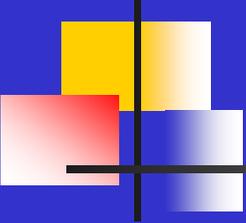


Polyglobulie Primitive: Biologie Moléculaire

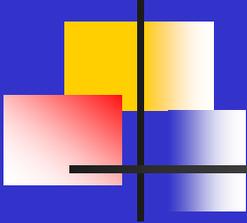
Bruno Cassinat
Unité de Biologie Cellulaire
Service de Médecine Nucléaire
Hôpital Saint-Louis, Paris

6ème JJHF, Angers, 2004



Les Syndromes Myéloprolifératifs Thérapeutique

- LMC: Anomalie Moléculaire Bcr-Abl : sensibilité à l'Imatinib
 - Syndromes Myéloprolifératifs atypiques
 - avec fusion FIP1L1-PDGFRa: sensibilité à l'Imatinib
 - avec fusion X- PDGFRb: sensibilité à l'imatinib
 - avec fusion X-FGFR1: développement de thérapies ciblées
 - Polyglobulie Vraie
 - Thrombocytémie Essentielle
 - Splénomégalie Myéloïde
- } Anomalie Moléculaire ?
Thérapeutique Ciblée ?



Les Syndromes Myéloprolifératifs

Diagnostic

Diagnostic de LMC: Présence de la translocation t(9;22) et transcrit Bcr-Abl

Diagnostic de PV: Hématocrite

Volume Globulaire

Dosage d'Epo

Recherche d'une polyglobulie secondaire: imagerie

gaz du sang, EFR

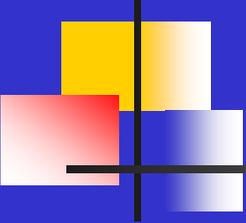
Culture des progéniteurs

Clonalité, caryotype

Biopsie médullaire



Un marqueur moléculaire est vivement souhaité



Les Polyglobulies Vraies

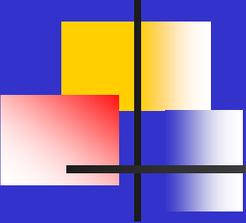
Anomalies moléculaires

Clonalité: - Anomalies du caryotype
- Clonalité des cellules sanguines

Mutations: - Récepteur de l'Epo
- VHL

Anomalie de l'expression génique ou protéique

- c-mpl
- Bcl-xL
- Kinases ou phosphatases
- PRV-1
- nouveaux marqueurs?



Clonalité: Anomalies Cytogénétiques

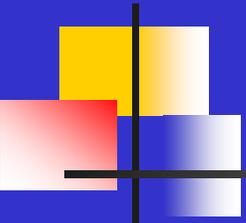
Rationnel: PV = maladie clonale sans anomalie moléculaire spécifique
anomalies cytogénétiques participent au diagnostic de clonalité

Fréquence des anomalies:

- Fréquence augmente avec stade de la maladie
15% au diagnostic à 30% en cours d'évolution jusqu'à 80% à la fin
- acquisition de nouvelles anomalies avec l'évolution de la maladie
- cytogénétique conventionnelle vs FISH ?

Anomalies retrouvées: 20q-, trisomie 8 et 9, 5q-, 7q-, 13q-

Un gène candidat en 20q: L3MBTL
répresseur de transcription



Clonalité des cellules sanguines

Les syndromes Myéloprolifératifs (TE et PV) sont des maladies clonales dans la majorité des cas étudiés.

Marqueurs du chromosome X:

Iso-enzymes de la G6PD: historique

Profil de méthylation de PGK, HPRT

Nombre de tandem repeat de HUMARA

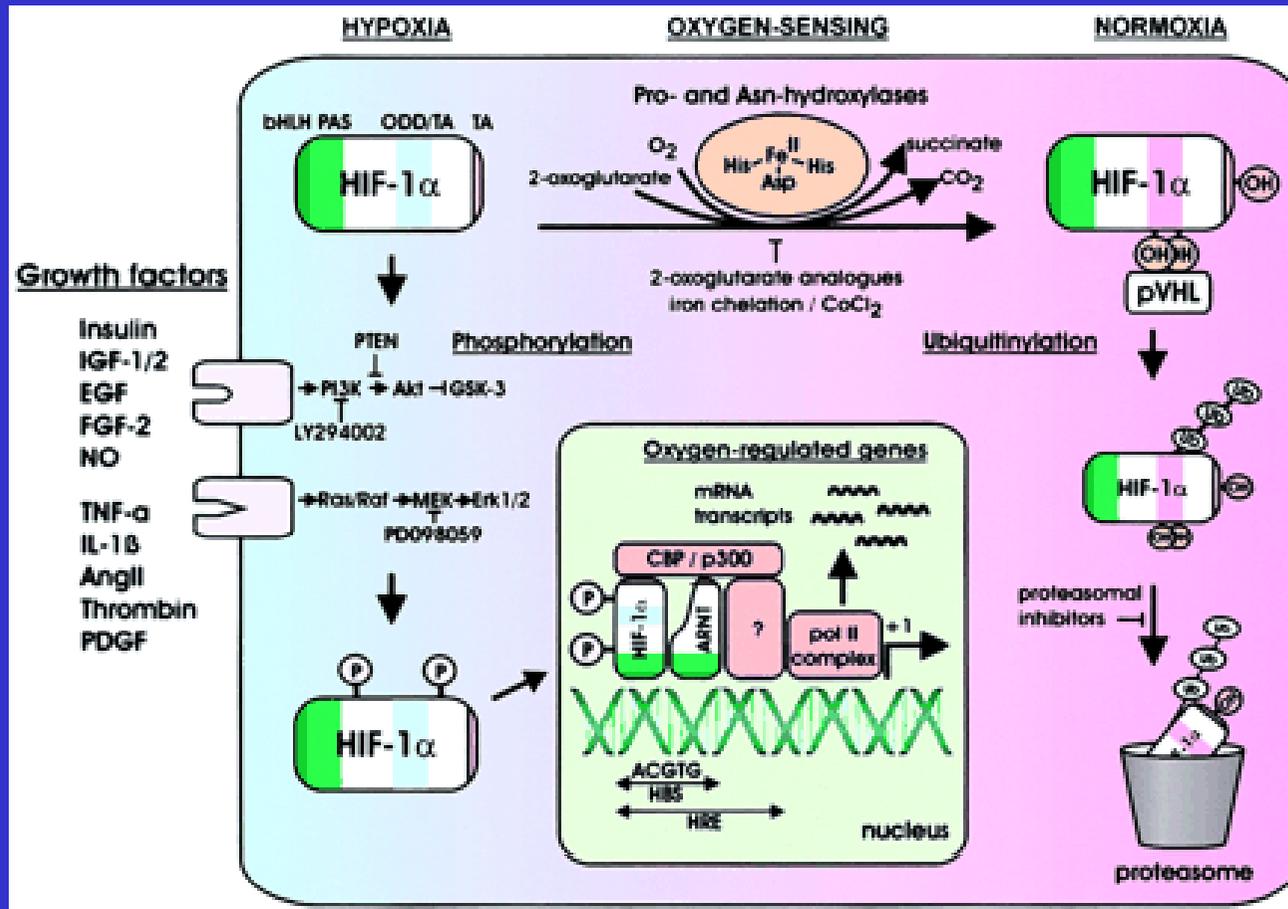
ARN de G6PD, IDS, p55, MPP1, BTK: par RT-PCR +/- SSCP

Etudes sur Polynucléaires ou Plaquettes

→ Restriction aux patients de sexe féminin

(Fialkow 1981; Lucas 1989; Anger 1990, El Kassar 1995 et 1997, Liu 200...)

Anomalies du gène VHL Von Hippel-Lindau



D'après Wenger RH, FASEB J, 2002

Anomalies de VHL

Le Syndrome de von Hippel-Lindau

Mutations hétérozygotes constitutives

Transmission autosomale dominante

Acquisition d'une autre mutation dans l'allèle sauvage

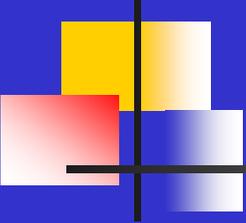
Mutations faux sens, tronquantes ou délétions

anomalies du systèmes nerveux

cancer du rein, hémangioblastome, phéochromocytome

Polyglobulies réactionnelles

Tumeurs sécrétrices d'Epo



Anomalies de VHL

Chuvashie : Région de Russie centrale

Polyglobulie à transmission autosomale récessive

VG augmenté

Epo ↗ mais pas de cause secondaire

Sensibilité à l'Epo des progéniteurs ↗

Pas de caractère de clonalité

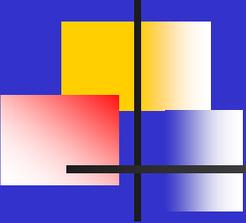
Diagnostic précoce: âge moyen = 16 ans

Surmortalité par thromboses et hémorragies

Mutations homozygotes du gène VHL: Arg200Trp, Asp136Tyr, Val130Ile

Les hétérozygotes sont représentés avec une fréquence importante
avantage sélectif des hétérozygotes?

Pas de tumeurs associées

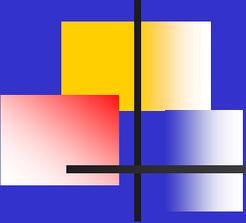


Anomalies de VHL

Conséquences des mutations de VHL dans la polyglobulie de Chuvashie

- Réduction de l'ubiquitination de HIF-1
- Stabilisation de la protéine HIF-1
- Le mutant est moins efficace pour inhiber la transactivation par HIF-1
- Certains gènes cibles de HIF-1 sont surexprimés sans hypoxie:
Epo, VEGF en particulier
Mais certains gènes cibles restent inchangés

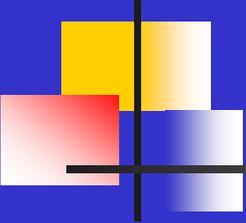
Au total: semble une altération modérée des fonctions de VHL



Anomalies de VHL

Description en dehors de Chuvashie:

- Percu et al., Blood 2003
Screening de 78 patients en grande Bretagne
Polyglobulie + Epo N ou ↗ sans cause secondaire
8 patients homozygotes Arg200Trp
Age de 8 à 32 ans
familles originaires du Pakistan et du Bangladesh
- Pastore et al., Blood 2003
8 enfants américains avec polyglobulie inexpliquée
1 enfant homozygote Arg200Trp: origine Russe
1 enfant double hétérozygote
2 frères avec mutation hétérozygote: polyglobulie familiale
Mutation dominante? 1 a fait hémangiome renal.



Anomalies de VHL

Pastore, Am J Hum Genet, 2003

13 patients avec polyglobulie inexpliquée,

Epo Normale ou haute, diagnostic dans l'enfance

3 homozygotes Arg200Trp: 2 frères danois (asymptomatique)

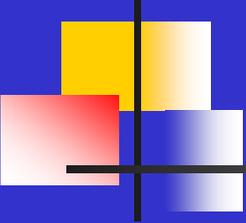
et 1 américain: thrombose mésentérique (15 ans), embolie pulmonaire (18 ans)

3 patients (américains) doubles hétérozygotes Arg200Trp + autre

1 patient (croate) homozygote H191D

6 patients sans mutation de VHL ni EpoR

NB: 2 mutations retrouvées chez les doubles hétérozygotes avec Arg200Trp
ont été auparavant associées à des syndromes VHL

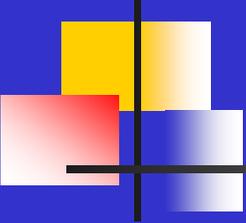


Expression Protéique et Génique

Expression anormale au niveau protéique : c-mpl
Bcl-x_L

Expression anormale au niveau de l'ARN: PRV-1

Profils d'expression génique



Expression de c-mpl dans les PV

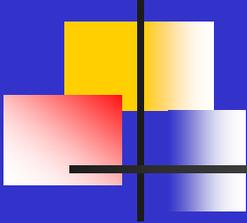
C-mpl = récepteur de la thrombopoïétine

Moliterno 1998: expression de c-mpl sur plaquettes et méga ↘ dans les PV
Phosphorylations intracellulaires induites par TPO ↘

Moliterno 1999: anomalies post-traductionnelles (glycosylation) de c-mpl

Tefferi 2000: expression de c-mpl sur les méga de PV ↘

Le Blanc 2000: expression hétérogène de c-mpl dans les PV



Expression de Bcl-x_L

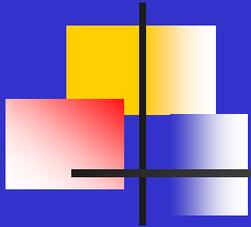
(Silva et al., 1998)

Bcl-x_L: famille de Bcl2
antiapoptotique

Colonies en absence d'Epo chez patients PV: haut niveau de Bcl-x_L

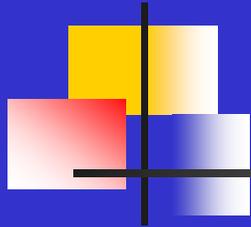
Moelle totale: % de cellules glycophorin A et Bcl-x_L ↗ dans PV

en comparaison avec Normaux,
Polyglobulies secondaires
autres SMP



Polyglobulie vraie: Kinases - Phosphatases

- Aucune Anomalie de Tyrosine Kinase dans la Polyglobulie Vraie
- Imatinib: inhibe la pousse in vitro des BFU-E de PV (Oehler 2003)
Efficacité chez certains patients: Saignées ↘
Plaquettes inchangées
(Silver 2003; Cortes 2003)
NB: Expression de c-kit ↗ dans tous les SMP (Siitonen 1994)
Autre Anomalie ?
- Phosphatases: Activité Phosphatase globalement augmentée (Sui 1997)
PTP-MEG2 phosphatase hyperactive dans PV (Xu 2003)
Cause ou conséquence ?



Un Gène Surexprimé: PRV-1

Clonage par Hybridation soustractive sur ARN de polynucléaires

gène surexprimés dans les PV (Temerinac 2000)

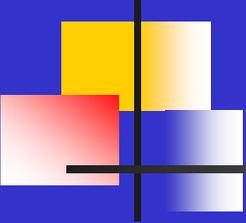
code une protéine de surface

membre de la famille des récepteurs de surface Ly-6/uPAR

identique à NB1, CD177: antigène impliqué dans neutropénies (Bux 2002)

Surexpression au niveau des ARN mais pas de la protéine (Klippel 2002)

→ Mesure de l'expression par RT-PCR quantitative



Un Gène Surexprimé: PRV-1

Cas des PV

	<u>Cellules</u>	<u>Nb patients</u>	<u>% avec PRV-1</u> ↗
Klippel 2003	PN	67 PV, 7 SE 80 normaux	100%
Cilloni 2004	Sg total	34 PV, 12SE 25 normaux	100%
Kralovics 2003	PN	23 PV 18 normaux	91 %
Liu 2003	PN	13 PV	69 %
Tefferi 2004	PN	30 PV, 22 SE 10 normaux	83 %
Bock 2003	BM fixées	12 PV	0 %

Un Gène Surexprimé: PRV-1

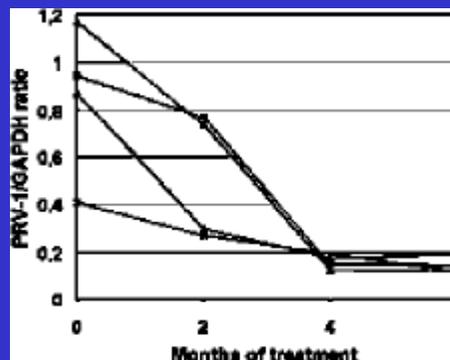
Cas des PV

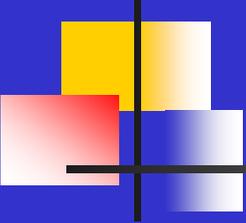
Fruehauf 2003: ARN extraits des PN

12 PV traitées par saignées et HU: 100 % de PRV-1 ↗

10 PV traitées par IFN: pas significativement différent des normaux

4 PV: 6 mois sous PEG-IFN 50 µg/semaine : réduction de 6 fois



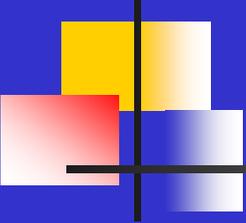


Un Gène Surexprimé: PRV-1

Cas des TE

	<u>Cellules</u>	<u>Nb patients</u>	<u>% avec PRV-1</u>
Cilloni 2004	PN	32 TE 16 secondaires	100 %
Kralovics	PN	15 TE 18 normaux	67%
Liu 2003	PN	12 TE	20 %
Johansson 2003	MNC	70 TE	24 %

↳ Thrombose chez 10/17 PRV-1 positif et 14/53 PRV-1 négatif (p=0.02)
Délais de mise sous traitement cytoréducteur plus court si PRV-1 positif (p=0.01)
Plusieurs études rapportent taux de thrombose supérieur chez patients PRV-1 +



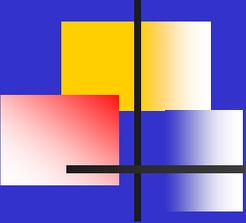
Un Gène Surexprimé: PRV-1

Causes de Variabilité inter-études:

- diagnostic
- traitement antérieur
- origine des ARN: Polynucléaires ou cellules mononuclées
- technique:
 - robustesse de la méthode: Choix des primers et sonde
Gamme étalon ou non
Appareil
 - choix du gène de référence: GAPDH, 18-S, Abl, Gus ...
 - mode d'expression des résultats: Δ Ct, Copies, μ g ARN



STANDARDISATION Nécessaire



Gene Profiling: Nouveaux marqueurs?

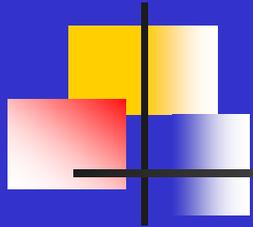
Pellagatti 2003: ARN de polynucléaires sur puces cDNA 6000 gènes
11 patients PV versus normaux
147 gènes up-régulés dans la majorité des cas

11 gènes up-régulés
dans la totalité des cas

GYG
PYGL
SLP1
ADM
SFRSK1
CAAF1
IP30
GNG10
ANX3
FCER1G

20 gènes down régulés
dans la majorité des cas

SGK
BTG2
IL7-R
Etc..



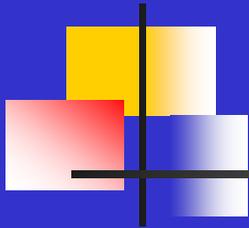
Gene Profiling: Nouveaux marqueurs?

Kralovics et al. Non publié

Microarray sur ARN de polynucléaires de SMP : 280 gènes

Test de 15 gènes sur 24 PV, 12 TE, 7 SE, 14 normaux

RT-PCR quantitative sur 3 gènes suffisent à différencier PV
même 3 patients avec PRV-1 normal



CONCLUSION

