



Régulation physiologique et pathologique de la production de plaquettes sanguines

par **William VAINCHENKER**, Membre élu dans la discipline « Biologie humaine et sciences médicales »

Les cellules du sang représentent au moins dix types cellulaires différents impliqués dans de très nombreuses fonctions. Une dynamique exceptionnelle gouverne leur renouvellement à travers un système de différenciation complexe et hiérarchisé qui a pour origine une cellule souche hématopoïétique dont une des propriétés est de donner naissance aux dix lignées sanguines. Les lignées érythroblastique et mégacaryocytaire assurent respectivement à la production des globules rouges et des plaquettes. Ces deux lignées sont très particulières et très proches. Toutes deux aboutissent à des cellules anucléées chez les mammifères avec une production extrêmement importante de l'ordre de 2×10^{11} globules rouges et plaquettes par jour chez l'homme.

Mon équipe a consacré l'essentiel de ses travaux à l'étude à ces deux lignées sanguines, avec un accent plus particulier sur la lignée mégacaryocytaire et ses pathologies.

Mon projet de recherche, initié dans l'unité Inserm 91 dirigée par le Professeur Jean Rosa, dans l'équipe de Janine Breton Gorius, était de déterminer s'il existait un facteur de croissance spécifique de la lignée mégacaryocytaire qui soit responsable de la production plaquettaire. Des données anciennes suggéraient l'existence d'un facteur humoral régulant la production plaquettaire mimant le modèle de l'érythropoïétine pour la production des globules rouges. Ce facteur, resté hypothétique pendant près de 35 ans, avait été appelé thrombopoïétine. Lorsque nous avons commencé notre travail, l'existence même de ce facteur avait été mise en cause. Avec Najet Debili, nous avons démontré que le plasma de sujets avec des chiffres de plaquettes très bas (thrombopénies) contenait une activité biologique qui stimulait la mégacaryopoïèse *in vitro* et nous avons supposé que cette activité devait correspondre à la thrombopoïétine. Au début des années 1990, Françoise Wendling dans l'équipe de Pierre Tambourin a isolé et caractérisé un nouvel oncogène viral à l'origine de syndromes myéloprolifératifs chez la souris. Ce gène, appelé MPL, codait pour un récepteur orphelin de la famille des récepteurs de cytokines hématopoïétiques avec une structure assez homologue au récepteur de l'érythropoïétine. Nous avons montré que MPL était essentiellement exprimé dans la lignée mégacaryocytaire et que son inhibition diminuait très fortement la réponse des cellules mégacaryocytaires au plasma de sujets thrombopéniques. Ces observations suggéraient que MPL devait être le récepteur de la thrombopoïétine. Nous avons présenté et publié nos résultats et il a fallu moins d'un an entre cette découverte, la purification à partir de plasma d'animaux thrombopéniques de la thrombopoïétine en se servant du récepteur MPL et le clonage du gène. Dans cette course de vitesse, nous avons été distancés par trois importantes firmes de biotechnologie.

Nous avons participé à la caractérisation de la fonction de la thrombopoïétine et montré que cette molécule agit non seulement sur presque toutes les étapes de la mégacaryopoïèse, mais aussi sur les cellules souches hématopoïétiques. Sur le plan clinique, on attendait beaucoup de la thrombopoïétine recombinante dans le traitement des patients thrombopéniques. Cet espoir n'a pas abouti car la molécule s'est avérée immunogène. Ces dernières années, des agonistes de MPL ont été obtenus qui sont utilisés de manière croissante en thérapeutique chez l'homme.

En parallèle, Jean-Luc Villeval dans mon équipe a créé des modèles de souris surexprimant la thrombopoïétine. Nous avons montré que cette surexpression aboutit à une myélofibrose, une pathologie qui ressemble étrangement à une hémopathie maligne chez l'homme appelée myélofibrose primaire.



La myélofibrose primaire appartient au cadre des syndromes myéloprolifératifs dits classiques, formes de leucémies chroniques qui comprennent trois maladies proches : la polyglobulie de Vaquez caractérisée par un excès de globules rouges, la thrombocytémie essentielle caractérisée par un excès de plaquettes et la myélofibrose primaire caractérisée par le développement d'une fibrose de la moelle osseuse. Ces trois maladies se caractérisent par une hypersensibilité à des cytokines, incluant l'érythropoïétine et à la thrombopoïétine, comme nous l'avons précédemment montré avec Nicole Casadevall dans la polyglobulie de Vaquez. Cependant le mécanisme moléculaire de l'hypersensibilité restait inconnu et n'était pas lié à une synthèse excessive de cytokines comme la thrombopoïétine. Nous avons fait l'hypothèse que cette indépendance aux cytokines pouvait être liée à une mutation acquise sur une protéine de signalisation commune aux récepteurs de l'érythropoïétine et de MPL. Notre hypothèse a été renforcée par la démonstration que des inhibiteurs de JAK2 étaient capables d'abolir cette hypersensibilité aux cytokines, ce qui nous a amené à séquencer le gène et découvrir une mutation récurrente somatique JAK2V617F. Ce travail a été effectué par un ingénieur de recherche Inserm Jean Pierre Le Couédic et 2 étudiantes de thèse Valérie Ugo et Chloé James.

JAK2 est une kinase qui est constitutivement associée aux récepteurs de l'érythropoïétine et à MPL. Il s'agit de la première molécule indispensable dans la cascade de signalisation en aval du récepteur. JAK2 est normalement activé par la fixation du ligand à son récepteur et enclenche les différentes voies de signalisation, dont les voies STATs. La mutation est située dans le domaine pseudo-kinase, domaine qui empêche l'auto-activation de la kinase tant que le ligand ne se fixe pas au récepteur. La mutation V617F abroge cette dépendance.

La mutation V617F a été trouvée dans près de 95% des polyglobulies de Vaquez, et 60% des thrombocytémies essentielles et des myélofibroses. Il apparaissait donc que les syndromes myéloprolifératifs classiques devaient être des maladies liées à l'activation anormale de JAK2 au niveau des récepteurs de cytokines. Cette hypothèse a été confirmée dans les syndromes myéloprolifératifs négatifs pour JAK2V617F par la découverte d'autres mutations incluant des mutations de MPL qui activent aussi cette voie de signalisation. Très récemment des mutations de la calréticuline, protéine chaperonne du réticulum endoplasmique, ont été découvertes qui pourraient activer la signalisation MPL/JAK2 par un tout nouveau mécanisme. Ce dernier travail est réalisé par Isabelle Plo et Hana Raslova en collaboration avec l'équipe de Stefan Constantinescu en Belgique.

Nous avons également montré que JAK2V617F avait un effet oncogénique, paradoxalement très faible, au niveau des cellules souches hématopoïétiques ce qui nous a conduit à faire l'hypothèse qu'un autre événement génétique pourrait précéder la mutation JAK2V617F chez certains patients et être responsable d'une hématopoïèse dépendante d'une seule cellule souche hématopoïétique (hématopoïèse clonale). Cette hypothèse a été vérifiée. En effet, avec l'équipe d'Olivier Bernard nous avons identifié des mutations du gène TET2 responsables de cette hématopoïèse clonale chez une partie des patients. Ce travail a eu deux conséquences majeures 1) montrer que TET2 était impliqué dans un grand nombre de pathologies malignes, et 2) du point de vue fondamental de mettre en lumière les protéines TET, protéines qui se sont avérées être des enzymes à fonction fondamentale puisqu'elles régulent activement la déméthylation du génome par hydroxyméthylation.



Enfin il faut insister sur le fait que le travail réalisé sur les syndromes myéloprolifératifs a eu des applications thérapeutiques puisque la mutation V617F a été découverte en 2004 et les premiers inhibiteurs de JAK2 sont entrés en essais cliniques en 2006 et 2007 avec une molécule approuvée en usage clinique aux USA et en Europe en 2012. Ces médicaments ont fait avancer le traitement de ces maladies mais beaucoup de chemin reste encore à faire avant d'obtenir une guérison de ces pathologies.