



NOUVELLE

L'épiderme et les astrocytes influencent la réponse systémique à l'hypoxie et la sécrétion d'érythropoïétine

Dominique Labie, Laure Coulombel

D. Labie :

Inserm U567, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

dominique.labie@inserm.fr

L. Coulombel :

Médecine/Sciences, ADR Inserm, 2, rue d'Alésia, 75014 Paris, France.

laure.coulombel@inserm.fr

► Une réponse adaptative essentielle à un environnement hypoxique est l'augmentation de la synthèse rénale de l'érythropoïétine (EPO) qui entraîne à son tour toute une série de réactions systémiques - dont la production accrue de réticulocytes et de globules rouges - mais également extrahématopoïétiques [1]. L'induction du gène *epo* est contrôlée par la fixation du facteur de transcription HIF (*hypoxia inducible factor*) en 3' du gène sur un élément HRE

(*hypoxia responsive element*). HIF est un dimère des sous-unités alpha et bêta dont il existe 3 isoformes. Si HIF-1 est la plus étudiée, on sait maintenant que le contrôle de HIF-2 se distingue de celui de HIF-1. En conditions normoxiques, les sous-unités alpha sont extrêmement instables et sont hydroxylées (par la prolylhydroxylase qui est le senseur tissulaire de l'oxygène). Elles interagissent alors avec la protéine VHL (*von Hippel Lindau*) qui provoque leur ubiquitiny-

lation et leur dégradation [2]. Chez les mammifères, il est couramment admis que la réponse systémique à l'hypoxie est avant tout le fait d'une réponse rénale [3]. Les observations d'une synthèse d'EPO par les astrocytes [4], ou encore d'une sensibilité directe des kératinocytes à la concentration en oxygène de l'air ambiant (par analogie avec le modèle des amphibiens) sont restées marginales ou considérées comme des processus de régulation purement locaux. L'équipe de

Randall S. Johnson, de l'UCSD (*University of California San Diego*), remet en question ce dogme dans deux articles publiés dans *Cell* en 2008 [5] et *J Clin Invest* en 2009 [6] en démontrant que la peau et les cellules gliales du système nerveux prennent une part active à la réponse systémique à l'hypoxie et notamment dans le contrôle de la synthèse d'EPO. La stratégie expérimentale utilisée est la même dans les deux articles : analyse de la réaction à l'hypoxie de souris dont les gènes *hif* et *vhl* sont sélectivement inactivés dans la peau ou les astrocytes.

L'épiderme dans la réponse à l'hypoxie

La peau semble se comporter comme un organe hypoxique [7] : en effet, les kératinocytes fixent le nitroimidazole EF5, un marqueur spécifique des zones hypoxiques, et expriment un taux élevé de transcrits *HIF-1*. Pour analyser cette question plus précisément, les auteurs ont construit un mutant *K14cre+HIF-1^{+/+}* qui caractérise une inhibition spécifique de l'expression de *HIF-1* dans les kératinocytes (l'expression de *cre* étant contrôlée par le promoteur de la kératine 14), ce qui ne compromet pas la survie des animaux et ne modifie pas, à l'état normoxique basal (20 % O₂), leurs paramètres hématologiques. En revanche, la réponse des mutants à une atmosphère hypoxique (9 % O₂) est anormale : le taux plasmatique d'EPO, qui s'élève de 30 fois chez les souris sauvages, n'atteint que 30 % de cette valeur chez les mutants et s'accompagne d'un défaut de réponse transcriptionnelle du gène *epo* dans le rein, ce qui prouve l'intervention de la réaction cutanée à l'hypoxie dans la régulation rénale de l'EPO. Ce défaut ne se voit pas chez les mutants *K14cre+/HIF-2^{+/+}* qui réagissent normalement suggérant donc très fortement un rôle déterminant de *HIF-1 α* dans l'induction de l'EPO au niveau de l'épiderme. De même, les mutants dépourvus d'expression de *VHL* dans l'épiderme (*K14cre+/VHL^{+/+}*), ce qui stabilise ainsi l'expression des *HIF-1 α* et *-2 α* , ont un hémato-

crité élevé et des taux élevés de réticulocytes et d'EPO. Cette surexpression d'EPO est majoritairement hépatique et non rénale. Les auteurs ont dupliqué ces résultats dans un modèle de déplétion conditionnelle de *VHL* chez l'adulte, éliminant un possible retentissement de l'absence de *VHL* et de la surexpression de *HIF-1/2* dans la peau au cours du développement.

L'utilisation de doubles et triples mutants par croisement de souris *knock-out* conditionnelles *HIF-1^{+/+}* et/ou *HIF-2^{+/+}* avec les animaux chez lesquels *vhl* est inactivé dans les kératinocytes a permis de démontrer l'action prédominante de *HIF-2* dans le phénotype du mutant *k14cre-VHL* : son invalidation rétablit le taux d'EPO, à un niveau équivalent à celui du témoin, alors que la délétion épidermique de *HIF-1* dans ces mutants *K14creVHL^{+/+}* n'est pas suffisante pour contrebalancer ce dernier effet. Cette observation met en évidence un rôle différentiel net des deux sous-unités *HIF-1 α* et *HIF-2 α* selon que *VHL* est fonctionnel ou non [8].

La voie NO/iNOS est un intermédiaire essentiel de l'action de HIF dans l'épiderme

On sait qu'un des signaux déclenchant la réponse hypoxique dans le rein et le foie est le flux sanguin. Or, chez les mutants *K14creVHL^{+/+}*, le flux sanguin est dévié vers l'épiderme aux dépens du rein et du foie. Il en résulte une diminution de la pression sanguine et une hypoxie dans ces deux organes. Or, l'oxyde nitrique (NO) - un régulateur majeur du tonus vasculaire et notamment un vasodilatateur - est élevé chez les mutants. En effet, *inos* (*inducible oxide nitric synthase*) est un gène cible de la réponse transcriptionnelle de *HIF* à l'hypoxie. Il était donc légitime d'analyser l'implication de la voie NO/iNOS dans cette déviation du flux sanguin vers la peau. Les auteurs ont vérifié chez des souris normales une observation faite chez des rats : l'inhibition générale de synthèse de NO par le L-NAME (N(G)-nitro-L-

arginine méthyl ester) chez un animal témoin se traduit par une augmentation systémique de la production d'EPO (20 %). Chez le mutant *K14creVHL^{+/+}*, l'administration de L-NAME aboutit, elle, à une diminution de la vasodilatation cutanée et donc à une diminution du taux d'EPO systémique qui rejoint celui des animaux non mutants traités. La signalisation NO s'avère donc un intermédiaire essentiel par lequel la modification de *HIF* au niveau cutané module la stimulation de la synthèse d'EPO. L'implication de cette voie est confirmée par l'action d'un donneur de NO (nitroglycérine) : sans effet s'il est administré par voie générale, il induit une synthèse rénale d'EPO (x 7) s'il est délivré sous forme d'un timbre cutané. Il existe donc une régulation très spécifique du flux sanguin dans l'épiderme qui peut détourner le flux des territoires splanchniques vers la peau, induisant un signal hypoxique dans ces territoires qui sont aussi les principaux pourvoyeurs d'EPO.

La peau « respire »-t-elle ?

L'EPO intervient surtout dans l'adaptation à une hypoxie chronique, et on peut se demander quel serait le rôle de la peau en cas d'hypoxie aiguë. Dans cette situation, la réponse cardiorespiratoire prédomine et, *via* une vasoconstriction pulmonaire indépendante de *HIF*, elle dérive immédiatement l'intensité du flux sanguin vers le cerveau et le foie. Pour tester le rôle de la peau, des souris normales ont été placées de telle façon que la concentration en oxygène soit différente au niveau de la tête (air respiré) et du corps (reflétant l'oxygénation de la peau). Si l'air inspiré est hypoxique (10 % O₂) et que la souris est exposée entièrement à une atmosphère hypoxique (10 % O₂), on observe (au bout de 5 heures) une élévation importante du taux d'EPO (et des transcrits *epo* rénaux) ; celle-ci est plus que doublée si la peau est exposée à des conditions normoxiques (21 % O₂). Cette adaptation du taux d'EPO à une modification

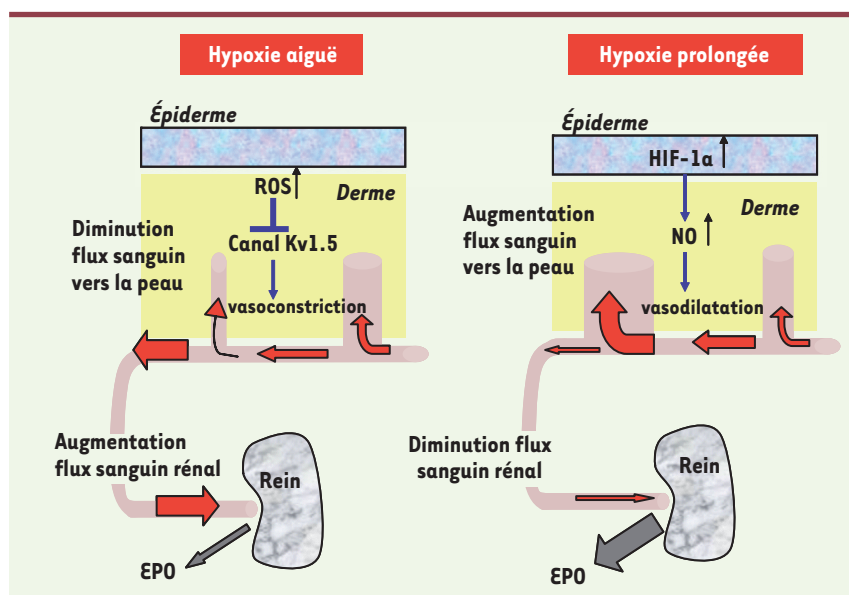


Figure 1. Réponse de la peau à l'hypoxie. À gauche, la réponse immédiate (<1 heure) à une hypoxie aiguë met peut-être en jeu des mécanismes identiques à ceux qui entraînent une vasoconstriction pulmonaire via le canal potassique Kv1.5. À droite, l'adaptation à une hypoxie plus prolongée (> 5 heures) fait intervenir les facteurs HIF-1 et une modulation du flux sanguin. L'intensité du flux sanguin est illustrée par la largeur des flèches rouges, et la vasodilatation ou la vasoconstriction cutanée par la largeur des vaisseaux (inspiré de [5]).

de l'oxygénation cutanée est abolie chez les mutants $K14creHIF-1\alpha^{f/f}$, confirmant qu'elle fait intervenir *HIF-1*. Si l'on mesure au bout d'une heure directement la réponse vasculaire immédiate (grâce à des microbilles fluorescentes) chez ces souris en hypoxie respiratoire, on constate qu'une hypoxie cutanée entraîne une vasoconstriction, mais que si le reste du corps est placé en normoxie, il y a une dérivation massive (x 10) du flux vers la peau, ce qui diminue le flux rénal et hépatique et stimule la réponse hypoxique systémique. Cette réaction immédiate ferait intervenir le même canal potassium Kv1.5 qui contrôle la vasoconstriction pulmonaire et confirme que la peau intervient aussi dans la régulation de la réponse du tonus vasculaire à une hypoxie aiguë [9].

Les astrocytes :

source d'EPO lors d'une hypoxie aiguë

On sait que des sources alternatives d'EPO existent, dont le foie et le cerveau, mais elles ne compensent pas la défaillance de la production rénale, par exemple chez les patients atteints d'insuffisance rénale [10]. Dans le cerveau, l'EPO est produite par les neurones et les astrocytes (la population majoritaire des cellules gliales), mais les doutes sur sa capacité à traverser

la barrière hémato-encéphalique expliquent qu'on lui ait attribué majoritairement un rôle paracrine local, notamment de neuroprotection [11]. Suivant la même logique que précédemment et la même stratégie expérimentale, le groupe de Randall Johnson démontre que l'EPO d'origine astrocytaire joue un rôle non négligeable dans la régulation de l'érythropoïèse, et ce via la voie HIF-. Les trois gènes *hif-1α*, *hif-2α* et *vhl* sont inactivés sélectivement dans les astrocytes via le système cre-lox, l'expression de la recombinaise étant placée sous contrôle du promoteur *GFAP* (*glial fibrillary acidic protein*) spécifique de la lignée astrocytaire. Les animaux transgéniques recombinants sont tous viables à la naissance mais, alors que l'inactivation de *hif-1* ou *hif-2* seule dans les astrocytes n'a pas de conséquences pathologiques, celle de *vhl* ($GFAPcre+VHL^{f/f}$) entrave la croissance de l'animal et abrège sa durée de vie. On constate en particulier des déficits neurologiques, troubles locomoteurs et hydrocéphalie témoignant d'une perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, mais ce qui est frappant, c'est l'élévation extrême de l'hématocrite (environ 80 % dès 5 semaines) du nombre de réticulocytes et du taux d'EPO plasmatique (x 5). Chez ces mutants

$GFAPcre+VHL^{f/f}$, l'augmentation des transcrits d'EPO atteint 2 000 fois le taux normal dans les astrocytes, alors que la sécrétion rénale d'EPO est effondrée, témoignant d'un rétrocontrôle négatif fonctionnel qui confirme la responsabilité de l'EPO astrocytaire dans les altérations systémiques observées. Curieusement la synthèse hépatique d'EPO persiste. Le croisement de ces souris avec des animaux *knock-out* pour les gènes *hif-α* a permis d'incriminer HIF-2 dont la délétion rétablit un hémato-crite et une survie normale chez les souris $GFAPcre+VHL^{f/f}$ alors que celle de *HIF-1* semble plutôt aggraver le phénotype. En même temps qu'elle induit la production d'EPO, la délétion de *Vhl* stimule aussi la production du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) qui est une cible de VHL [12]. Toutefois, la délétion de *vegf*, si elle réduit les conséquences non hématologiques du phénotype mutant $GFAPcre+VHL^{f/f}$, n'en corrige pas les altérations hématologiques.

L'EPO astrocytaire s'élève rapidement chez des souris normales exposées à une atmosphère hypoxique, et la délétion de *hif-2* dans les astrocytes minimise cette réponse qui est complètement abolie chez les doubles mutants *hif-1* et *hif-2*. Curieusement, en l'absence de HIF-2 astrocytaire, les taux d'EPO

plasmatiques restent bas dans ces premières heures, indiquant que ni le rein ni le foie ne compensent cette diminution d'EPO astrocytaire. Logiquement, l'augmentation du nombre d'érythroblastes médullaires et donc de réticulocytes est moindre chez les souris *GFAPcre+HIF-2^{f/+f}*. Ces mêmes défauts sont observés chez ces animaux *GFAPcre+HIF^{f/+f}* après une saignée, autre stimulus puissant de la synthèse d'EPO rénale. Mais dans les deux cas, une correction intervient au-delà de 72 heures. La normalisation tardive des paramètres suggère que l'EPO cérébrale est impliquée dans la réponse aiguë à l'hypoxie, et qu'elle précède la réponse rénale, comme un garde-fou préservant l'oxygénation du cerveau dans l'urgence. Il semble donc que le rôle de l'EPO du cerveau soit moins confidentiel qu'on ne le pense et contribue à la régulation systémique de la réponse à l'hypoxie. Il faut alors admettre que l'hormone traverse la barrière hémato-méningée [13]. Reste à comprendre pourquoi la réponse rénale ne pourrait intervenir aussi précocement que la réponse astrocytaire.

Conclusion

Ces deux articles montrent à l'évidence que l'explication simpliste de la production d'EPO quasi exclusive par le rein en réponse à une baisse de la teneur en oxygène du sang doit évoluer. La production astrocytaire d'EPO s'avère être un élément essentiel à la préservation de l'oxygénation cérébrale face au danger d'une hypoxie aiguë,

et les réactions du tonus vasculaire, souvent immédiates dans un organe très exposé comme la peau, s'avèrent être des acteurs incontournables qui modulent l'apport de sang aux organes synthétisant l'EPO.

Mais le plus grand mérite de Randall Johnson est peut-être d'avoir donné une explication moléculaire aux très anciennes observations de nos collègues français... P. Carnot et C. Deflandre proposaient en 1906 l'idée d'une « hémopoïétine » cérébrale ; C. Durand observait en 1969 une vasoconstriction cutanée chez les voyageurs séjournant en haute altitude, réaction que ne provoquait pas l'inhalation seule d'une atmosphère hypoxique ; d'autres auteurs encore induisaient une érythropoïèse après stimulation cérébrale chez le chat, ou la constataient chez un patient ayant une occlusion d'une artère cérébrale. ♦

How skin and astrocytes influence the organism systemic erythropoietin response to hypoxia

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Nathalie Mazure (CNRS, UMR 6543, Université de Nice) pour la relecture critique de ce texte.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Semenza GL. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood* 2009 ; 114 : 2015-9.
2. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1. *Cell Death Differ* 2008 ; 15 : 621-7.
3. Semenza GL. O2-regulated gene expression : transcriptional control of cardiorespiratory physiology. *J Appl Physiol* 2004 ; 96 : 1173-7.
4. Chavez JC, Baranova O, Lin J, Pichiule P. The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocyte. *J Neurosci* 2006 ; 26 : 9471-81.
5. Boutin AT, Weidemann A, Fu Z, et al. Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell* 2008 ; 133 : 223-34.
6. Weidemann A, Kerdiles YM, Knaup KX, et al. The glial cell response is an essential component of hypoxia-induced erythropoiesis in mice. *J Clin Invest* 2009 ; 119 : 3373-8.
7. Minson CT. Hypoxic regulation of blood flow in humans. Skin blood flow and temperature regulation. *Adv Exp Med Biol* 2003 ; 543 : 249-62.
8. Rankin EB, Biju MP, Unger TL, et al. Hypoxia-inducible factor 2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest* 2007 ; 117 : 1068-77.
9. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL. The role of K⁺ channels in determining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation, and apoptosis: implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension. *Microcirculation* 2006 ; 13 : 615-32.
10. Weidemann A, Johnson RS. Nonrenal regulation of EPO synthesis. *Kidney Int* 2009 ; 75 : 682-8.
11. Dame C, Juul SE, Christensen RD. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* 2001 ; 79 : 228-35.
12. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999 ; 126 : 1149-59.
13. Banks WA, Jumble NL, Farrell CL, et al. Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier : a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darpoetin alfa. *Eur J Pharmacol* 2004 ; 505 : 93-101.