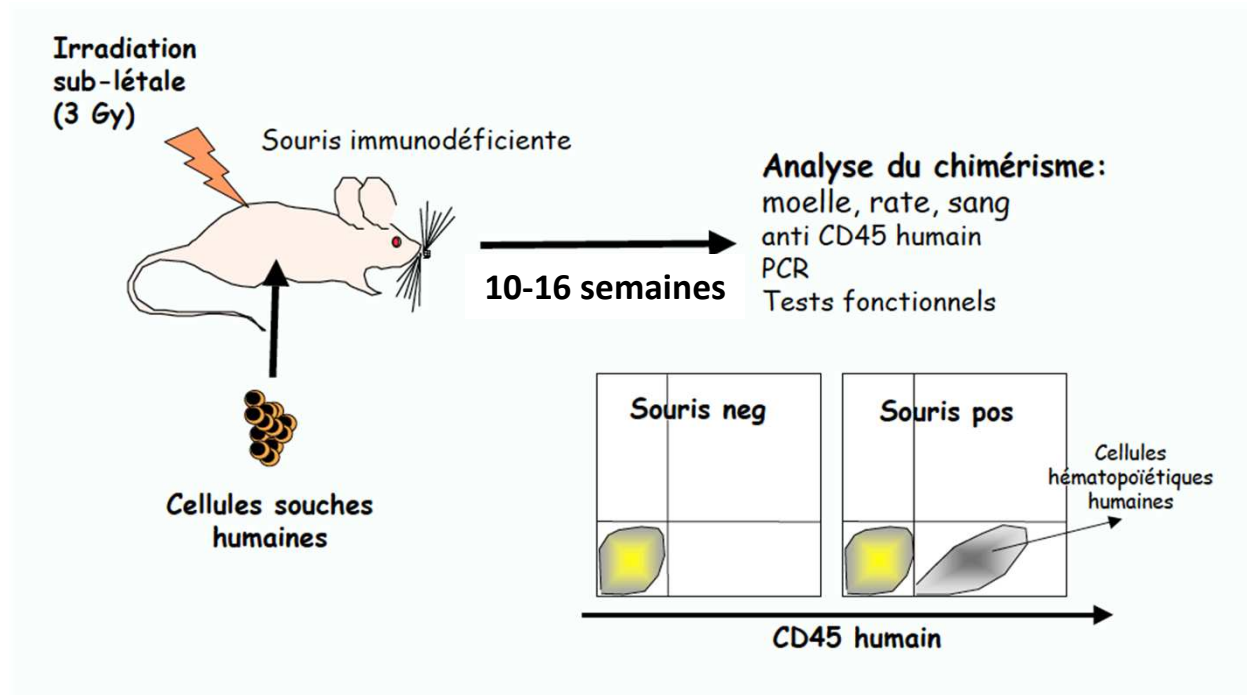
Caractéristiques

Caractérisation fonctionnelle

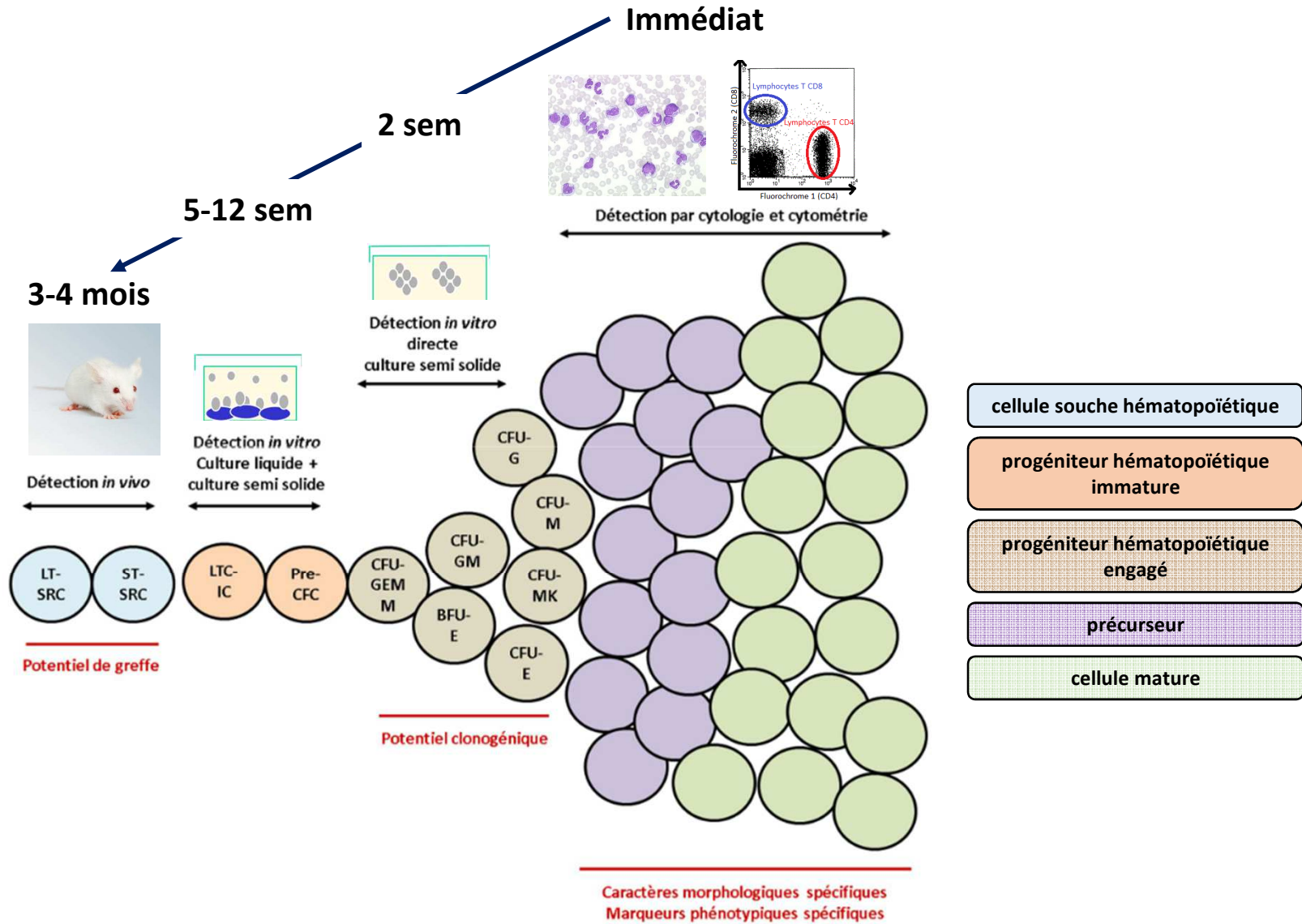


Transplantations xénogéniques (SRC)

- Utilisation de modèles de **souris immunodéficientes** (SCID, NOD-SCID, NSG...)
- **Grefe et reconstitution à long terme de tous les lignages hématopoïétiques**

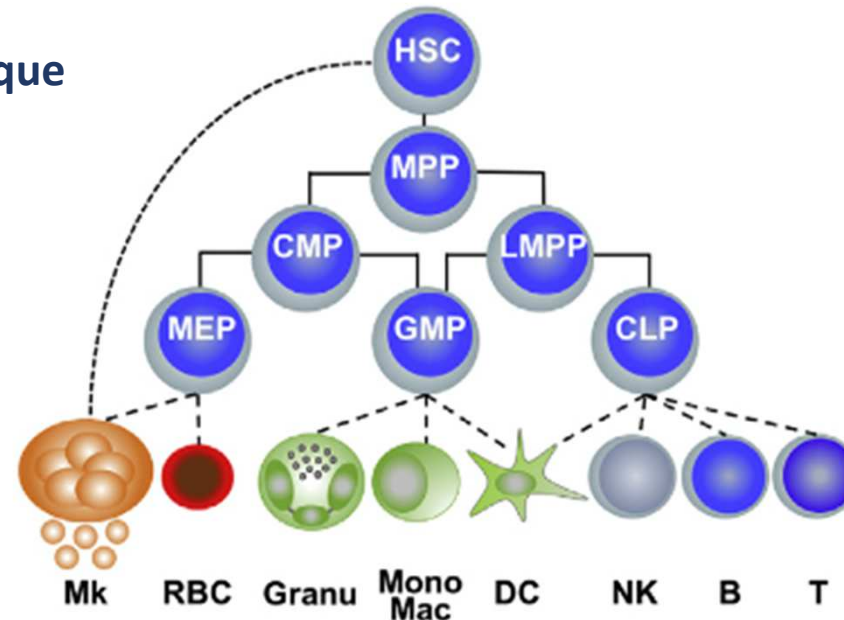


En résumé



Hématopoïèse : modèles de différenciation

1 Modèle classique

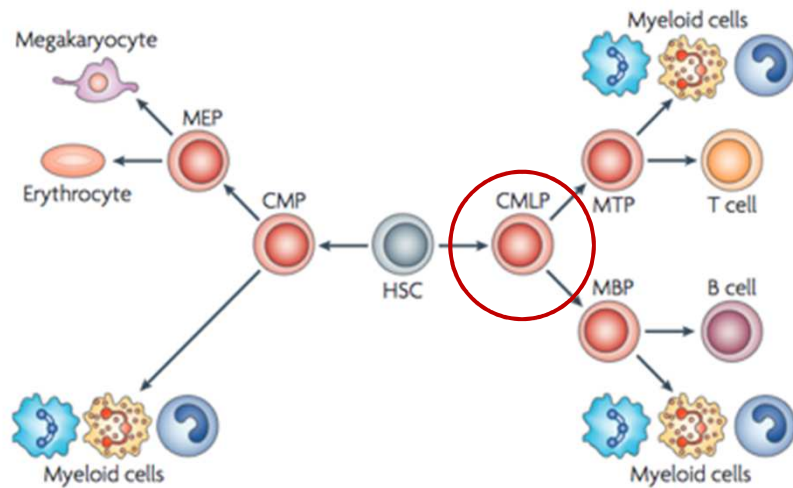


Haas, Cell Stem Cell, 2018

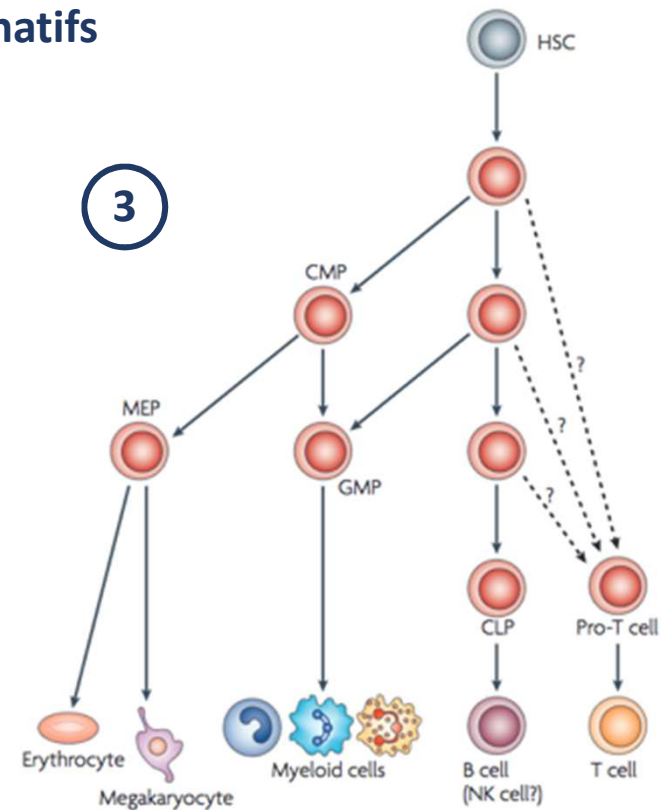
- Génération de progéniteurs multipotents (MPP)
- Restriction progressive du potentiel de différenciation avec embranchements binaires
- Séparation précoce des lignages myéloïde et lymphoïde
- Possible voie directe à partir des HSC pour le lignage mégacaryocytaire

Modèles alternatifs

2



3



Ceredig, Nat Reviews, 2009

- Progéniteur commun myéloïde et lymphoïde
- Perte progressive du potentiel méga-érythro puis du potentiel granulo-macrophages
- Silencing des gènes myéloïdes = pré-requis pour l'engagement dans le lignage lymphoïde

Dans tous ces modèles :

- CSH = population homogène
- Chaque stade = état cellulaire stable et figé

Hématopoïèse : « potential » vs « cell fate »

- « **Potential** » : capacité des CSH à se différencier ou à s'autorenouveler dans un contexte où elle sont poussées à s'expandre (expériences de reconstitution de greffe)
- « **Cell fate** » : comportement des CSH dans des conditions physiologiques (approches non invasives *in situ*)

Hématopoïèse normale : nouveaux concepts

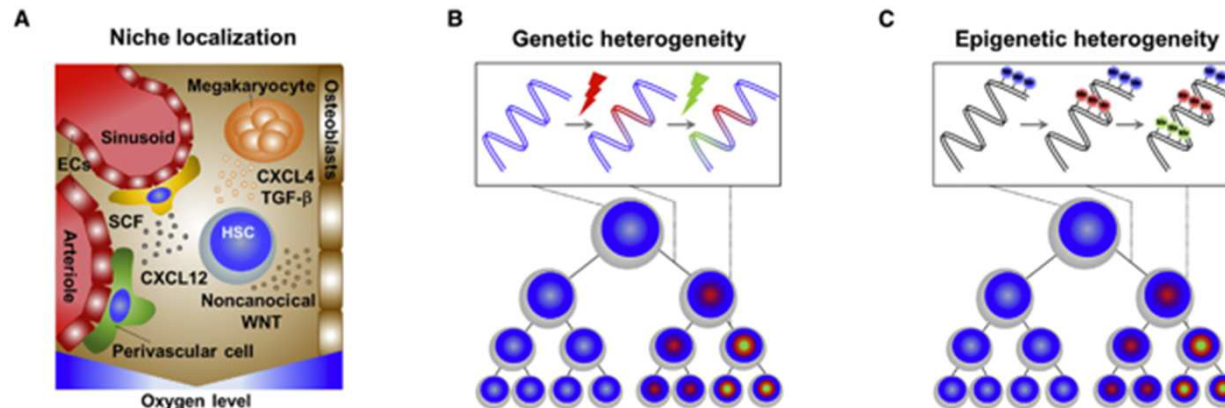
Hématopoïèse : hétérogénéité des CSH

- **Déterminants extrinsèques :**

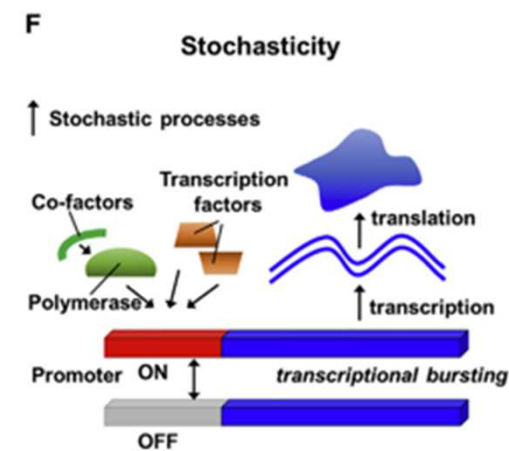
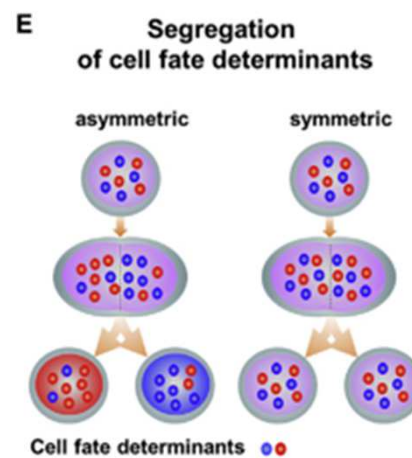
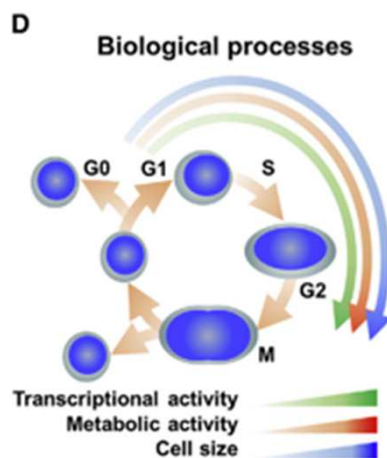
- Microenvironnement médullaire / niche : cytokines, contact cellules-cellules, propriétés biochimiques et biophysiques de la niche (ex: rigidité de la matrice extracellulaire)
- Signalisation paracrine et juxtacrine

- **Déterminants intrinsèques :**

- Anomalies génétiques
- Anomalies épigénétiques : modifications de la configuration / accessibilité de la chromatine +++



- **Etat cellulaire (cycle)** : activité métabolique, transcriptionnelle, taille de la cellule
 - Phase G0/ quiescence / faible production de ROS / protection contre les dommages de l'ADN
 - Influence le biais de lignage (« priming » lymphoïde)
- **Divisions asymétriques** : division asymétrique de certains facteurs cellulaires qui déterminent le « destin » des HSC
- **Stochasticité** : transcrits et protéines issues de cellules « identiques » peuvent beaucoup varier

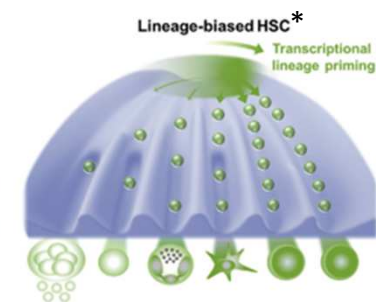
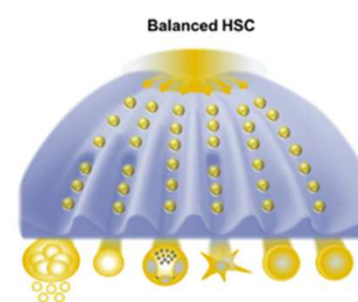
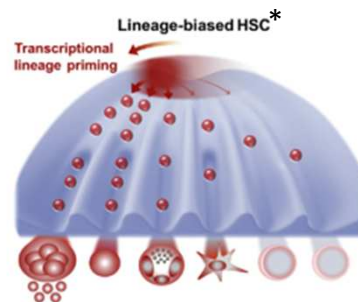
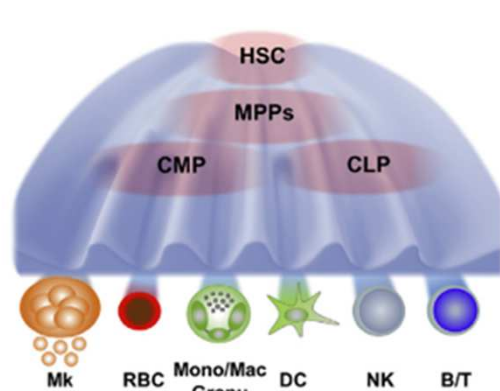


- **Hétérogénéité moléculaire et fonctionnelle des CSH :**

- **Biais de différenciation** : « myeloid », « lymphoid » ou « megakaryocytic-biased HSC » (barcoding in situ)
- **« Transcriptional lineage priming »** : présence de profils d'expression spécifiques de lignages (single cell RNA seq)
- **Biais fonctionnel** : « transcriptional lineage priming » est corrélé au biais fonctionnel de lignage (analyse fonctionnelle en single cell)

Hématopoïèse : nouveau modèle de différenciation

- Les CSH ne « sautent » pas d'un état transcriptionnel stable à un autre mais changent progressivement :
 - Perte progressive de la plasticité aboutissant à un engagement dans la différenciation
 - Acquisition progressive de programmes transcriptionnels spécifiques de lignées
- **Etats transitoires et non stables / notion de continuum**
- Possibilité de transition dans les 2 sens



* : Conservent leur potentiel de multipotence

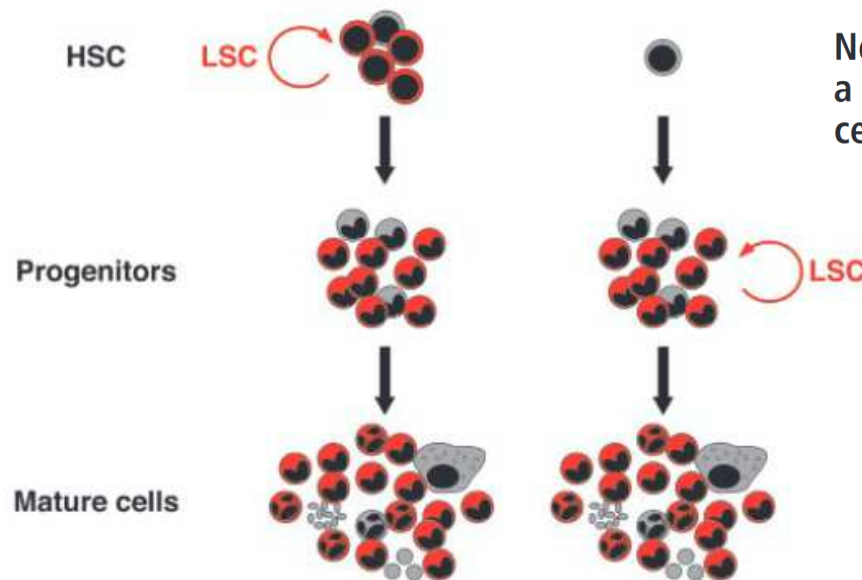
Haas, Cell Stem Cell, 2018

Conséquences sur l'hématopoïèse pathologique

- Hétérogénéité des CSH :
 - Evolution vers une **hémopathie** (myéloïde ou lymphoïde)
 - Phénomènes de **résistance au traitement et de rechute**
 - Développement d'une **hématopoïèse clonale** avec l'âge par l'accumulation d'anomalies génétiques

Hématopoïèse leucémique

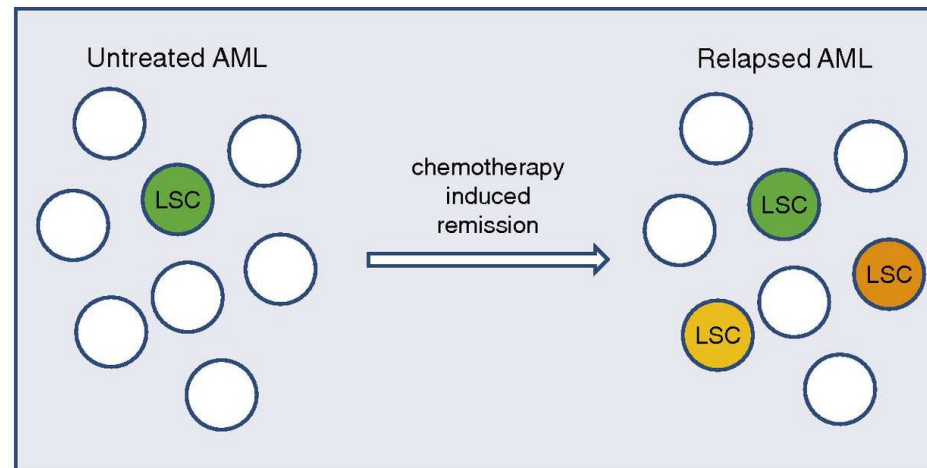
- Hématopoïèse associée au développement des leucémies
- Dérive d'un petit contingent de **cellules souches leucémiques (LSCs)**
- LSCs :
 - **Rares ++**
 - Population **hétérogène** de cellules leucémiques, provenant de la transformation de **CSH** ou de **cellules myéloïdes progénitrices**



Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?

Passégué, PNAS, 2003
 Bonnet, BJH, 2005
 Wang, Mol Ther, 2017
 Löwenberg, Blood, 2017,

- Hétérogénéité phénotypique, génétique, épigénétique et fonctionnelle
- Propriétés d'**autorenouvellement, de quiescence cellulaire et de chimiorésistance**



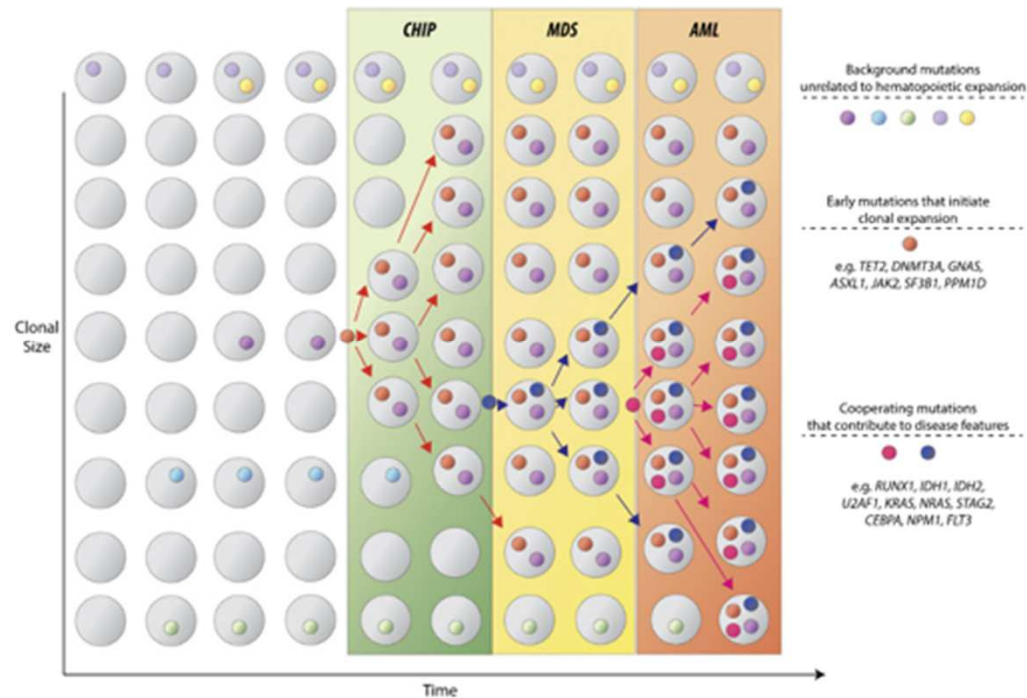
- Quiescence => résistance aux traitements cytotoxiques standards
- **Ciblage thérapeutique difficile**

- **Phénotype aberrant** : expression du CD123 (interleukin-3 receptor α) au sein du compartiment CD34+/CD38-
=> anticorps monoclonal anti-CD123
- **Propriété métaboliques différentes** (phosphorylation oxydative, activation of NF- κ B...)
=> anti BCL2, inhibiteurs d'IDH2
- **Propriétés épigénétiques différentes**
- => inhibiteurs de BET, EZH2

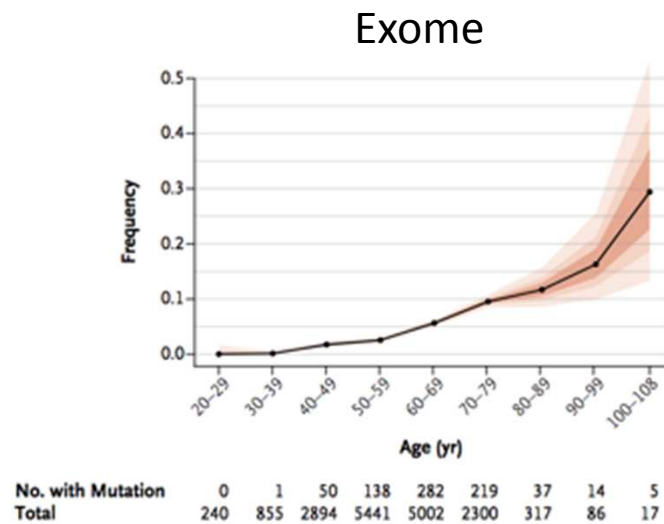
Hématopoïèse clonale et CHIP

Hématopoïèse clonale : définition

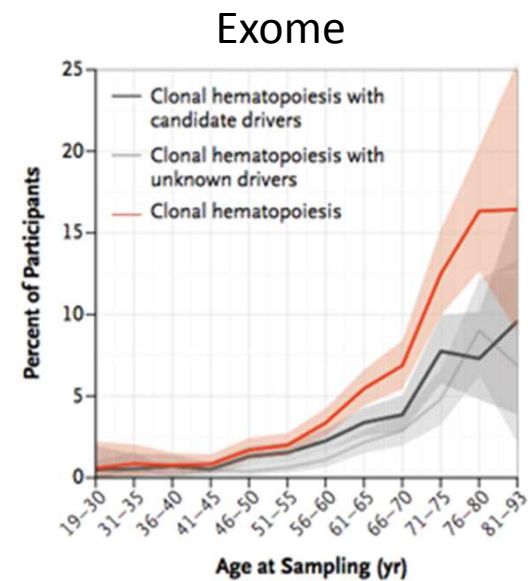
Présence d'un clone (caractérisé par une ou plusieurs mutations partagées) qui contribue de façon plus importante et disproportionnée à la production des cellules sanguines matures



- 10% des plus de 70 ans sont porteurs de mutations pouvant prédisposer au développement d'hémopathies

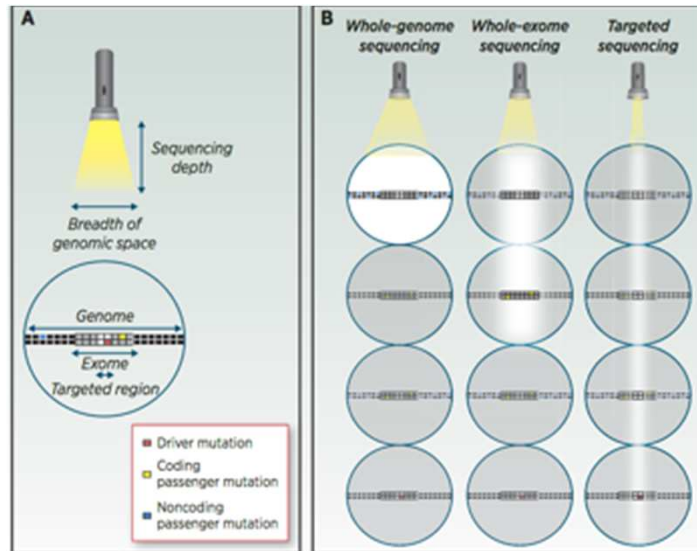


Jaiswal, NEJM, 2014



Genovese, NEJM, 2014

Techniques de détection



Limites de détection (profondeur) :

- **Exome : 0,07%**
- **Reséquençage ciblé : 0,0003%**

Gibson & Steensma, Clin Cancer Res, 2018

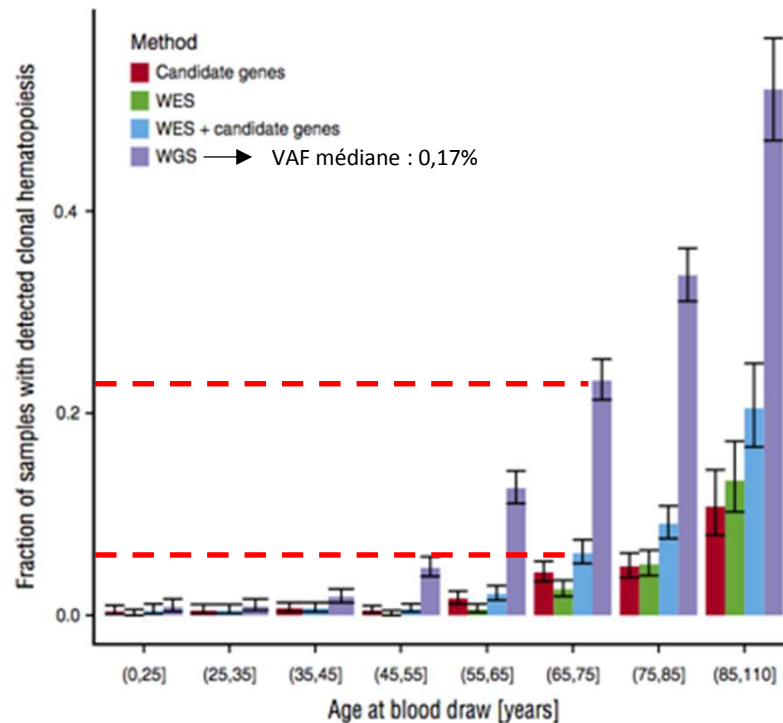
- Reséquençage ciblé (seuil de VAF : 0,0003%)
- 20 patients avec échantillons disponibles à 10 ans d'intervalle (time point 1 : range 51-65 ans, time point 2: 63-76 ans)
- **À 60 ans, 95%** présentaient des mutations dans des gènes associés aux LAM (ex : *TET2*, *DNMT3A*, etc...) => **hématopoïèse clonale** (≠ CHIP)

Young, Nat commun, 2016

- WGS : couverture plus importante / pas uniquement ciblé sur séquences codantes ou gènes candidats

Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly

Florian Zink,^{1,*} Simon N. Stacey,^{1,*} Gudmundur L. Norddahl,¹ Michael L. Frigge,¹ Olafur T. Magnusson,¹ Ingileif Jonsdottir,^{1,3} Thorgeir E. Thorgeirsson,¹ Asgeir Sigurdsson,¹ Sigurjon A. Gudjonsson,¹ Julius Gudmundsson,¹ Jon G. Jonasson,^{2,4} Laufey Tryggvadottir,⁴ Thorvaldur Jonsson,^{2,3} Agnar Helgason,^{1,5} Arnaldur Gylfason,¹ Patrick Sulem,¹ Thorunn Rafnar,¹ Unnur Thorsteinsdottir,^{1,3} Daniel F. Gudbjartsson,^{1,6} Gisli Masson,¹ Augustine Kong,¹ and Kari Stefansson^{1,3}

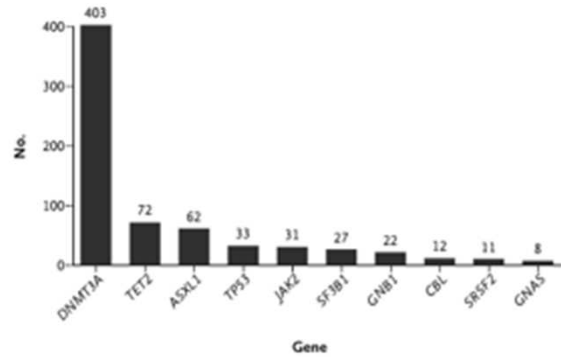


Hématopoïèse clonale :

- Associée à un taux de mortalité plus élevé et à un risque plus important d'hémopathie
- Mais dans la majorité des cas, **non liée à une mutation dans un gène candidat**

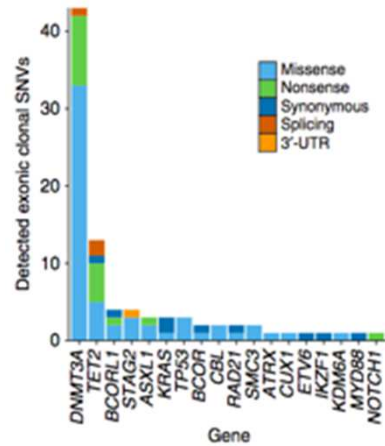
Mutations

Exome



Jaiswal, NEJM, 2014

Reséquençage ciblé



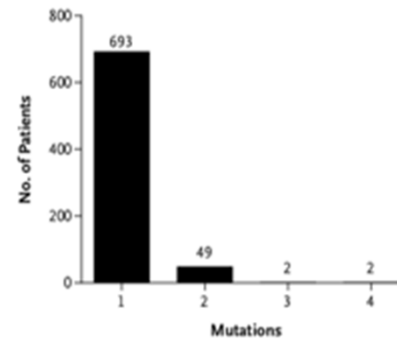
Young, Nat commun, 2016

WGS

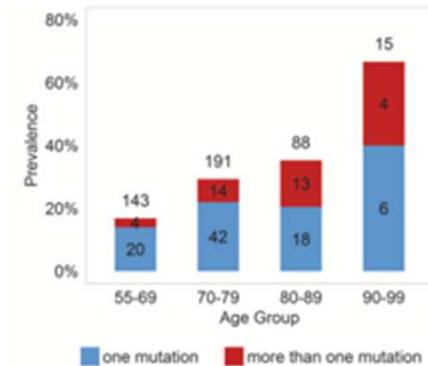
Mutation impact and gene symbol	Number of nonoutliers with mutation in gene*	Number of WGS outliers with mutation in gene†	P value‡	OR
High and moderate				
DNMT3A	39	105	6.6×10^{-64}	20.36
TET2	21	85	7.8×10^{-50}	30.18
ASXL1	27	23	5.0×10^{-9}	6.07
PPMTD	16	16	2.6×10^{-7}	7.09
SRSF2	0	5	3.0×10^{-5}	Inf
PRKCG	5	8	4.1×10^{-5}	11.30
ATM	59	24	6.3×10^{-5}	2.89
MTA2	4	7	9.6×10^{-5}	12.35

Zink, Blood, 2017

- Une seule mutation dans la plupart des cas
- Mais accumulation de plusieurs mutations avec l'âge



Jaiswal, NEJM, 2014

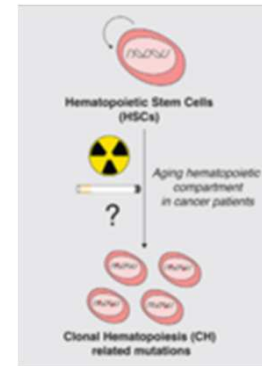


Arends, Leukemia, 2018

Hématopoïèse clonale : physiopathologie

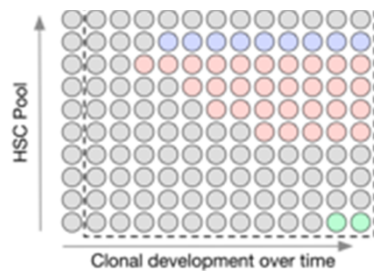
- Causes principales de stress mutagénique :

- Chimiothérapie / Radiothérapie
- Age
- Consommation tabagique



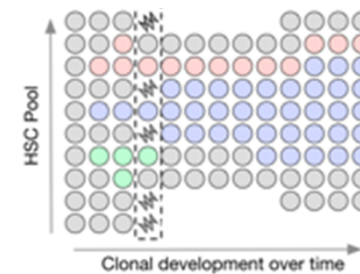
- Pressions de sélection qui permettent **l'expansion du clone**

Aging-associated selective pressure



TET2, DNMT3A, ASXL1

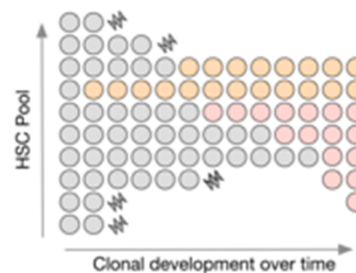
Therapy-associated selective pressure



TET2, DNMT3A, ASXL1

TP53 PPM1D, ATM, CHEK2

Immune-mediated clonal selection



TET2, DNMT3A, ASXL1

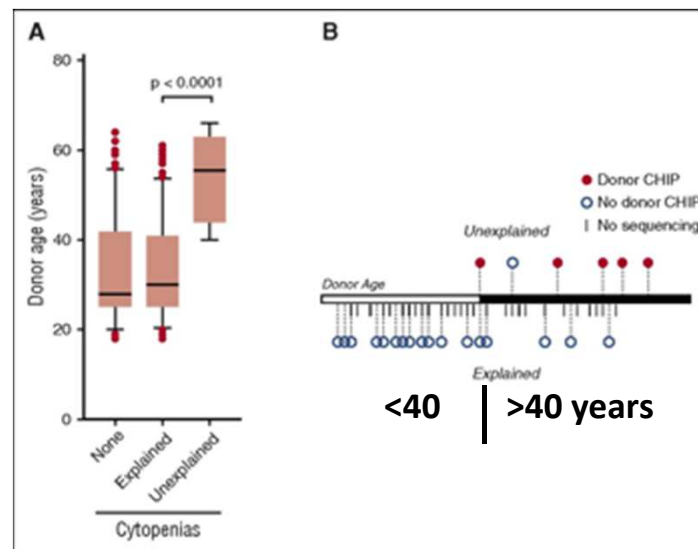
BCOR, BCORL1, PIGA

- No somatic variant
- *TP53 / PPM1D*
- *DNMT3A / TET2 / ASXL1*
- *IDH1/2*
- *BCOR / BCORL1 / PIGA*
- ✱ Apoptosis
- Differentiation

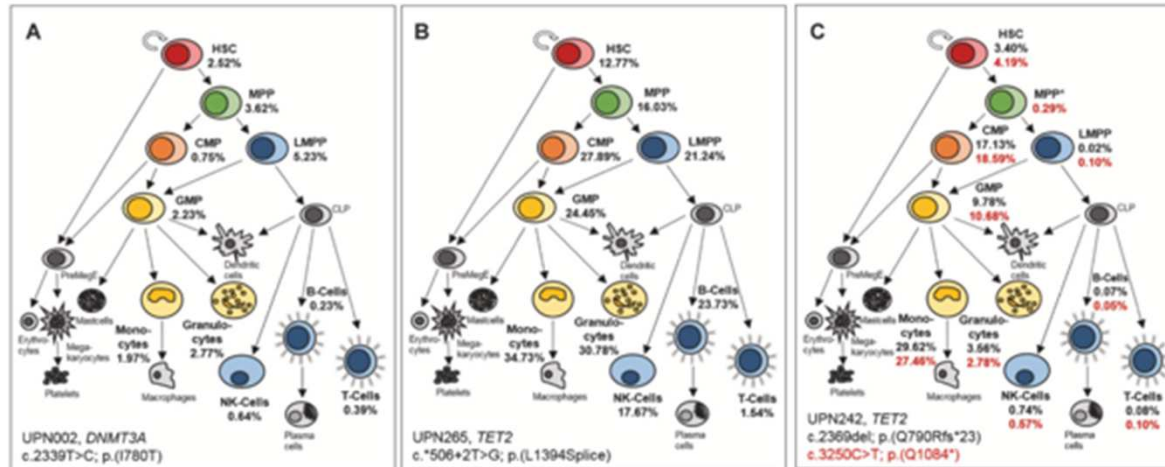
Hématopoïèse clonale : origine cellulaire

- **CSH ou progéniteur précoce**

- Mutations sont observées de **manière durable et à plusieurs timepoints** (Young, Nat commun, 2016)
- CHIP peut être observée en cas d'allogreffe de moelle osseuse / **CHIP issue du donneur**



Deep targeted sequencing

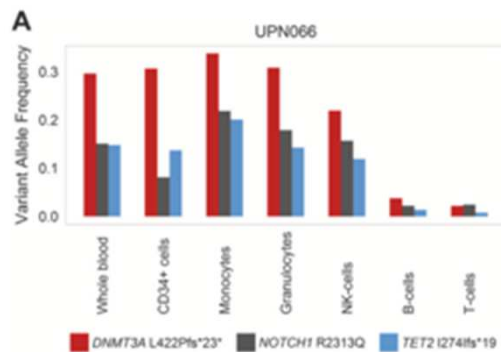


Expansion faible

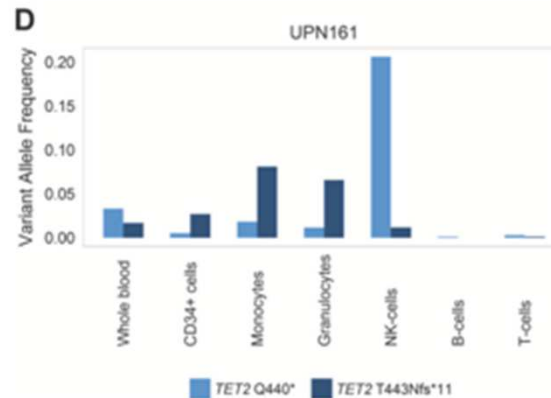
Expansion modérée

Expansion forte

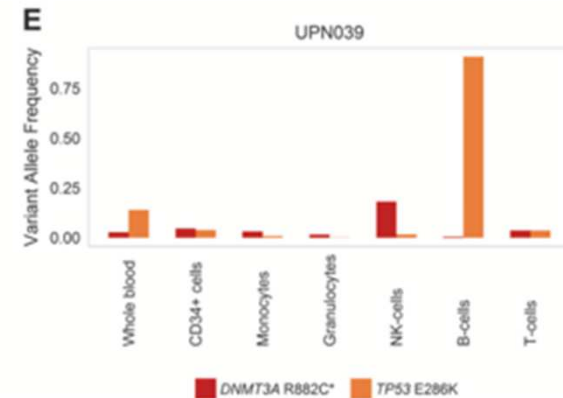
Pour la plupart des patients, l'expansion se fait entre HSC et CMP



Même clone



2 clones indépendants



Si plusieurs mutations, plusieurs scénarios possibles

Définition CHIP

Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential (CHIP)

- Features:

- Absence of definitive morphological evidence of a hematological neoplasm
- Does not meet diagnostic criteria for PNH, MGUS or MBL
- Presence of a somatic mutation associated with hematological neoplasia at a variant allele frequency of at least 2% (e.g., *DNMT3A*, *TET2*, *JAK2*, *SF3B1*, *ASXL1*, *TP53*, *CBL*, *GNB1*, *BCOR*, *U2AF1*, *CREBBP*, *CUX1*, *SRSF2*, *MLL2*, *SETD2*, *SETDB1*, *GNAS*, *PPM1D*, *BCORL1*)
- Odds of progression to overt neoplasia are approximately 0.5-1% per year, similar to MGUS

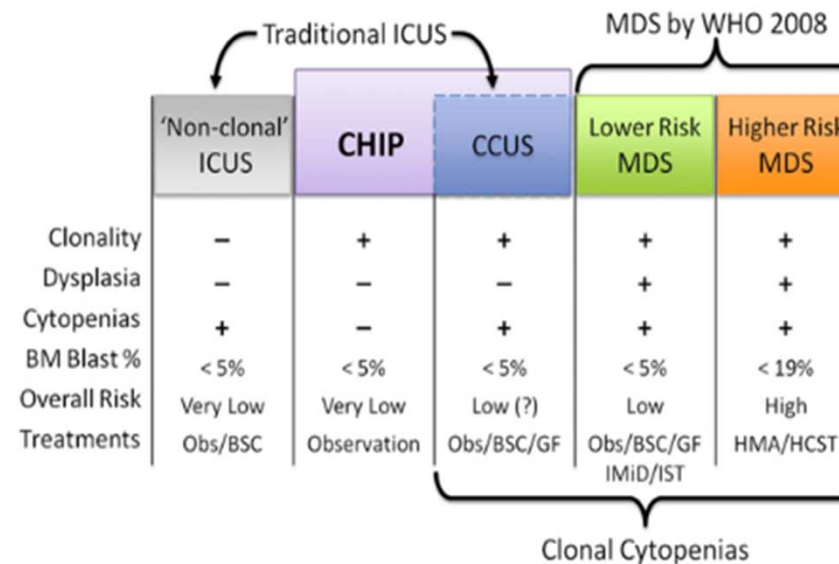
Cut-off = 2%

Plusieurs entités clinico-biologiques

Table 1. Acronyms describing clonal hematopoiesis and related conditions

Acronym	Condition	Description/Definition
ARCH	Aging related clonal hematopoiesis	Describes the presence of detectable, benign clonal hematopoiesis (defined by the presence of somatic mutations in the blood or bone marrow) whose incidence increases with age. No formal definition involving clonal abundance or types of mutations. No clinical significance is implied.
CHIP	Clonal hematopoiesis of indeterminate potential	Defined by somatic mutations of myeloid malignancy-associated genes in the blood or bone marrow present at $\geq 2\%$ variant allele frequency in individuals without a diagnosed hematologic disorder.
CHOP	Clonal hematopoiesis of oncogenic potential	Describes clonal hematopoiesis in a clinical context where it is associated with a significant likelihood of progressing to a frank malignancy.
IDUS	Idiopathic dysplasia of undetermined significance	Individuals with unexplained morphologic dysplasia of blood cells who are not cytopenic. Can occur with or without clonal hematopoiesis.
ICUS	Idiopathic cytopenia of undetermined significance	Patients with one or more unexplained cytopenias who do not meet diagnostic criteria for myelodysplastic syndrome or another hematologic disorder. Can occur with or without clonal hematopoiesis although often used to refer to cytopenias without evidence of clonal hematopoiesis.
CCUS	Clonal cytopenia of undetermined significance	Patients with one or more unexplained cytopenias who do not meet diagnostic criteria for myelodysplastic syndrome or another hematologic disorder, but who have somatic mutations of myeloid malignancy-associated genes in the blood or bone marrow present at $\geq 2\%$ variant allele frequency. Can be considered as the intersection between CHIP and ICUS.

Bejar, Leukemia, 2017



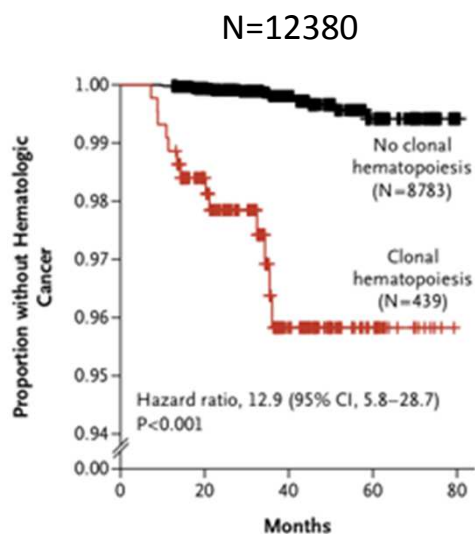
Steensma, Blood, 2015

Hématopoïèse clonale : variables cliniques

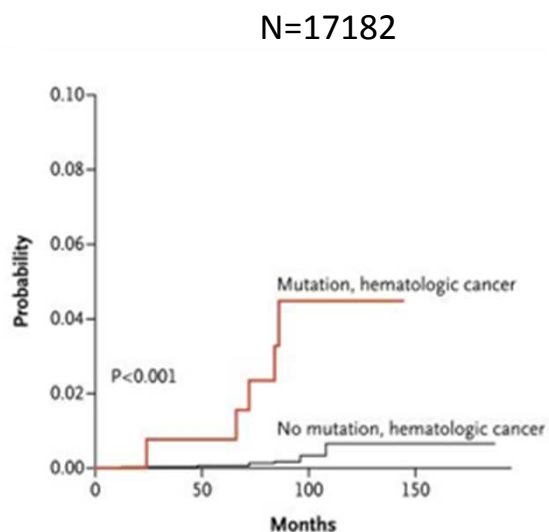
Table 1. Associations between CH and CH-PD and Clinical Variables

	Overall	CH	No CH	p value	CH-PD	No CH-PD	p value
Number of patients	5,649	1,353	4,296	-	246	5,403	-
Age (y)	58.3	66.1	55.8	<0.001	69.1	57.8	<0.001
Gender (% male)	49	50	49	0.40	48	49	0.89
Race							
White (%)	81	25	75	0.002 ^a	5	95	0.18 ^a
Black (%)	6	20	80	-	2	98	-
Other (%)	13	20	80	-	4	96	-
Cancer category							
GI (%)	22	24	76	0.06 ^b	4	96	0.039 ^b
GU (%)	18	25	75	-	3	97	-
Lung (%)	16	27	73	-	6	94	-
Breast (%)	13	21	79	-	3	97	-
Sarcoma (%)	8	21	79	-	4	96	-
Gynecological (%)	5	24	76	-	4	96	-
Other (%)	19	24	76	-	5	95	-
Hematologic parameters							
WBC	7.1	7.4	7.1	0.008	7.5	7.1	0.15
ANC	5.03	5.23	4.97	0.023	5.39	5.02	0.12
AMC	0.46	0.50	0.45	<0.001	0.51	0.46	0.029
ALC	1.35	1.36	1.35	0.51	1.31	1.35	0.38
NLR >4 (%)	38	40	38	0.11	44	38	0.062
Hemoglobin	12.4	12.4	12.5	0.12	12.3	12.4	0.19
RDW (%)	14.7	14.8	14.6	0.096	14.9	14.7	0.047
MCV	90.2	91.2	89.9	<0.001	92.1	90.1	<0.001
Platelet count	254	249	256	0.029	242	255	0.065
RBC transfusion (%)	22	21	22	0.69	22	22	0.91
Platelet transfusion (%)	6	4	6	0.011	5	6	0.83
Growth factor (%)	28	27	28	0.70	27	28	0.79
Associations with prior toxic exposures							
Current or former smoker (%)	46	53	44	<0.001	55	46	0.004
Prior chemotherapy (%)	64	64	64	0.89	60	64	0.24
Prior RT (%)	37	41	35	<0.001	44	37	0.021

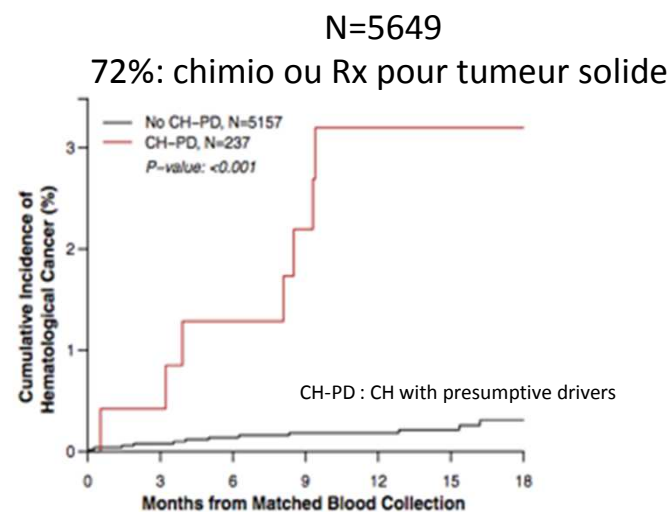
Hématopoïèse clonale : risque d'hémopathie



Genovese, NEJM, 2014



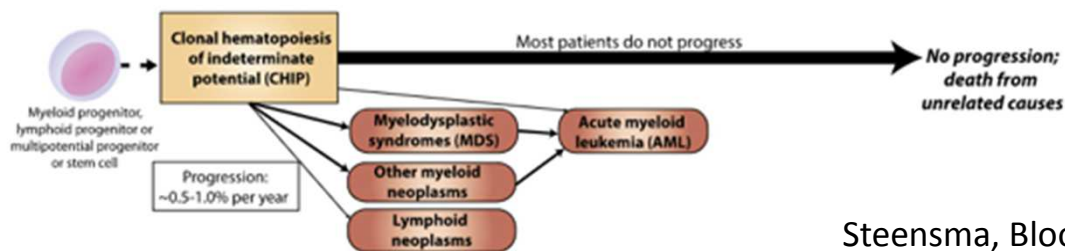
Jaiswal, NEJM, 2014



Coombs, Cell Stem Cell, 2017

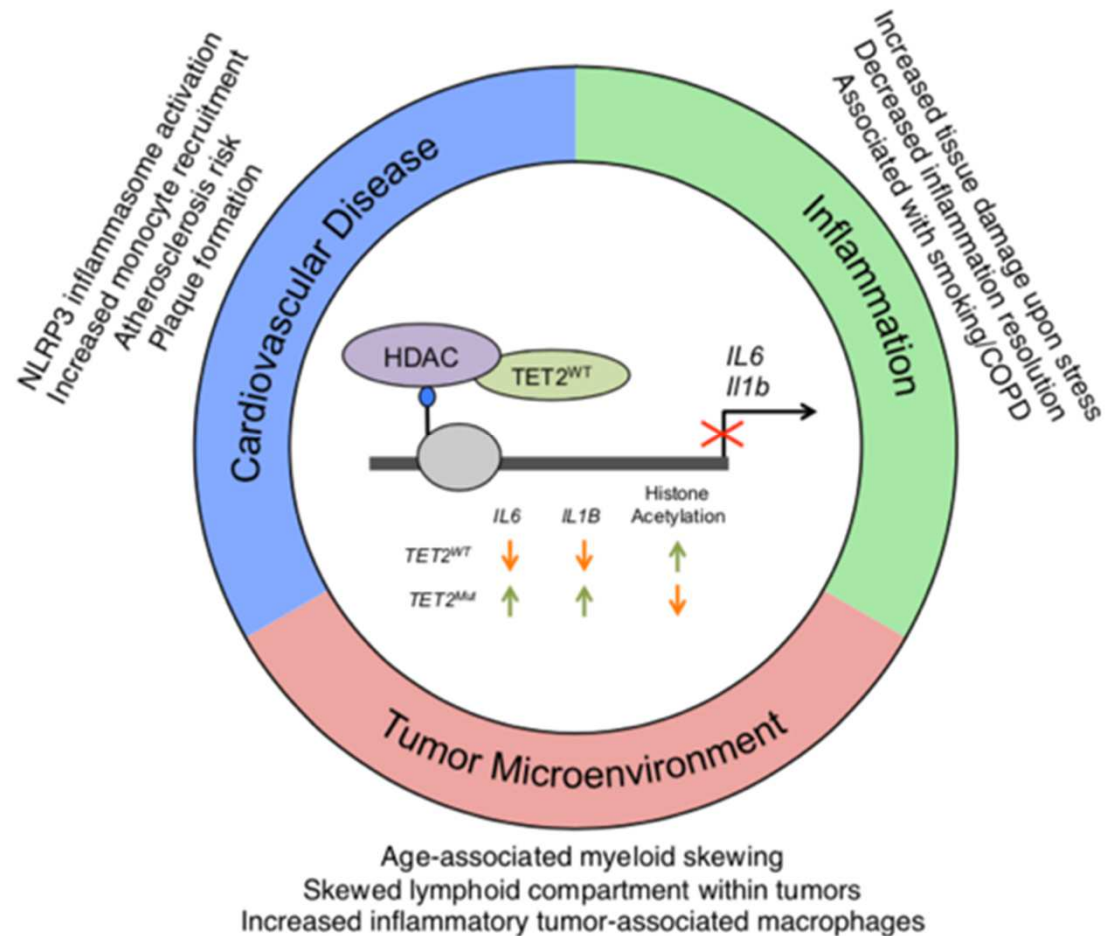
- Risque de développer une hémopathie chez les patients porteurs de CH:
 - **Risque relatif multiplié par 4 à 15**
 - **Risque absolu très faible : 0,5% à 1% par an** / Identique au risque de développer un myélome chez patients avec MGUS

- Quel type d'hémopathie ?
 - **Myéloïde (MDS, LAM)**
 - Lymphoïde ?

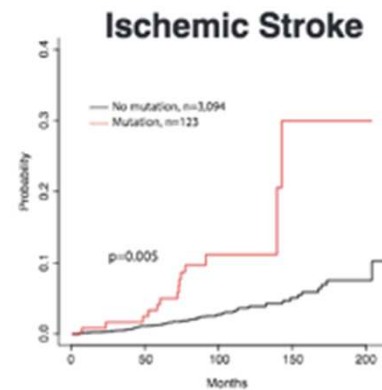
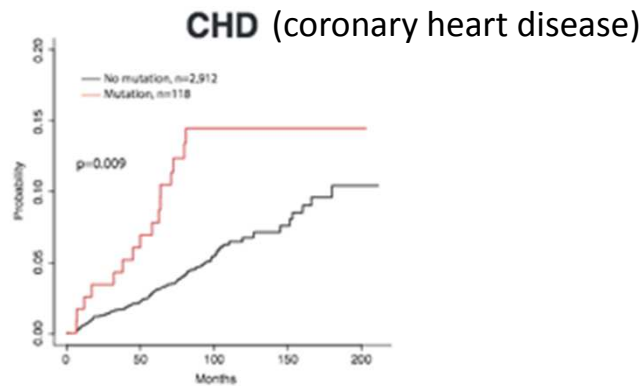


Steensma, Blood 2015

Hématopoïèse clonale et maladies non hématologiques

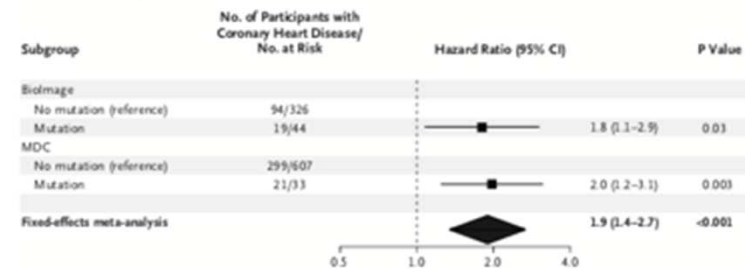


CHIP et maladies cardio-vasculaires

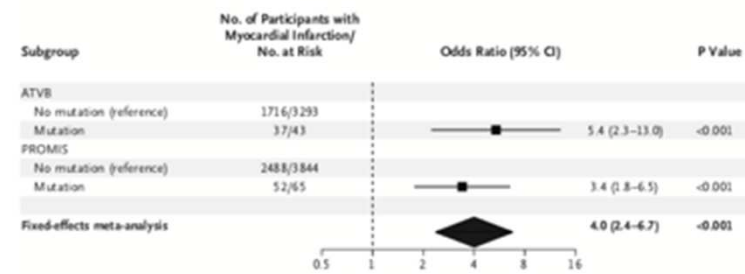


Jaiswal, NEJM, 2014

A CHIP and Coronary Heart Disease



B CHIP and Early-Onset Myocardial Infarction



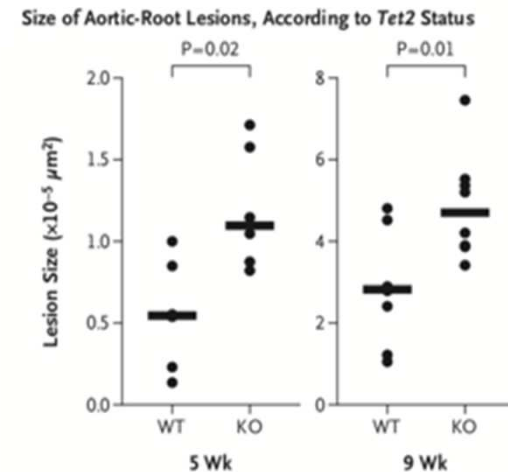
- Risque de **maladie coronarienne** multiplié par **1,9** (IC 95%: 1,4 à 2,7; p<0.001)
- Risque d'**IDM précoce** multiplié par **4** (IC 95%: 2,4 à 6,7; p<0.001)

Jaiswal, NEJM, 2017

Modèles murins : CHIP et maladies cardio-vasculaires

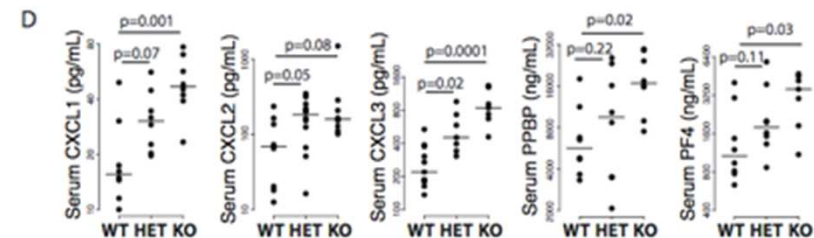
- Greffe de moelle de souris *Tet2*^{-/-} dans souris irradiées *Ldlr*^{-/-}
- Régime riche en cholestérol

- **Augmentation de la taille des lésions d'athérosclérose en l'absence de Tet2**

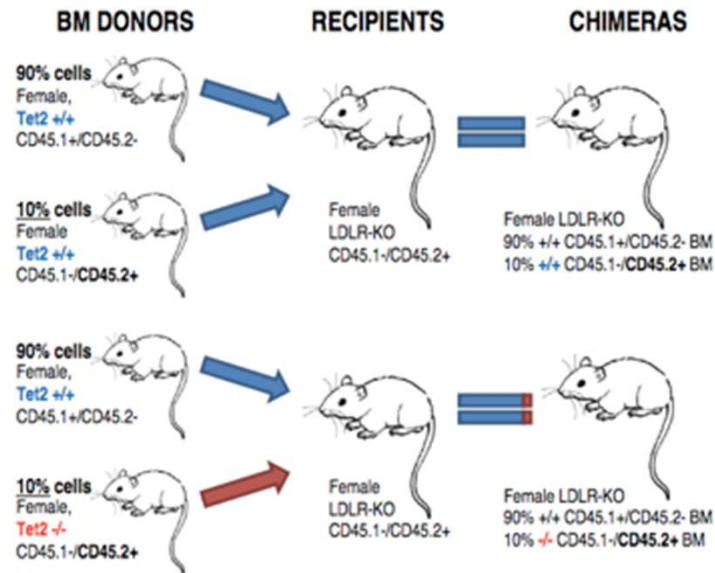


- Même résultats avec moelle *Tet2*^{+/-}
- Même résultats avec knock out *Tet2* uniquement **dans le compartiment myéloïde**

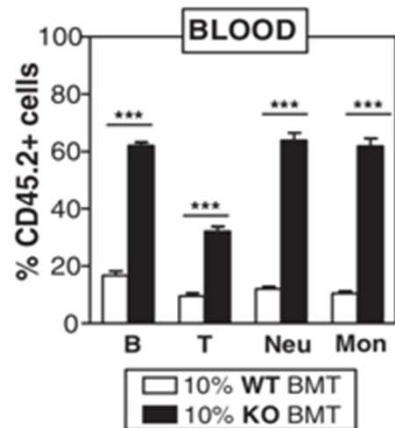
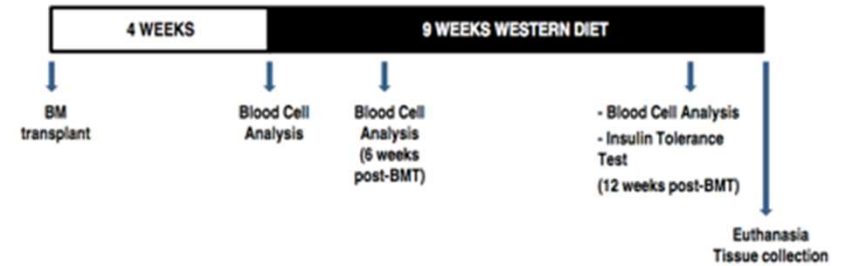
- **Expression augmentée des chimiokines CXC**
=> recrutement de monocytes / macrophages dans l'intima des artères
=> augmentation de l'athérosclérose



Modèle de CHIP

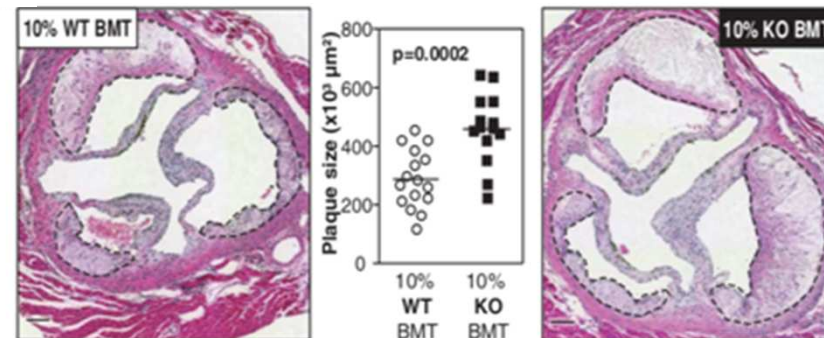


B

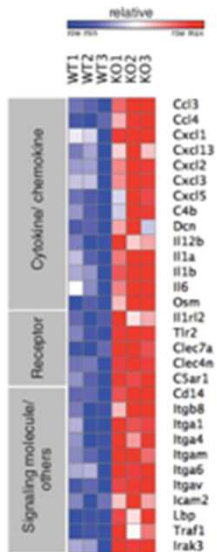


Expansion clonale des cellules *Tet2* $-/-$ dans tous les lignages

En présence d'un régime riche en cholestérol

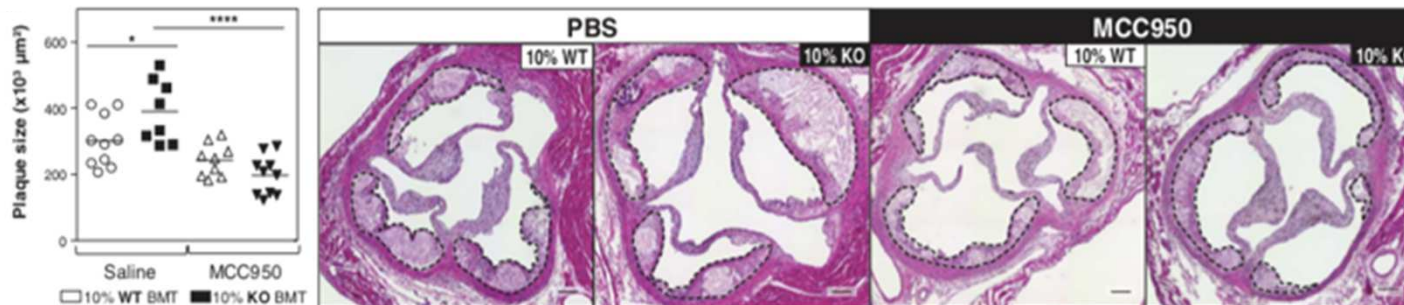
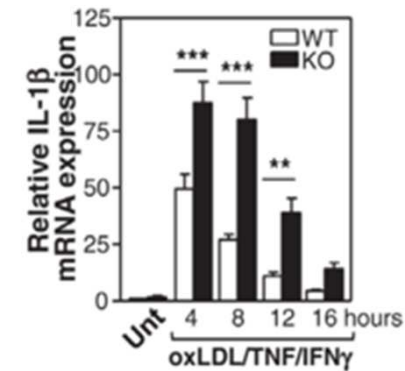


Augmentation de la taille des plaques d'athérosclérose



Augmentation de l'expression de **chimiokines et cytokines pro-inflammatoires** dans les macrophages *Tet2*^{-/-}

Augmentation de l'expression de l'IL1 β par modulation de l'inflammasome NLRP3

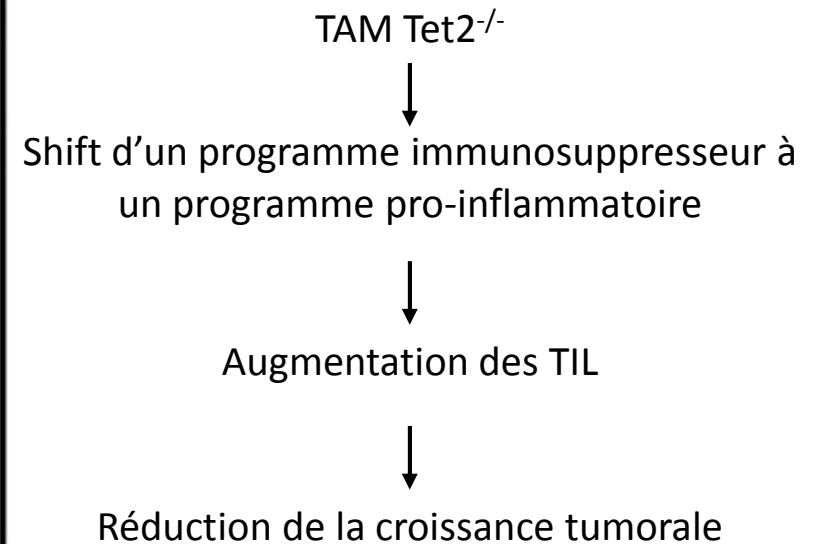
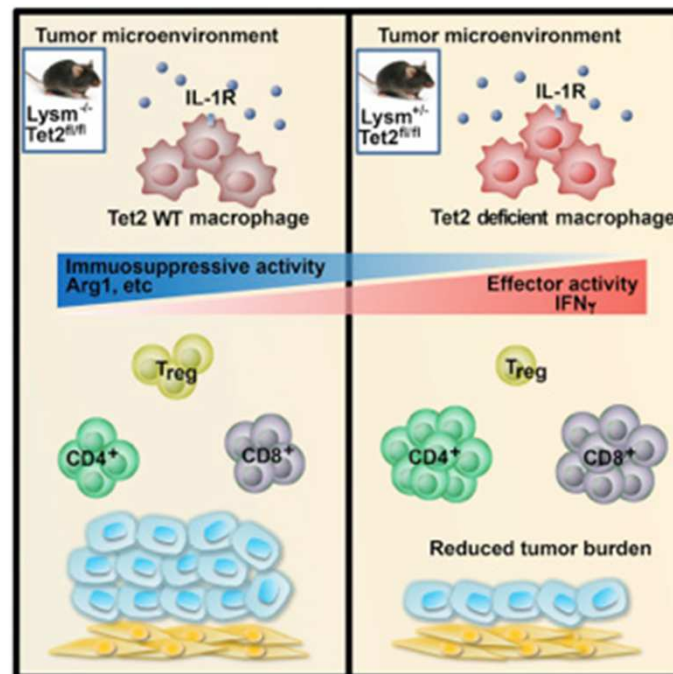


Effet de l'inhibiteur de l'inflammasome => protection contre la formation des plaques d'athérosclérose chez les souris *Tet2*^{-/-}

Hématopoïèse clonale et micro-environnement

- **Altérations du micro-environnement tumoral**
- Présence de mutations de CH dans le stroma de cancers du sein ou de la vessie
- **Accumulation de TILs au sein du microenvironnement tumoral** (Kleppe, NPJ Breast Cancer, 2015 ; Pan, Immunity, 2017)

Souris Tet2^{-/-}
(compartiment myéloïde)
+ mélanome



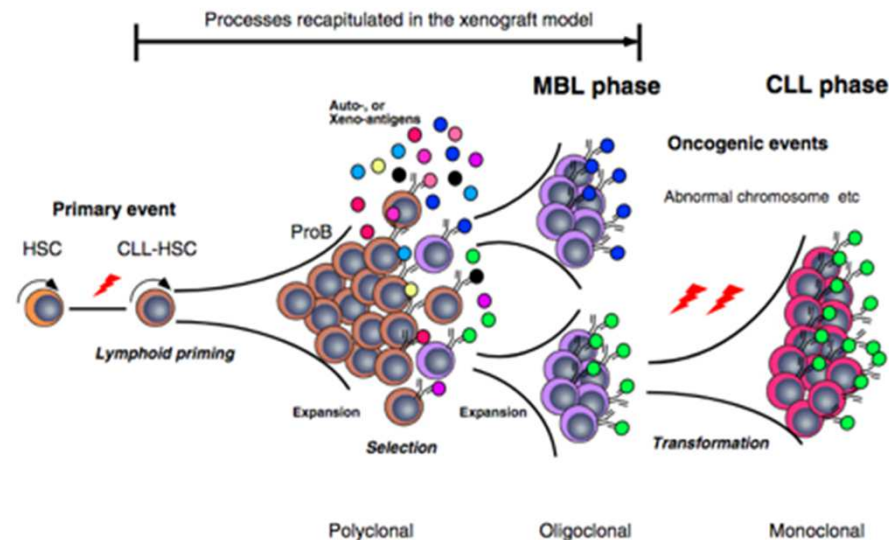
Hématopoïèse clonale : prise en charge

- **Pas de consensus**
- **A surveiller comme les MGUS ?**
- Mieux définir les groupes à risque d'évolution vers une hémopathie
- Quelle population screener ?
 - Population générale asymptomatique ?
 - A priori non : pas d'études, anxiété, pas de traitement efficace (Gibson & Steensma, Clin Cancer Res, 2018)
 - **Population ciblée ?**
 - Après traitement cytotoxique ? Dans le contexte d'aplasie médullaire ?
- Si oui, comment ?
 - Quelle profondeur ? Quelle technologie ?
 - Quelles anomalies ? Gènes candidats vs tous les gènes ?
 - Quel seuil de VAF considérer ? 2% ? Moins ?
- La recherche d'une CH doit-elle faire partie du **bilan systématique d'évaluation du risque cardiovasculaire ?**
- Si diagnostic de CHIP, intérêt des **traitements anti-inflammatoires ou hypolipémiants ?**

Hématopoïèse clonale et hémopathies lymphoïdes

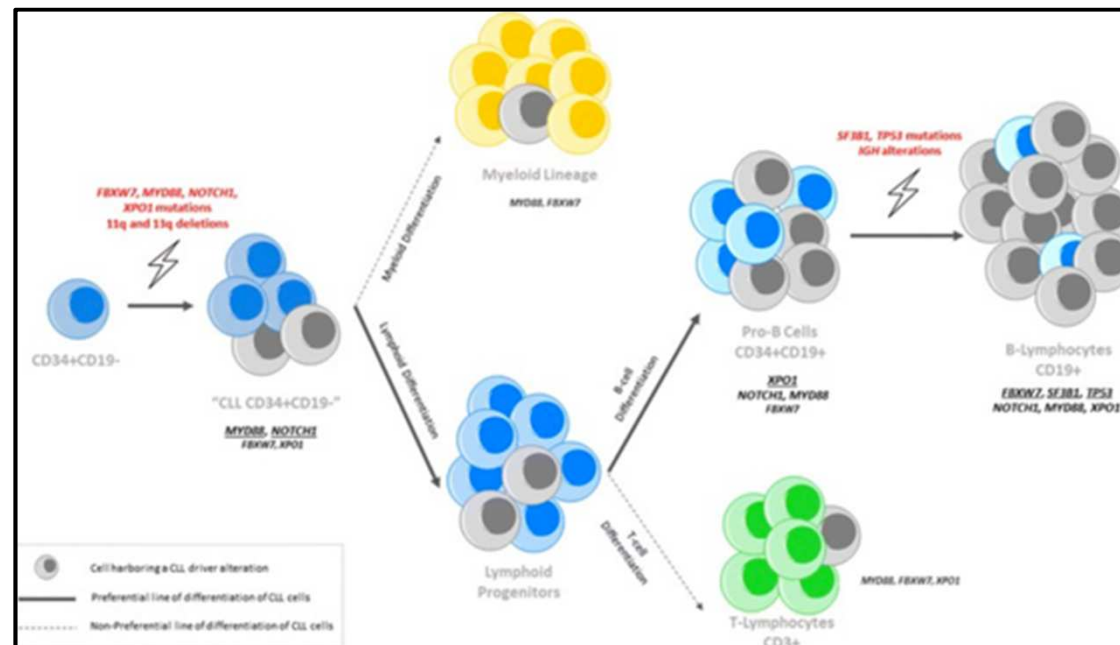
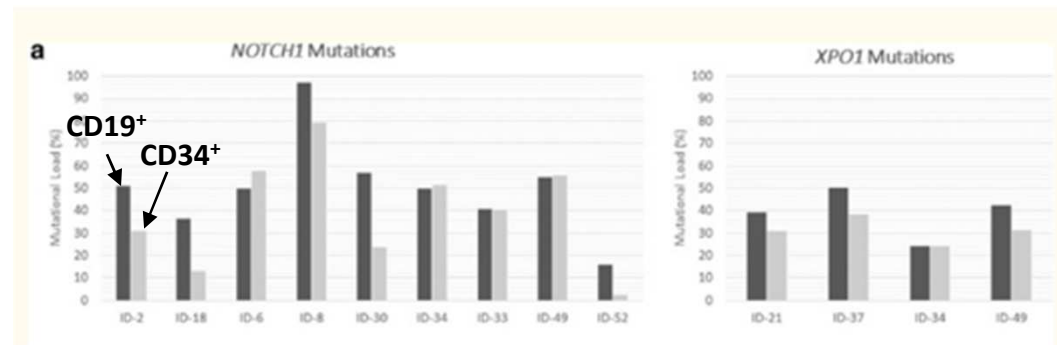
Atteinte de la CSH dans la LLC

- Moelle osseuse de patients atteints de LLC : proportion plus importante de progéniteurs pro-B CD10+CD19+ (x5 par rapport aux sujets contrôles)
- Greffe dans souris NSG de CSH de patients atteints de LLC => développement de clones B CD5+ ou CD5- (≠ contrôles où la proportion de cellules B CD5+ est très faible (<1%))
- Xénogreffes sériées de CSH de patients avec LLC : maladie transplantable avec à chaque passage, développement de clones B CD5+ et CD5-

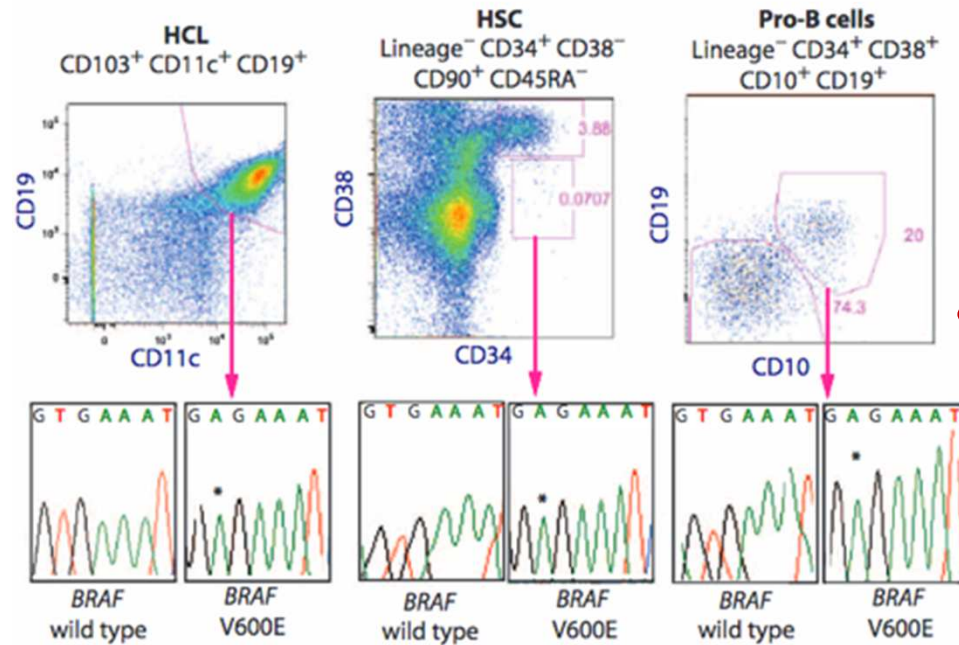


- Présence de **mutations acquises dans les progéniteurs multipotents** des patients atteints de LLC

(Damm, Cancer Discovery, 2014; Quijada-Álamo M, J Hematol Oncol, 2017)



Atteinte de la CSH dans la leucémie à tricholeucocytes



- **Présence de la mut BRAFV600E dans les cellules de HCL, CSH et Pro-B**

- Greffe de CSH mutées d'un patient HCL dans souris NSG
 - Prise de greffe => autorenouveaulement des CSH de HCL
 - **Développement d'une maladie de type HCL**

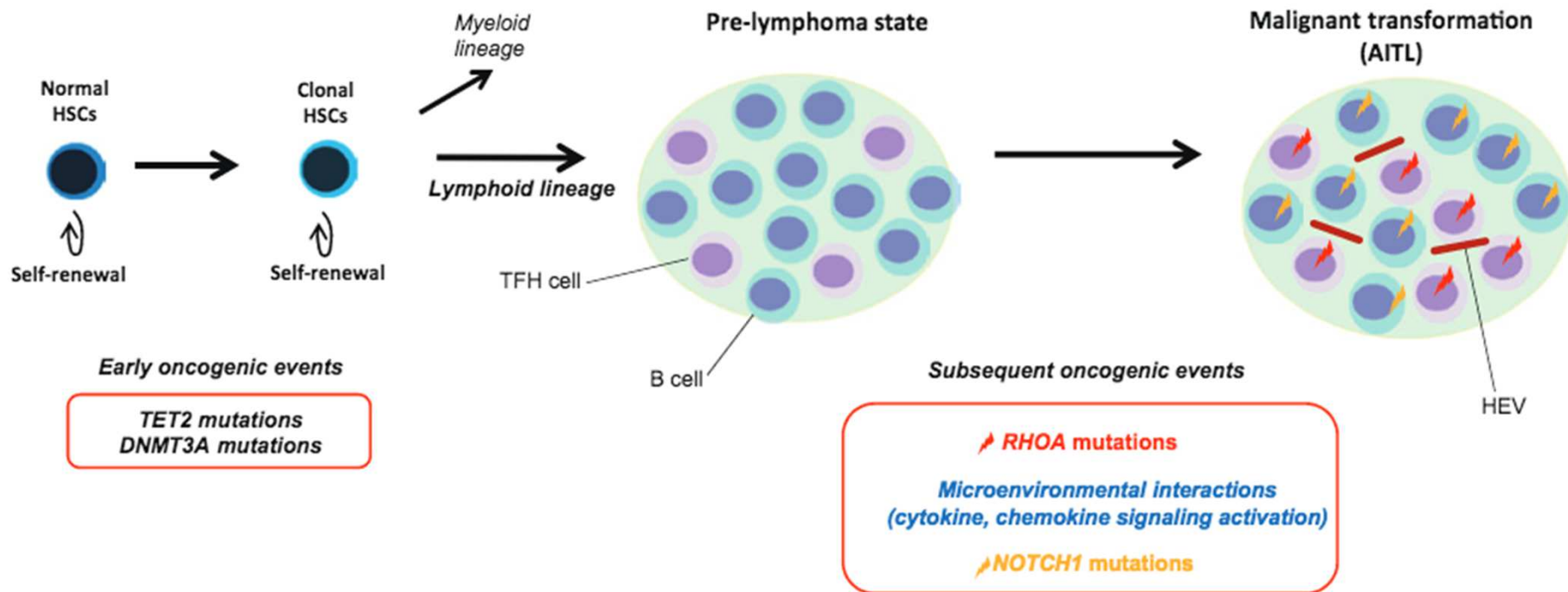
Atteinte de la CSH dans les lymphomes T périphériques

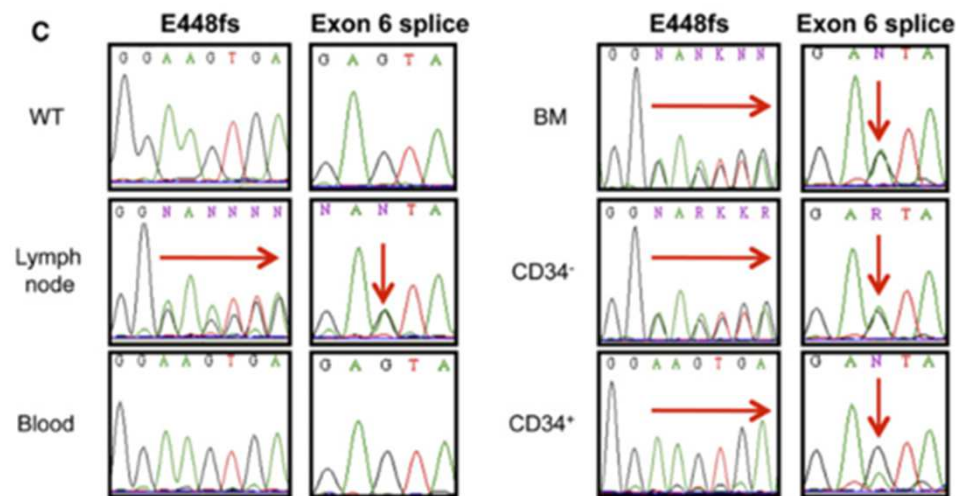
- Mutations de *TET2* et *DNMT3A* fréquentes dans les PTCL
- Présentes aussi dans les hémopathies myéloïdes (LMMC, SMP, LAM) et dans les CHIP
- Observées dans les CSH chez les patients avec hémopathies myéloïdes ou CHIP



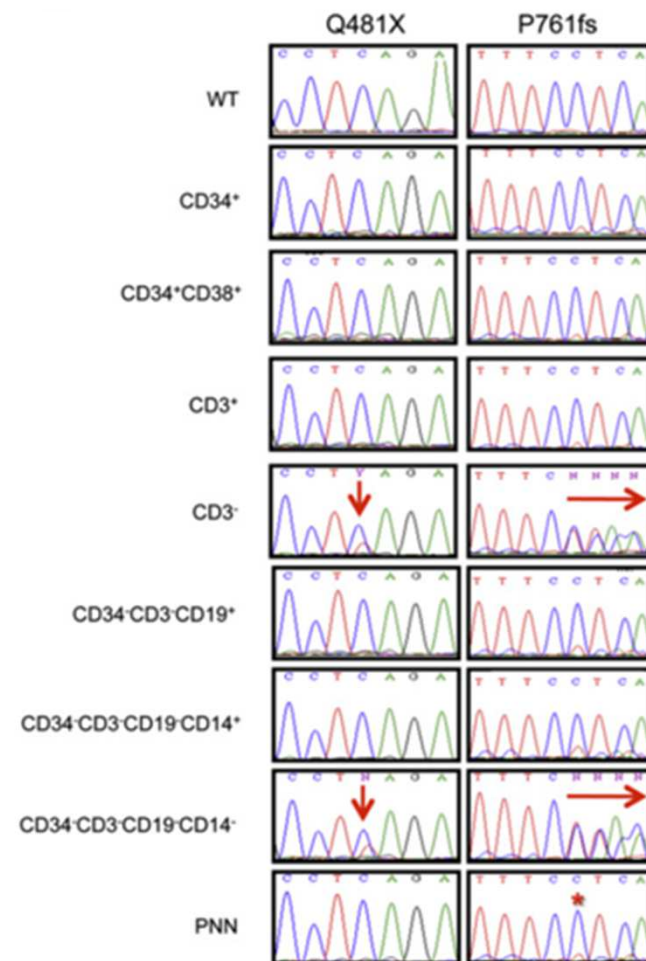
Atteinte de la CSH dans les hémopathies lymphoïdes T matures

Modèle d'oncogénèse multi-étapes

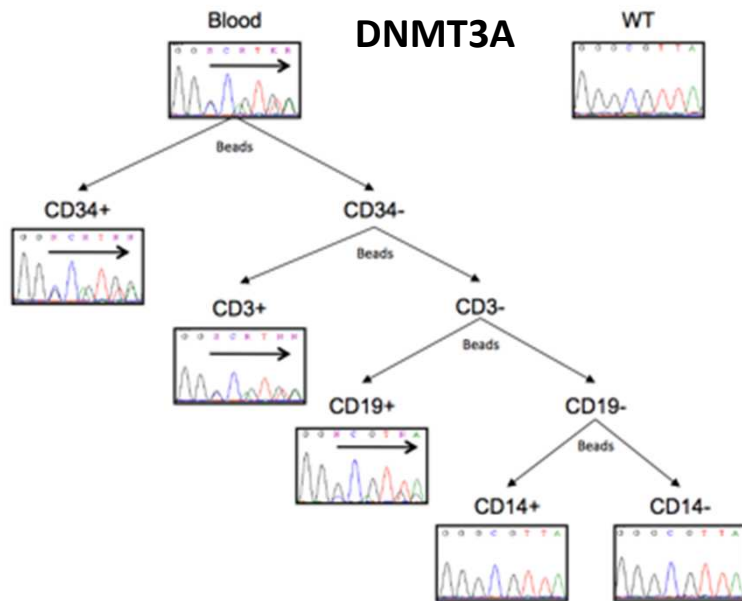




	E448fs/4663+1G>A	wt/4663+1G>A	wt/wt	Total
CD34 ⁺ CD38 ⁻	8	5	6	19
CD34 ⁺ CD38 ⁺	6	3	0	9
Total	14	8	6	28

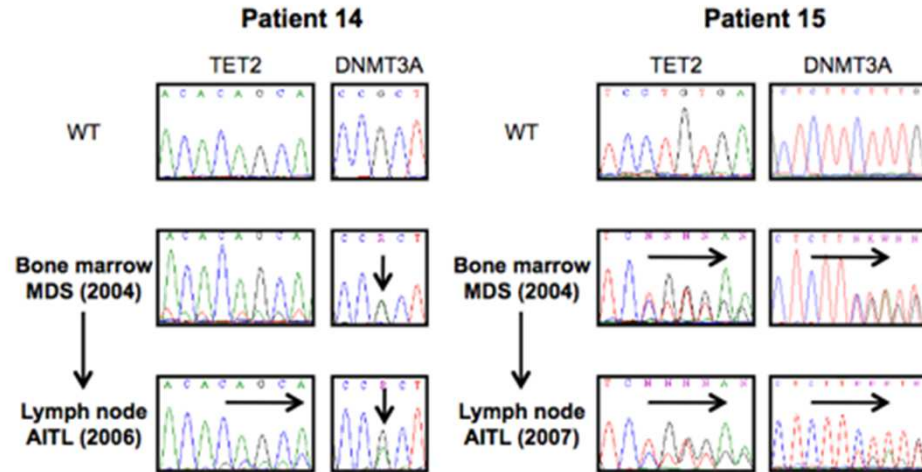


Les mutations de *TET2* sont observées dans les CSH de patients avec hémopathie lymphoïde T



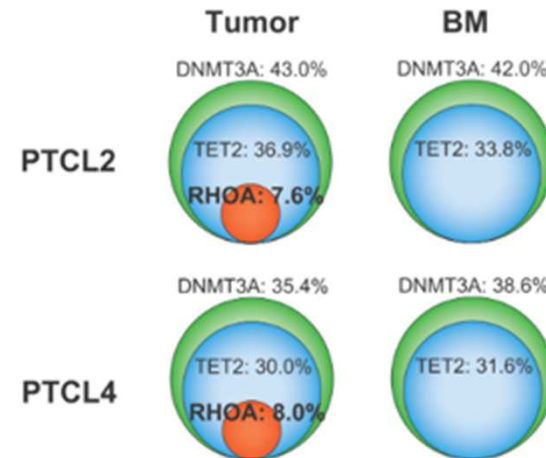
Les mutations de *DNMT3A* sont observées dans les CSH de patients avec hémopathie lymphoïde T

Couronné, NEJM, 2012



Double pathologie : MDS et AITL
Ancêtre commun

Couronné, NEJM, 2012

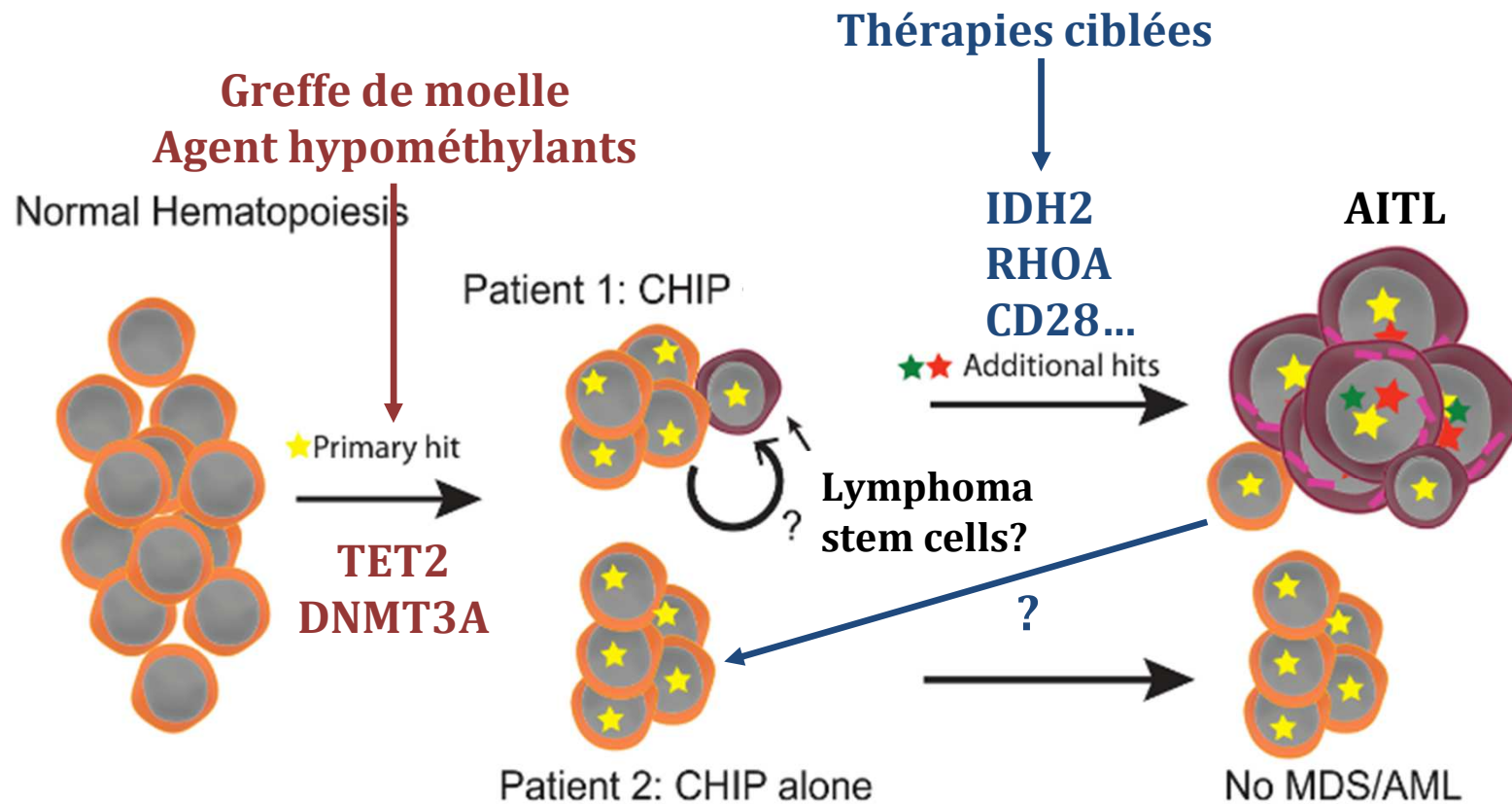


Mutations de *TET2* et *DNMT3A* surviennent dans des CSH/progéniteurs précoces

Sakata-Yanigomoto, Nat Genet, 2014

Conséquences sur la prise en charge

- Chimiothérapies de type CHOP / CHOEP => Survie à 5 ans ≈ 30%
- Autre stratégie thérapeutique ?



Nouvelles technologies

- Apport des nouvelles technologies pour la compréhension de l'hématopoïèse

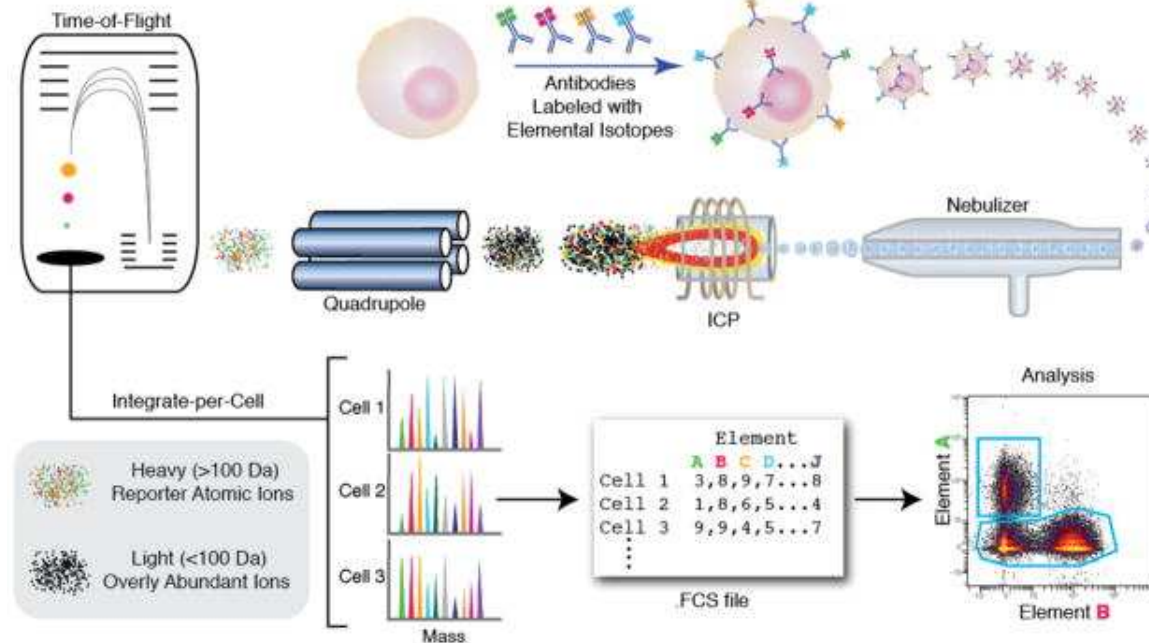
Table 1

Lineage tracing methods in the study of hematopoiesis

Approach	Utility in hematopoietic development
→ Mass cytometry (CyTOF)	Allows for simultaneous identification of multiple cell types from heterogeneous sample of blood
Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF)	Analyzes protein contents in samples and elucidates glycosylation patterns
→ Single-cell RNA sequencing CRISPR/Cas9-based genome editing	Investigates cell-to-cell variation at transcription level Used to knock out hematopoietic genes and the β -globin gene in human HSCs and allows for multiple genetic modifications
→ Polylox barcoding Multiplexed fluorescent labeling and sequencing	To study origin and clonal composition of HSCs The single-cell transplant data are coupled with single-cell gene expression analysis on different cells to resolve subpopulations with corresponding gene expression and repopulation potential
Tissue engineering & 3D scaffold development	Recreates 3D microenvironment conducive for HSC formation, expansion, development, and differentiation.

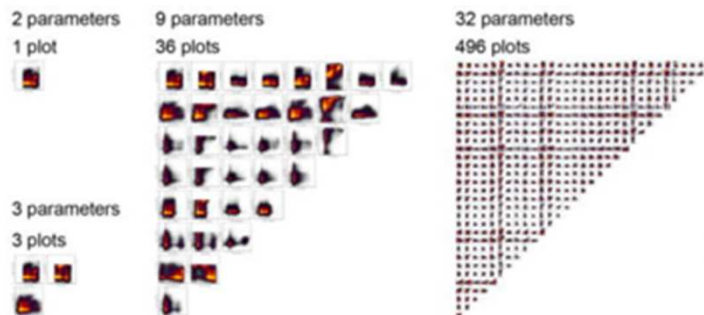
CYTOF / Cytométrie de masse

Métaux rares conjugués à des anticorps



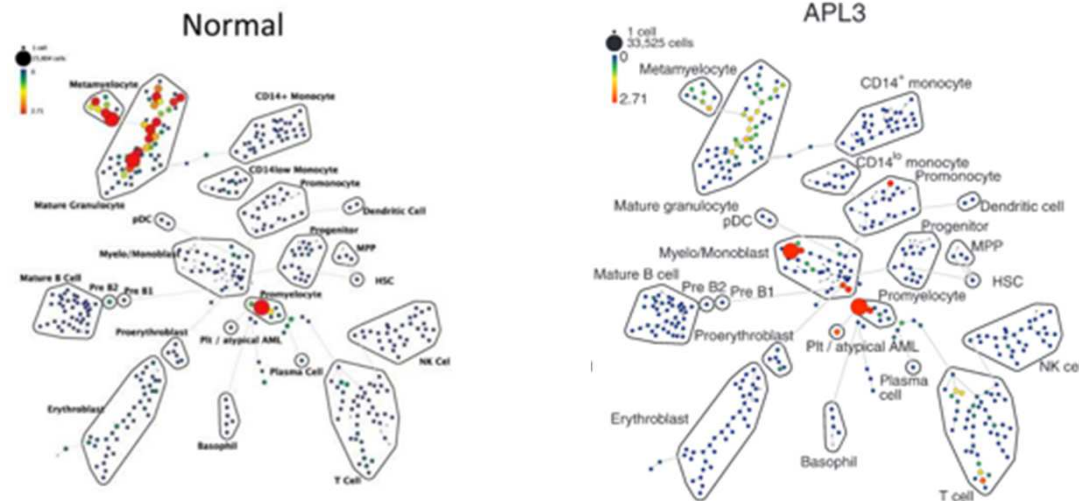
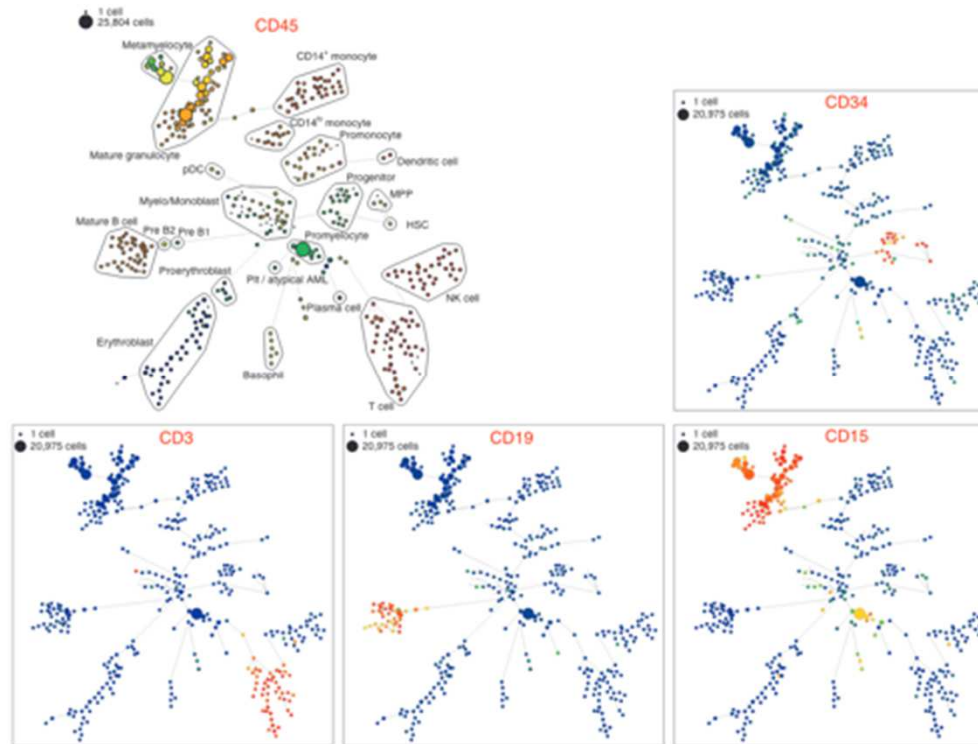
Possibilité de détecter 60 métaux différents =60 marqueurs

Application à des échantillons complets ou à de l'unicellulaire

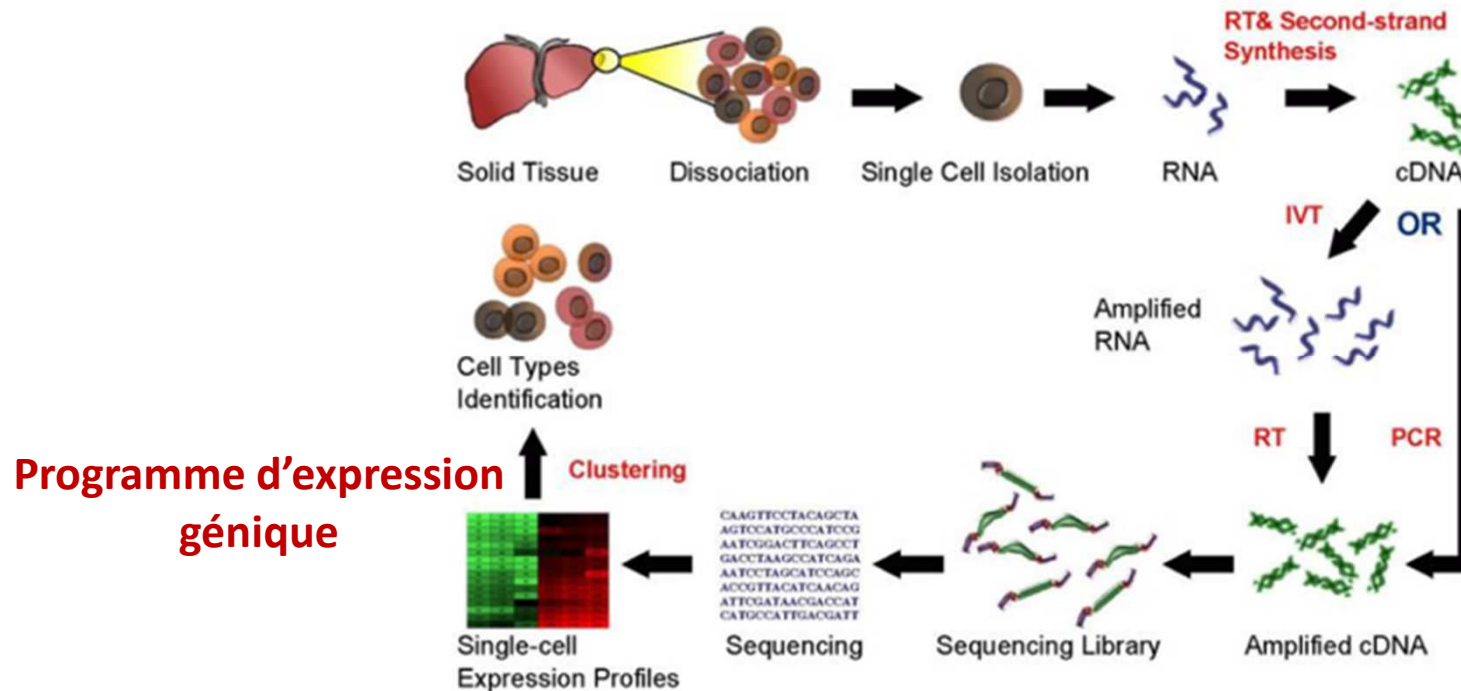


Nécessite de développer des algorithmes d'analyse automatisés

Algorithm SPADE



Single-cell RNA-seq



Quantité faible de transcrits



Amplification nécessaire +++ (jusqu'à 1 million)

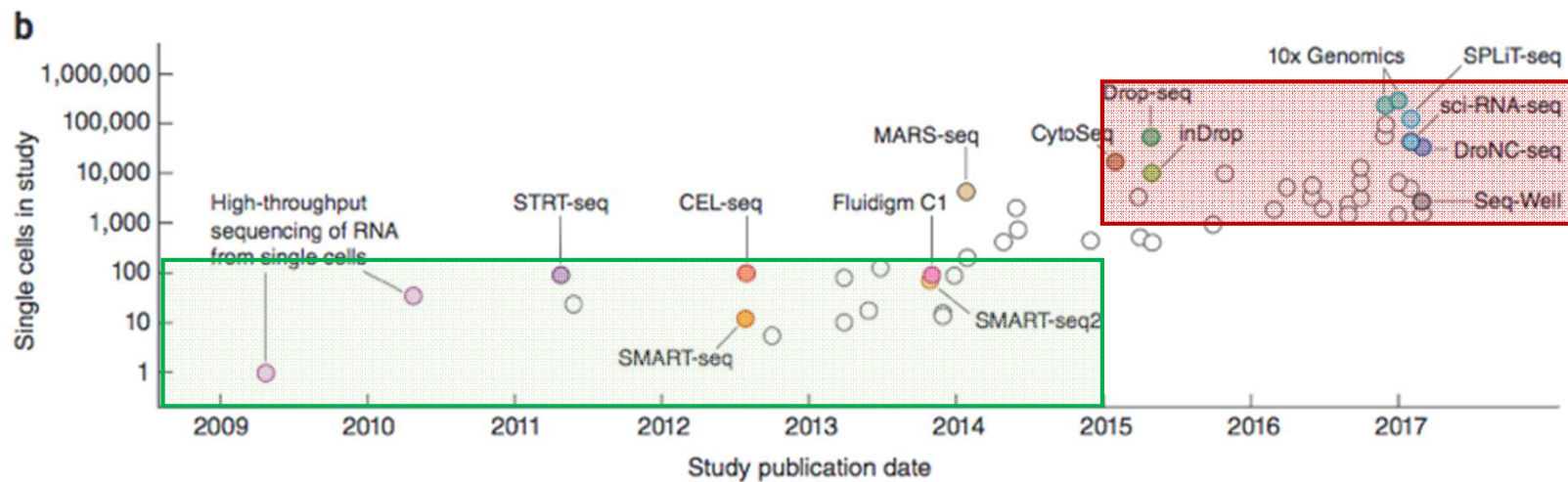
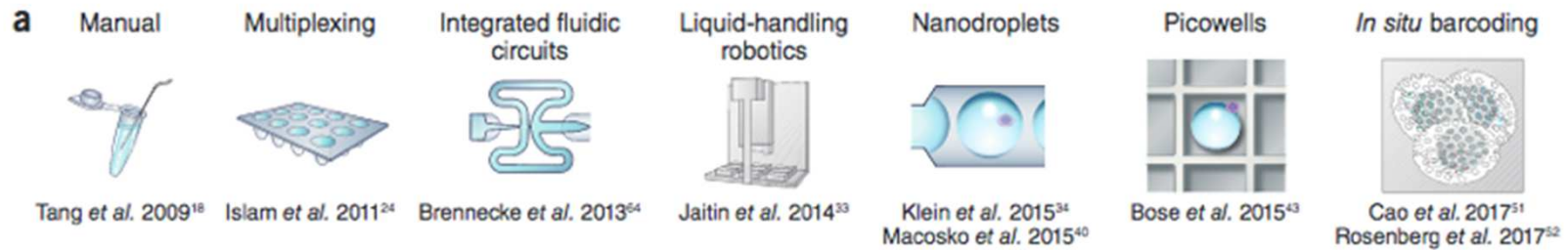
Gene « drop out »: un gène est exprimé dans une cellule mais pas dans une autre



Biais



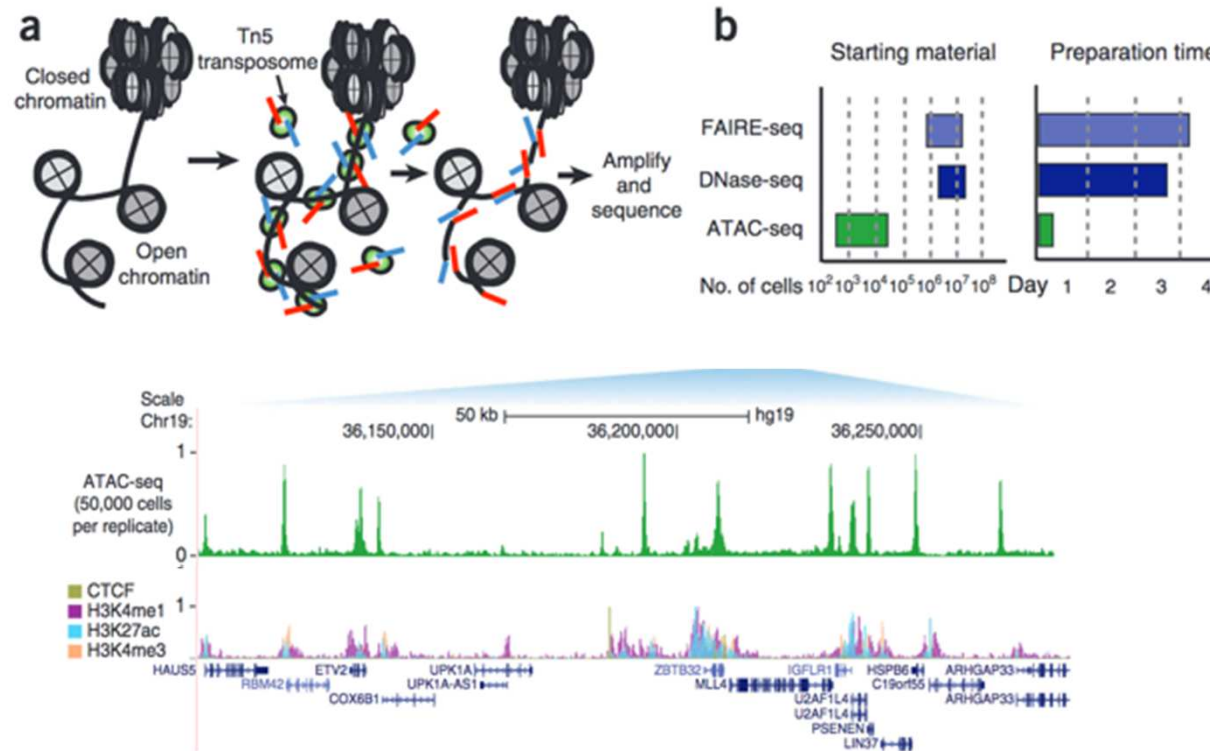
Correction / normalisation



Actuellement, analyse de 10^5 à 10^6 cellules en même temps

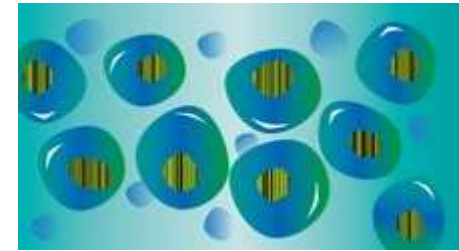
ATAC-seq

Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing.



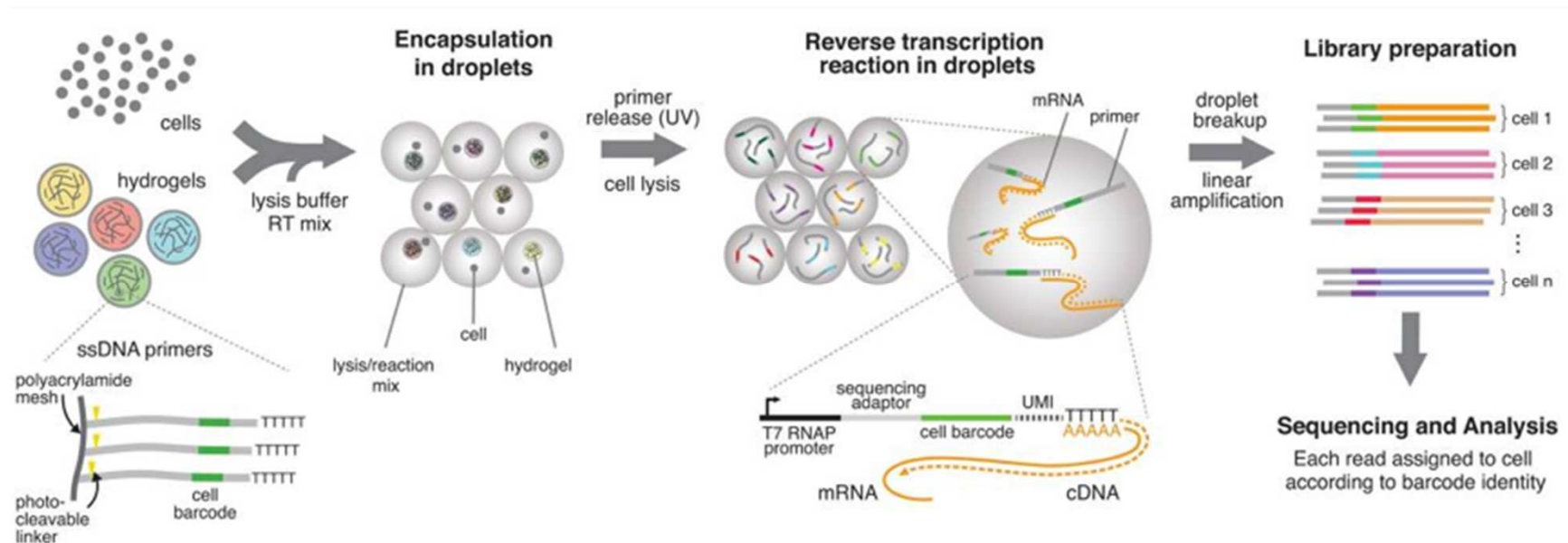
Accessibilité de la chromatine
Etat d'ouverture de la chromatine

Méthodes de tagging



- ***In vitro* : barcoding**

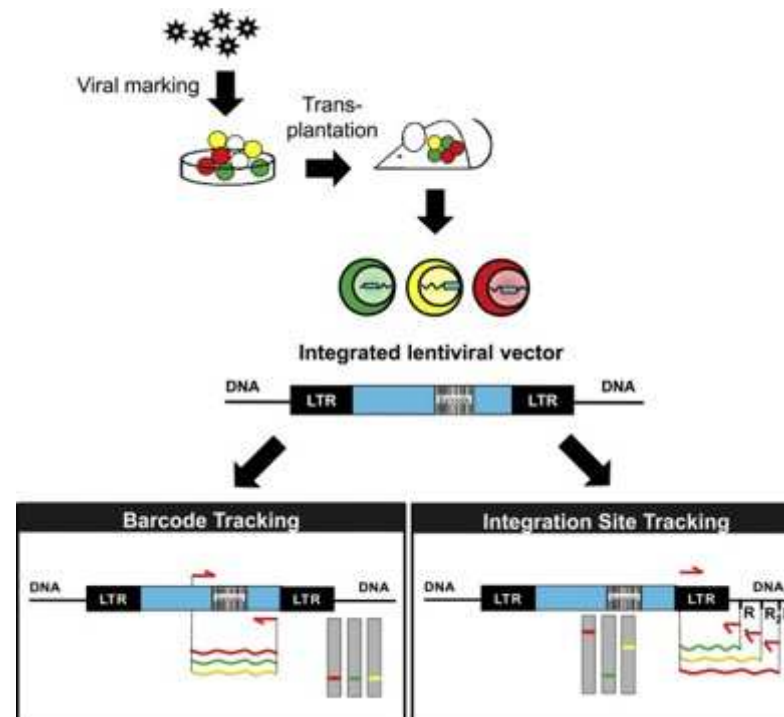
- 1^{ère} étape dans la préparation de la librairie
- Permet lors de l'analyse de distinguer les cellules entre elles (nécessaire dans les analyses par single cell)



- ***In vivo***:

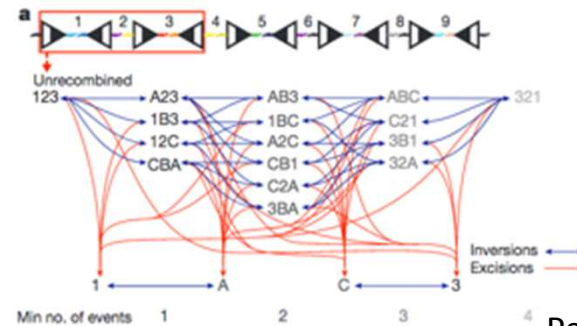
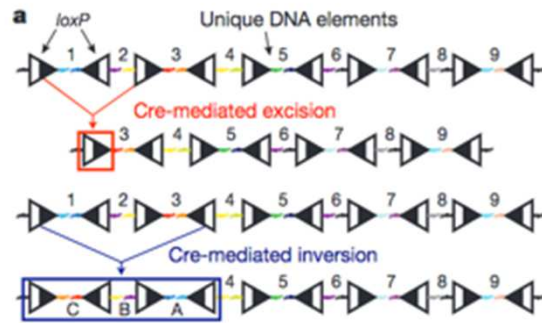
- **Barcoding ex-vivo** puis réinjection des cellules barcodées dans la souris (expériences de greffes) :

- Intégration virale (lenti ou rétrovirus)
- Transposons
- CRISPR-CAS9



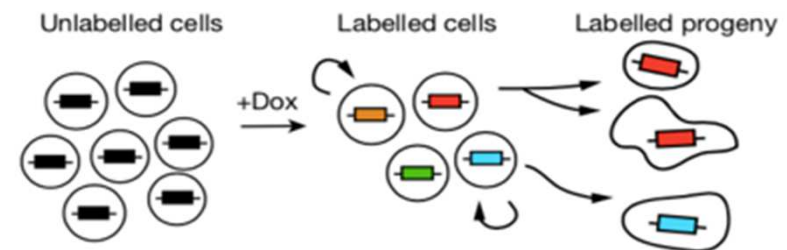
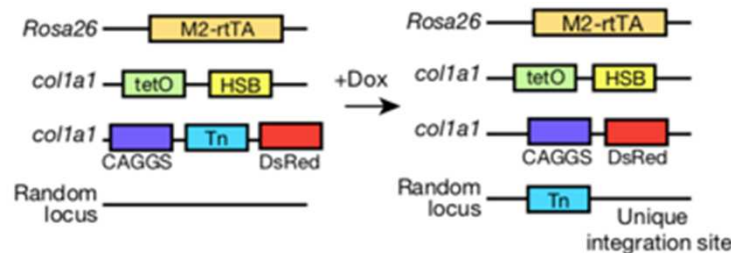
➤ Tagging *in situ* :

- Système Polylox : barcoding



Pei, Nature, 2017

- Transposons : site d'intégration unique et propre à chaque cellule



Tags partagés si issus de la même cellule



Rodriguez-Fraticelli, Nature 2018