
Caractérisation et différenciation des cellules souches hématopoïtiques

Table of Contents

1. Caractérisation des cellules de la moelle osseuse	1
1.1. Caractérisation microscopique	1
1.2. Caractérisation cytométrique	6
1.2.1. Les cellules différenciées de la moelle osseuse	6
1.2.2. Les lymphocytes T	7
1.2.3. Les lymphocytes B, les granulocytes et les monocytes	8
1.2.4. Les érythroblastes	9
1.2.5. Les cellules souches dans les cellules de la moelle osseuse	11
2. Différenciation lymphocytaire des cellules de sang de cordon en culture sur cellules stromales.	13
2.1. Différenciation des lymphocytes B	13
2.1.1. Protocole expérimental	13
2.1.2. Résultats expérimentaux	14

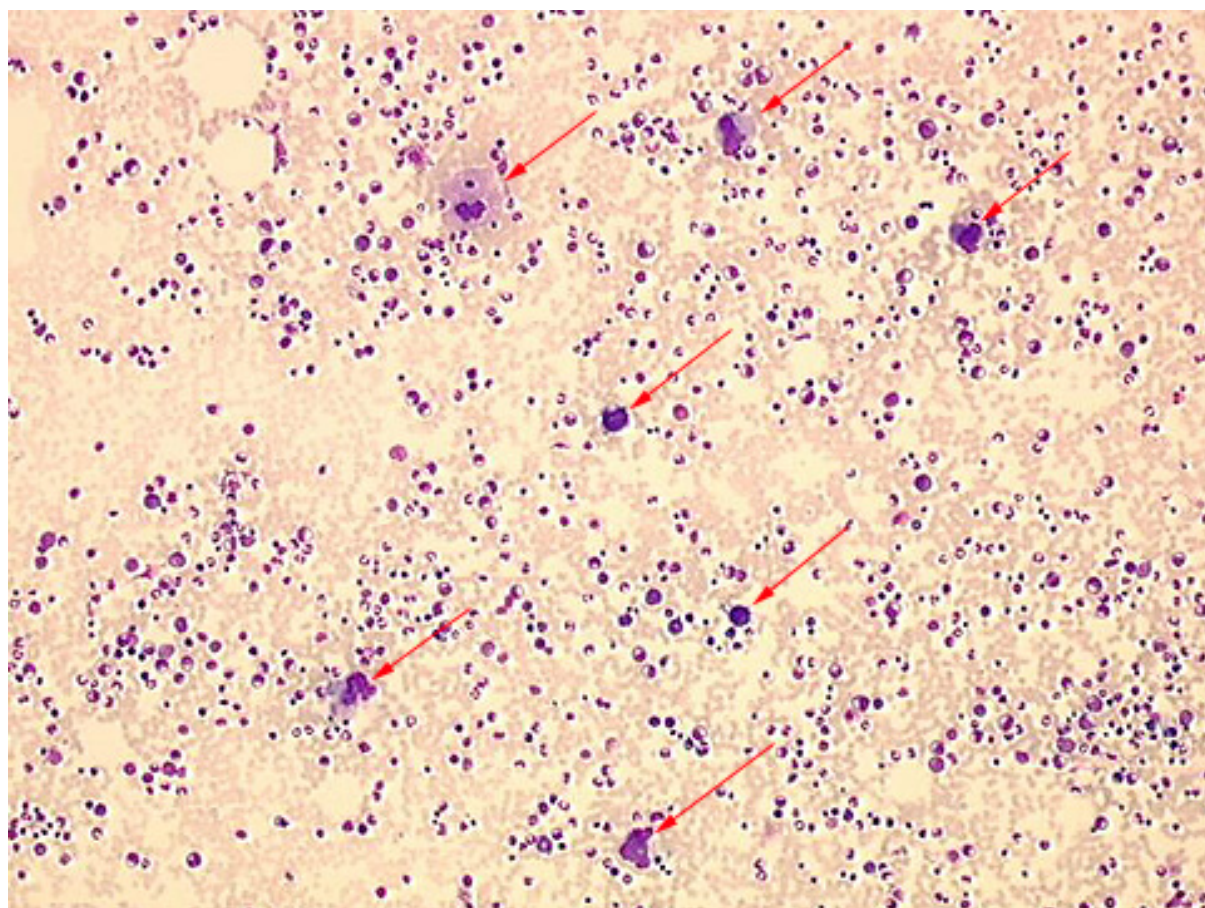
1. Caractérisation des cellules de la moelle osseuse

Les cellules souches adultes sont des cellules rares que l'on peut observer dans différents tissus (Moelle osseuse, foie, muscles, pancréas...). La moelle osseuse est un tissu facilement accessible au sein duquel on peut trouver les cellules souches hématopoïtiques

1.1. Caractérisation microscopique

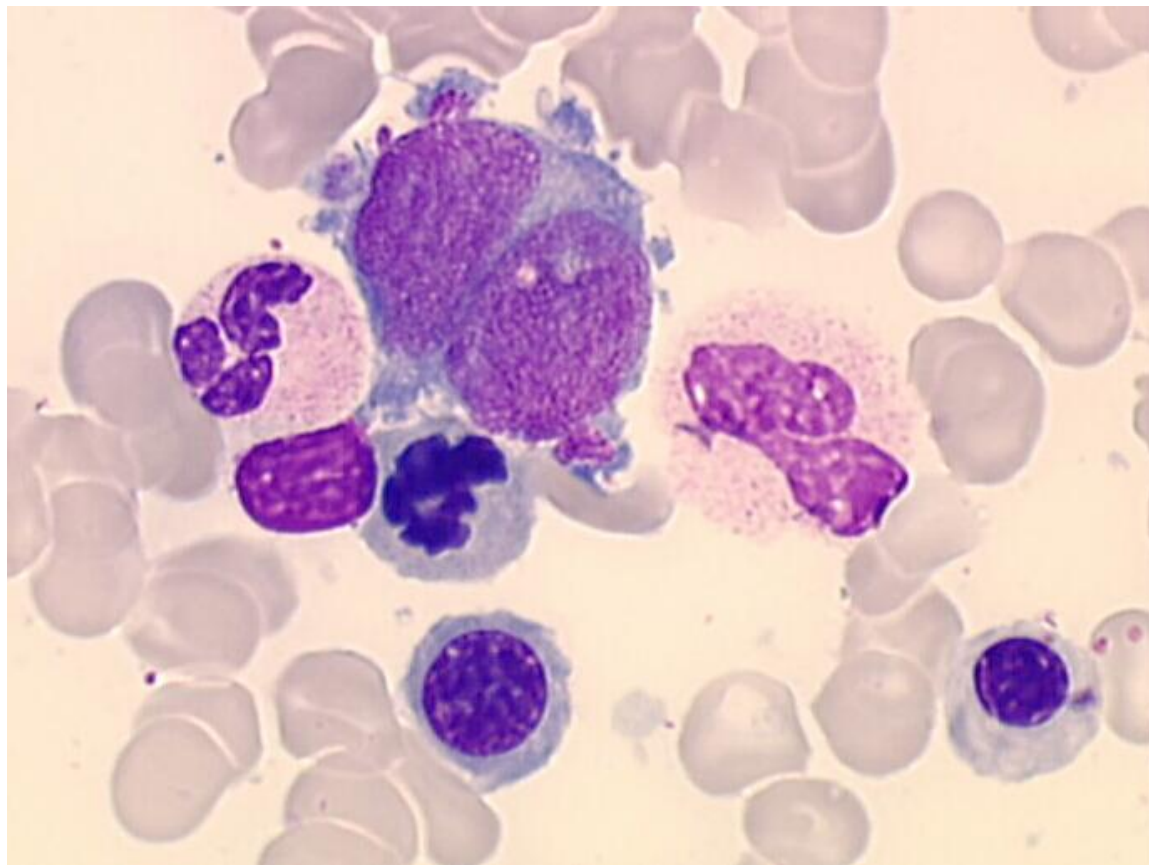
L'observation microscopique d'un frottis de moelle osseuse permet de déterminer la présence de différentes cellules différenciées.

Figure 1. Frottis de moelle osseuse. Les flèches indiquent les mégacaryocytes (source LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE DU C.H.U. D'ANGERS)



1. Mégacaryocytes

Figure 2. Mégacaryocyte (source LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE DU C.H.U. D'ANGERS)

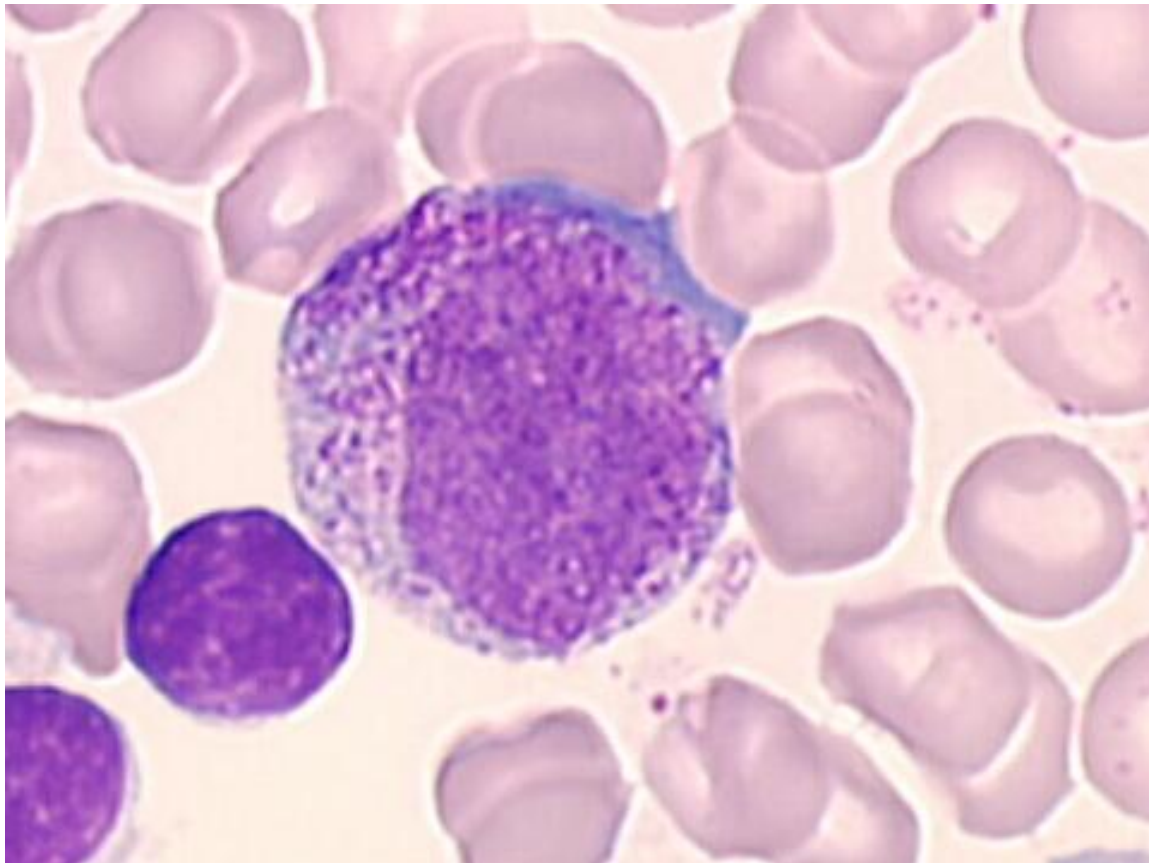


Les mégacaryocytes sont des cellules peu nombreuses que l'on peut repérer facilement à faible grossissement grâce à leur grande taille.

Ils présentent le plus souvent un noyau bilobé. Ce sont de grosses cellules (30 à 40 microns) assez rares dans la moelle osseuse (moins de 0.1% de la population cellulaire)

2. Les granulocytes ou polynucléaires

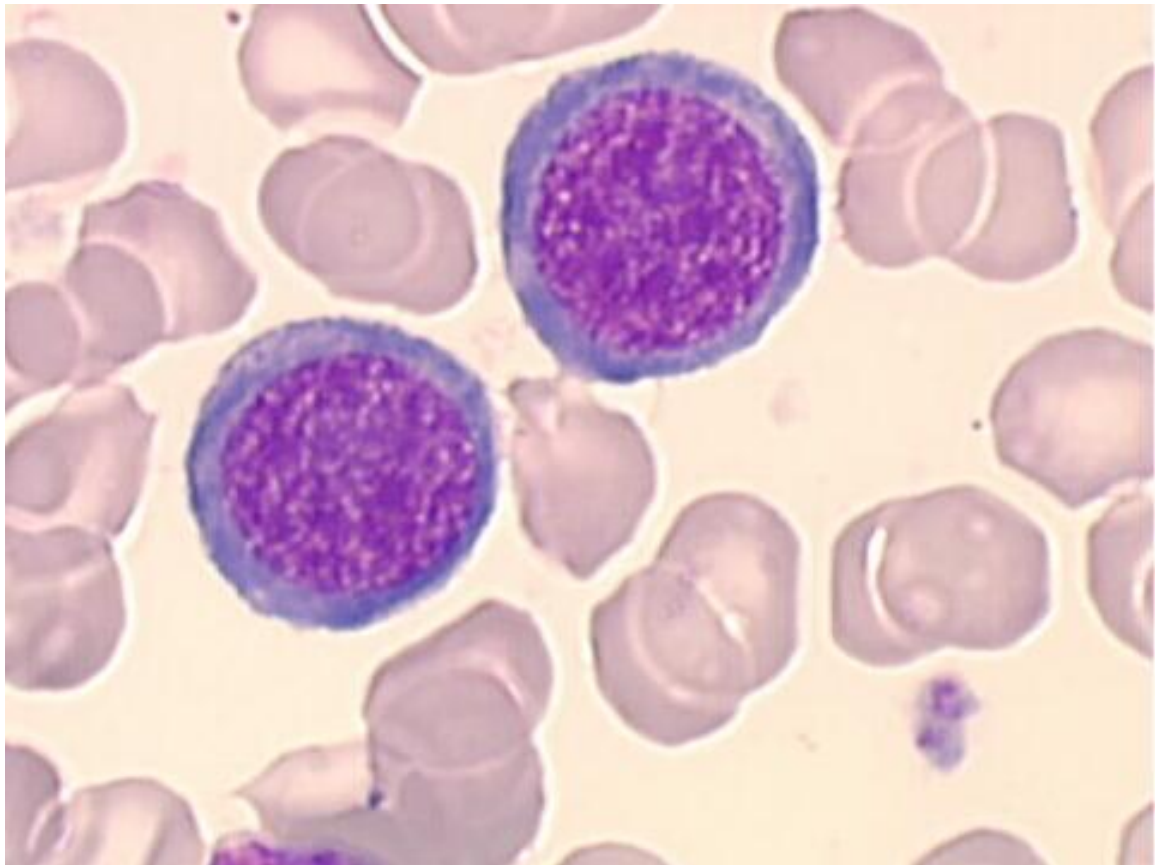
Figure 3. Myelocyte (source LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE DU C.H.U. D'ANGERS)



On peut observer dans la moelle les différents stades de la lignée myéloïde, du myeloblaste au granulocyte en passant par les myelocytes de différents stades. La différenciation est marquée par l'apparition d'une granulation progressive.

3. Les érythroblastes

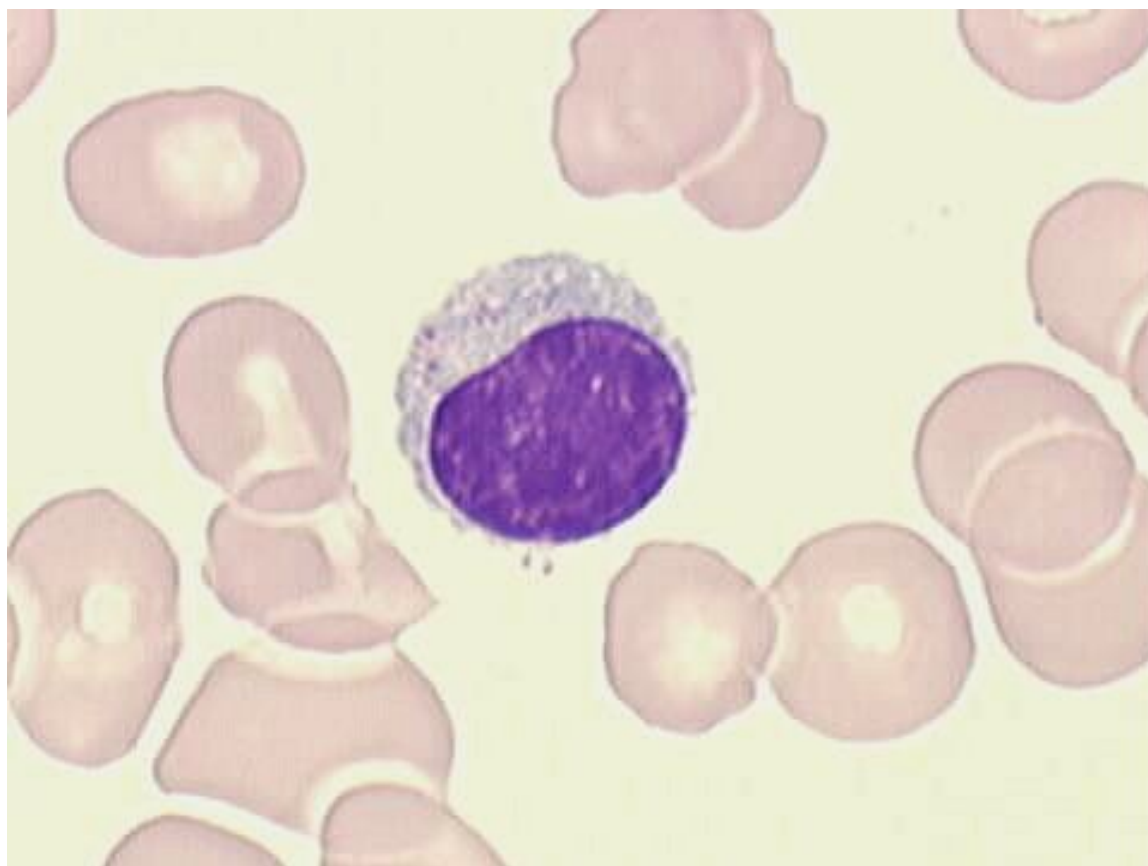
Figure 4. Erythroblastes (source LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE DU C.H.U. D'ANGERS)



On peut observer dans la moelle osseuse les différents stades de la lignée "rouge" ou érythroïde. Du proérythroblaste à l'érythrocyte en passant par le réticulocyte qui expulsera le noyau picnotique, on observe une diminution de la taille du noyau.

4. Les lymphocytes et monocytes

Figure 5. Lymphocytes et Monocytes (source LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE DU C.H.U. D'ANGERS)



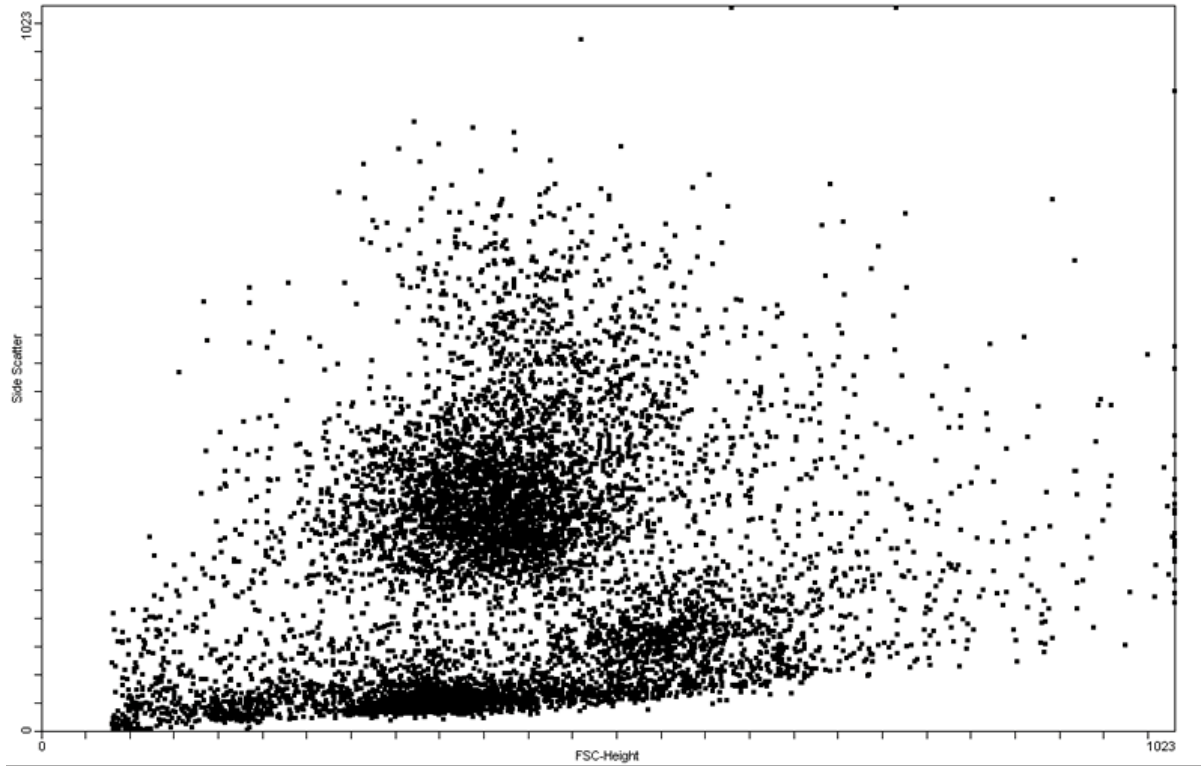
Les lymphocytes et les monocytes médullaires sont semblables aux lymphocytes et monocytes sanguins. On observe le même rapport N/C élevé.

1.2. Caractérisation cytométrique

1.2.1. Les cellules différenciées de la moelle osseuse

Une des particularités des cellules différenciées est de présenter à leur surface des marqueurs spécifiques (CD : Cell Differentiation) qui peuvent être utilisés comme antigènes pour des anticorps auxquels on aura fixé différentes molécules fluorescentes (fluorochromes). L'analyse des résultats par cytofluorométrie permet de visualiser les différentes populations cellulaires différenciées de la moelle osseuse.

Figure 6. Les paramètres FSC (Forward scatter) et SSC (Side scatter) donnent des indications sur la taille et la granulosité des cellules.



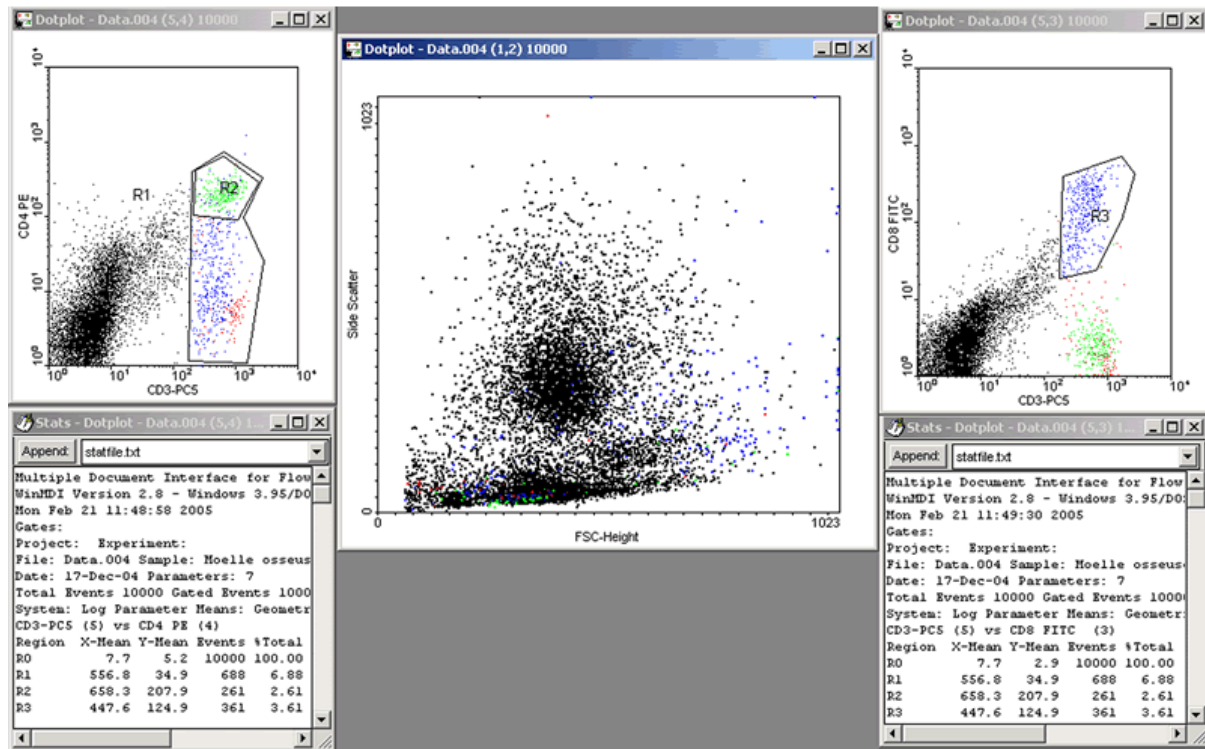
Sur ce graphique bidimensionnel (Dot Plot) apparaît des regroupements de cellules. Ces ensembles correspondent-ils à des groupes homogènes de cellules différenciées? L'analyse des marqueurs cellulaires devrait permettre de répondre à cette question.

1.2.2. Les lymphocytes T

L'ensemble des lymphocytes T présentent à leur surface le CD3 (composant du complexe du récepteur T). Les lymphocytes T sont subdivisés en deux sous-populations:

1. Les lymphocytes T4 ou Thelper qui présentent les marqueurs CD4 à leur surface.
2. Les lymphocytes T8 ou Tcytotoxiques qui présentent les marqueurs CD8 à leur surface.

Figure 7. Caractérisation cytométriques des lymphocytes T



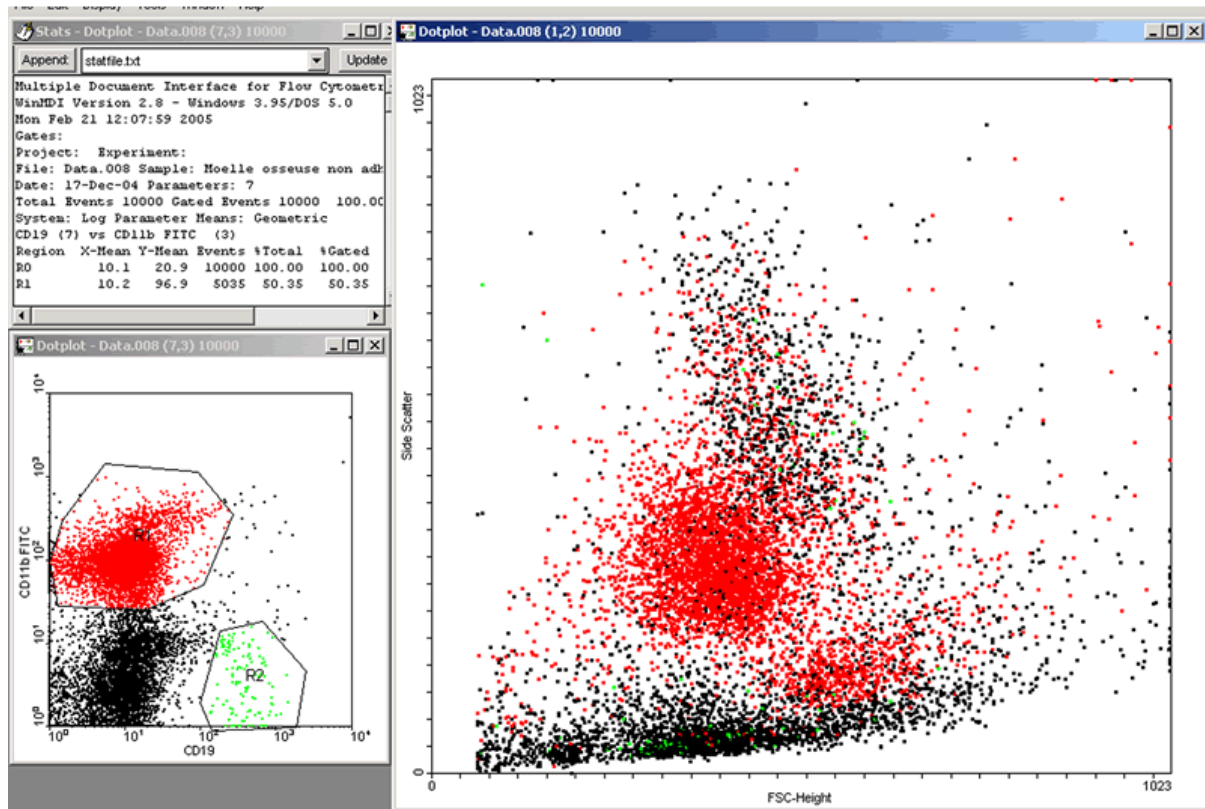
On localise et quantifie ainsi sur le graphique bidimensionnel présentant la taille et la granulosité, les différentes populations de Lymphocytes T. On obtient une population de lymphocytes T dans la moelle osseuse de l'ordre de 7 % de la population cellulaire totale. Les lymphocytes T4 quant à eux représentent 2.5% et les lymphocytes T8 3.5%.

1.2.3. Les lymphocytes B, les granulocytes et les monocytes

Les lymphocytes B présentent entre autre, à leur surface le marqueur de différenciation CD19.

Les granulocytes et les monocytes partagent quant à eux le marqueur de différenciation CD11b.

Figure 8. Caractérisation des Lymphocytes B, des granulocytes et des monocytes

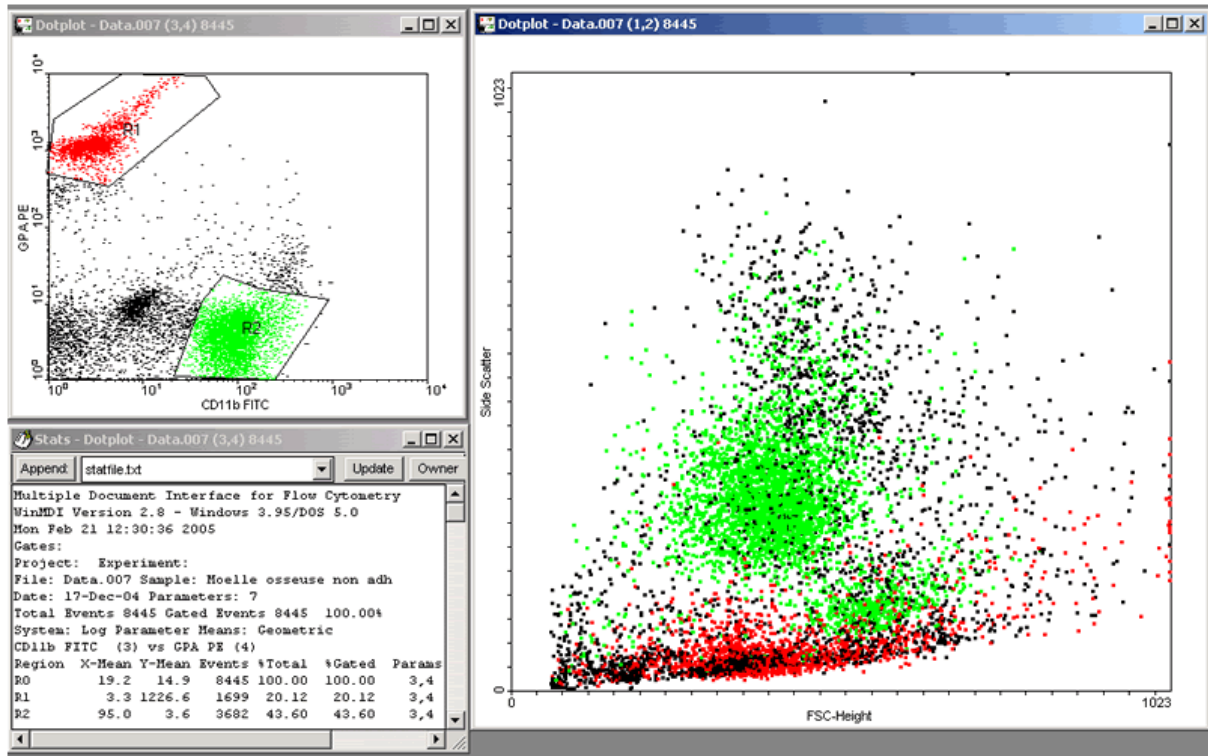


On localise cytométriquement et on quantifie ainsi les deux populations cellulaires qui représentent respectivement près de 50% des cellules de la moelle osseuse pour les granulocytes et les monocytes et seulement 1.23% pour les lymphocytes B.

1.2.4. Les érythroblastes

Les érythroblastes qui sont les futurs globules rouges, sont caractérisés par la présence à leur surface de la glycopherine A (GPA).

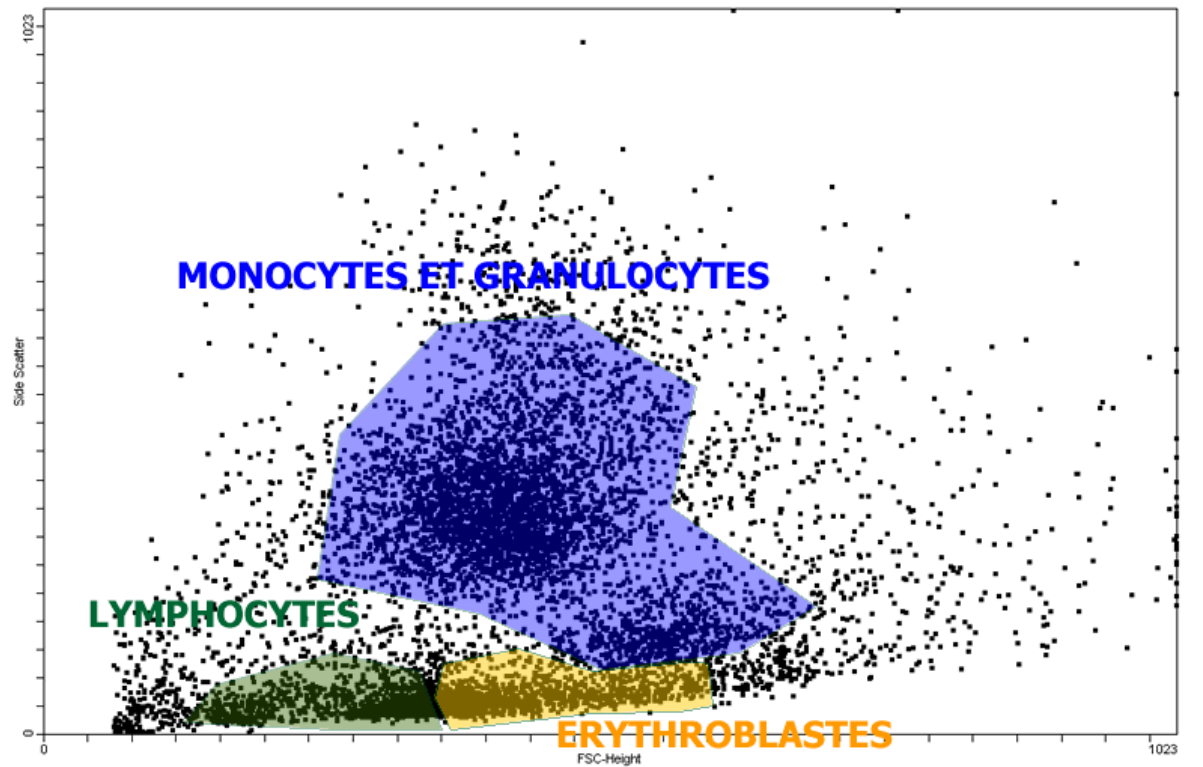
Figure 9. Caractérisation des érythroblastes



On localise cytométriquement et on quantifie ainsi les érythroblastes parmi les cellules de la moelle osseuse. Les érythroblastes représentent environ 20% des cellules de la moelle osseuse.

En conclusion on peut localiser sur un graphe bidimensionnel différentes populations cellulaires de la moelle osseuse.

Figure 10. Caractérisation cytométrique des populations cellulaires de la moelle osseuse



1.2.5. Les cellules souches dans les cellules de la moelle osseuse

La caractérisation des cellules souches hématopoïétiques ne peut se faire à partir de la simple observation microscopique d'un frottis de moelle osseuse. Cette caractérisation nécessite une analyse des marqueurs cellulaires par cytofluorométrie.

La caractérisation des cellules souches dans la moelle osseuse se fait en isolant tout d'abord les cellules indifférenciées (CD34+) puis parmi cette population cellulaires, on isole les CD38- représentant les cellules souches.

La proportion de cellules indifférenciées parmi les cellules de moelle osseuse est de 1.45%. La proportion de cellules souches hématopoïétiques est elle de 0.39 %.

Figure 11. Caractérisation cytométrique des cellules souches de la moelle osseuse

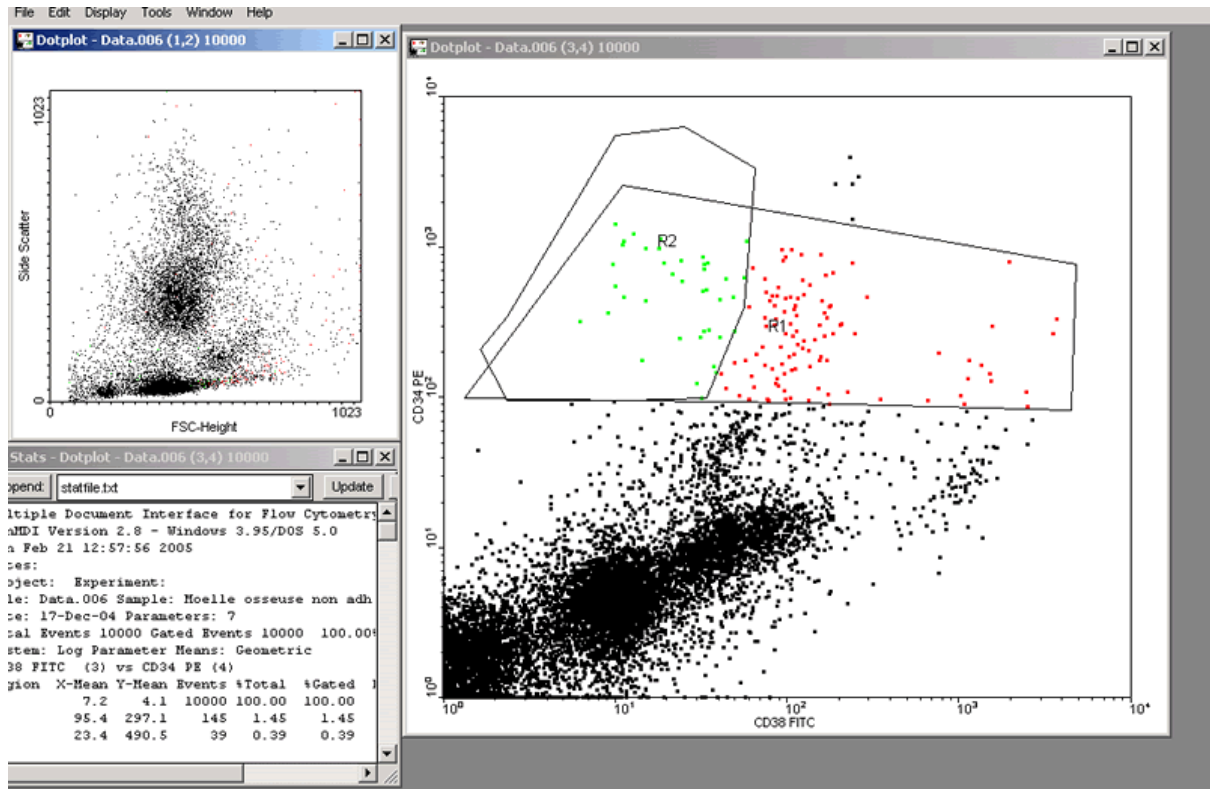
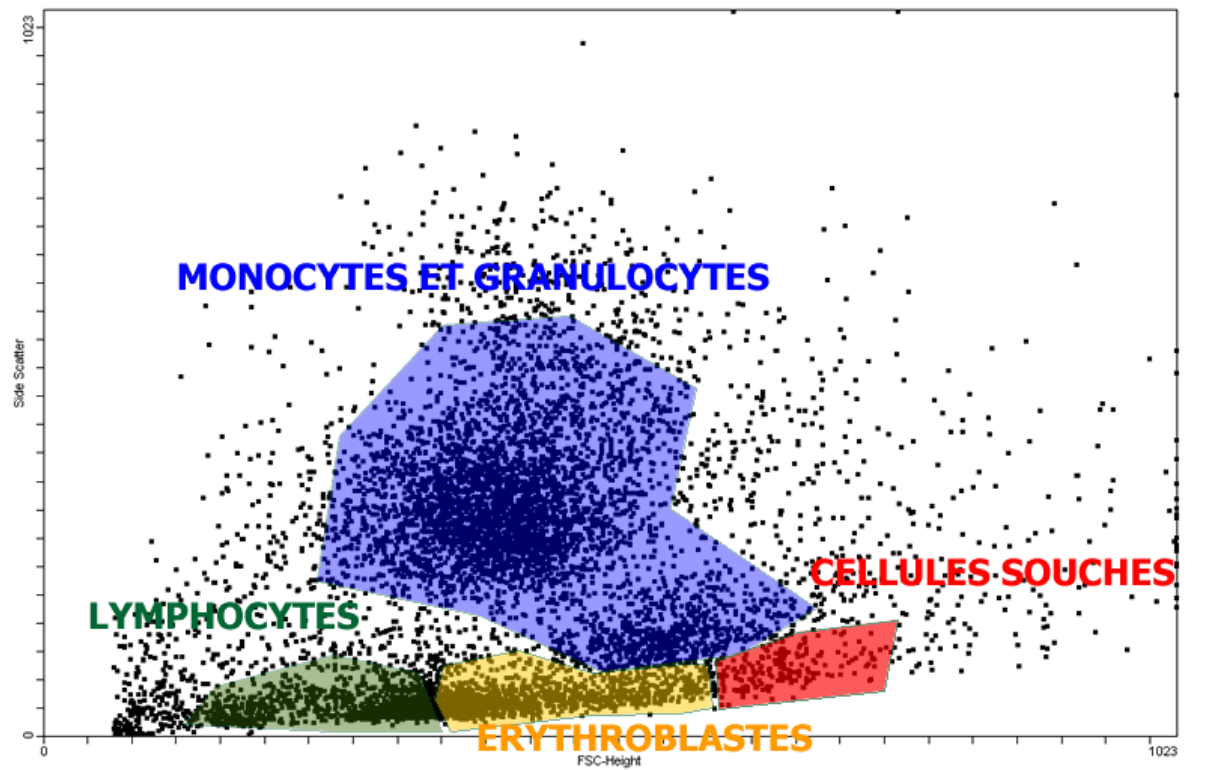


Figure 12. Localisation des cellules souches



2. Différenciation lymphocytaire des cellules

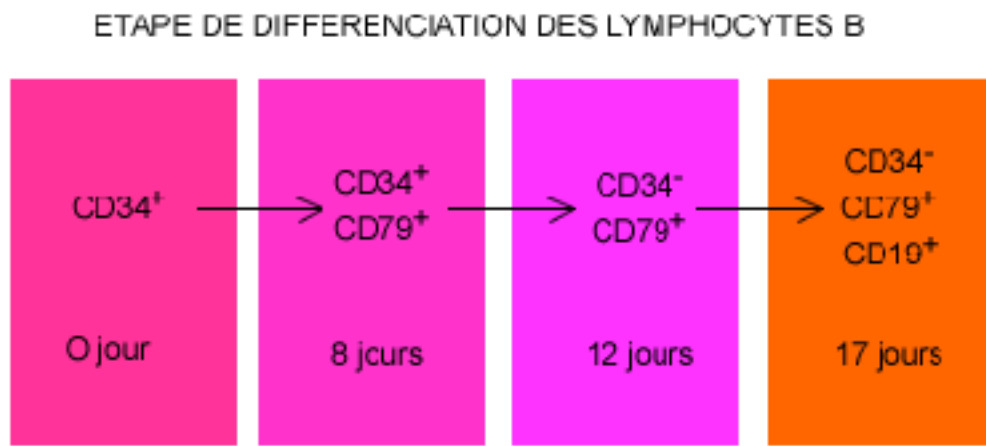
de sang de cordon en culture sur cellules stromales.

2.1. Différenciation des lymphocytes B

2.1.1. Protocole expérimental

Les cellules issues du sang de cordon humain sont mis en culture sur des cellules stromales murines. Des prélèvements sont réalisés à différentes étapes de la différenciation lymphocytaire.

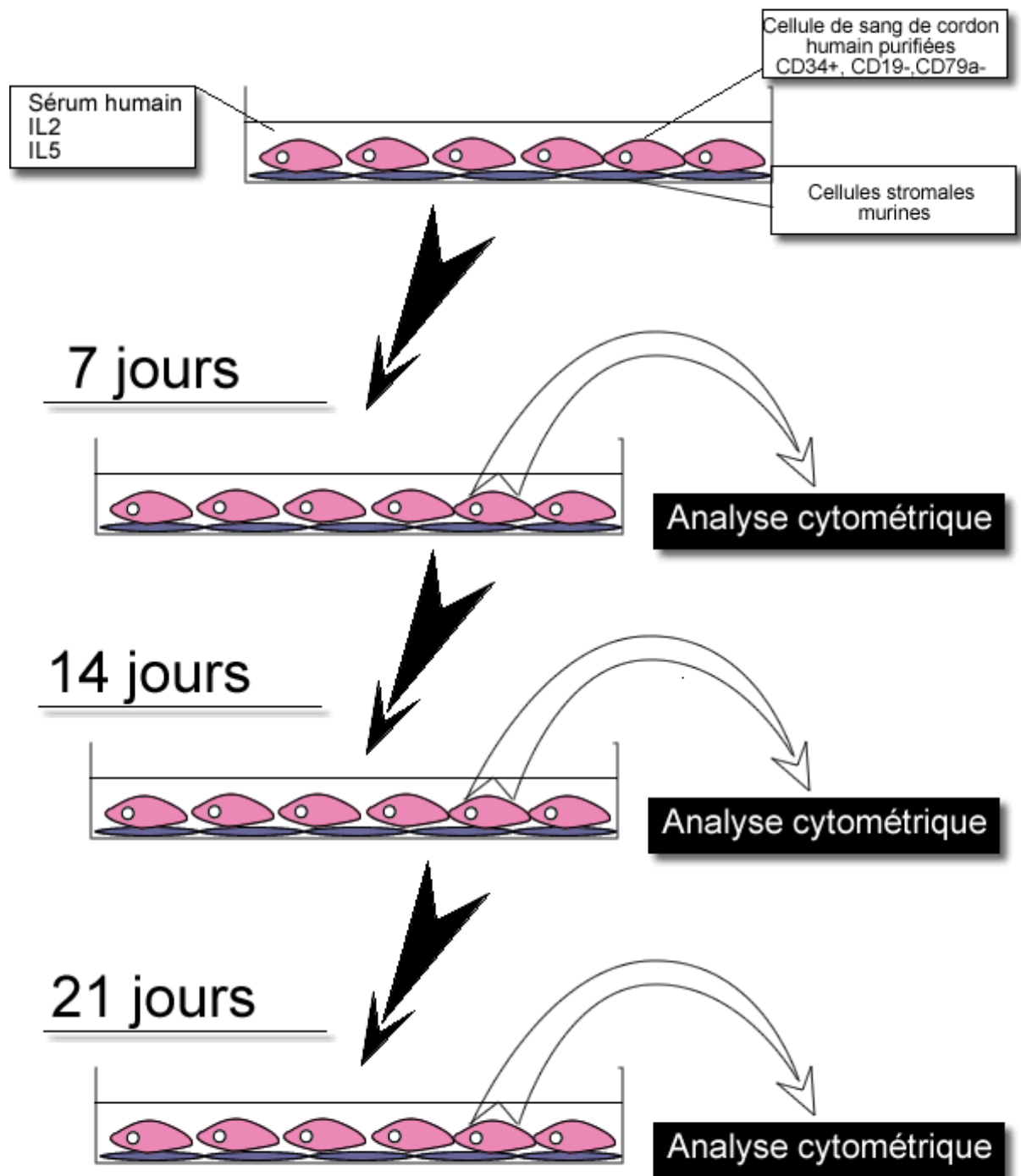
Figure 13. Les étapes de la différenciation des Lymphocytes B



Les marqueurs cellulaires caractérisés (CD79a marqueur précoce de la différenciation et CD19 marqueur final de différenciation) permettent de suivre cette différenciation dans le temps.

Figure 14. Protocole d'analyse de la différenciation lymphoïde B

Protocole d'analyse de la différenciation LB

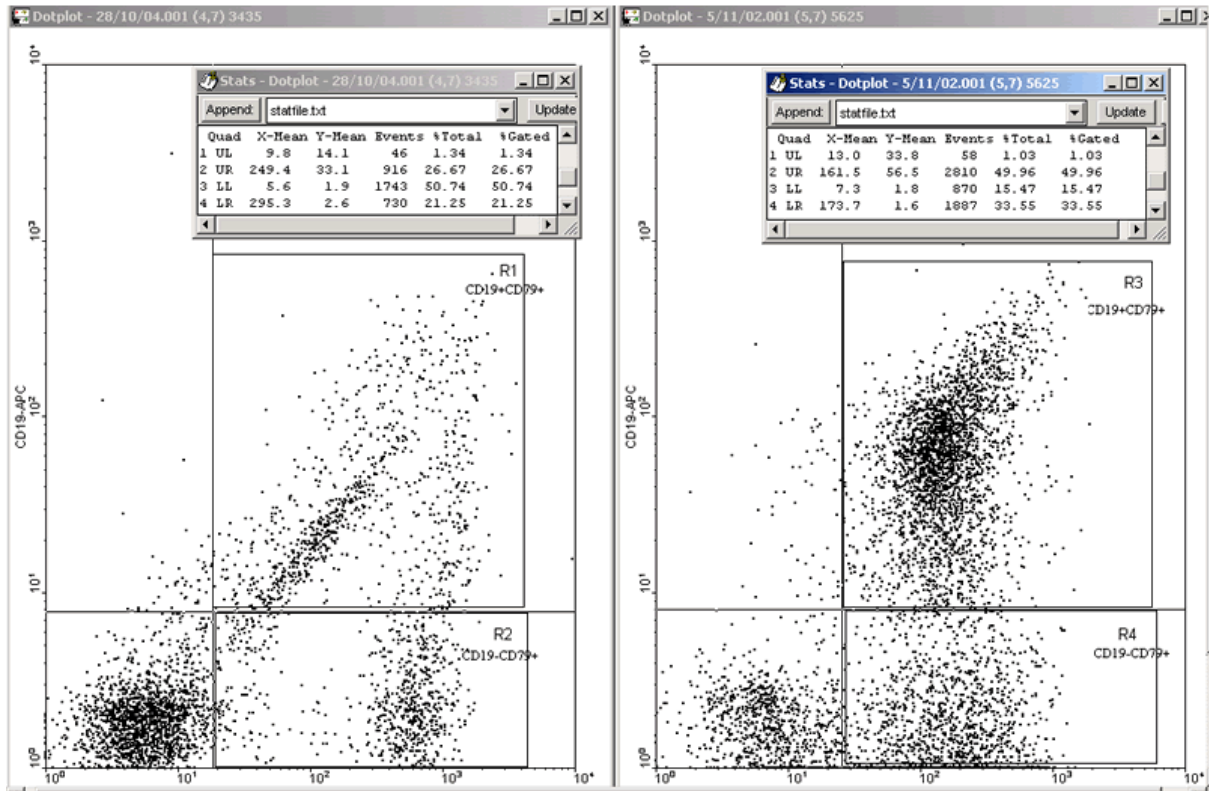


2.1.2. Résultats expérimentaux

Pour chaque fichier de données cytométriques on a marqué

1. CD10-RD1 (marqueur spécifique des précurseurs des lymphocytes B)
2. CD79a-PC5
3. CD19-APC

Figure 15. Résultats des marquages à 14 et 21 jours



on observe sur cette cinétique une évolution des populations cellulaires. En effet , la population cellulaire CD34+,CD19-,CD79- diminue au cours du temps, alors que les cellules présentent progressivement des caractères de cellules différenciées (CD79 puis CD19 pour les lymphocytes B différenciés).

Cette différenciation est directement liée au contact établi entre les cellules indifférenciées issues du sang de cordon avec les cellules stromales .