

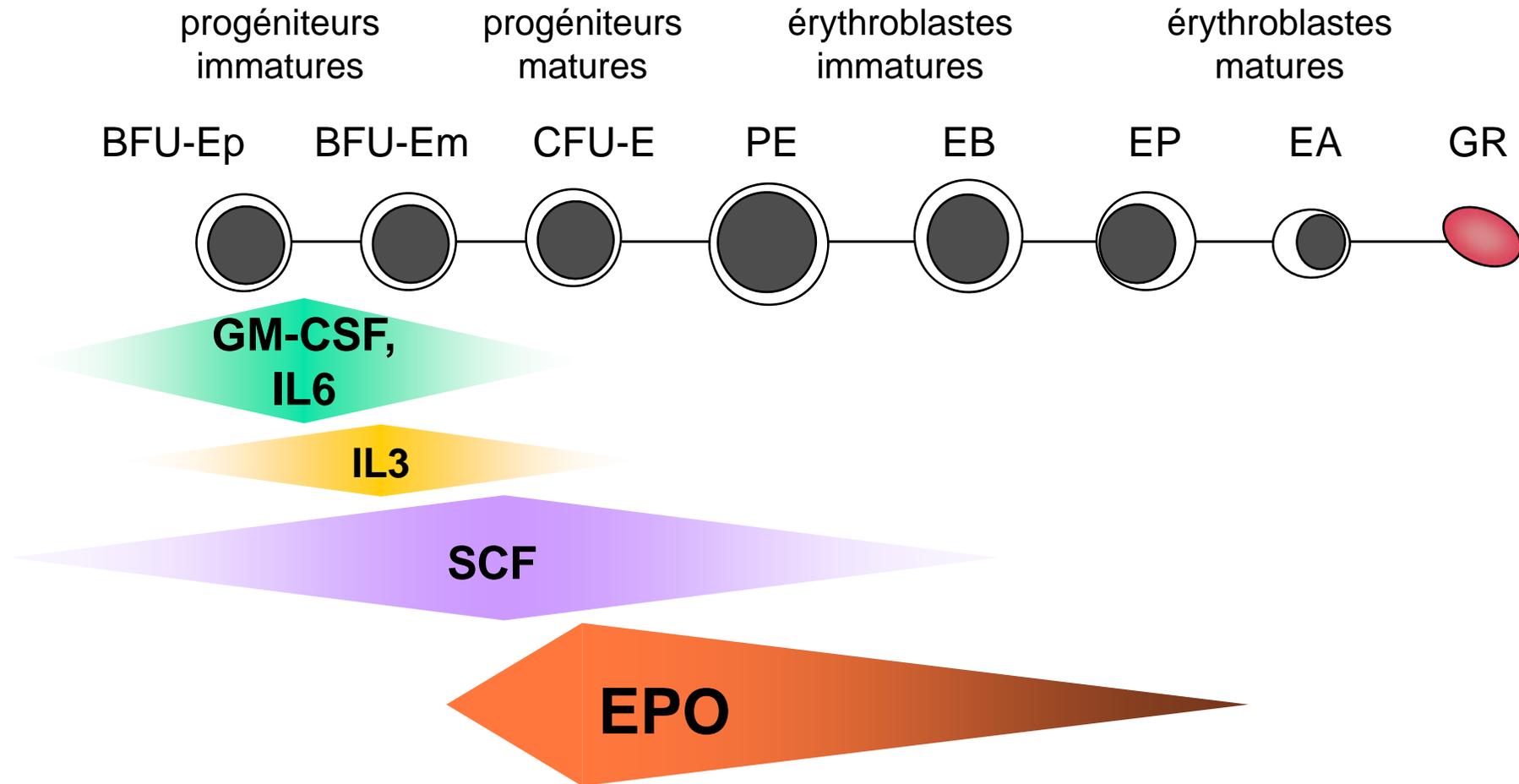
Erythropoïétine, récepteur de l'érythropoïétine et polyglobulies

Valérie Ugo

Laboratoire d'Hématologie, CHU Brest

Inserm U362, Villejuif

Erythropoïèse : Action des cytokines



L'érythropoïétine est la seule cytokine à agir sur l'érythropoïèse terminale

Caractéristiques biochimiques de l'érythropoïétine

- Masse moléculaire de la partie protéique :
18 400 Da
- Masse moléculaire de la protéine glycosylée :
30 400 Da
- Glycosylation nécessaire à l'activité biologique in vivo

Synthèse de l'EPO

Cellules productrices - Rein adulte -

- Cellules péri-tubulaires interstitielles, d'origine fibroblastique

Maxwell, 1993

- Cellules tubulaires

Maxwell, 1990

Loya, 1994

- En pathologie

- Rein polykystique : cellules péri-tubulaires

Eckardt, 1989

- Cancer du rein : cellules d'origine tubulaire

Da silva, 1990

Synthèse de l'EPO

Foie adulte

- Hépatocytes + autre cellule ?

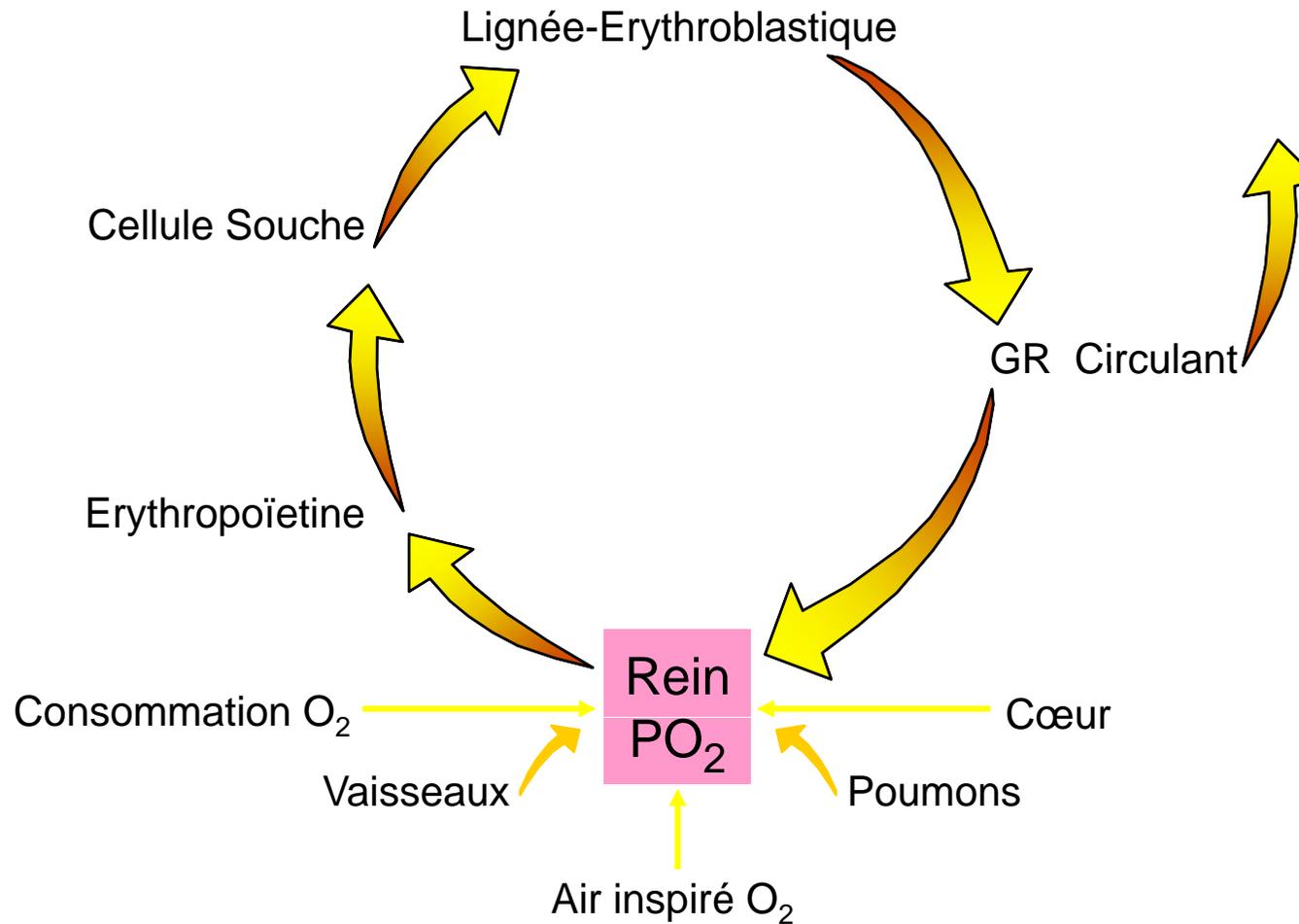
Koury S.T. 1991

Schuster S.J. 1992

- Hépatocytes + cellules de ITO

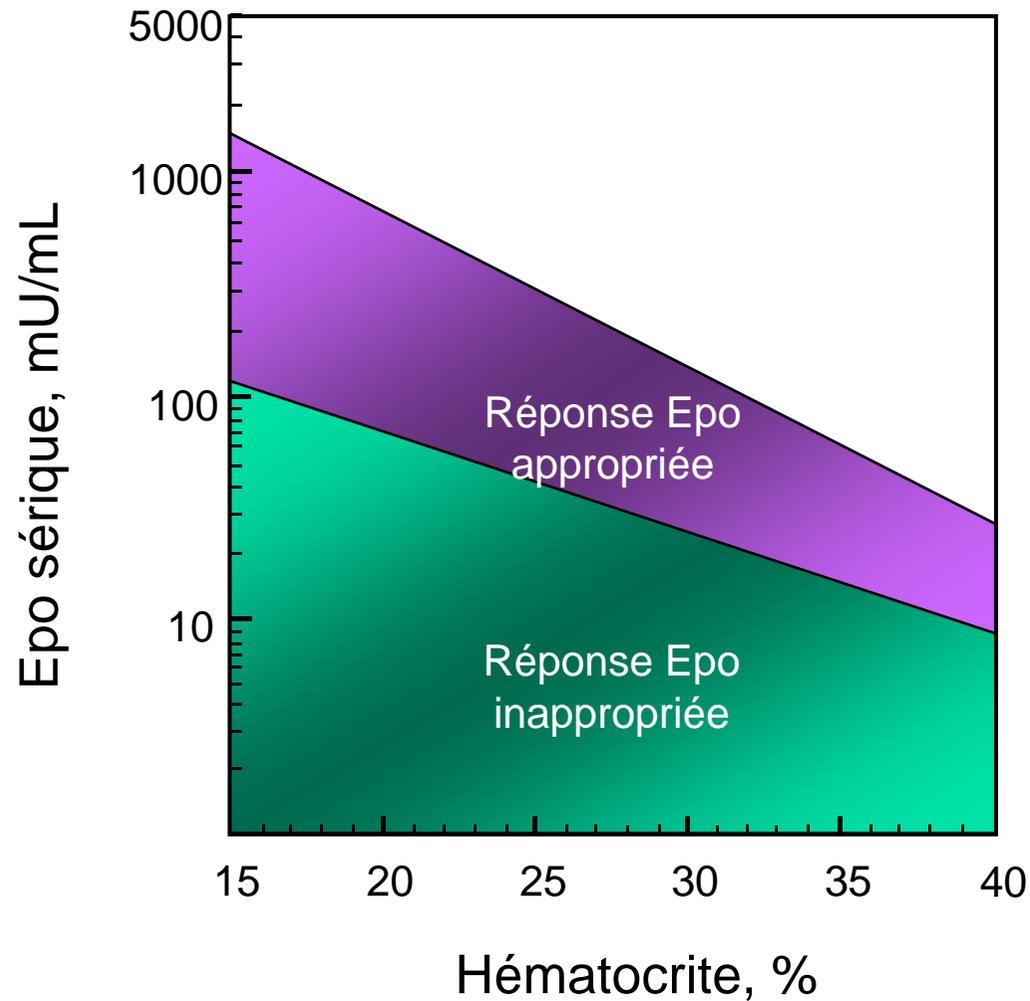
Maxwell P.H. 1994

Régulation de la production d'Epo



Régulation de la production d'Erythropoïétine par le rein

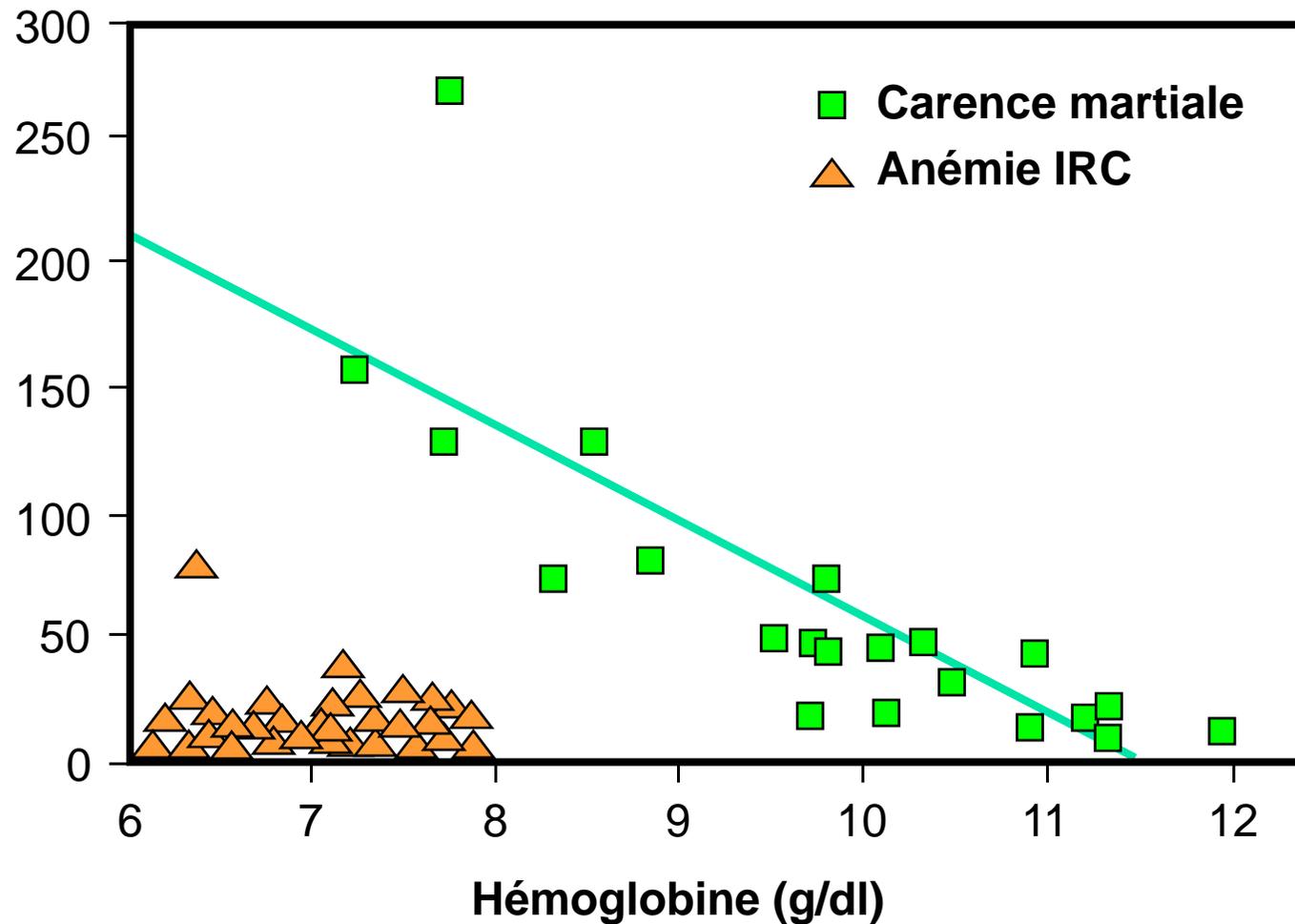
Relation entre hématokrite et taux sérique d'EPO



D'après M. Cazzola, Blood 1997

Sécrétion d'érythropoïétine en réponse à l'anémie

Erythropoïétine UI/L

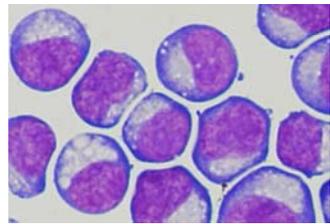


Récepteurs à l'érythropoïétine

expression

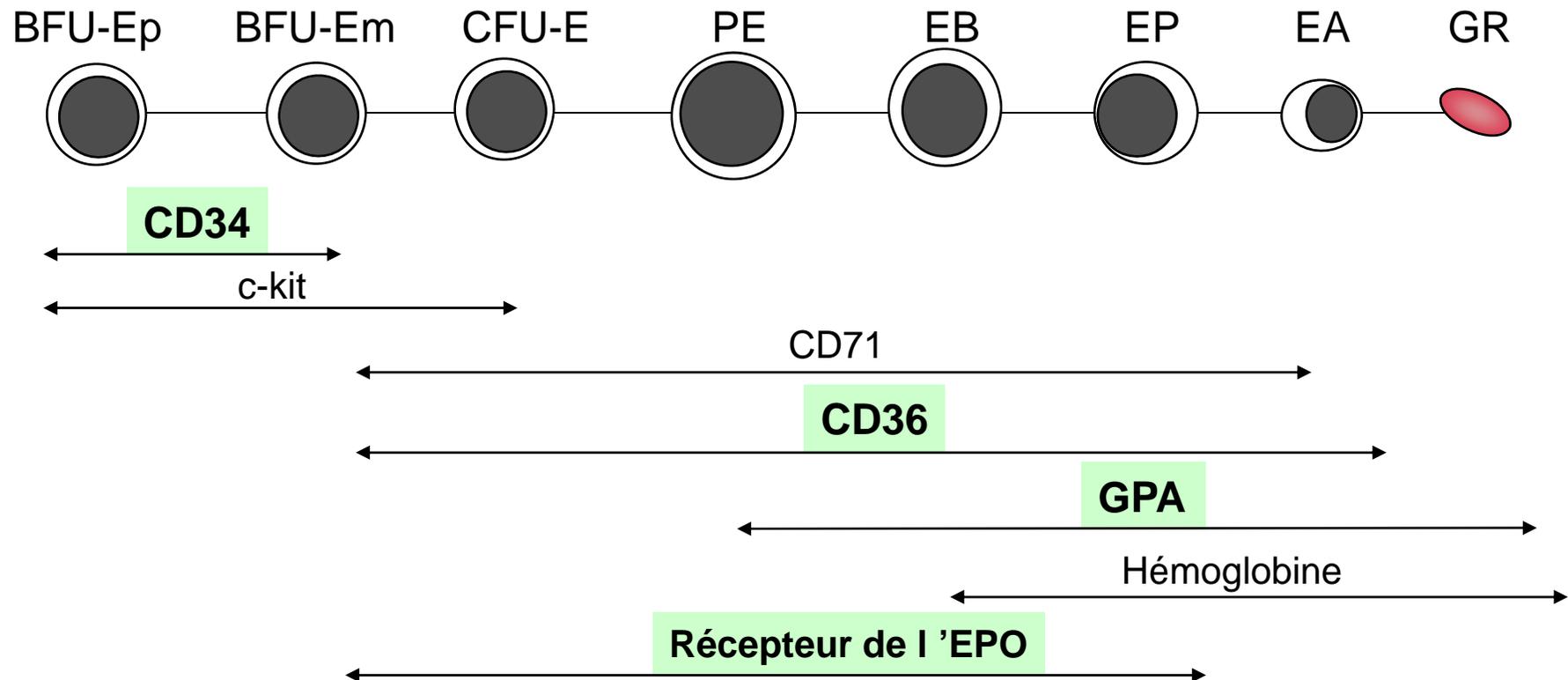
- ◆ Erythroblastes
 - Normaux
 - Lignées
- ◆ Mégacaryocytes
- ◆ Placenta
- ◆ Cellules endothéliales
- ◆ Astrocytes - neurones

Erythropoïèse: marqueurs de différenciation

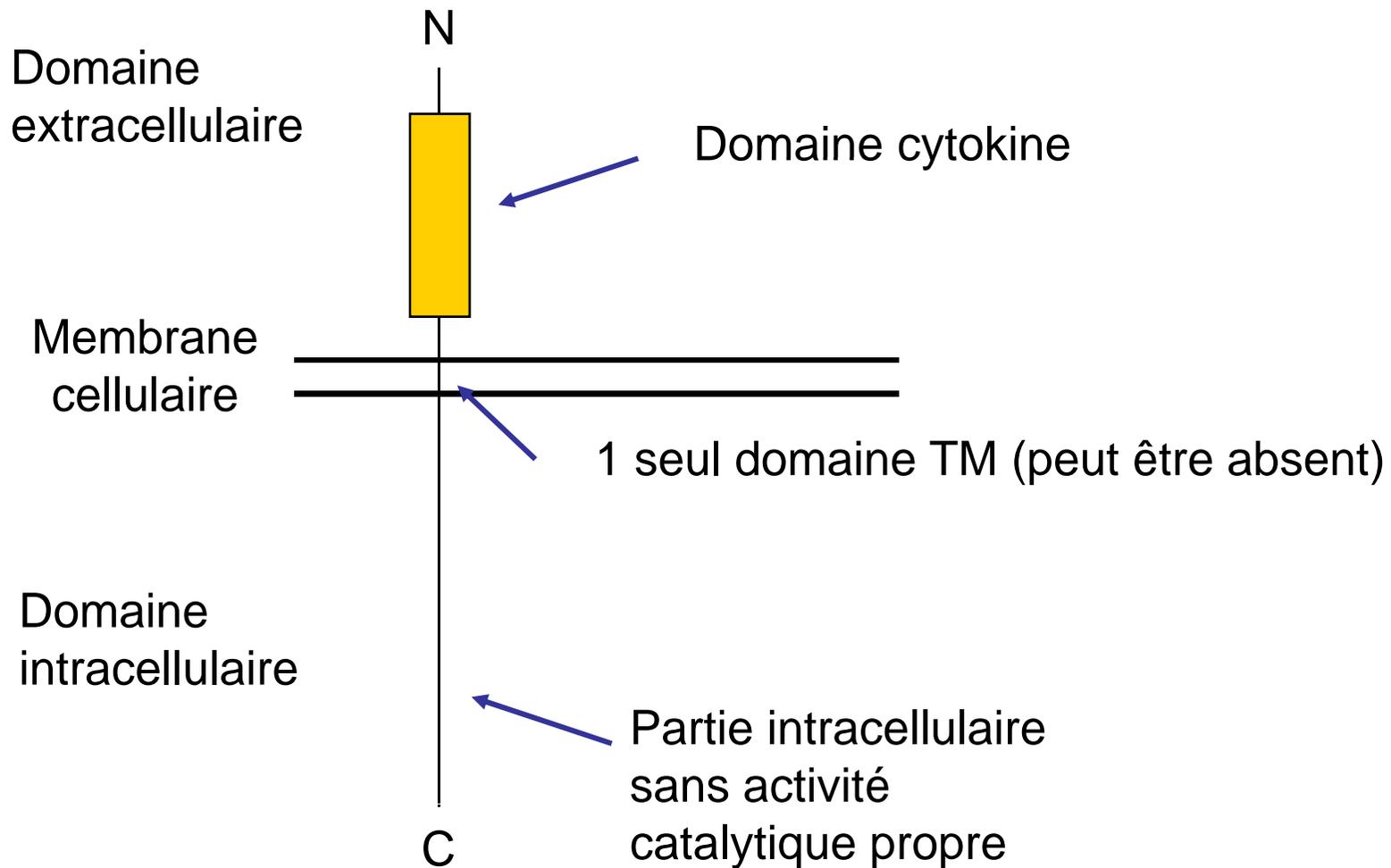


Erythropoïèse précoce

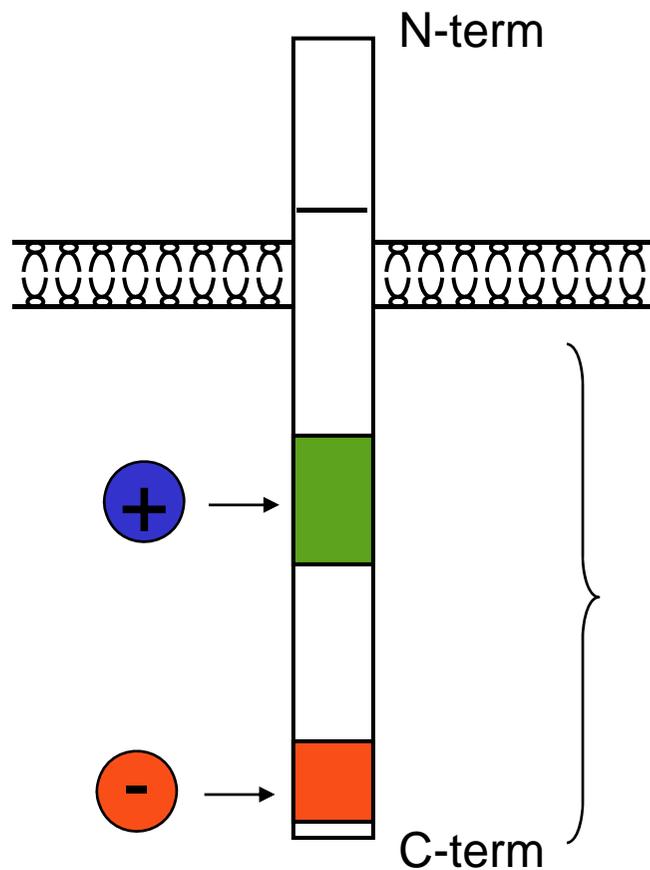
Erythropoïèse tardive



Structure générale des récepteurs de cytokines



Récepteur de l'érythropoïétine

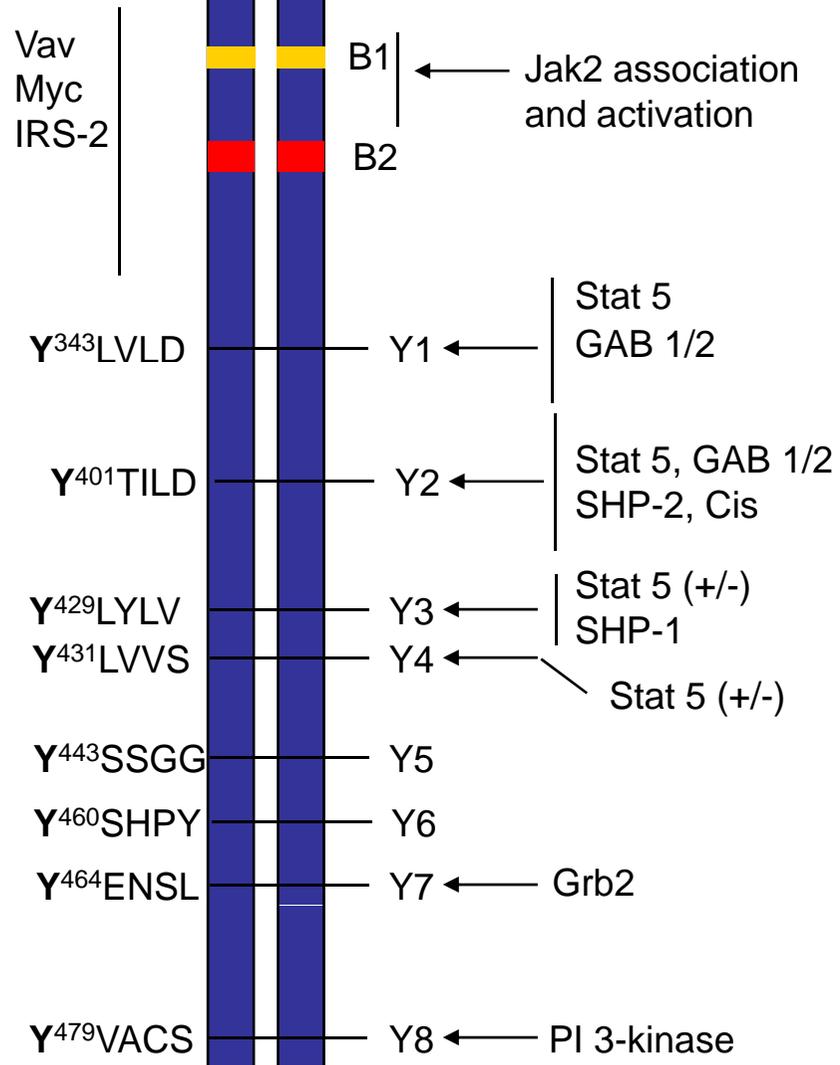


- cloné en 1989
- chromosome 19
- 5 kb, 8 exons

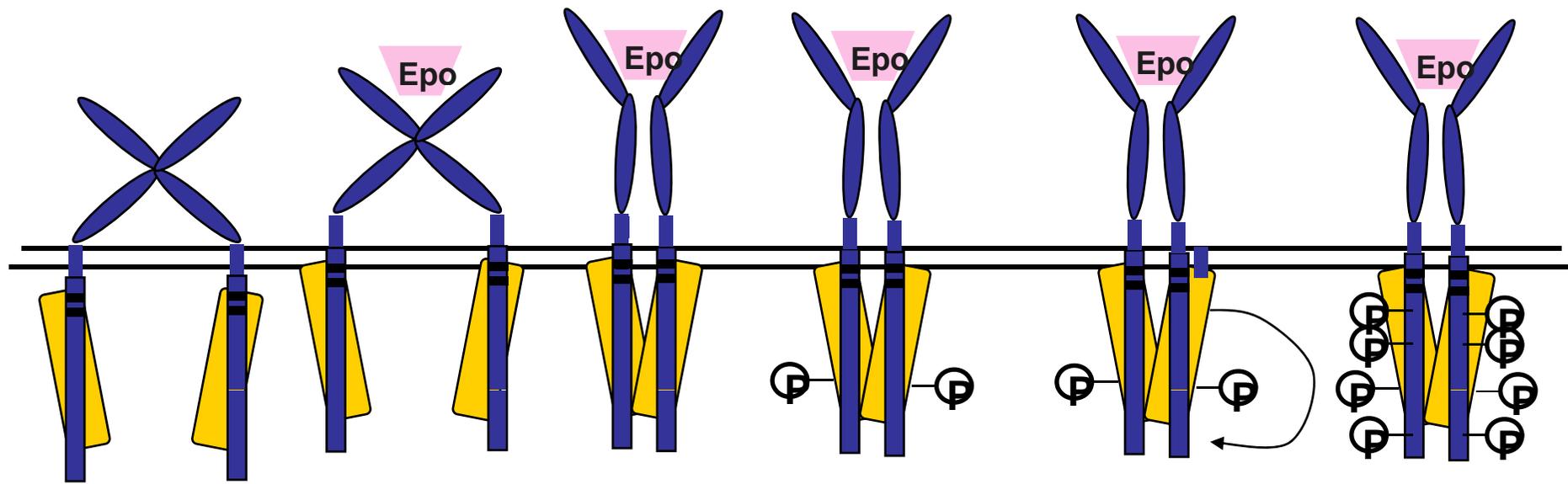
- protéine 508 aa
- 55 à 72-78 kDa
- exons 7 et 8 du gène : partie intracytoplasmique

D'Andrea et al, 1989

Récepteur de l'Epo



Mécanisme d'activation de R-EPO



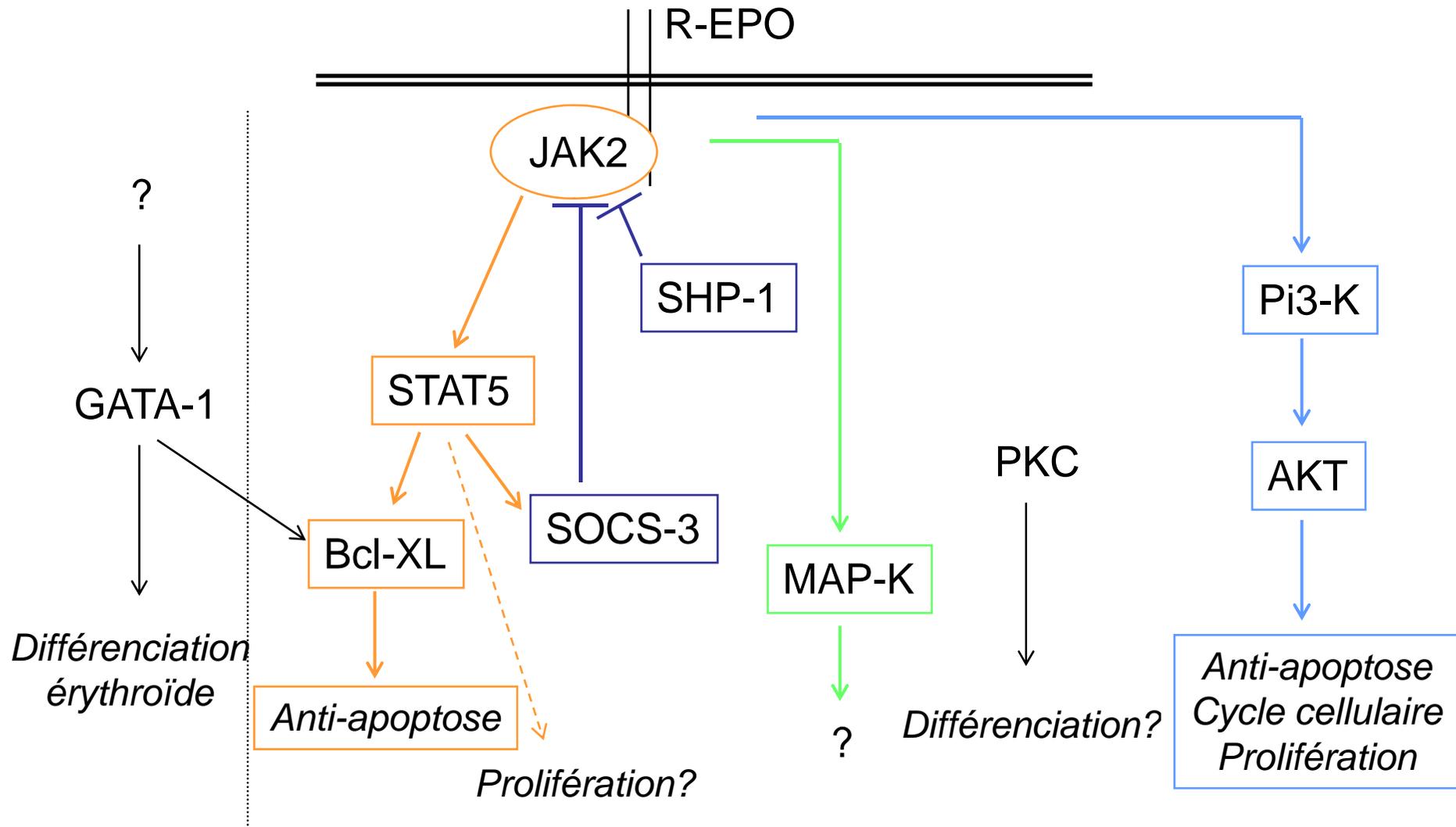
Relais intracellulaires

STAT5

PI 3-kinase

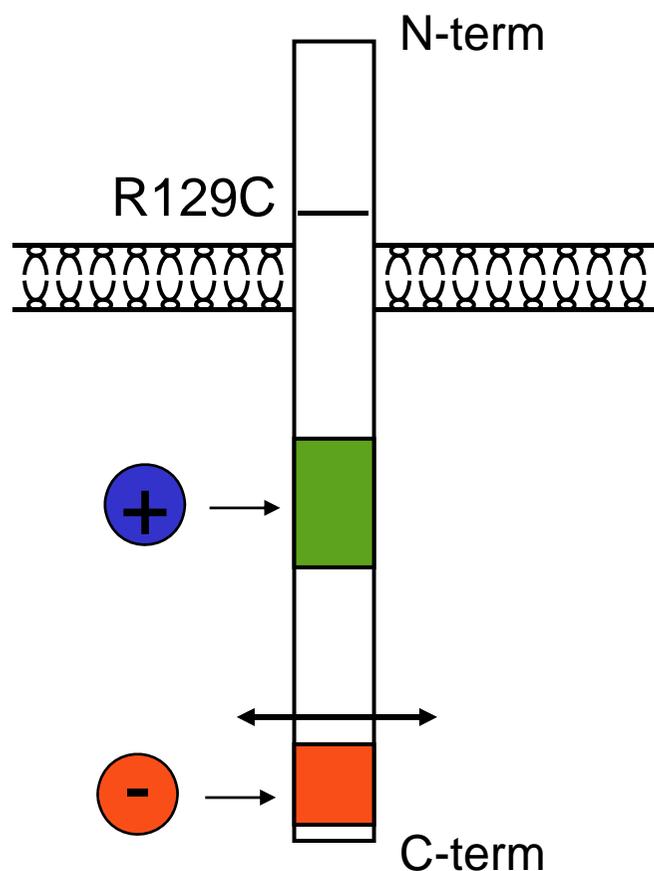
Ras/MAP kinases

Représentation des mécanismes de survie, de prolifération, et de différenciation induits par l'EPO



Anomalies du récepteur de l'EPO

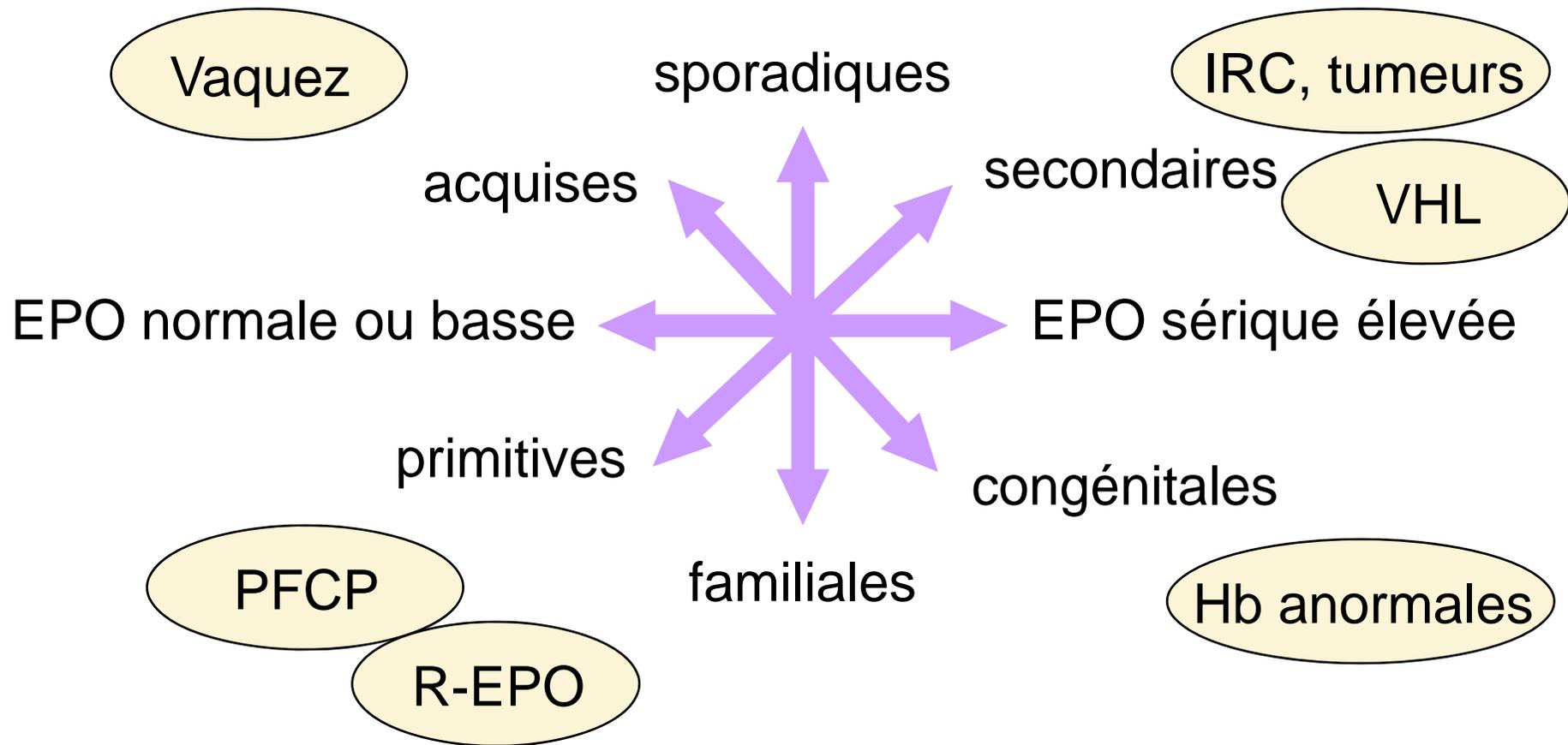
Modèles expérimentaux



- mutation ponctuelle : arginine \leftrightarrow cystéine (codon 129)
==> autonomie de croissance et tumorigénicité
- délétion de l'extrémité C-terminale chez la souris
==> augmentation d'activité de R-EPO

Yoshimura, 1990, D'Andrea, 1991

Polyglobulies ou érythrocytoses



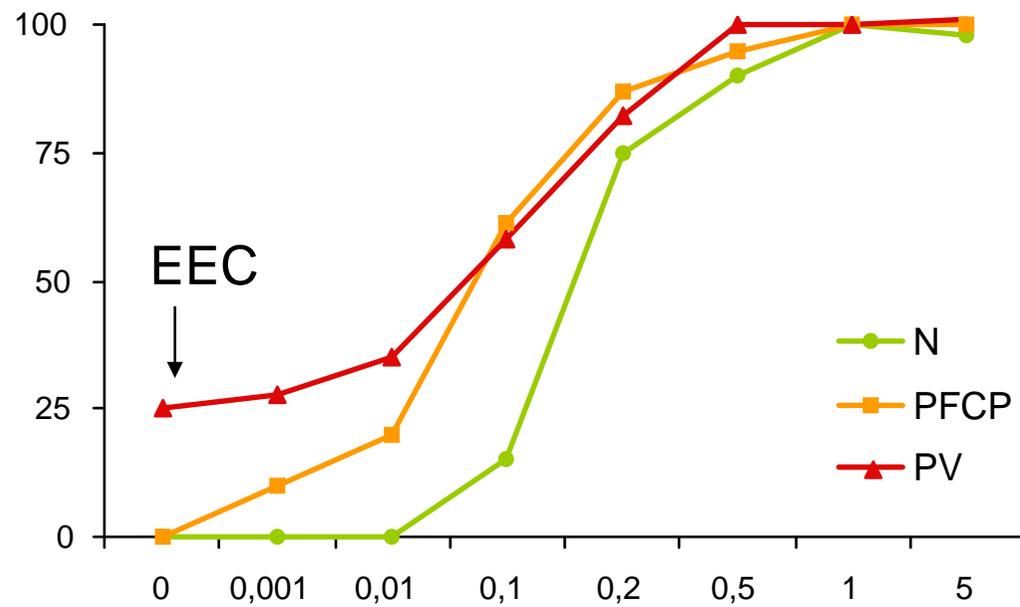
Le récepteur de l'EPO est normal dans la maladie de Vaquez

- Observation de colonies spontanées ou endogènes en absence d'érythropoïétine (EEC)
- Pas d'anomalie de l'affinité du récepteur de l'EPO
- Pas de mutation du gène du récepteur à l'EPO
- Pas de stimulation autocrine par l'EPO
 - pas de détection de transcrit de l'EPO dans la moelle des patients, ni dans les colonies d'érythroblastes obtenues in vitro.
 - des anticorps anti-EPO ne bloquent pas la prolifération spontanée

Means, 1989, Fischer, 1994, Le Couédic, 1996

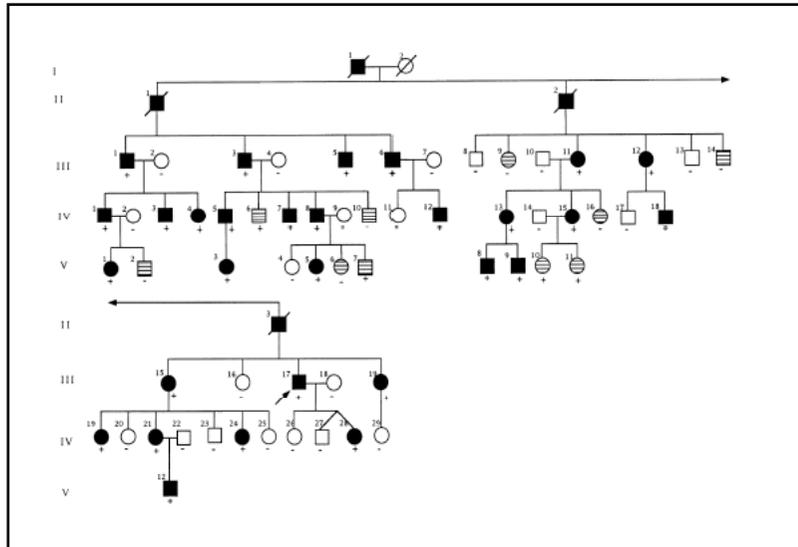
Polyglobulies primitives

Formation des colonies érythroïdes in vitro



Polyglobulie familiale et mutation du gène de R-EPO

- Etude de trois familles polyglobuliques : pas d'anomalie de R-EPO en Southern blot (*Emanuel, 1992*)



- 1ère description d'une famille avec 33 membres atteints (*De la Chapelle, 1993*)
- Propositus : champion du monde de ski de fond
- 5 générations étudiées
- transmission autosomique dominante
- Espérance de vie normale, aucun symptôme

Polyglobulie familiale

Caractéristiques des sujets polyglobuliques

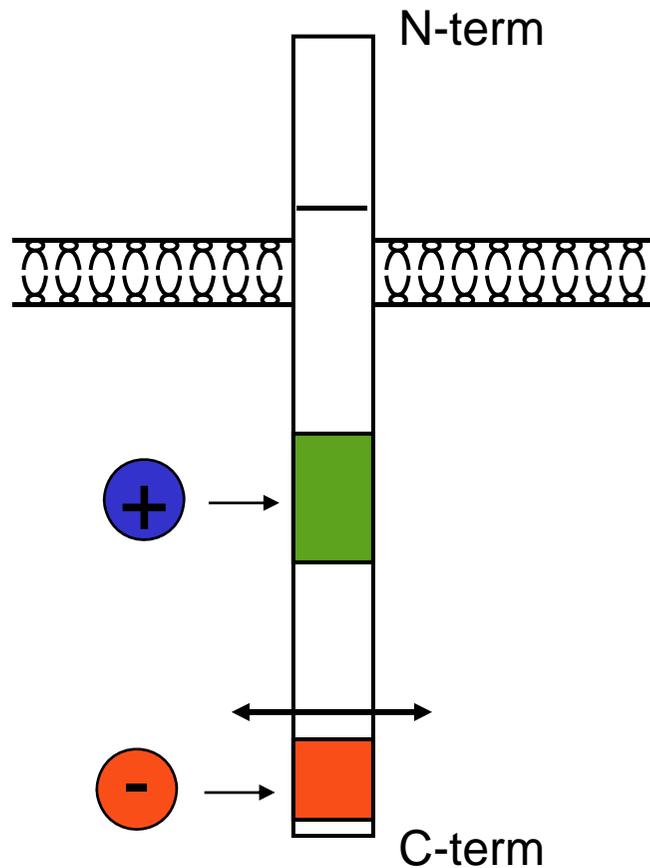
De La Chapelle, 1993

- Hb moyenne
H = 20,4 g/dl F = 19,1 g/dl
- Hypersensibilité à l'EPO des progéniteurs médullaires (10^{-2})
- Pas d'autonomie vraie
- Pas de stimulation des progéniteurs par le sérum des patients

Mutation du gène de R-EPO

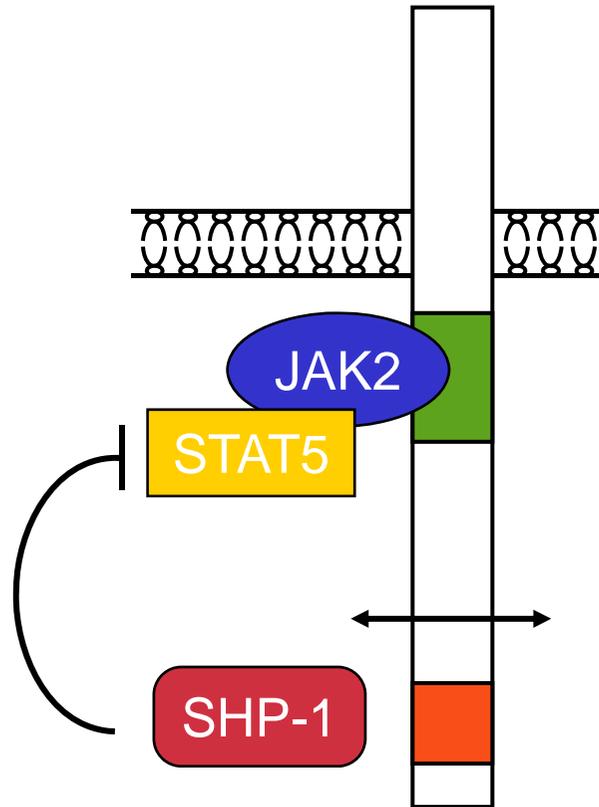
Délétion de l'extrémité C-terminale

De La Chapelle, 1993



- Etude du gène de R-EPO
 - mutation G6002A (exon 8)
 - TGG (tryptophane) en TAG (codon stop)
 - récepteur « tronqué » de 70 aa à l'extrémité C-term
 - mutation présente 29 cas/29 étudiés
- Hétérozygotes

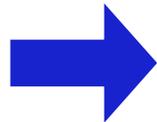
La délétion de l'extrémité C-terminale entraîne la perte du site de fixation de SHP-1



- Transfection de R-EPO tronqué dans Ba/F3 confère hypersensibilité à l'Epo (*De La Chapelle, 1993*)
- Présence des 2 types de transcrits dans les progéniteurs (*Sokol, 1995*)
- Diminution du taux d'inactivation de Stat5 et de Jak2 (*Arcasoy, 1999*)

Polyglobulies familiales et congénitales primitives (PFCP)

- ↑ masse sanguine avec érythrocytose pure
- aucun critère de PV : GB et plaq N, pas de SPM
- pas d'évolution leucémique
- Hb et Ht remarquablement stables
- absence de cause secondaire, taux d'EPO NI ou bas
- affinité de l'Hb pour l'O₂ Nle
- hypersensibilité à l'Epo des progéniteurs



maladie extrêmement rare (incidence ?)
transmission autosomique dominante
rars cas sporadiques, ou à trans. autos. récessive

Mutations de R-EPO et polyglobulie familiale :

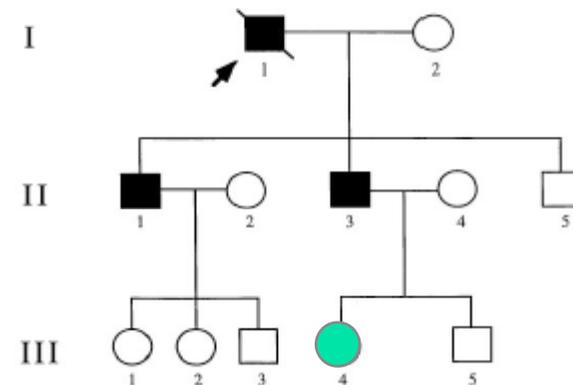
Données de la littérature

Delachapelle, 1993	F	G6002A	perte 70 aa
Sokol, 1995	F	5974insG	perte 64 aa
Furukawa, 1997	F	C5986T	perte 74 aa
Arcasoy, 1997	F	del 7 pb 5985-5991	perte 59 aa
Kralovics, 1997	F	del 7 pb 5985-5991	perte 59 aa
	F	5967insT	perte 65 aa
Percy, 1998	S	G6002A	perte 70 aa
Kralovics, 1998	F	C5964G	perte 83 aa
Watowich, 1999	F	dupl 5968-5975	perte 79 aa
Kralovics, 2001	F	G5959T	perte 84 aa
Arcasoy, 2002	F	G5881T	perte 110 aa
Ugo, 2004	F	del 2 pb 5857-5858	perte 85 aa
Petersen, 2004	F	del 4 pb 5938-5941	perte 58 aa

Mutations de R-EPO et polyglobulies

Remarques

- 1 enfant porteur de la mutation, hypersensibilité des progéniteurs érythroïdes mais pas de polyglobulie (*Kralovics, 1998*)



- Cas sporadiques de mutation ponctuelle C6148T (P488S) effet ? (*Sokol, 1994 ; Le Couédic, 1996*)
- Mutation intronique de signification inconnue (*Kralovics, 2001*)

Erythropoietin receptor mutations and Olympic glory

- Existe-t-il un lien entre le taux d'Hb et la performance sportive ?
- Risque d'incitation au dopage
- Existe-t-il une diminution de l'espérance de vie des patients R-EPO muté ?
 - risque d'affections myocardiques
 - hémorragies / ischémies cérébrales
- Effets extra-hématopoïétiques des mutations de R-EPO ?

Longmore, Nat Genet 1993 ; Prchal, Science 1995

Polyglobulie et mutation de R-EPO

Modèles animaux (1)

- Remplacement (knock-in) du R-EPO murin par le récepteur humain sauvage et muté (C5964G)
- C5964G \Rightarrow récepteur amputé de 83 aa en C-term
- souris wt / hm \rightarrow polyglobuliques, Ht 55%
hypersensibilité in vitro des progéniteurs
- souris hm / hm \rightarrow viables
sévérement polyglobuliques, Ht > 60%
splénomégalie



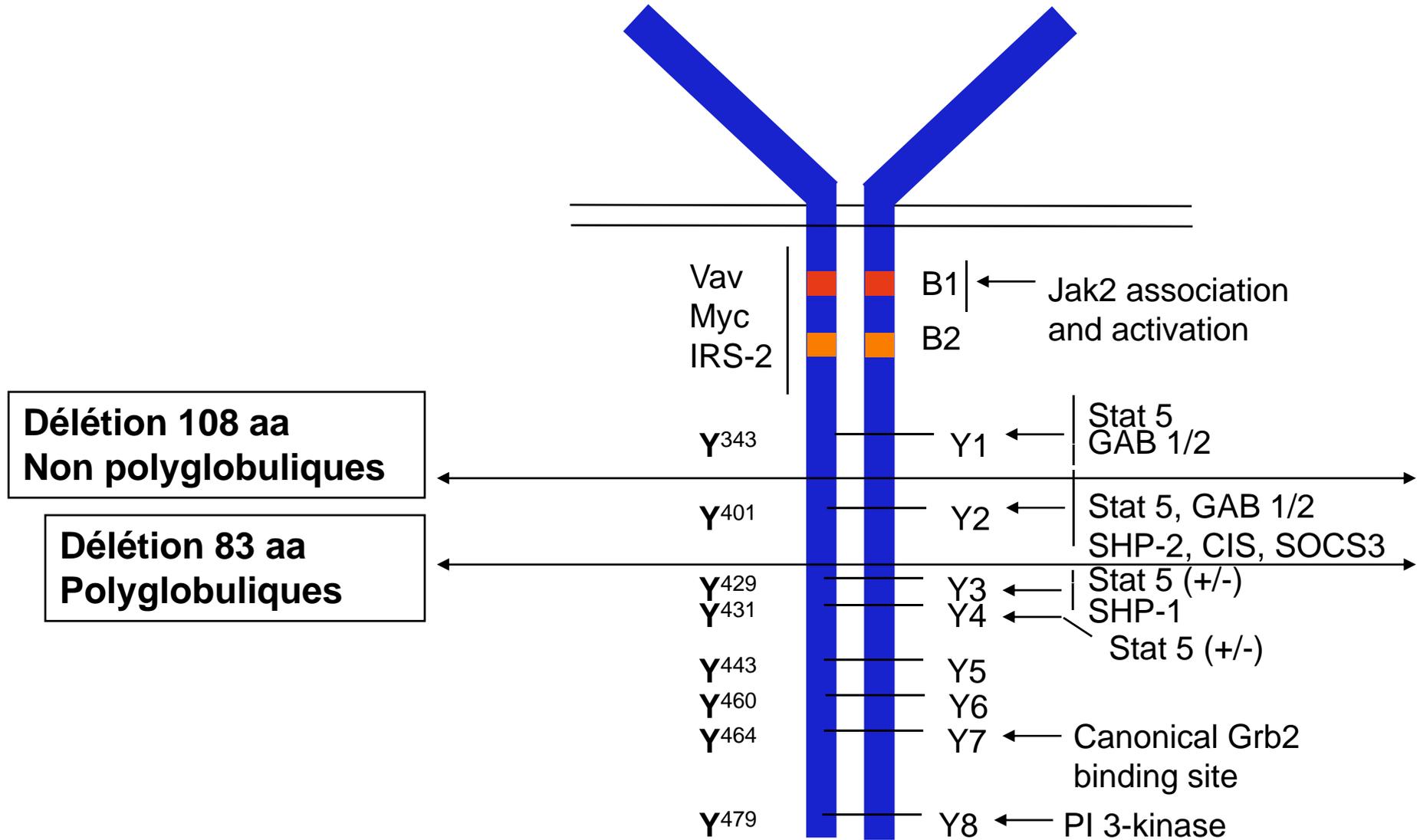
Mutation de R-EPO

Modèles animaux (2)

- Délétion de 108 aa
- Souris viables
- Hétérozygotes : pas d'érythrocytose, Ht normal
- Homozygotes
 - Taux d'Hb = 1,08 x
 - Légère ↗ du nb de CFU-E dans la moelle
 - ↗ activation STAT5 en réponse à l'EPO
- Idem + mutation Y343
 - Phénotype similaire aux souris STAT5a/b -/-
 - Sauf splénomégalie

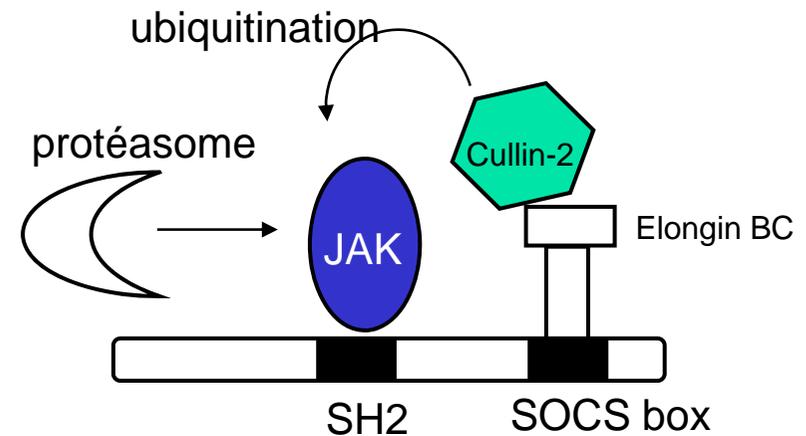
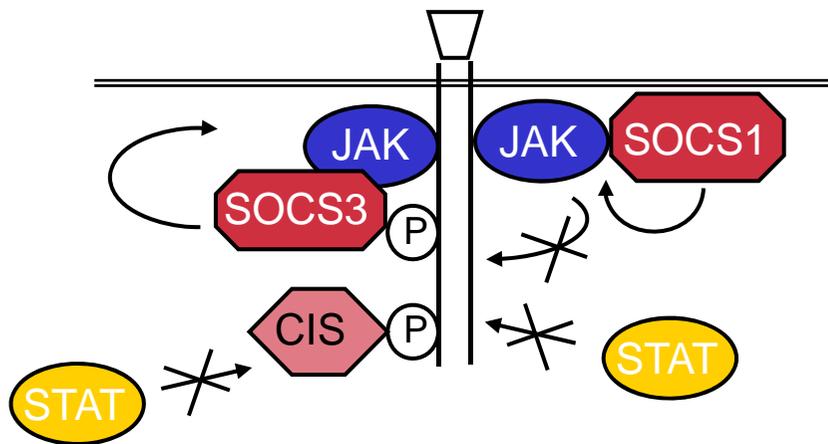
Zang et al, 2001

Modèles animaux : discordances



Inhibition de la transduction du signal par les SOCS (suppressors of cytokine signaling)

- Différents modes d'action moléculaires
- Se fixent aux JAKs et/ou sur EPO-R
- Et inhibent leur activité catalytique en agissant comme pseudo-substrat
- Mécanisme de compétition CIS - STAT5 (Y401) ?
- Puis dégradation des protéines du signal par le protéasome





Souris SOCS3 -/- Résultats discordants

■ Phénotype léthal à J12-16

- Erythrocytose marquée
- ↘ nb de prog érythro du foie
- ↗ de la x° in vitro des progéniteurs érythroïdes

■ Les cellules SOCS3-/- reconstituent des souris létalement irradiées

- ↗ du nb de progéniteurs
- ↗ de la réponse à l'epo (↗ taille des colonies)

■ Phénotype léthal à J11,5-13,5

- Anomalies placentaires trophoblaste, labyrinthe plac ==> insuffisance placentaire
- Petite taille des embryons, hypocellularité globale

- Pas d'érythrocytose
- Pas d'anomalie des progéniteurs érythroïdes (nb, taille des colonies, réponse à l'epo)

Marine, 1999

Roberts, 2001

Mutations de R-EPO et polyglobulies

Remarques et questions non résolues

- Physiopathologie peu claire
- Polyglobulies non malignes familiales et congénitales : rares mais incidence mal connue
 - Importance du recensement des cas
 - 12% avec mutation R-EPO
 - Autres mutations?
- Existe-t-il une diminution de l'espérance de vie des patients R-EPO muté?
Proposition de suivi médical spécialisé
 - risque d'affections myocardiques
 - hémorragies / ischémies cérébrales
- Mutations - perte de fonction ?
 - anémies ou dysérythropoïèses congénitales ?

Hôtel Dieu, Paris
Laboratoire d'Hématologie
Nicole Casadevall

CHU Brest
Laboratoire d'Hématologie
Valérie Ugo

Hôpital Henri Mondor, Créteil
Laboratoire des Hémoglobines
Inserm U468
Claude Préhu
Frédéric Galactéros