

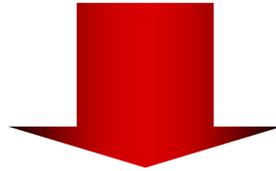
Érythropoïèse des Syndromes myélodysplasiques

Cas du **Syndrome 5q-**

Laure VINCENT

Laboratoire Central d'Hématologie - CHRU de Montpellier

Anomalie clonale acquise d'un progéniteur hématopoïétique



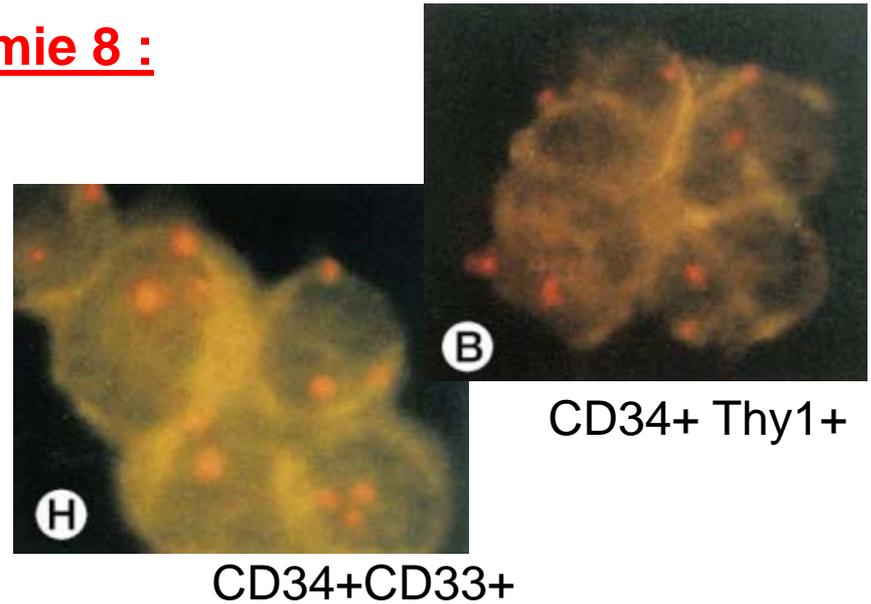
Niveau d'atteinte ?

- cellule souche hématopoïétique
- progéniteur myéloïde multipotent

Atteinte d'un progéniteur myéloïde multipotent ?

Cas des myélodysplasies avec trisomie 8 :

- Compartiment CD34+Thy1+ non atteint
- Atteinte uniquement myéloïde
 - Précurseurs CD34+CD33+ atteints
 - CFU GEMM, CFU GM, érythroblastes PNN atteints
- CD34+CD19+ non atteints
- CD34+CD7+ non atteints
- Lymphocytes B, T , NK périphériques non atteints



Cas des myélodysplasies avec trisomie 8 et 5q-

Cell population	FISH results, % of total cells			
	Normal	+8 alone	5q- alone	5q- and trisomy 8
CD34+CD38- (HPCs)	0	0	34	66



Del 5q = évènement précoce / Trisomie 8 = acquise secondairement

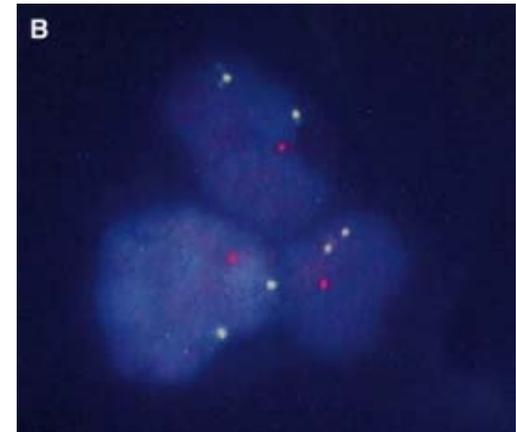
Nilsson et al. Blood 2002

Saitoh et al. Blood 1998

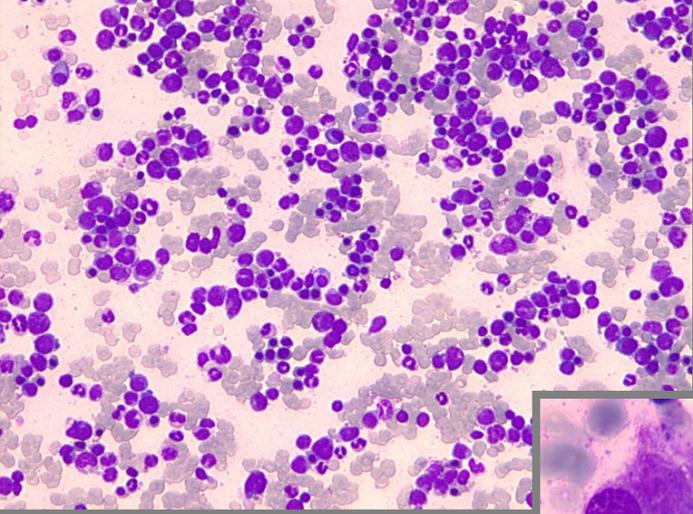
Atteinte d'une cellule souche hématopoïétique ?

Cas de Syndromes 5q- et autres myélodysplasies avec del(5q) :

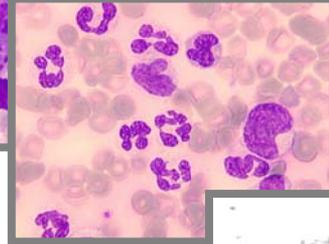
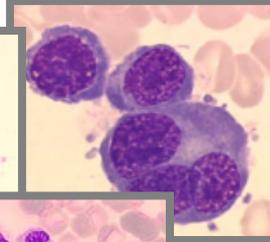
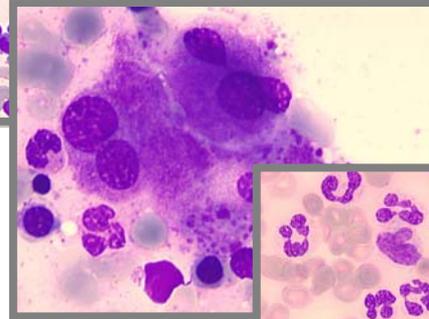
- **Compartiment CD34+CD38-** quasi entièrement 5q-
 - faible activité LTCIC
 - absence de reconstitution de l'hématopoïèse après greffe chez une souris NOD/SCID irradiée
- **Compartiment CD34+ CD19+ pro B : large fraction 5q-**
- Pas de lymphocytes matures 5q- (ou fraction minime).
Pas de lymphopénie.



CD34 + CD38 –

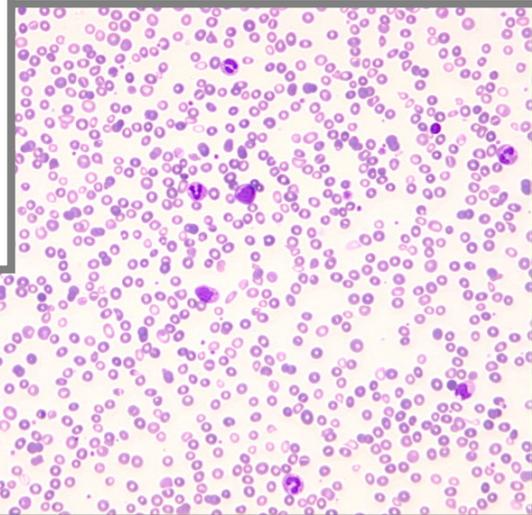
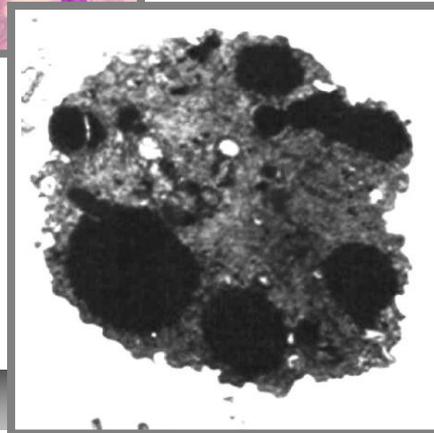


Moelle riche



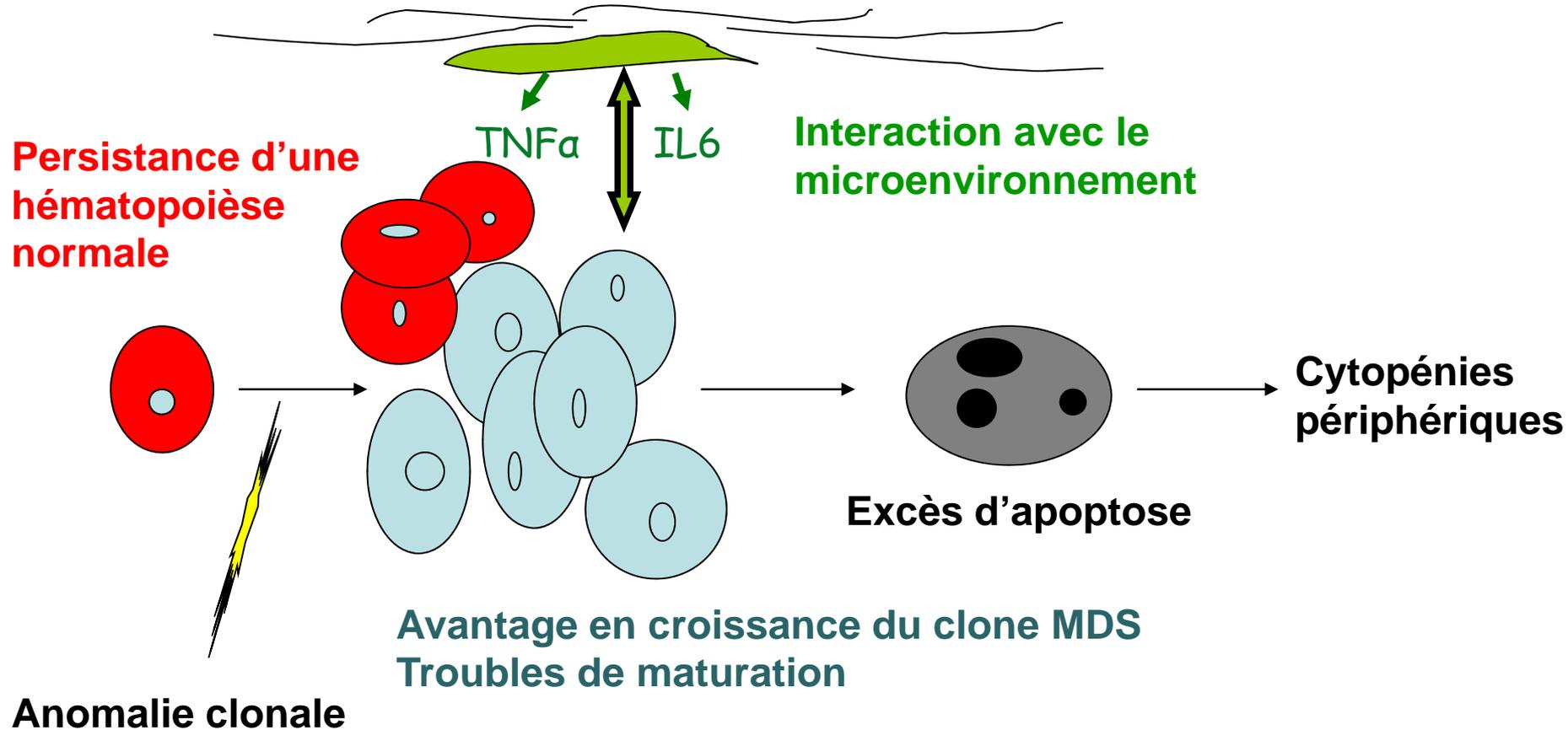
**Troubles de maturation
Dysplasies multilignées**

**Excès d'apoptose intra-médullaire
des précurseurs des 3 lignées**



**Cytopénies
périphériques**

Un modèle d'hématopoïèse inefficace

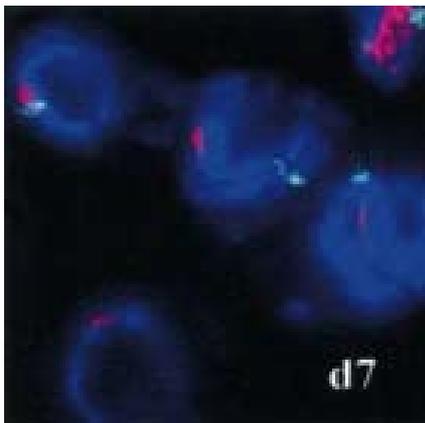


Avantage de croissance pour le clone MDS

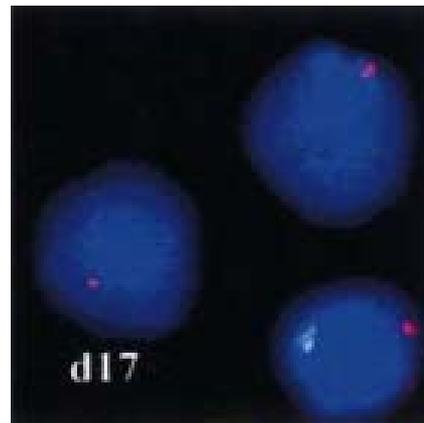
Culture de moelle totale myélodysplasique :

- Pousse préférentielle des cellules appartenant au clone par rapport aux cellules appartenant à l'hématopoïèse normale
- Persistance d'une hématopoïèse normale

RAEB 45 X, -Y



J7 : 20%



J17 : 74%

***TET2*, gène candidat de l'avantage de croissance**

4q2.4 : Région comportant 1 seul gène : *TET2*

- Potentiellement suppresseur de tumeur
- Impliqué dans plusieurs néoplasies myéloïdes
- Rôle inconnu potentiellement régulateur de la balance survie / croissance / différenciation au cours de l'hématopoïèse

Délétions ou mutations 4q2.4 acquises

Présentes dans **20%** des MDS de différents types (bas et haut risque)

Anomalies de *TET2* et syndromes myélodysplasiques

Concernent 1 ou 2 allèles :

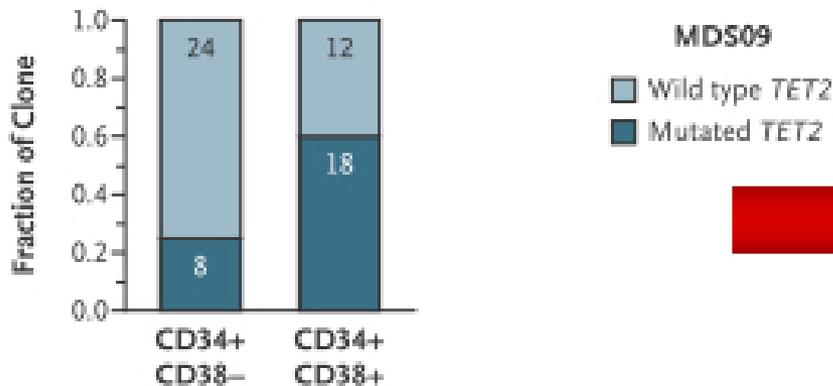
- Mutations bi-alleliques

homozygotes ou hétérozygotes composites avec charges alléliques différentes (mutations acquises à des moments différents)

- Pertes d'hétérozygoties associées à des mutations de l'autre allèle délétion ou dysomie uniparentale

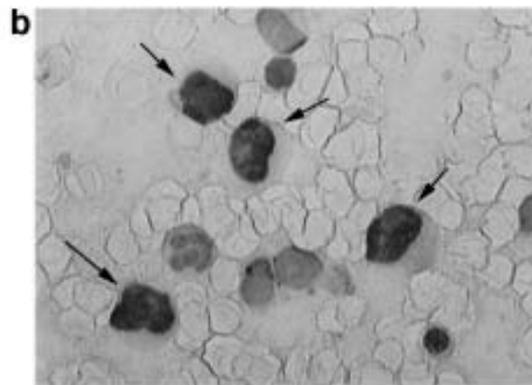
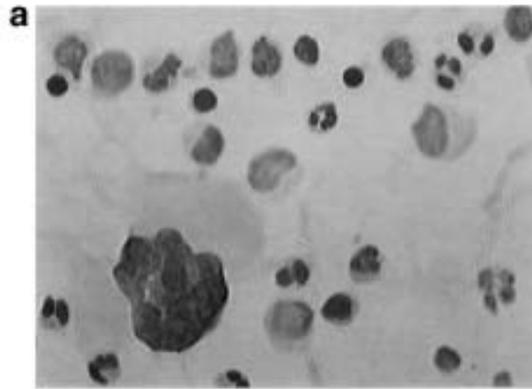
- Mutations hétérozygotes

Au cours de la différenciation (CD34+CD38- à CD34+CD38+) :



**Évènement précoce et
amplification du clone**

Excès d'apoptose médiée par Fas



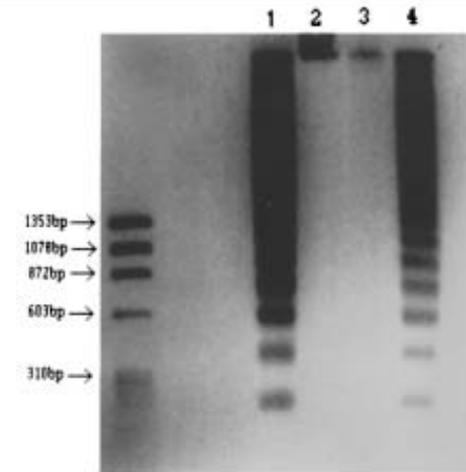
TUNEL : 39% (MDS) v 12,6% (contrôle)*

- Décrit initialement sur moelle totale puis dans les cellules **CD34+** et dans les **précurseurs des lignées érythroïdes et granuleuses**

- Fas est fonctionnel

- Fas est surexprimé

- Prédomine dans les **MDS de bas risque**



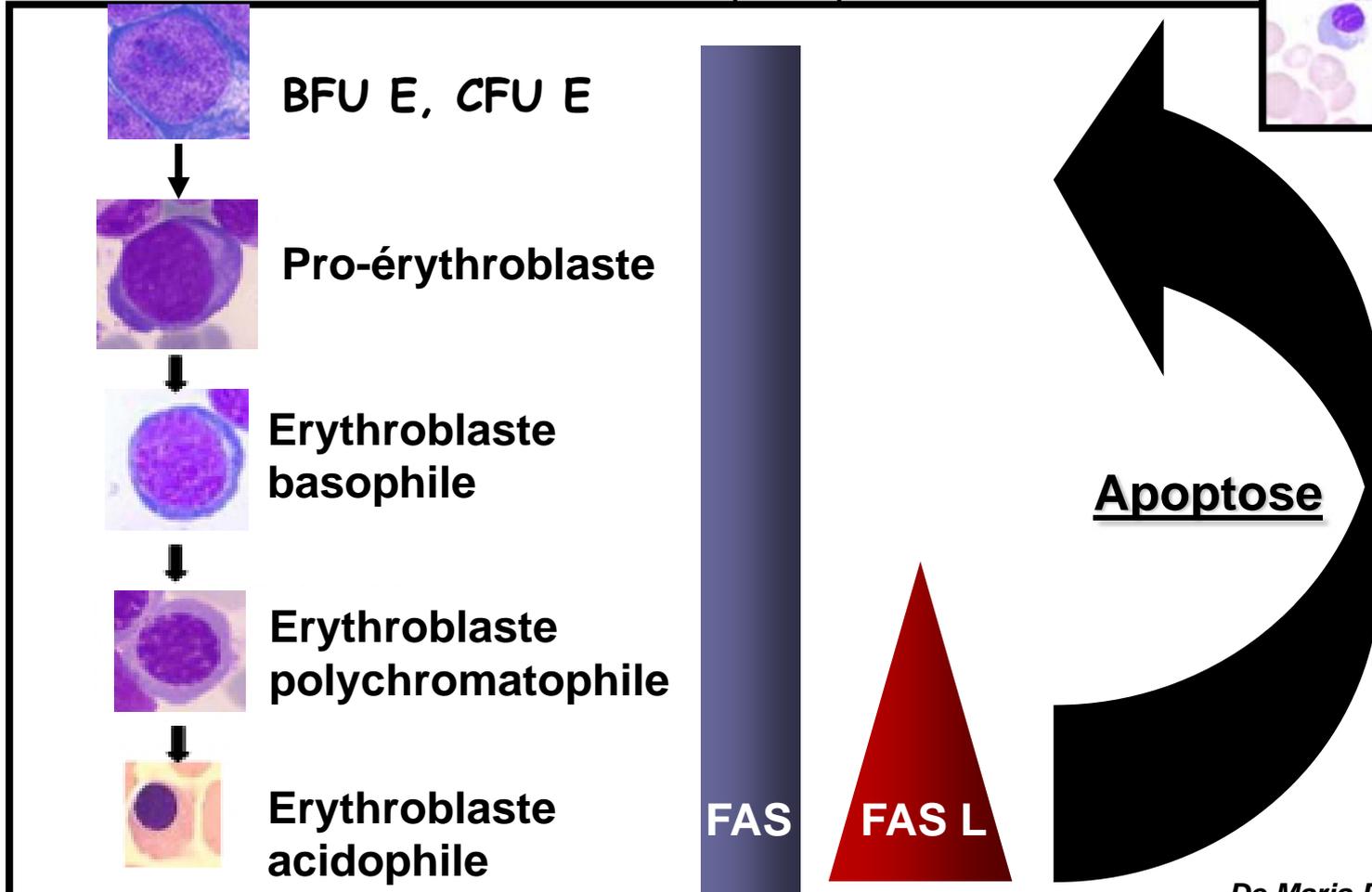
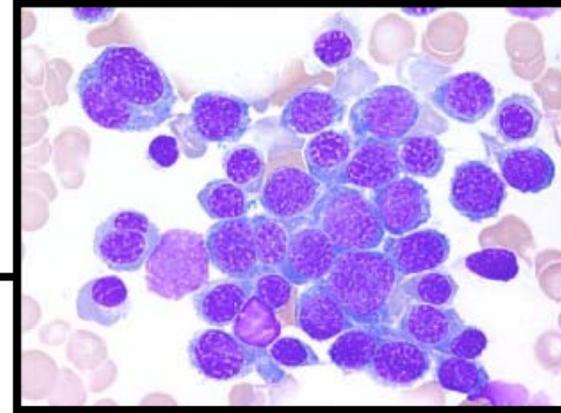
Présence d'ADN en échelles

*Bouscary et al *Leukemia* 1997, Raza A et al *Blood* 1995, Clarck *Leukemia lymphoma* 1990
Rajapaska et al *Blood* 1996, Parker et al *Blood* 1997, Mundle S et al *Int J Hematol* 1999

Erythropoïèse normale

Régulation basée sur l'**APOPTOSE** induite par Fas

Cellules matures exprimant Fas L
sont capables d'induire l'**apoptose**
des cellules immatures qui expriment Fas



Erythropoïèse myélodysplasique « inefficace »

Surexpression de **Fas** notamment dans les **précurseurs immatures**
(CD34+, CD33+ et glycophorine A +)

+

Augmentation rapide au fur et à mesure de la différenciation des
précurseurs érythroïdes de l'expression de **FasL**

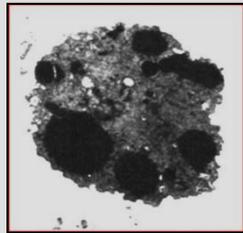
Excès d'apoptose
des **précurseurs érythroïdes immatures**

Diminution de la pousse des **CFU et BFU** dans les MDS
corrélé à l'expression de **Fas** dans les cellules CD34+ et GPA+

Rôle pléiomorphe de la Caspase 3

Voie létale

Apoptose : voie finale commune



PARP

Bcl X L

Ex : Précurseurs érythroïdes immatures en l'absence d'EPO



Apoptose

Voie non létale

A minima lors de l'érythropoïèse normale

Intégrité nucléaire

Lamine B

Cytosquelette

Protéine 4-2

Band 3

Condensation de la chromatine

Acinus

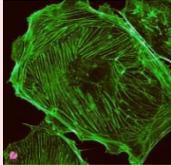
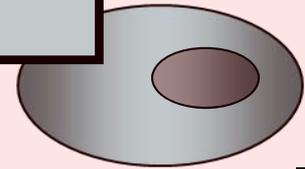
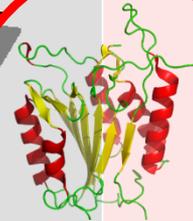
Régulation de FT

GATA1

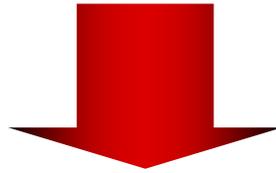
Différenciation

Survie

Caspase 3



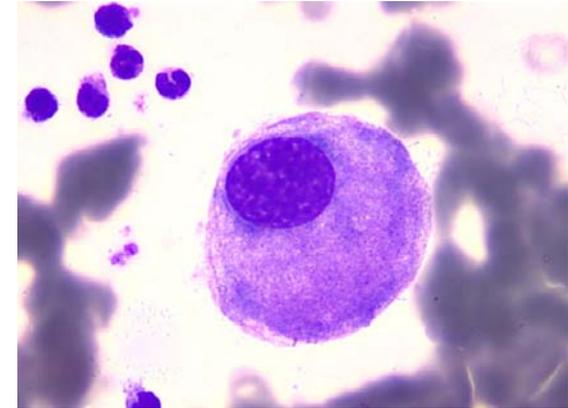
Une dérégulation de mécanismes normaux et complexes de contrôle de l'érythropoïèse



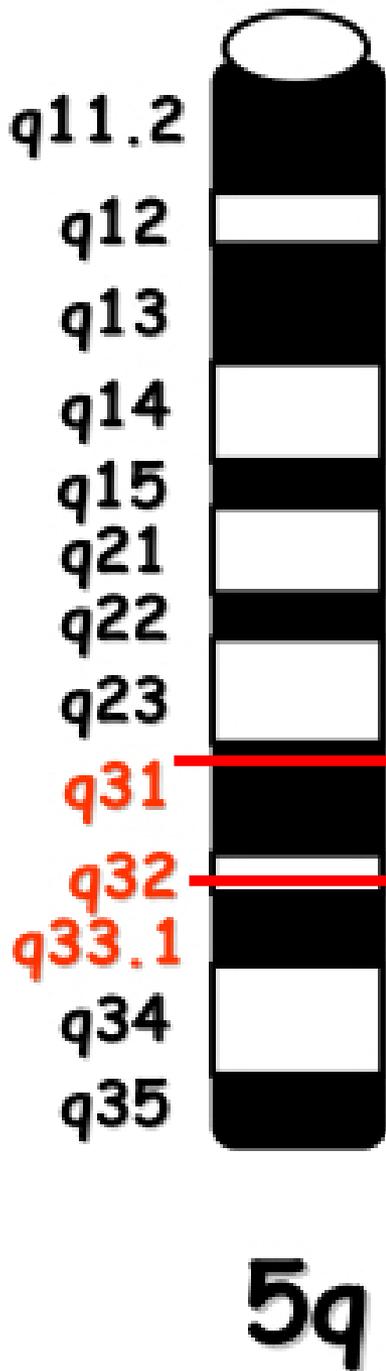
**Excès d'apoptose
Troubles de la maturation érythroïde**

Le syndrome 5q-

- Défini par la corrélation :
 - un terrain : femmes âgées
 - un **tableau cytologique** particulier :
 - Anémie macrocytaire réfractaire
 - Mégacaryocytes hypolobulés
 - Taux de plaquettes normal ou augmenté
 - Neutropénie modérée
 - une **délétion interstitielle d'un bras 5q**
 - et d'un **faible risque de transformation en LA**, pronostic favorable



Région commune de délétion interstitielle



*Zhao N, Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997;94:6948-53
Horrigan Lehmann et al Leukemia 2007*

Zone de délétion minimale q31
« Anomalies 5q des LAM / MDS avec anomalies caryotypiques associées »

Zone de délétion minimale
q32 q33.1 « Syndrome 5q- »

*Boulwood J, et al. Genomics 1994
Jaju RJ, et al. Genes Chromosome Cancer 1998
Boulwood J, et al. Blood 2002; 99 :4638-41.*

40
gènes

Parmi les 40 gènes...

33/40 gènes normalement exprimés par les cellules souches hématopoïétiques

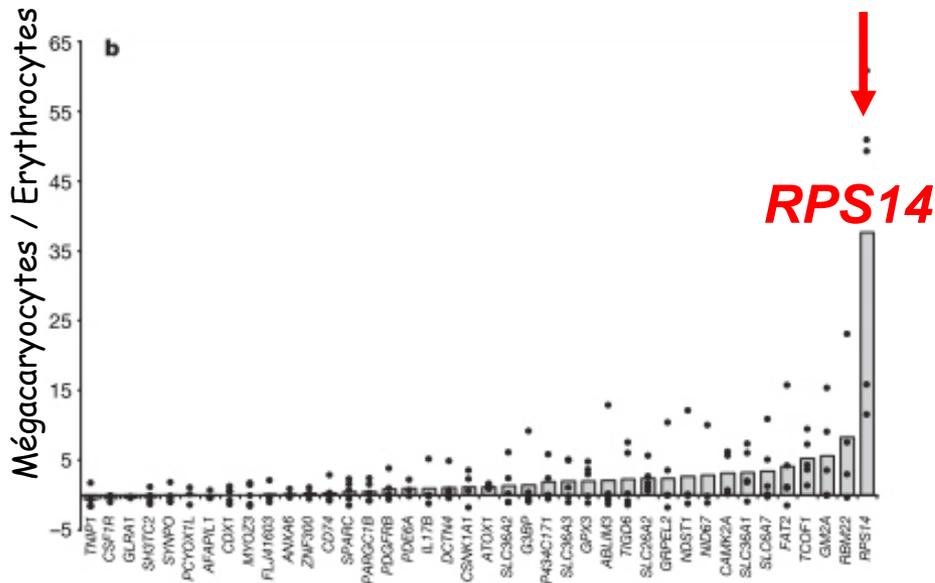
– **SPARC** : gène potentiellement suppresseur de tumeur

- Cancers poumon, ovaire
- Régulation les interactions avec la matrice extra cellulaire : anti adhésion
- Anti prolifération
- Souris SPARC -/- : thrombopénie et diminution des BFU E

– **RPS14** : composant de la sous unité 40S du ribosome

Étude génétique fonctionnelle

- Inactivation des 40 gènes dans les cellules CD34+ normales à l'aide de Sh RNA



Sh RNA RPS14

Phénotype érythrocytaire :

- caractéristiques cytologiques : troubles de maturation
- apoptose

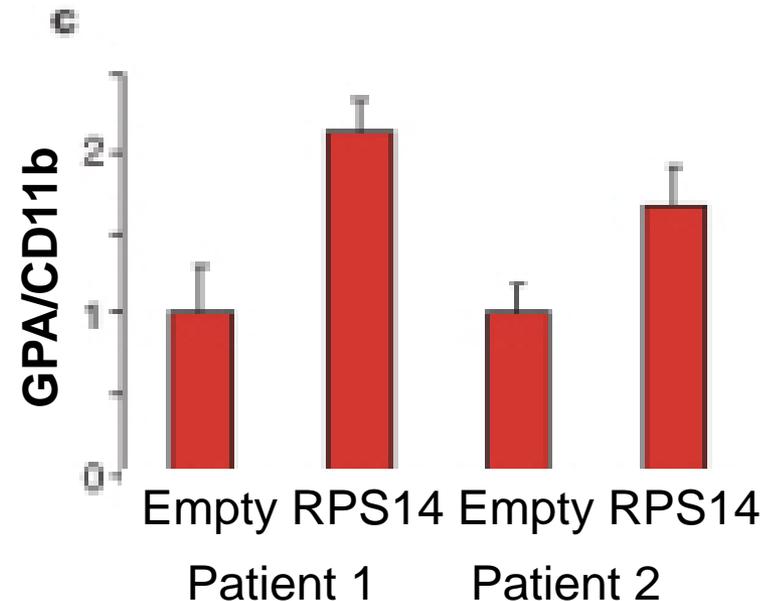
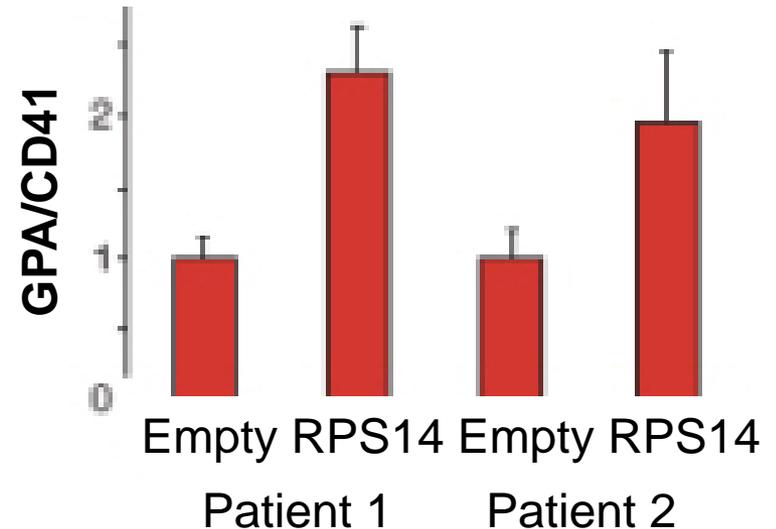
Étude fonctionnelle de *RPS14*

Réintroduction du gène *RPS14*
dans une cellule CD34+ 5q-



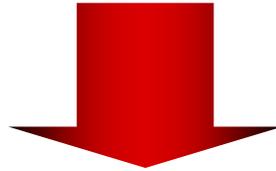
Restauration l'expression des
transcrits érythroïdes et de la
différenciation (**Glycophorine A**)

Phénotype érythrocytaire



***RPS14* et haplo-insuffisance**

- Aucune délétion ou mutation bi allélique décrite
- Pas de perte totale d'expression du transcrit



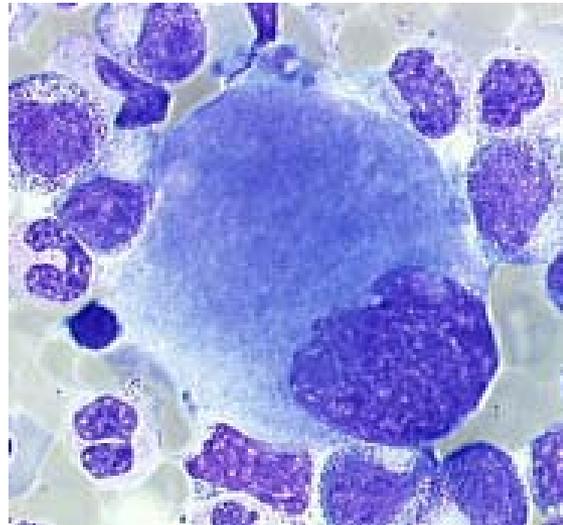
Une délétion mono allélique suffit pour faire apparaître le phénotype

RPS19 et Maladie de Blackfan Diamond

- Mutation hétérozygote de *RPS19*
- Phénotype de dysérythropoïèse

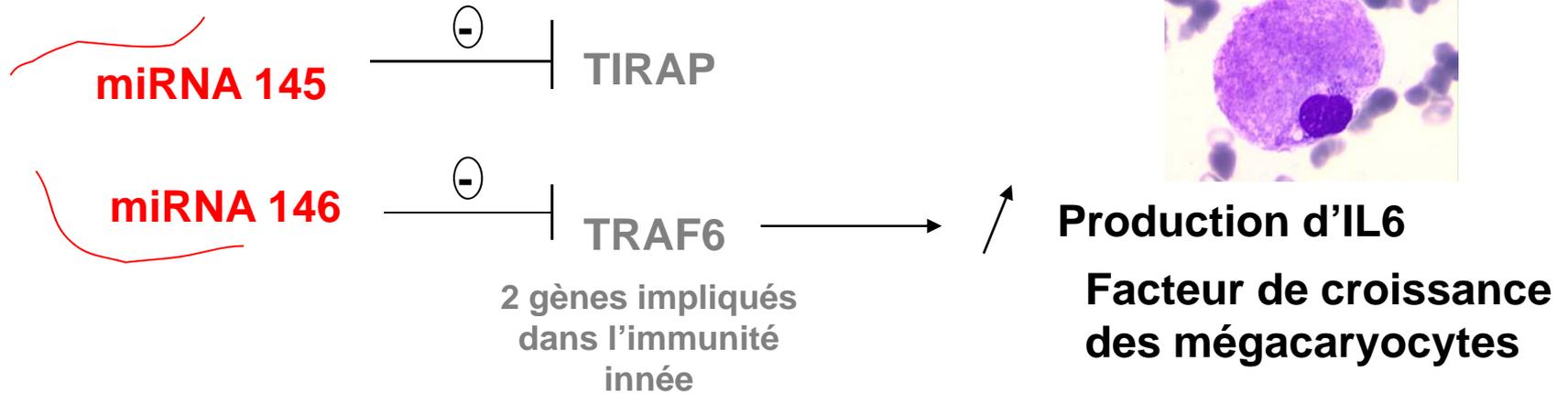
Phénotype plaquettaire

Dysplasie mégacaryocytaire + thrombocytose

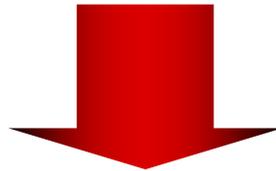


miR-145 et miR-146a sous-exprimés

présents dans les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques



K-o des **2 miRNA** ou expression forcée de *TRAF6*



Reproduit le phénotype plaquettaire du syndrome 5q-

thrombocytose / dysplasie mégacaryocytaire / neutropénie modérée

Modèle murin de syndrome 5q-

Chromosome engineering utilisant la technique de recombinaison **CreLoxP**

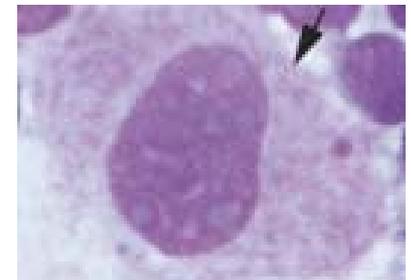
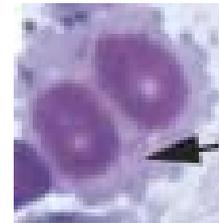
Création d'une **délétion** à l'intérieur l'équivalent murin de la Région Commune de Délétion interstitielle (intervalle CD74 Nid67 Chr18) dans les cellules embryonnaires + Génération de souris.

Région contenant 8 gènes dont *RPS14*

Reproduit un phénotype 5q-
(même plaquettaire !)

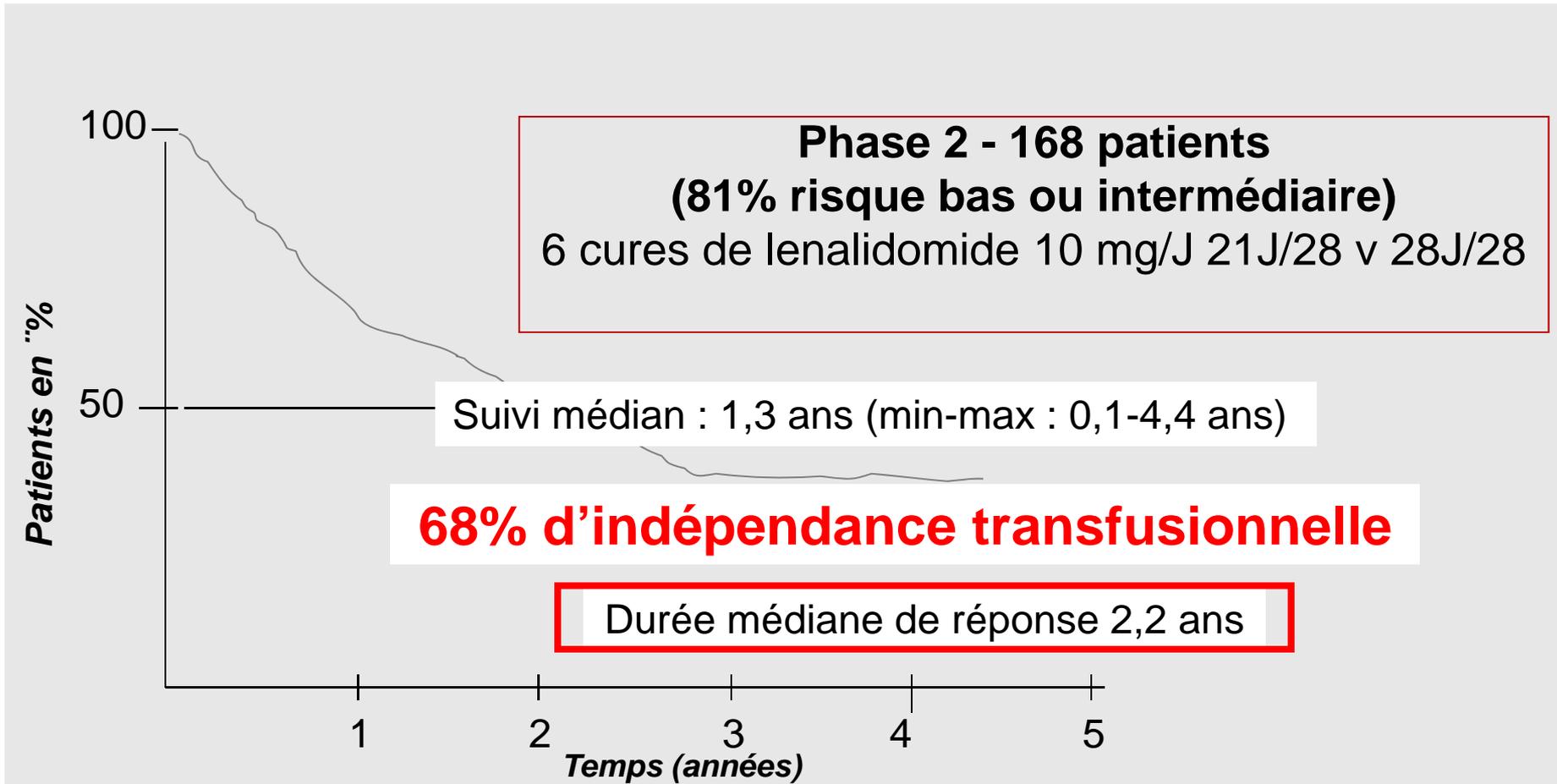
Excès de p53 et d'apoptose

L'inhibition de p53 restaure un **phénotype normal**



Stress ribosomal = check point pour p53 ?

Efficacité du lénalidomide



-38/63 réponse cytogénétique

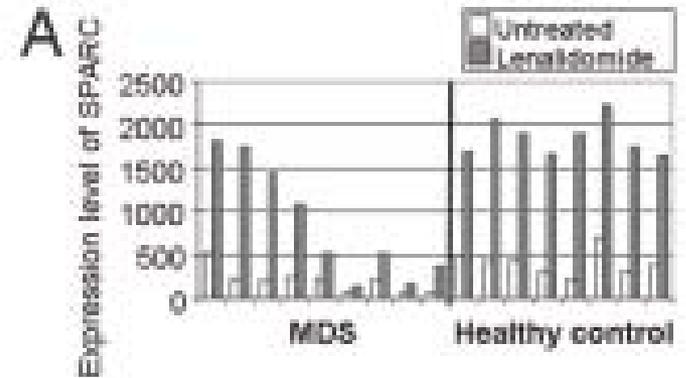
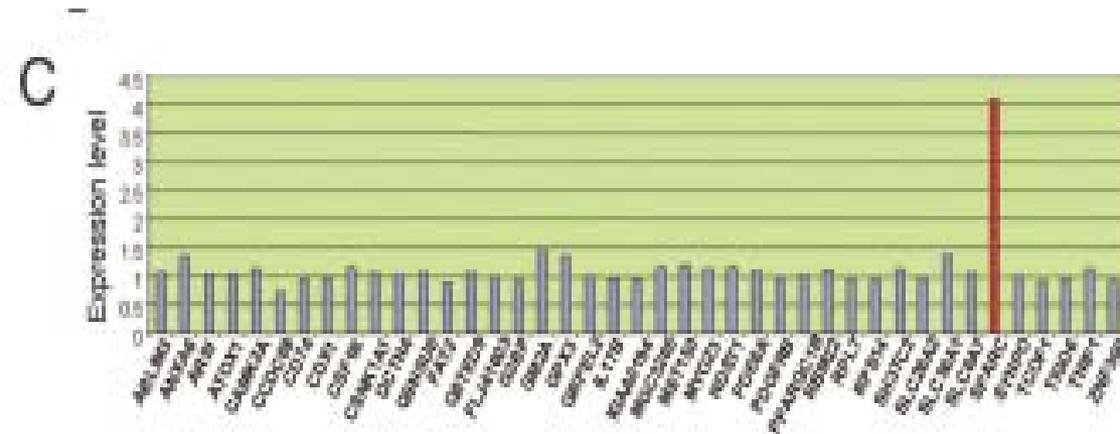
-EI sévères : neutropénie (55%), thrombopénie (44%)

Mode d'action du lenalidomide

- Augmente l'expression de **SPARC** par probable suppression du clone anormal

Régulation des interactions avec la MEC (collagène laminine intégrines)

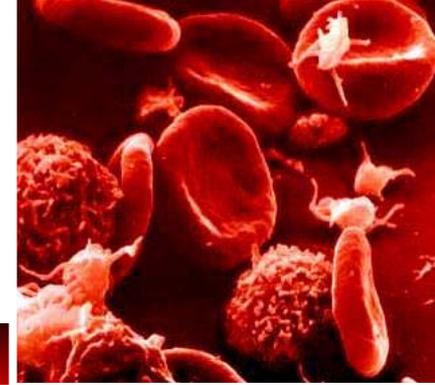
- Anti adhésion
- Anti angiogénique (bloque la prolifération endothéliale médiée par VEGF et FGF2)



- Régule négativement **PU1** un facteur de transcription de la différenciation granuleuse

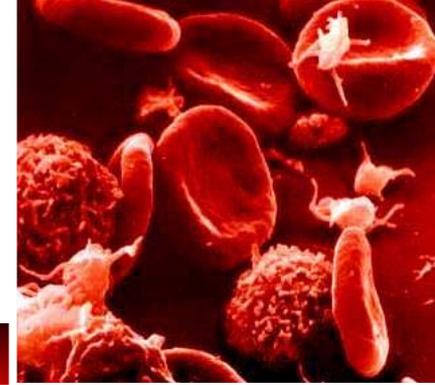
Arrêt transitoire de la maturation granuleuse et accumulation de précurseurs myéloïdes immatures

Conclusion (1/2)



- Atteinte clonale d'une cellule souche hématopoïétique ou d'un précurseur myéloïde multipotent
- **Avantage en croissance du clone tumoral**
- Excès d'apoptose et troubles de maturation secondaires à des anomalies de mécanismes normaux de régulation de l'hématopoïèse
- **Hématopoïèse inefficace**
- **Cytopénies périphériques**
- **Transformation en LAM après acquisition de mécanismes de résistance à l'apoptose**

Conclusion (2/2)



Syndrome 5q-

- Région commune de délétion interstitielle
40 gènes
- Haplo insuffisance de *RPS14* et phénotype érythroïde
- MiR-145 et -146a et phénotype plaquettaire
- Taux élevé de réponse au lenalidomide
Rôle de *SPARC* et microenvironnement
Rôle des FT hématopoïétiques