

COMMUNICATION

Mégacaryopoïèse : régulation de la production plaquettaire par la thrombopoïétine

MOTS-CLÉS : MÉGACARYOCYTES. PLAQUETTES. THROMBOPOÏÉTINE. RÉCEPTEURS À LA THROMBOPOÏÉTINE. THROMBOCYTOSE

Megakaryopoiesis: regulation of platelet production by thrombopoietin

KEY-WORDS (Index medicus): MEGAKARYOCYTES. BLOOD PLATELETS. THROMBOPOIETIN. RECEPTORS, THROMBOPOIETIN. THROMBOCYTOSIS

William VAINCHENKER *, Rodolphe BESANCENOT, Fabrizia FAVALE

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

RÉSUMÉ

Chaque jour 2×10^{11} plaquettes sont produites chez l'homme par un mécanisme hautement régulé et unique en biologie cellulaire. En effet les plaquettes sanguines proviennent de la fragmentation du cytoplasme de leur précurseur, le mégacaryocyte, cellule médullaire géante. Cette taille est liée à la polyploidisation du mégacaryocyte par un mécanisme appelé endomitose qui aboutit à un contenu en ADN de $2^x N$ (habituellement $16N$). Cette augmentation de la taille permet à chaque mégacaryocyte de libérer plusieurs milliers de plaquettes. La fragmentation du cytoplasme s'effectue par un mécanisme très coordonné passant par l'extension de pseudopodes appelés proplaquettes qui vont ensuite se fragmenter en plaquettes, cette fragmentation ayant lieu dans le sang sous l'effet du flux. La thrombopoïétine est un facteur de croissance qui régule l'ensemble de la mégacaryopoïèse depuis les cellules souches hématopoïétiques jusqu'à la maturation des mégacaryocytes, à l'exception de la formation des plaquettes. Elle est essentiellement synthétisée par le foie et son taux est régulé essentiellement, mais non uniquement, par sa clearance plaquettaire ou mégacaryocytaire via son récepteur MPL. MPL est un récepteur de cytokine homodimérique dont la signalisation dépend de la kinase JAK2. MPL et JAK2 sont impliqués dans de nombreuses

* INSERM UMR 1009, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins — 94805 Villejuif ; e-mail : william.vainchenker@igr.fr

Tirés à part : Professeur William VAINCHENKER, même adresse

Article reçu le 5 février 2013, accepté le 18 février 2013

pathologies héréditaires ou malignes aboutissant soit à des thrombopénies voire des aplasies médullaires soit à des thrombocytoses. Le ciblage de ces deux molécules est devenu un objectif crucial dans plusieurs pathologies.

SUMMARY

Each day, 2×10^{11} platelets are produced in the human body by a highly regulated mechanism. The biology of platelet formation is unique, as platelets arise from cytoplasmic fragmentation of their marrow precursor, the megakaryocyte (MK). MKs are giant cells that undergo polyploidisation during maturation, through a process called endomitosis, leading to a cell with a $2^x N$ DNA content. This huge size allows each MK to produce several thousand platelets. MK cytoplasmic fragmentation is a dynamic and organized process beginning with extensions, called proplatelets, that further fragment to give rise to platelets. This last process takes place in the bloodstream and is regulated by shear stress. Thrombopoietin (TPO) is the hormone that, with the exception of platelet shedding, regulates all the steps of megakaryopoiesis, from the hematopoietic stem cell to MK maturation. TPO is mostly synthesized by the liver, mainly in constitutive fashion, and its plasma level is dependent on its clearance by platelets and MK after binding to its receptor MPL. MPL is a type I homodimeric cytokine receptor that requires the kinase JAK2 for its signaling activity. MPL and JAK2 are involved in numerous inherited and malignant disorders leading to thrombocytopenia and aplastic anemia or to thrombocytosis. They are now being targeted therapeutically.

INTRODUCTION

Les plaquettes sont des cellules sanguines jouant un rôle essentiel dans l'hémostase. Bien que ces cellules soient anucléées et aient une durée de vie courte (autour de 7 jours), leur nombre reste relativement constant dans le sang d'un même individu, témoignant d'une production constante et finement régulée. Le processus qui aboutit à la production des plaquettes est appelé mégacaryopoïèse et représente une des branches de l'hématopoïèse.

Le mégacaryocyte (MK), précurseur médullaire des plaquettes provient lui-même de la différenciation de la cellule souche hématopoïétique (CSH) multipotente, qui à travers différentes étapes de détermination va restreindre sa potentialité vers une cellule purement engagée dans la lignée mégacaryocytaire : le progéniteur mégacaryocytaire, cellule $2N$ capable de proliférer [1]. Dans ce processus de détermination, les deux lignées érythro/mégacaryocytaires sont très liées et proviennent d'un progéniteur bipotent appelé MEP. De manière intéressante le MEP pourrait être originaire d'un progéniteur myéloïde commun, mais aussi directement d'une CSH multipotente.

Les progéniteurs mégacaryocytaires encore appelés CFU-MK sont encore capables de proliférer et vont, à un moment donné, commuter leur mécanisme de multiplication vers une polyploïdisation, processus appelé endomitose. De manière quasi synchrone, la cellule alors appelée mégacaryoblaste, puis mégacaryocyte va aussi

commencer à synthétiser les protéines plaquettaires, responsables essentiellement de leurs fonctions hémostatiques et thrombotiques. Cette maturation cytoplasmique va s'accélérer après l'arrêt des endomitoses avec le développement des organelles importants du mégacaryocyte : les membranes de démarcation, invagination de la membrane cytoplasmique et les granules, en particulier les granules alpha contenant la plupart des protéines secrétées par la plaquette et les granules denses. Le mégacaryocyte mature avant de relâcher des plaquettes et se localiser dans une niche vasculaire au contact des cellules endothéliales avant de commencer l'étape terminale de formation des proplaquettes [1].

Nous allons donc détailler les deux phénomènes uniques à la mégacaryopoïèse la polyploïdisation par endomitose et la formation des plaquettes avant d'aborder la régulation de la production plaquettaire par la thrombopoïétine.

MÉGACARYOCYTE ET POLYPLOÏDISATION

Les mégacaryocytes de la moelle adulte ont une ploïdie modale de 16N avec des ploïdies allant de 2N à 64N voire 128N. Lors de la maturation terminale, le mégacaryocyte peut arrêter sa ploïdisation à n'importe quel niveau de ploïdisation et des mégacaryocytes 2N appelés micromégacaryocytes peuvent former des plaquettes. Lors d'une stimulation de la thrombopoïèse, la ploïdie des mégacaryocytes augmente rapidement. La polyploïdisation du mégacaryocyte fait partie intégrante du système de différenciation ; cependant les raisons qui ont abouti à faire du mégacaryocyte une cellule polyploïde au cours de l'évolution ne sont pas encore claires. Par exemple, chez les oiseaux les « mégacaryocytes » sont des cellules 2N qui vont donner des thrombocytes nucléés de manière efficace. La polyploïdisation pourrait faciliter l'accélération de la production plaquettaire en cas de stress en permettant des économies de formation de membrane ; en outre l'augmentation du nombre de copies de chaque gène pourrait augmenter l'activité métabolique de la cellule et aussi éviter les haploinsuffisances dans une cellule soumise à un stress oxydatif important [2].

La description détaillée des endomitoses est très récente. Contrairement aux hypothèses initiales, les endomitoses sont identiques à la mitose quasiment jusqu'aux stades tardifs car l'endomitose est un échec de la cytokinèse. Les deux cellules filles sont quasiment séparées, mais la séparation échoue et les deux cellules filles fusionnent. Le point crucial est donc cette étape de commutation d'une cellule 2N vers une transition 4N, qui au lieu de donner 2 cellules filles 2N, va engendrer une cellule 4N. Ensuite l'augmentation de la polyploïdisation suit le même processus, mais avec des anomalies plus importantes de la mitose : fuseau multipolaire, peu d'extension du fuseau en anaphase B et séparation moindre des cellules filles avant l'échec de la cytokinèse [3].

L'un des points spécifiques au mégacaryocyte est lié à son noyau unique polylobulé alors qu'habituellement les échecs de cytokinèse aboutissent à des cellules multinu-

cléées. Il existe en même temps des anomalies de caryocinèse avec la persistance de ponts internucléaires au moment de la séparation des deux cellules filles dont le mécanisme reste inconnu.

Globalement la régulation du cycle cellulaire est très proche de celle d'une mitose avec une succession de phase G1/S/G2/M, mais avec échec de la cytokinèse. Des résultats récents suggèrent que la kinase Aurora A inhibe la polyploïdisation du mégacaryocyte normal et leucémique [4]. Cependant l'anomalie majeure responsable de l'endomitose est un défaut au niveau de l'anneau contractile qui présente un défaut d'invagination et une diminution des forces contractiles. Deux mécanismes non exclusifs pourraient expliquer ces défauts :

- la cytokinèse est régulée par la voie Rho/Rock qui en phosphorylant la chaîne légère de la myosine au niveau de l'anneau contractile et en activant la dynamique des microtubules permet la cytokinèse. Il a été montré un défaut d'activation de RhoA au niveau de l'anneau contractile dans les endomitoses qui était lié à une diminution de l'expression de deux GEF : GEF-H1 au stade 2N-4N, puis ECT2 dans les mégacaryocytes polyploïdes [5].
- La myosine II est un des constituants majeurs de l'anneau contractile. Il n'y a pas d'accumulation de la myosine II A, myosine majoritaire du mégacaryocyte dans l'anneau contractile. Par contre la myosine IIB est présente mais son expression est rapidement éteinte en cours de la polyploïdisation du mégacaryocyte. Cette extinction est nécessaire à la polyploïdisation [6].

Il y a un lien entre la régulation transcriptionnelle de la différenciation terminale et le processus d'endomitose. En effet la régulation négative de GEF-H1 est liée au complexe transcriptionnel SRF/MAL (MKL1 ou MRTF-A) qui joue un rôle majeur dans la régulation du cytosquelette et la formation des plaquettes. MAL est impliqué dans une translocation OTT-MAL responsable d'une leucémie à mégacaryoblaste de l'enfant [2]. L'expression de la myosine IIB est régulée par un des facteurs transcriptionnels majeurs du mégacaryocyte, RUNX1 responsable de son extinction en cours de la différenciation. Ce résultat explique l'hypoploïdie des mégacaryocytes de souris *runx1^{-/-}* et des patients FPD/AML (mutations germinales de *RUNX1*) avec une persistante de la myosine IIB y compris dans les plaquettes [7]. L'arrêt du cycle endomitotique est lui sous le contrôle de CDKIs (Cyclin-dependent kinase inhibitor *protein*), essentiellement p19^{INK4D} également régulé par RUNX1 [8].

MÉGACARYOCYTE ET FORMATION DE PLAQUETTES

Le mécanisme de la formation des plaquettes est resté pendant longtemps très controversé avec deux théories opposées. La première suggérait que les membranes de démarcation délimitaient des territoires plaquettaires dans le cytoplasme du

mégacaryocyte et le mégacaryocyte par rupture relâchait ces plaquettes préformées. La seconde suggérait que le mégacaryocyte à la fin de sa maturation formait de longues extensions appelées proplaquettes par déroulement des membranes de démarcation qui se fragmentaient pour donner des plaquettes. Cette seconde hypothèse a été totalement confirmée par différents abord : imagerie *in vitro* et *in vivo*, études ultrastructurales, génétique (souris présentant des thrombopénies comme les souris p45^{NF-E2}) [9].

La formation de proplaquettes demande des remaniements importants du cytosquelette avec un rôle crucial des microtubules dans les étapes initiales d'extension cytoplasmique. Les microtubules s'orientent tout au long des proplaquettes et procurent des forces centrifuges par glissement. À l'extrémité de la proplaquette, les microtubules forment une boucle qui délimiterait la future plaquette. Les microtubules permettent aussi la migration des mitochondries et des granules du corps du mégacaryocyte vers les proplaquettes.

Le cytosquelette d'actine et de myosine est également important. L'actomyosine est impliquée dans les branchements au niveau des proplaquettes, mais surtout procure les forces contractiles centripètes qui s'opposent à celle des microtubules évitant la formation trop rapide de proplaquettes et une fragmentation inappropriée. Les branchements d'actine *via* le complexe Arp2/3 sont également impliqués dans le développement des membranes de démarcation.

La théorie initiale retenue dans la littérature était celle développée par le groupe de JE. Italiano suggérant que les plaquettes étaient libérées à l'extrémité des proplaquettes où l'organisation des microtubules est similaire à celle d'une plaquette, les proplaquettes ayant extravasé la barrière endothéliale. Cependant les images réalisées *in vivo* ont montré qu'en fait des morceaux de mégacaryocyte de grande taille et des mégacaryocytes entiers passaient dans les sinusoides. En fait ce sont les proplaquettes ou les mégacaryocytes qui sont fragmentés en plaquettes dans le sang sous la force du flux sanguin. Ces proplaquettes subissent une maturation avec une réorganisation des microtubules, la scission de plaquettes elles-mêmes semble être organisée suivant une structure ressemblant à un anneau contractile. Ce mécanisme pourrait expliquer que les maladies associées à des changements de taille de plaquettes impliquent essentiellement le système actomyosine. Les mégacaryocytes eux-mêmes peuvent être également fragmentés dans le flux sanguin, probablement dans la circulation pulmonaire.

Un autre élément déterminant dans la formation des plaquettes est la nécessité d'un synchronisme parfait entre migration du mégacaryocyte, sa sortie de la moelle et la formation des proplaquettes. Des molécules de la matrice extracellulaire et des cellules médullaires stromales inhibent la formation des proplaquettes, *via* probablement l'activation de l'actomyosine alors que d'autres comme le vWF ou les cellules endothéliales induiraient cette formation. La migration et la sortie de la moelle sont sous le contrôle de la chimiokine SDF-1 et impliquent l'activation de la voie des petites protéines G (Cdc42, Rac) et la formation de podosomes [2].

RÉGULATION DE LA PRODUCTION PLAQUETTAIRE PAR LA THROMBOPOÏÉTINE

La thrombopoïétine et son récepteur MPL

C'est grâce à l'étude du virus MPLV (myeloproliferative leukemia virus) qui est responsable chez la souris d'un syndrome myéloprolifératif qu'a été découvert MPL. En effet la caractérisation moléculaire du génome de MPLV a permis de mettre en évidence l'oncogène responsable de la leucémie (*v-mpl*) dont la séquence présente des homologies avec les récepteurs de la superfamille des cytokines et qui correspond en fait à la forme tronquée dans le domaine extracellulaire de son homologue cellulaire *c-mpl* [10].

MPL est un récepteur homodimérique qui appartient à la famille des récepteurs de cytokine de type 1. Il est exprimé par les mégacaryocytes et les plaquettes mais également par les cellules souches hématopoïétiques, les progéniteurs précoces et les cellules endothéliales. C'est une protéine glycosylée d'une masse moléculaire de 85-92 kDa composée d'un domaine extracellulaire d'environ 466 AA, d'un domaine transmembranaire de 22 AA et d'un domaine intracytoplasmique de 122 AA. Sa partie extracellulaire a la particularité de présenter une duplication du domaine HRD (*Hematopoietic Receptor Domain*) commun à la superfamille des récepteurs de cytokines et contenant les quatre résidus cystéines conservés dans la partie N terminale ainsi qu'un pentapeptide Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser (W-S-X-W-S) en C terminal. Contrairement aux autres récepteurs homodimériques il présente un domaine amphipathique R/KWQFP (R chez l'homme, K chez la souris) situé à la jonction des domaines cytoplasmique et membranaire (AA 514 à 518) crucial dans le contrôle négatif de l'activité du récepteur car son absence ou son inactivation entraîne une activation constitutive du récepteur.

Le domaine cytoplasmique ne possède pas d'activité catalytique intrinsèque mais est associé à deux membres de la famille des Janus Kinase (JAK), JAK2 et TYK2. JAK2 et TYK2 sont toutes les deux des protéines chaperonnes de MPL permettant son expression à la surface membranaire, néanmoins seul JAK2 est indispensable à la signalisation. Cependant on ne peut exclure que des dimères JAK2 et TYK2 soient fonctionnels.

La TPO, qui a été découverte en 1994 comme étant le ligand du récepteur orphelin MPL, interagit avec le récepteur au niveau du domaine HRD distal. Comme pour le récepteur de l'EPO, MPL est présent à la membrane sous forme d'un homodimère inactif et c'est la liaison de la TPO qui entraîne une modification conformationnelle permettant le rapprochement des deux protéines JAK2, leur transphosphorylation et l'initiation de la signalisation avec l'activation de nombreuses protéines permettant la survie, la prolifération et la différenciation. Schématiquement trois principales voies de signalisation sont activées : la voie des STATs avec notamment les effecteurs STATs 1, 3 et 5 (*Signal transducer and activator of transcription*), la voie

PI3K (*PhosphoInositol-3 Kinase*) et la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*). La signalisation est limitée par des régulateurs négatifs comme les protéines SOCS, la protéine adaptatrice LNK, des protéines de la famille des SFKs de même que l'ubiquitination du récepteur par CBL aboutissant à la dégradation de celui-ci par le protéasome [11, 12].

Les effets de la thrombopoïétine sur les cellules souches et la mégacaryopoïèse

La TPO est la principale cytokine stimulant la mégacaryopoïèse à toutes les étapes en dehors de la formation des proplaquettes. En effet les souris invalidées pour le gène de la *tpo* ont le même phénotype que les souris *c-mpl^{-/-}* avec une thrombopénie majeure secondaire à une diminution des mégacaryocytes dans la moelle. La TPO agit ainsi à la fois sur les temps précoces en induisant la formation de colonies de mégacaryocytes à partir de cellules CD34⁺, en augmentant la polyploïdisation et la taille des mégacaryocytes, mais également sur les temps tardifs en augmentant la maturation cytoplasmique et l'expression de marqueurs de surface spécifiques comme le CD41. Elle agit néanmoins en synergie avec d'autres cytokines essentiellement avec le SCF, l'interleukine 11 (IL-11) et l'EPO pour stimuler la différenciation des progéniteurs [13]. Au-delà de son rôle dans la mégacaryopoïèse la TPO joue également un rôle plus vaste sur les progéniteurs immatures et sur CSH — comme en attestent les modèles de souris invalidées pour le gène de la *tpo* qui ont une réduction des progéniteurs myéloïdes de plus de 50 % et un nombre de cellules souches effondré. Des expériences de reconstitution médullaires après irradiation chez des souris *tpo^{-/-}* ont montré une altération de leur capacité de reconstitution suggérant un rôle de la TPO dans l'expansion des CSH. De même il existe une augmentation des CSH en cycle chez les souris *tpo* KO alors qu'on retrouve une augmentation de CSH quiescentes après stimulation par la TPO. L'ensemble de ces considérations a permis de conclure que la TPO joue un rôle central dans le contrôle de la survie et de la prolifération des CSH, la balance entre quiescence et prolifération étant probablement régulée par le microenvironnement médullaire [14].

Régulation du niveau de thrombopoïétine implication pour la thérapeutique

La TPO est synthétisée majoritairement par les cellules hépatiques et dans une moindre mesure par le rein et les cellules stromales médullaires. Les taux de TPO plasmatiques sont comme pour l'EPO et le nombre de globules rouges, inversement corrélés au taux de plaquettes. La première hypothèse émise pour expliquer la régulation des taux de TPO a donc été celle d'une augmentation transcriptionnelle en situation de thrombopénie par analogie avec l'EPO. Cependant aucune régulation importante de l'activité transcriptionnelle de la TPO n'a pu être mise en évidence chez les souris rendues thrombopéniques par irradiation et/ou chimiothérapie et/ou l'utilisation d'anticorps antiplaquettes. De même dans les modèles murins d'invalidation du gène de la *tpo* les souris KO ont une diminution des progéniteurs mégacaryocytaires et des plaquettes (aux alentours de 10 % de la

normale) alors que les souris hétérozygotes ont une thrombopénie à 50 % de la normale avec un effet dose en défaveur d'une régulation transcriptionnelle.

L'hypothèse alternative était donc que la TPO soit produite de façon constante par le foie et c'est la masse mégacaryocytaire et plaquettaire qui va réguler la demi-vie de la protéine en dégradant la TPO après liaison à son récepteur MPL et internalisation du couple TPO-MPL *via* un mécanisme dépendant des clathrines. Ainsi le taux de TPO est inversement corrélé à la masse mégacaryocytaire/plaquettaire mais plus spécifiquement aux taux de récepteur MPL en surface et à sa capacité à internaliser la TPO. En temps normal c'est la masse plaquettaire qui est prédominante dans le contrôle des taux de TPO mais dans certaines situations pathologiques comme notamment dans le cadre du purpura thrombopénique immunologique les taux de TPO ne sont que modérément augmentés car il existe une augmentation de la masse mégacaryocytaire pour tenter de contrecarrer la thrombopénie périphérique et de ce fait une augmentation de la clearance de la TPO.

C'est ce qui explique d'ailleurs que soient utilisés les analogues de la TPO dans les PTI en seconde ligne pour permettre une augmentation supraphysiologique de la TPO dépassant les mécanismes de clearance mégacaryocytaire et permettant une augmentation du taux de plaquettes [13].

Néanmoins il existe des exceptions à ce mode de régulation montrant en fait qu'il s'agit d'un mécanisme plus complexe. En effet dans les thrombocytoses inflammatoires il existe une augmentation de l'ARNm de la TPO au niveau du foie en réponse à l'IL6 ou bien encore l'augmentation de la production paracrine de TPO par les cellules stromales médullaires au niveau de la niche hématopoïétique en situation de thrombopénie majeure dont le mécanisme reste encore mal connu. En effet il est difficile de concevoir que la régulation d'un facteur de croissance aussi important que la TPO ne puisse être régulée que par sa clearance [12].

PATHOLOGIES ASSOCIÉES À DES ANOMALIES HÉRÉDITAIRES OU ACQUISES DE LA THROMBOPOÏÉTINE ET DE SON RÉCEPTEUR

De nombreux troubles héréditaires ou acquis touchent la voie de production plaquettaire avec pour conséquences soit une thrombopénie (plaquette $< 150 \times 10^9/L$) soit une thrombocytose (plaquette $> 450 \times 10^9/L$).

Parmi les thrombocytoses avec une altération génétique sur la voie de la production plaquettaire on distingue classiquement les thrombocytoses acquises clonales et les thrombocytoses familiales.

Les thrombocytoses acquises clonales sont dominées par la thrombocytémie essentielle (TE) qui est une forme de néoplasmes myéloprolifératifs (NMP). Les NMP BCR-ABL négatifs qui regroupent la TE, la Polyglobulie de Vaquez (PV) et la Myélofibrose Primaire (MFP) ont une physiopathologie commune en ce sens que l'on retrouve une activation constitutive de la voie JAK/STAT le plus souvent

induite par la mutation JAK2V617F. Cette mutation explique le syndrome myéloprolifératif par lui-même comme la thrombocytose, la polyglobulie ou l'hyperleucocytose mais pas forcément la totalité de la maladie. Dans les TE on retrouve une mutation de JAK2 (JAK2V617F) dans 60 % des cas, de MPL dans environ 5 % des cas. Les mutations de MPL responsables de l'activation du récepteur sont essentiellement sur le tryptophane 515, acide aminé crucial du domaine amphipathique. Cette hétérogénéité se retrouve également au niveau clinique où certains patients vont évoluer rapidement vers une myélofibrose ou une leucémie aiguë. La MFP est également une pathologie de la signalisation de MPL dans laquelle on retrouve une mutation du récepteur dans 5 % des cas et une prolifération anormale de mégacaryocytes entraînant une réaction stromale aboutissant à la fibrose médullaire [15]. Dans les modèles murins la surexpression de la TPO reproduit la pathologie. Cependant, dans la maladie humaine des mutations d'autres gènes qui pourraient entraîner des défauts de maturation de la lignée mégacaryocytaire sont également présentes. Il existe maintenant dans l'arsenal thérapeutique des MFP à haut risque différents inhibiteurs de JAK2 qui ont prouvé leur efficacité sur l'amélioration des symptômes généraux et l'importance de la splénomégalie, mais sans effets spectaculaires sur la maladie clonale.

Les mutations retrouvées dans les thrombocytoses héréditaires touchent l'axe TPO/MPL et peuvent être la conséquence de mutations des gènes codant pour la TPO ou de son récepteur MPL [16]. Les mutations de la TPO ont pour conséquence une meilleure efficacité de traduction de l'ARNm et donc une augmentation de la production de la TPO. Les mutations de MPL peuvent aboutir à une activation constitutive du récepteur avec donc des taux de TPO bas : la plus fréquemment retrouvée est MPLS505N qui est aussi présente dans d'authentiques TE sporadiques, mais également la mutation germinale de MPL en W515 (MPLW515R). De manière intéressante un nombre croissant de mutations germinales de JAK2 est retrouvé dans les thrombocytoses héréditaires, ces mutations sont situées soit dans le domaine pseudo-kinase y compris sur la valine 617 mais par une autre substitution qu'une alanine (JAK2V617I) et dans le domaine kinase [17]. Toutes ces mutations aboutissent à des activités kinase constitutives beaucoup plus faibles que JAK2V617F. Il est donc intéressant de constater que les thrombocytoses acquises et héréditaires partagent la même physiopathologie, la différence majeure étant que les premières sont des maladies clonales.

De manière intéressante, vu le double rôle de MPL, rôle dans la signalisation et la clearance de la TPO, des mutations perte de fonction peuvent aboutir à des thrombocytoses héréditaires avec des taux de TPO élevés. C'est le cas notamment de la mutation MPL-K39N connue aussi sous le nom de MPL Baltimore par diminution de la protéine ou de la mutation P106L décrite chez une famille saoudienne consanguine et dont le mécanisme précis n'a pas été élucidé.

Les thrombopénies peuvent également être secondaires à des anomalies de l'axe TPO/MPL. C'est le cas notamment des amégacaryocytoses congénitales (CAMT). Elles sont en rapport avec des mutations de MPL qui aboutissent soit à une perte

totale de l'expression de MPL à la surface membranaire soit à un récepteur qui est encore exprimé en surface mais hypofonctionnel. Cliniquement il s'agit d'une thrombopénie sévère à la naissance due à une absence de mégacaryopoïèse progressant vers une aplasie médullaire à plus ou moins court terme en fonction de l'activité résiduelle du récepteur. Les taux de TPO sont comme attendu très élevés du fait de l'absence de clearance par le récepteur [18]. De manière intéressante il a été montré récemment que des aplasies médullaires familiales étaient liées à des mutations perte de fonction de MPL.

Il semble vraisemblable que l'axe TPO/MPL est également dérégulé dans le syndrome TAR (Thrombopénie avec absence de radius) caractérisé par l'association d'une thrombopénie la première année de vie avec une aplasie radiale dans lequel il y a un blocage de la mégacaryopoïèse en rapport avec une diminution de la signalisation par la TPO [19]. Il n'y a pas de mutations de MPL ou de JAK2 mais une diminution de la protéine Y14 impliquée dans l'épissage [20]. Il est donc possible que l'épissage d'une molécule indispensable à la signalisation de MPL soit régulé par ce mécanisme.

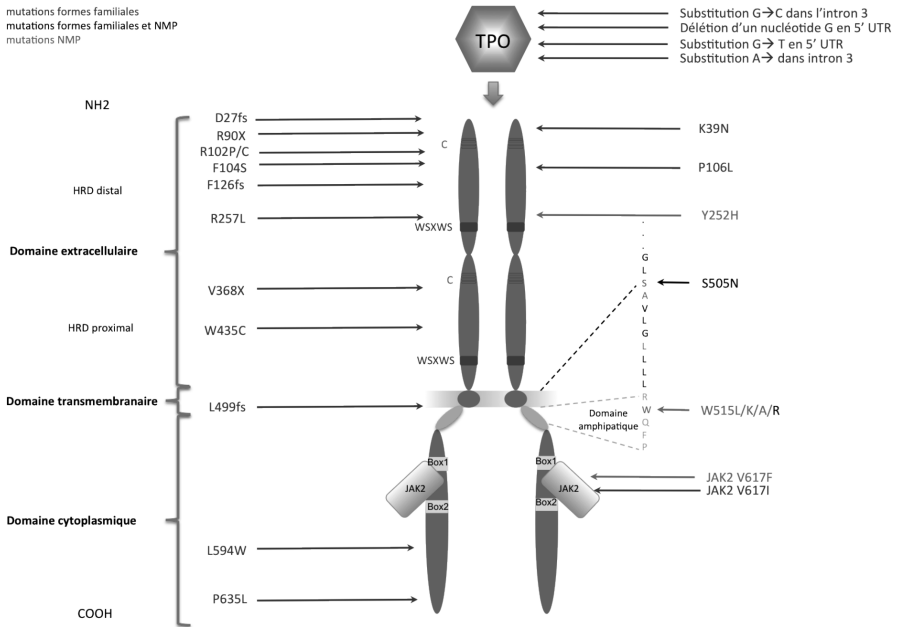
CONCLUSION

Au total les recherches fondamentales effectuées sur la mégacaryopoïèse ont permis de mieux comprendre les mécanismes uniques à la biologie de cette différenciation (polyploïdisation et formation des plaquettes) ainsi que la régulation de la production plaquettaire. Les conséquences ont été importantes dans la compréhension du mécanisme de maladies héréditaires ou acquises aboutissant à des thrombopénies ou des thrombocytoses ouvrant la voie à de nouvelles approches thérapeutiques comme les agents mimétiques de la TPO et les inhibiteurs de JAK2. À terme ces approches pourraient avoir des conséquences également en thérapie cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHANG Y., BLUTEAU D., DEBILI N., VAINCHENKER W. — From hematopoietic stem cells to platelets. *J. Thromb. Haemost.*, 2007, 5 Suppl 1, 318-327.
- [2] BLUTEAU D., LORDIER L., DI STEFANO A. *et al.* — Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *J. Thromb. Haemost.*, 2009, 7 Suppl 1, 227-234.
- [3] LORDIER L., JALIL A., AURADE F., LARBRET F. *et al.* — Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*, 2008, 112, 3164-3174.
- [4] WEN Q., GOLDENSON B., SILVER S.J., SCHENONE M. *et al.* — Identification of regulators of polyploidization presents therapeutic targets for treatment of AMKL. *Cell*, 2012, 150, 575-589.
- [5] GAO Y., SMITH E., KER E., CAMPBELL P. *et al.* — Role of RhoA-specific guanine exchange factors in regulation of endomitosis in megakaryocytes. *Dev. Cell*, 2012, 22, 573-584.

- [6] LORDIER L., BLUTEAU D., JALIL A., LEGRAND C. *et al.* — RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat. Commun.*, 2012, 3, 717.
- [7] ANTONY-DEBRÉ I., BLUTEAU D., ITZYKSON R., BACCINI V. *et al.* — MYH10 protein expression in platelets as a biomarker of RUNX1 and FLII alterations. *Blood*, 2012, 120, 2719-2722.
- [8] GILLES L., GUIÈZE R., BLUTEAU D., CORDETTÉ-LAGARDE V. *et al.* — P19INK4D links endomitotic arrest and megakaryocyte maturation and is regulated by AML-1. *Blood*, 2008, 111, 4081-4091.
- [9] PATEL S.R., HARTWIG J.H., ITALIANO J.E. — The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.*, 2005, 115, 3348-3354.
- [10] SOUYRI M., VIGON I., PENCIOLELLI J.F., HEARD J. M. *et al.* — A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell*, 1990, 63, 1137-1147.
- [11] KAUSHANSKY K., DRACHMAN J.G. — The molecular and cellular biology of thrombopoietin, the primary regulator of platelet production. *Oncogene*, 2002, 21, 3359-3367.
- [12] KAUSHANSKY K. — The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J. Clin. Invest.*, 2005, 115, 3339-3347.
- [13] KAUSHANSKY K. — Thrombopoietin. *N. Engl. J. Med.*, 1998, 339, 746-754.
- [14] DE GRAAF C.A., METCALF D. — Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle*, 2011, 10, 1582-1589.
- [15] VANNUCCI A.M., PIERI L., SUSINI M.C., GUCLIELMELLI P. — BCR-ABL1-negative chronic myeloid neoplasms: an update on management techniques. *Future Oncol.*, 2012, 8, 575-593.
- [16] TEOFILI L., LAROCCA L.M. — Advances in understanding the pathogenesis of familial thrombocythaemia. *Br. J. Haematol.*, 2011, 152, 701-712.
- [17] MEAD A.J., RUGLESS M.J., JACOBSEN S.E., SCHUH A. — Germline JAK2 mutation in a family with hereditary thrombocytosis. *N. Engl. J. Med.*, 2012, 366, 967-969.
- [18] GEDDIS A.E. — Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Pediatr. Blood Cancer*, 2011, 57, 199-203.
- [19] GEDDIS A.E. — Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia and thrombocytopenia with absent radii. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 2009, 23, 321-331.
- [20] ALBERS C.A., PAUL D.S., SCHULZE H., FRESON K. *et al.* — Compound inheritance of a low-frequency regulatory SNP and a rare null mutation in exon-junction complex subunit RBM8A causes TAR syndrome. *Nat. Genet.*, 2012, 44, 435-439, S431-432.



Principales mutations de MPL et du gène de la TPO retrouvées dans la pathologie.

MPL est constitué d'un domaine extracellulaire présentant une duplication du domaine HRD (Hématopoïetique Receptor Domain), d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracytoplasmique. Ce dernier est associé de manière non covalente grâce à deux motifs Box1 (riche en proline de séquence P¹⁷S¹⁸L¹⁹P²⁰) et Box 2 (hydrophobe et chargé) à une tyrosine kinase de la famille JAK: JAK2. La liaison de la TPO va permettre le rapprochement des domaines intracytoplasmiques, l'activation des protéines JAK2 et l'initiation de la signalisation. Sont représentées les principales mutations responsables soit de thrombopénies (à gauche) soit de thrombocytoses (à droite) et retrouvées dans les formes familiales (bleu), dans les Néo plasmes myéloprolifératifs (rouge) ou encore à la fois dans les formes familiales et acquises (noir). Les mutations du gène de la TPO ne sont responsables que de thrombocytoses et sont retrouvées majoritairement dans les régions non codantes du gène où elles entraînent une augmentation de la traduction de la protéine.

FIG. 1. — Principales mutations de MPL et du gène de la TPO retrouvées dans la pathologie