

Mutation des gènes des télomères et Foie

Concours de diaporama
AFEF 2019

Téломères, Télomérases

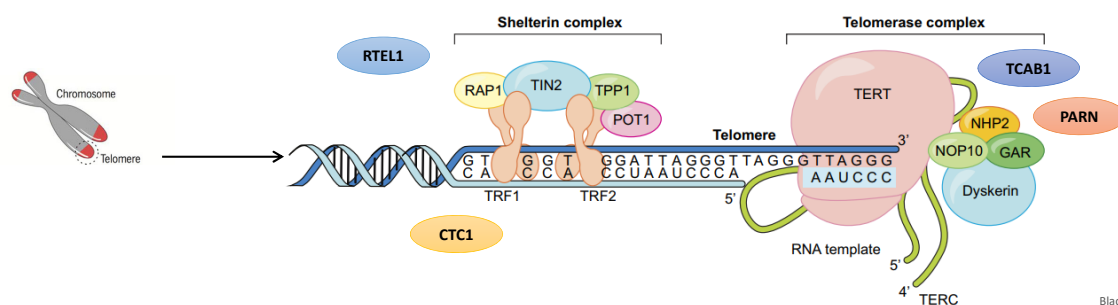
Téломères

= séquences répétées d'ADN (TTAGGG) situées à l'extrémité des chromosomes. Essentiels pour protéger les régions codantes de la perte d'ADN induite par la division cellulaire.

Raccourcissement trop important → sénescence et apoptose

Télomérases

- Complexe enzymatique responsable de l'allongement des télomères par l'addition de séquences de télomères répétées aux extrémités des chromosomes.
- Composé de : TERC, de la matrice ARN et de TERT l'enzyme clé.



Blackburn, Nat. Med 2006

Téломères :

Les télomères sont les terminaisons des chromosomes formées des seules liaisons TTAGGG (Thymine, Adénine, Guanine). Les télomères sont recouverts de protéines, les « shelterines ».

A chaque division cellulaire on constate un raccourcissement progressif des télomères et au bout d'un certain nombre de divisions (40 environ), une dégénérescence de la cellule et sa mort. Chaque mitose s'accompagne donc d'une perte de matériel chromosomique. Cette attrition télomérique, après un certain nombre de divisions, devient incompatible avec la survie de la cellule. Cette sénescence cellulaire répliquative constitue une sorte d'horloge biologique régulant la survie des cellules en fonction de leur passé répliquatif. Les télomères sont essentiels au maintien de l'intégrité et de la stabilité chromosomique.

Télomérases :

La télomérase (Telomerase Reverse Transcriptase, TERT) est un complexe enzymatique ribonucléoprotéique catalysant l'élongation des télomères. Elle permet la réparation des télomères et leur maintien à leur longueur initiale. Ce système contrecarre l'érosion physiologique des télomères et prévient donc la sénescence cellulaire. La plupart des cellules somatiques ont une activité télomérase très faible ou indétectable, et vont évoluer ainsi vers le vieillissement puis la mort cellulaire précoce. À l'opposé, les cellules à fort potentiel prolifératif sont caractérisées par une importante activité enzymatique :

lymphocytes T activés, cellules souches et cellules tumorales. En réparant les télomères, la télomérase permet aux cellules tumorales de proliférer et de se développer à l'infini.

Le complexe enzymatique est nécessaire à la synthèse des télomères et se compose de :

La sous-unité protéique : TERT (Telomerase Reverse Transcriptase), l'enzyme clé.

La sous-unité ARN : TERC, ARN non codant servant de modèle dans la transcriptase inverse

Matrice à ARN

Raccourcissement des télomères :

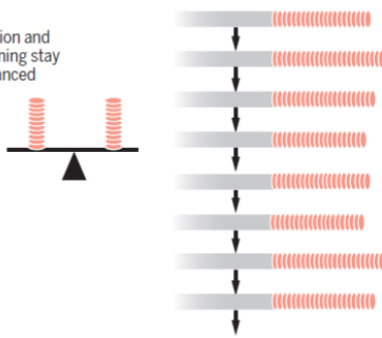
Le raccourcissement des télomères est un phénomène universel associé à l'âge avancé et avec les pathologies liées à l'âge. La maintenance des télomères est essentielle pour ralentir le raccourcissement qui se produit avec chaque division cellulaire et ayant pour conséquence un vieillissement cellulaire prématuré.

→ Lorsque survient un raccourcissement trop important des télomères cela entraîne une sénescence et une apoptose prématurée.

Téломères, Télomérases

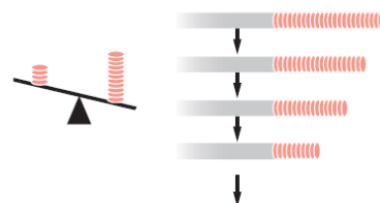
Abundant telomerase as cell divides

Addition and shortening stay balanced



Cells keep dividing
Most human cancers

Insufficient telomerase as cell divides



Cell division STOPS after a delay
Senescence; cell malfunctions; genomic instability
Mitochondrial malfunction, pro-inflammatory, tumorigenic factors

Raccourcissement excessif des télomères

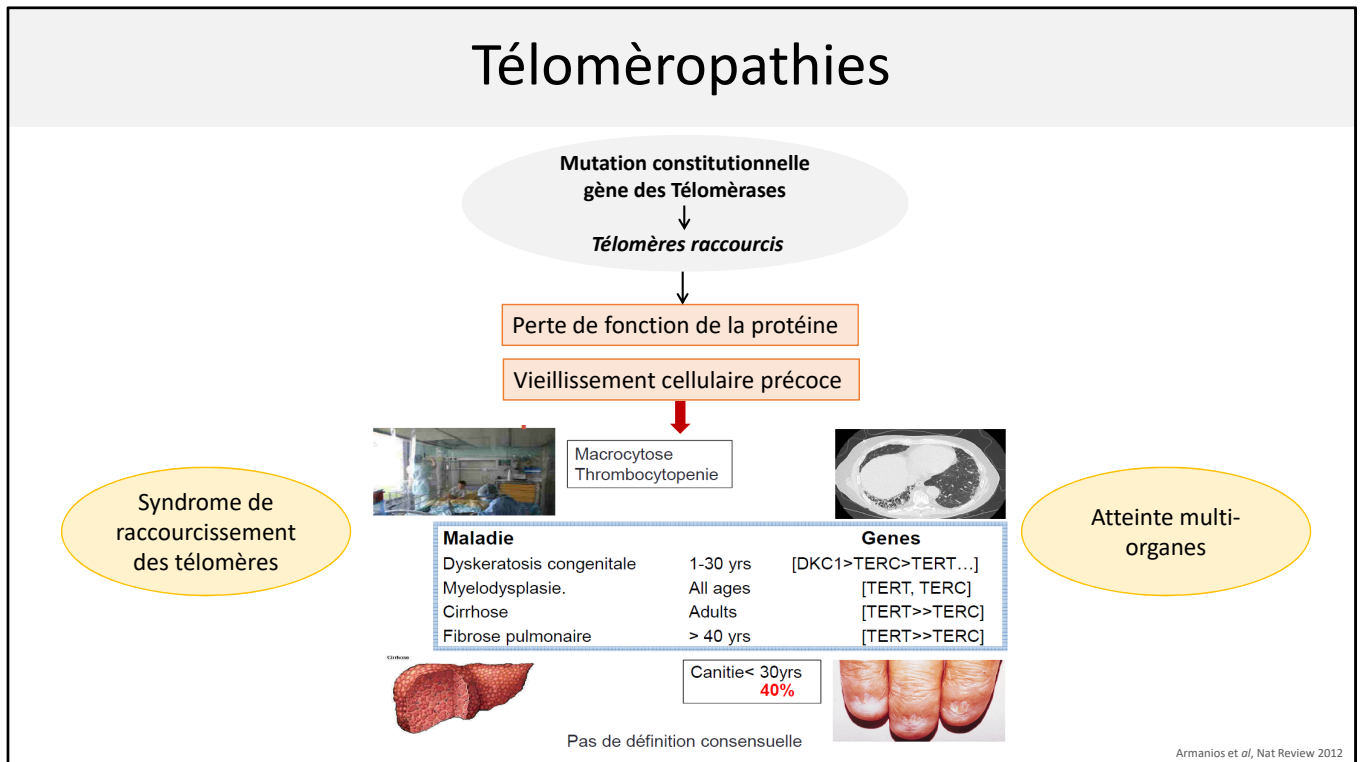


Sénescence et Instabilité génétique

Blackburn, Nat. Med 2006
Blackburn et al, Science 2015
Patnaik et al, J Hepatol 2018

Lorsqu'il y a une activité télomérase insuffisante, cela entraîne un raccourcissement excessif des télomères durant les divisions cellulaires.
→ Cela aboutit à un **arrêt des divisions cellulaire, une sénescence prématurée et une instabilité génétique.**

Téломéropathies



Les mutations constitutionnelles des gènes des télomérases entraînent une perte de fonction de la protéine ayant pour conséquence un vieillissement cellulaire précoce aboutissant à des atteintes hématologiques (Aplasie Médullaire, Myelodysplasie, Cytopénies), pneumologiques (Fibroses pulmonaires sévères), cutanées (Dyskératoses), et hépatiques.

Les mutations constitutionnelles sont retrouvées dans toutes les cellules, et entraînent ainsi ces atteintes multi-organes.

Les mutations du gène TERT et celles du gène TERC codant la sous unité ribosomique de TERT sont majoritairement décrites et sont à l'origine des anomalies de la sénescence cellulaire.

Les patients portant ces mutations ont des profils cliniques particuliers qui ne sont pas bien connus entrant dans le spectre du « syndrome de raccourcissement des télomères » ou « téloméropathies ».

Atteintes d'organes

Précoces

Atteinte tissulaire ou cellulaire	Manifestations cliniques
Atteinte Pulmonaire	<ul style="list-style-type: none">- Fibrose Pulmonaire- Pneumopathie interstitielle diffuse- Emphysème précoce
Atteinte Hématologique	<ul style="list-style-type: none">- Cytopénies isolées, macrocytose- Hypoplasie – Aplasie médullaire- Syndrome myélodysplasique (SMD)
Atteinte Dermatologique	<ul style="list-style-type: none">- Canitie/alopecie précoce- Hypo/hyperpigmentation- Dysplasie/dystrophie unguéale- Leucoplasie buccale
Atteinte osseuse	<ul style="list-style-type: none">- Ostéoporose fracturaire précoce- Nécrose non vasculaire
Système immunitaire	<ul style="list-style-type: none">- DICV- Infections opportunistes
Atteinte Ophtalmologique	<ul style="list-style-type: none">- Rétinopathies précoce avec risque de cécité
Cancers	<ul style="list-style-type: none">- Cancers épithéliaux (peau et autres)- Cancers hématologiques (SMD et LMA)

Armanios et al, Nat Review 2012

Les atteintes d'organes sont précoces et peuvent être multiples.

Les atteintes principales sont :

- l'atteinte pulmonaire : avec apparition d'une fibrose précoce
- l'atteinte hématologique : avec soit des cytopénies isolées, soit une aplasie médullaire ou un syndrome myélodysplasique (SMD)
- l'atteinte dermatologique : avec des signes cutanés de vieillissement précoce
- l'atteinte hépatique (que l'on va détailler ci-après)

On peut retrouver d'autres atteintes d'organes :

- Atteinte osseuse avec souvent une ostéoporose précoce, sévère, et fracturaire
- Atteinte ophtalmologique, principalement postérieure (rétinopathies)
- Atteinte du système immunitaire avec la survenue d'infections opportunistes dans un contexte de DICV
- Survenue de cancers, principalement secondaires à l'atteinte hématologique (accutisation de syndrome myélodysplasique : Leucémie myéloïde aigue LAM)

Atteinte Hépatique ?

Mal connue,
peu de
données

Corrélation
clinico-
histologique ?

Facteur
pronostic ?
Complications ?

Hypertension Portale non cirrhotique

Hyperplasie nodulaire régénérative (HNR)
Syndrome Hépatopulmonaire (SHP)

Cirrhose cryptogénétique 

Surcharge en fer
Stéatose

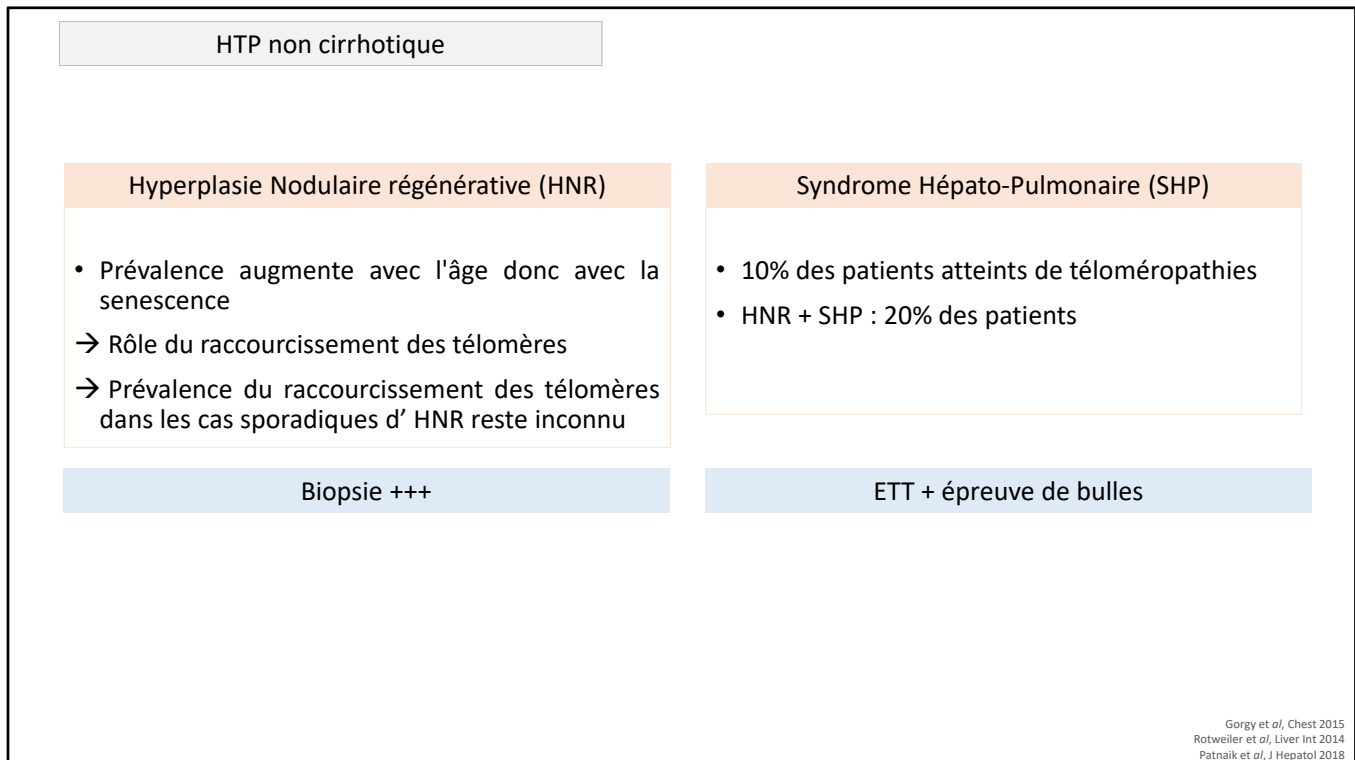
Rôle des cofacteurs : surpoids ? OH ? Virus ?

- Aucun facteur pronostic n'a été identifié
- Impossible de prédire la gravité de l'atteinte et la survenue d'un CHC

Calado et al, PLOS One 2009
Patnaik et al, J Hepatol 2018
Kapuria et al, Hepatology 2019

- Les atteintes hépatiques secondaires à ces mutations sont encore mal connues. Les atteintes les plus fréquemment retrouvées sont des Hyperplasie Nodulaire régénérative (HNR), des cirrroses cryptogénétiques avec une fibrose particulièrement sévère et des atteintes vasculaires du foie, se compliquant d'hypertension portale (HTP). Une surcharge en fer et une stéatose ont été retrouvées chez les patients biopsiés. De façon paradoxale, plus de CHC ont été décrits en lien avec ces téloméropathies. Le rôle oncogène de ces mutations reste encore mal compris actuellement, notamment en cas de lésion vasculaire du foie.

- La caractérisation de ces maladies hépatiques est difficile et nécessite à ce jour systématiquement une ponction biopsie hépatique car il n'y a pas de corrélation clinico-histologique des atteintes décrites.
- Aucun facteur pronostic n'a été identifié concernant ces atteintes hépatiques, et il est impossible de prédire la gravité de l'atteinte et la survenue d'un CHC.



Atteinte hépatique : HTP non cirrhotique.

HNR :

- La prévalence augmente avec l'âge comme démontré dans une grande étude d'autopsie, suggérant un mécanisme dépendant de l'âge.

SHP : dans une série de baltimore

- Retrouvé chez 10% des patients atteints de téloméropathies.
- HNR + SHP chez 20%

Il paraît important de réaliser les examens complémentaires essentiels au diagnostic de ces atteintes : la biopsie hépatique, et une ETT avec épreuve de bulles.

Cirrhose Cryptogénétique

- 7% des patients atteints de téloméropathies
- Atteinte précoce : âge moyen 37 ans

- Incidence plus élevée des mutations associées aux télomères chez les patients atteints cirrhose sporadique de causes connues par rapport à des patients contrôles non cirrhotiques.
- Longueur moyenne des télomères dans les globules blancs des patients cirrhotiques était significativement plus courte que chez les témoins appariés selon l'âge (0,114 contre 0,001) dans 80% des cas.

→ Rôle du raccourcissement des télomères dans le développement et / ou la progression de la cirrhose chez les patients avec une cause connue ?

→ Mécanisme encore mal connu

Dokal et al, Br J haematol 2000
Calado et al, PLOS One 2009
Calado et al, Hepatology 2011
Patnaik et al, J Hepatol 2018

Cirrhose Cryptogénétique :

- Retrouvée chez 7% des patients atteints de téloméropathies
- Survenue précoce +++ avant 40 ans

Une incidence plus élevée des mutations associées aux télomères a été retrouvée chez les patients atteints cirrhose sporadique de causes connues par rapport à des patients contrôles non cirrhotiques. La longueur moyenne des télomères dans les globules blancs des patients cirrhotiques était significativement plus courte que chez les témoins appariés selon l'âge (0,114 contre 0,001) dans 80% des cas.

Ces résultats peuvent suggérer un rôle du raccourcissement des télomères dans le développement et / ou la progression de la cirrhose chez les patients avec une cause connue ?

Corrélation Clinico-histologique ?

1^{re} étude : description de cas

Liver function tests	Liver histology
(not available)	Massive necrosis without significant hepatitis; some early fibrosis in areas of parenchymal collapse as well as at the edges of portal areas and around central veins
Bilirubin mildly elevated; albumin mildly decreased	Hepatocyte variation in cell and nuclear size, and variation in plate width, consistent with regeneration on reticulin stain; CD34 stained positive in sinusoidal endothelial cells; iron heavily accumulated, mainly in hepatocytes in zone 1
Enzymes elevated; normal albumin	Hepatic architecture is distorted by bridging fibrosis; moderate inflammation, hepatitis, and cholestasis
Alkaline phosphatase elevated; normal bilirubin; low albumin	Cirrhosis with foci of lobular inflammation dominated by plasma cells, extensive sinusoidal fibrosis, and Mallory bodies
normal	Macrovesicular steatosis with foci of lobular inflammation and portal chronic inflammatory infiltrate and mild hepatocellular iron accumulation
Enzymes elevated	Hepatocytes with mild variation in nuclear size, mild hepatocellular iron accumulation in a pericanalicular pattern, and several zones displaying abnormally widened hepatocyte plates
Enzymes elevated	Nodular regenerative hyperplasia with zones of small compressed hepatocytes alternating with zones of large hepatocytes with widened plates; CD34 positive in sinusoidal endothelial cells mainly around the portal areas and central veins

→ Description cas par cas, population hétérogène, difficultés à généraliser

Calado et al, PLOS One 2009

Est-ce qu'il y a une Corrélation Clinico-Histologique de ces atteintes ?

Etude de Calado et al en 2009, première étude, étude de cas.

Absence de corrélation clinico-biologique retrouvée dans cette première étude sur l'atteinte hépatique des téloméropathies.

Etude Américaine récente

- N=121 patients atteints ou suspects de téloméropathie dépistés et 40 patients (40%) présentant une atteinte hépatique ont été inclus dans l'étude
- Suivi médian de 2,4 ans

Prédominance d'hommes âgés en moyenne de 40 ans

Mutation du gène *TERT* dans 52% des cas et télomères très courts dans 72% des cas

Paramètres biologiques (median IQR)	Atteinte hépatique n=40	Imagerie du foie	Patients n=23/40	Biopsie Hépatique	Patients n=6/40
ALAT (U/L)	76 (32 ; 122)	Hépatomégalie	n=6 (26%)	HNR	n=1
ASAT (U/L)	40 (29 ; 67)	Hyperéchogénéicité	n=9 (39%)	Stéatohépatite	n=3
PAL (U/L)	86 (66 ; 132)	Contours irréguliers	n=5 (21%)	Surcharge en fer	n=3
Albumine (g/L)	35 (32 ; 37)	Splénomégalie	n=5 (21%)	Cirrhose	n=2
Bilirubine totale (μmol/L)	10,2 (8,5 ; 17)	HTP	n=2 (9%)		
Hb (g/dL)	9 (7,5 ; 10,2)	Surcharge en fer	n=5 (21%)		
Plaquettes (G/L)	23000 (15000 ; 39000)				

Un patient, qui avait à la fois une cirrhose et une stéatohépatite, avait des enzymes hépatiques normales au moment de la biopsie.

→Suspicion diagnostique , pas d'imagerie dans 50% des cas, uniquement 6 biopsies

Kapuria et al, Hepatology 2019

Résultats d'une étude américaine récente, décrivant les résultats biologiques, radiologiques de 40 patients atteints de téloméropathie avec atteinte hépatique. Seulement 6 patients ont été biopsiés et les lésions retrouvés sont : HNR, Cirrhose, Stéatohépatite et Surcharge en fer.

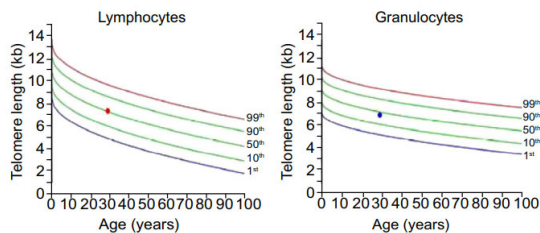
A noter, un patient, qui avait à la fois une cirrhose et une stéatohépatite, avait des enzymes hépatiques normales au moment de la biopsie.

Longueur des télomères

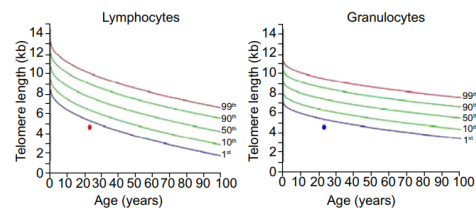
Mesure de la longueur des télomères

Détermination de la longueur des télomères leucocytaires (LTL)

- Southern Blot
- FISH ou Flow-FISH
- PCR quantitative
- STELA : analyse de l'élongation d'un seul télomère : REFERENCE



Longueurs de télomères dans les lymphocytes et les granulocytes au 50ème percentile (similaire à environ 50% de la population normale au même âge)



Patient dont la longueur des télomères est inférieure au 1er percentile

La mesure de la longueur des télomères dans les cellules du sang périphérique constitue à ce jour le test de dépistage de référence pour l'identification des patients atteints de téloméropathies.

Cette mesure peut s'effectuer par *Southern blot*, PCR (*polymerase chain reaction*) quantitative ou FISH (*fluorescence in situ hybridization*) quantitatif parfois couplé à la cytométrie de flux (*flow-FISH*). La longueur des télomères des leucocytes diminue avec l'âge chez les individus sains, ce test diagnostique se révèle plus discriminant chez les enfants que chez les adultes.

Dans la majorité des études cliniques actuelles, la mesure de la longueur des télomères est estimée par la détermination de la longueur des télomères leucocytaires (LTL).

Un rapport de flux-FISH fournit la longueur des télomères par rapport à l'âge, ce qui est important car l'attrition des télomères fait partie du processus de vieillissement normal.

Figures :

2 exemples de résultats après mesure de la longueur des télomères : taille des télomères représentée en fonction de l'âge et en percentile.

A gauche : Longueurs de télomères dans les lymphocytes et les granulocytes au 50ème percentile (similaire à environ 50% de la population normale au même âge)

A droite : Patient dont la longueur des télomères est inférieure au 1er percentile.

Diagnostic génétique

Recherche de mutations

Détermination de la mutation : Plusieurs gènes ont été associés à des télomères raccourcis

- Séquençage ciblé
- Séquençage d'exome

Gene	Inheritance	Associated phenotypes
<i>DKC1</i>	X-linked	Dyskeratosis congenita, aplastic anaemia, nodular regenerative hyperplasia
<i>TINF2</i>	AD	Dyskeratosis congenita, Revesz syndrome (skin hyper/hypopigmentation, nail dystrophy, oral leucoplakia, bone marrow failure, developmental delay, sparse and fine hair, bilateral exudative retinopathy, and intracranial calcifications)
<i>TERC</i>	AD	Dyskeratosis congenita, aplastic anaemia, pulmonary fibrosis, nodular regenerative hyperplasia, cryptogenic cirrhosis
<i>TERT</i>	AD	Dyskeratosis congenita, aplastic anaemia, pulmonary fibrosis, nodular regenerative hyperplasia, cryptogenic cirrhosis
<i>NOP10</i>	AR	Dyskeratosis congenita, aplastic anaemia
<i>NHP2</i>	AR	Dyskeratosis congenita, aplastic anaemia
<i>RTEL1</i>	AR	Pulmonary fibrosis, nodular regenerative hyperplasia
<i>WRAP53</i>	AR	Dyskeratosis congenita
<i>NAF1</i>	AD	Pulmonary fibrosis
<i>ACD</i>	AD or AR	Fanconi anaemia
<i>CTC1</i>	AR	Coats plus disease, osteopenia, retinal exudates
<i>PARN</i>	AR	Dyskeratosis congenita, pulmonary fibrosis

Patnaik et al, J Hepatol 2018

La recherche de mutations se fait par séquençage soit ciblée soit séquençage d'exome.

Plusieurs gènes ont été associés à des télomères raccourcis, classés en fonction de leur rôle physiologique normal dans la biologie des télomères. Les modes de transmission sont généralement récessifs liés à l'X, autosomiques dominants et autosomiques récessifs.

Les principaux gènes mutés sont : TERT, TERC, DKC1, RTEL1.

Quelque soit la méthodologie, une mutation causale sous-jacente est identifiée que dans 40% des cas, ce qui suggère qu'il existe plusieurs altérations génomiques et épigénétiques non encore découvertes et qui entraînent une réduction de la longueur de télomères.

Diagnostic génétique

Difficultés

Hérédité complexe des téloméropathies

- Expressivité variable
- Interaction gène-environnement
- Pénétrance incomplète

Mutation génétique chez un patient asymptomatique?

Patient symptomatique sans mutation génétique retrouvées ?

Absence de mutation mais télomères courts ?

Risque pour les hétérozygotes de développer une autre atteinte ?

Peu de données..

Le conseil génétique est souvent difficile du fait de l'hérédité complexe des ces maladies. Les téloméropathies ne sont pas des maladies génétiques autosomiques dominantes habituelles, elles ont une expressivité variable et une pénétrance familiale incomplète. L'atteinte est retrouvée d'une génération à une autre mais avec des profils plus sévères au fur et à mesure de la descendance. Il n'est à l'heure actuelle pas possible de présumer de la survenue et de la gravité de l'atteinte clinique lorsque l'on présente une mutation TERT.

Des questions restent encore sans réponses :

- Quid de l'absence de mutation mais télomères courts ?
- Quel est le risque pour les hétérozygotes de développer une autre atteinte ?

Traitement

Seul
traitement :
greffe

- Greffe de moelle
- Transplantation Pulmonaire
- Transplantation Hépatique

Traitement
médical ?

Androgène Danazol®

Un essai de phase 2

Efficacité du Danazol® dans le traitement des téloméropathies :

- réduction précoce de l'attrition des télomères (chez 44% des patients)
- réponse hématologique à 3 mois chez 79% des patients

PHRC – ANDROTELO : septembre 2018
Hématologie, Saint-Louis

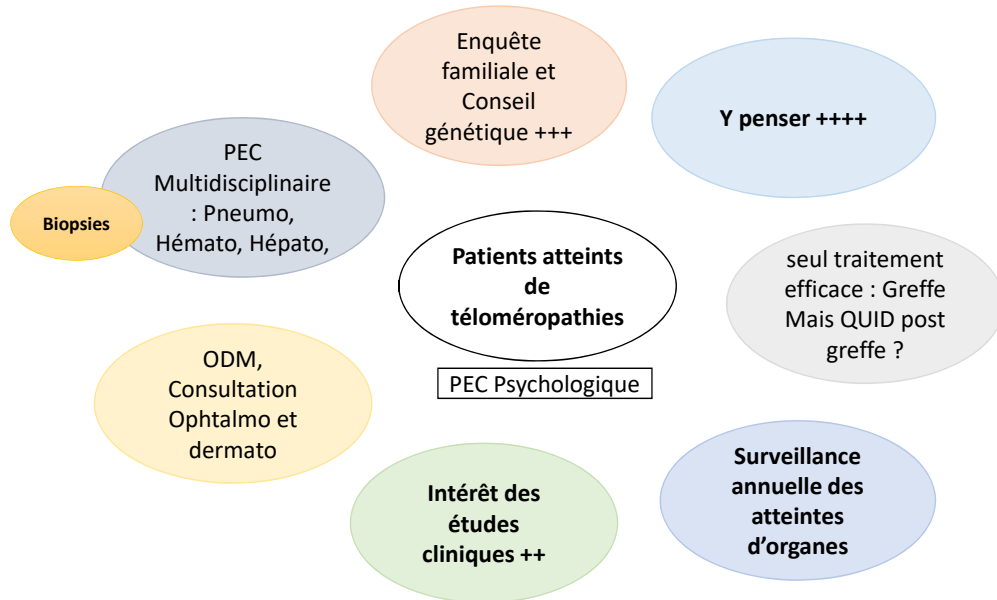
Barbaro et al, Biol Blood Marrow Transplant 2016
Townsend et al, NEJM 2016

Le seul traitement proposé aux patients est à l'heure actuelle la greffe en fonction de l'atteinte (transplantation hépatique, pulmonaire, et greffe de moelle osseuse).

Un essai de phase 2 a montré l'efficacité du Danazol® dans le traitement des téloméropathies avec comme effet une réduction précoce de l'attrition des télomères (chez 44% des patients) et une réponse hématologique à 3 mois chez 79% des patients.

Un PHRC est en cours actuellement en Hématologie à l'hôpital Saint-Louis : Protocole ANDROTELO pour étudier l'efficacité du DANAZOL chez ces patients.

Traitement



Nécessité d'études clinique pour mieux connaitre les atteintes, notamment hépatiques.