

L'érythropoïétine

L'érythropoïétine (Epo) stimule à la fois la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices érythropoïétiques. Produite principalement dans le rein et le foie, sa synthèse est induite par l'hypoxie tissulaire. En *cis* du gène codant pour l'Epo, des séquences géniques déterminent la spécificité tissulaire de sa production. Une courte séquence d'ADN en 3' du gène joue un rôle d'amplificateur de la transcription lorsqu'elle lie le facteur HIF-1 (*hypoxia-induced factor*). Ce facteur ubiquitaire stimule, dans les conditions d'hypoxie, la transcription d'autres gènes dans des cellules ne produisant pas l'Epo. Le récepteur de l'Epo appartient à la superfamille des récepteurs des cytokines. La transmission intracellulaire du signal relayé par ce récepteur emprunte les voies de la PI 3-kinase et de Ras/MAPkinase. Certaines polyglobulies secondaires sont liées à une production aberrante d'Epo par des cellules tumorales tandis que les polyglobulies primitives et certaines érythrocytoses familiales résultent d'une hypersensibilité du récepteur. Dès son apparition sur le marché, l'Epo recombinante est devenue le traitement de choix de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique terminale et préterminale. L'utilisation de cette cytokine pour d'autres indications est actuellement envisagée. La thérapie génique par l'Epo est en cours d'étude.

Catherine Lacombe
Patrick Mayeux

L'hématopoïèse est un phénomène complexe, contrôlé positivement et négativement par des glycoprotéines appartenant à la famille des cytokines dont on découvre de nouveaux membres chaque année. Parmi ces cytokines, l'érythropoïétine (Epo) fait figure de pionnier puisque son rôle dans la régulation de l'érythropoïèse a été suggéré dès 1906. L'Epo contrôle la production des globules rouges dans l'organisme. Il existe une régulation très étroite et très stricte entre la quantité d'oxygène délivrée aux tissus, la concentration d'Epo sérique et le nombre de globules rouges cir-

culants: en cas d'hypoxie, la synthèse d'Epo augmente ainsi que la production d'érythrocytes et, inversement, la production d'Epo diminue ainsi que le nombre de globules rouges en cas d'hyperoxygénation tissulaire. Le clonage moléculaire du gène de l'Epo a été réalisé en 1985 et les premiers essais thérapeutiques de la molécule recombinante dans les anémies de l'insuffisance rénale ont débuté avec succès dès l'année suivante dans les pays anglo-saxons [1]. Depuis cette époque, de nombreux progrès ont été réalisés dans l'identification des sites et des cellules qui produisent l'Epo, dans la compréhension de la régulation génique par

ADRESSE

C. Lacombe: maître de conférence, praticien hospitalier. Laboratoire d'hématologie, hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, et Inserm U. 363.
P. Mayeux: chargé de recherche au Cnrs. Inserm U. 363, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

RÉFÉRENCES

1. Varet B, Casadevall N, Lacombe C. L'érythropoïétine. *médecine/sciences* 1988; 4: 366-72.
2. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Varet B, Tambourin P. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 1988; 81: 620-3.
3. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidney by *in situ* hybridization. *Blood* 1988; 71: 524-7.
4. Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC, Doe BG, Ferguson DJP, Johnson MH, Ratcliffe PJ. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* 1993; 44: 1149-62.
5. Maxwell PH, Ferguson DJP, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Doe BG, Johnson MH, Ratcliffe PJ. Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells. *Blood* 1994; 84: 23-1830.
6. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994; 269: 19488-93.
7. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988; 242: 1412-5.
8. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia *via de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 5447-54.
9. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2423-7.
10. Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6496-500.
11. Semenza GL, Koury ST, Nejfelt MK, Gearhart JD, Antonarakis SE. Cell-type-specific and hypoxia-inducibility expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8725-9.

l'hypoxie, ainsi que dans l'analyse des relations structure-fonctions de la molécule. Parallèlement, le récepteur de l'Epo a été cloné et l'étude de la transduction du signal induite par l'Epo fait actuellement l'objet de nombreuses publications; cependant, le mode d'action de cette hormone n'est pas encore parfaitement élucidé. Cet article tentera de faire le point sur les connaissances récentes concernant l'Epo, son récepteur et certains aspects thérapeutiques.

Sites de production et cellules responsables de la synthèse d'Epo

On sait depuis bien longtemps que l'hypoxie est le *stimulus* qui déclenche la production d'Epo au niveau des organes producteurs: rein et foie essentiellement. Les cellules produisant l'Epo dans le rein ont été identifiées en 1988 comme une sous-population de cellules interstitielles périrubulaires situées dans le cortex rénal et la médullaire externe (*m/s n° 2, vol. 4, p. 128*) [1-3]. Toutefois, certains auteurs ont décrit une production d'Epo par les cellules tubulaires proximales. Depuis, de nombreux protocoles expérimentaux ont été développés pour tenter de mieux caractériser et d'isoler ces cellules. En particulier, le groupe de Raftcliffe en Angleterre a établi des souris transgéniques pour un gène d'Epo murine fusionné à l'antigène T de SV40, et contenant les séquences régulatrices situées de part et d'autre du gène de l'Epo sur lesquelles nous reviendrons. Le but était double: suivre l'expression de l'antigène marqueur T de SV40 (Ag T) et son éventuelle régulation par l'hypoxie, obtenir des tumeurs et établir des lignées productrices d'Epo selon le procédé d'oncogenèse ciblée. Cette approche a montré l'existence dans le cortex rénal de cellules périrubulaires positives pour l'antigène T de SV40, présentes également dans la médullaire externe après induction par l'hypoxie. Ces cellules sont positives pour une enzyme, la 5'-nucléotidase (5'NT), marqueur d'une sous-population de cellules interstitielles du rein ou fibroblastes de type I [4]. Ainsi, il semble qu'au niveau du rein, la synthèse d'Epo soit réalisée par

une population spécialisée de cellules interstitielles fibroblastiques. Il est, par ailleurs, intéressant de noter que la tentative d'oncogenèse ciblée avec l'antigène T de SV40 n'a abouti ni à la formation de tumeurs rénales, ni à l'établissement *in vitro* de lignées cellulaires produisant de l'Epo. Une explication proposée par les auteurs serait la stricte régulation du transgène *in vivo* par l'hypoxie qui préviendrait une forte expression cellulaire de l'antigène T et, par conséquent, la tumorigénèse.

L'identification des cellules synthétisant l'Epo dans le foie a été plus difficile en raison de la plus faible quantité d'Epo produite par cet organe. Deux populations cellulaires distinctes semblent sécréter l'hormone: les cellules majoritaires sont des hépatocytes distribués autour des veines centro-lobulaires du foie; il existe également un contingent plus faible de cellules interstitielles positives en hybridation *in situ* pour la synthèse d'ARN messager d'Epo. Récemment, ces cellules interstitielles hépatiques ont été identifiées: il s'agit des cellules de Ito, situées en position périsinusoïdale dans les espaces de Disse [5]. Il existe des analogies entre les cellules de Ito du foie et les cellules rénales fibroblastiques de l'interstitium: leur situation anatomique en contact étroit avec les hépatocytes ou les cellules tubulaires rénales, leur positivité pour la desmine et pour le marqueur 5' NT, dont l'expression augmente également en réponse à l'hypoxie.

Autres sites de production de l'Epo

De l'ARN messager d'Epo a été détecté par test de protection à la RNase chez le rat très hypoxique au niveau des testicules, de la rate et enfin du cerveau. La signification physiologique de ces résultats est inconnue, les quantités d'Epo produites sont négligeables en comparaison des contributions rénale et hépatique et il est clair que l'hématocrite ne peut jamais être maintenu à son taux normal en l'absence de rein. Par ailleurs, l'Epo produite dans le cerveau ne passerait pas dans la circulation à cause de la barrière hémato-encéphalique, et devrait donc avoir un rôle local. Cette production locale d'Epo dans le cerveau vient d'être confirmée par une équipe japonaise [6]: ce sont les as-

trocytes qui sécrètent l'hormone ; cette production cérébrale d'Epo est aussi stimulée par l'hypoxie.

Régulation de l'expression du gène de l'Epo

Bases moléculaires de la régulation du gène par l'hypoxie

L'hypoxie induit la transcription du gène de l'Epo dans un délai de deux heures, puis la sécrétion immédiate de la protéine nouvellement synthétisée. En effet, il n'y a pas de réserve intracellulaire d'Epo préexistante. Aucune lignée de cellules rénales ne produit de l'Epo mais des lignées cellulaires humaines dérivées d'hépatomes, comme Hep3B et HepG2, sécrètent de l'Epo. Ces cellules sont capables de détecter les variations d'oxygène et d'augmenter leur production d'Epo en réponse à l'hypoxie ; elles constituent donc un excellent modèle pour étudier les mécanismes de régulation du gène de l'Epo.

Il existe au niveau des cellules productrices d'Epo, ou dans leur environnement immédiat, un système permettant de déceler les variations d'oxygène (*oxygen sensor*). En 1988, un modèle de régulation de l'expression du gène de l'Epo a été proposé par Goldberg *et al.* [7]. Selon les auteurs, cette régulation mettrait en jeu une protéine renfermant un groupement prosthétique héminique (*m/s n°4, vol. 5, p. 262*). Lorsque la concentration tissulaire en oxygène est élevée, cette protéine héminique adopterait une conformation « oxy », inactive. La diminution de la concentration d'oxygène la ferait passer à une conformation « désoxy » active. Cette hypothèse très séduisante n'a été ni confirmée ni infirmée car aucune protéine transactivatrice du gène de l'Epo n'a encore été ni isolée ni clonée.

L'étude des séquences géniques promotrices et/ou amplificatrices qui confèrent une réponse, aussi bien à l'hypoxie qu'au chlorure de cobalt, a été entreprise par divers groupes ; des sites consensus de réponse aux hormones thyroïdiennes ont été décrits en 5' et 3' du gène. Ces sites pourraient rendre compte de l'action de ces hormones sur la production d'Epo en réponse à l'hypoxie. Mais

l'avancée majeure dans ce domaine a été la mise en évidence par plusieurs équipes d'une courte séquence d'ADN de 50 nucléotides, située en 3' du gène immédiatement après le site de polyadénylation et ayant un rôle d'amplification de la transcription durant l'hypoxie. Cette région amplificatrice multiplie par 20 la transcription du gène de l'Epo dans des cellules Hép 3B cultivées sous une atmosphère contenant 1% d'oxygène. Semenza décrit l'année suivante un facteur HIF-1 pour *hypoxia-induced factor*, synthétisé lors de l'hypoxie ou d'une stimulation par le chlorure de cobalt, et qui se fixe spécifiquement sur ce *enhancer* [8]. Le clonage du gène codant pour cette protéine n'est pas encore réalisé, mais on pense que son poids moléculaire serait voisin de 120 kDa. De façon intéressante, cette protéine HIF-1 est en réalité présente et inducible par l'hypoxie dans toutes les cellules de mammifères et pas seulement dans les cellules productrices d'Epo [9]. D'une part, cela implique que, outre la transactivation par la protéine HIF-1, la production d'Epo nécessite d'autres mécanismes assurant la spécificité tissulaire restreinte de l'expression du gène ; d'autre part, la protéine HIF-1, ubiquitaire, pourrait transactiver d'autres gènes cellulaires également réglables par l'hypoxie. Il vient d'être publié, en effet, que deux autres gènes, celui de la phosphoglycérate kinase I et celui de la lactate déshydrogénase A, sont activés par l'hypoxie et possèdent des séquences de fixation pour HIF-1 situées dans les régions promotrices de ces deux gènes, et non dans les régions *enhancer* en 3' comme pour l'Epo [10]. Les mécanismes de réponse à l'hypoxie semblent donc être assez ubiquitaires et pourraient être impliqués dans la régulation de nombreux gènes ; en ce qui concerne l'expression du gène de l'Epo, l'isolement et le clonage d'HIF-1 sont maintenant nécessaires pour savoir si HIF-1 correspond bien à l'entité décrite comme l'*oxygen sensor*.

Séquences géniques en cis déterminant la spécificité tissulaire de la production d'Epo

Bien longtemps avant le clonage du gène, le site de production essentiel de l'Epo avait été localisé dans le rein

de l'animal adulte ; le foie fœtal et le foie adulte sont aussi capables de synthétiser la protéine, comme nous l'avons vu. Pour étudier les mécanismes déterminant la spécificité tissulaire d'expression du gène de l'Epo, des souris transgéniques ont été établies avec des transgènes humains d'Epo comportant des longueurs variables de séquences flanquantes en 3' et 5' du gène. Ces souris exprimaient le transgène dans des organes différents selon les constructions, et étaient plus ou moins polyglobuliques en fonction des organes producteurs. Trois séquences d'ADN gouvernant l'expression tissulaire du gène de l'Epo ont été ainsi déterminées : une région de 6 kb située en 5' du gène de l'Epo (NRE : *negative regulatory element*) inhibe l'expression ubiquitaire non spécifique du gène de l'Epo. L'expression hépatique du gène nécessite une région de 0,4 kb (LIE : *liver inducibility element*) située immédiatement en 5' du gène alors que l'expression rénale requiert une région de 8 kb située de -14 à -6 kb en 5' du gène (KIE : *kidney inducibility element*). De plus, une région de 0,7 kb située en 3' est nécessaire à la régulation par l'hypoxie [11] (*figure 1*).

Il semble donc qu'une longue séquence régulatrice d'ADN située à plus de 6 kb en 5' du site d'initiation du gène soit indispensable pour l'expression rénale du gène de l'Epo. Par ailleurs, la région *enhancer* 3' contenant le site de fixation de HIF-1 conditionne la régulation par l'hypoxie. De façon surprenante, un article récent [12] localise la production d'Epo dans les cellules tubulaires rénales en utilisant un modèle de souris transgéniques ne contenant aucune de ces deux séquences régulatrices du gène de l'Epo.

Relations structure-fonction

La plupart des facteurs de croissance hématopoïétiques semblent avoir une structure tridimensionnelle similaire faite de quatre hélices α antiparallèles, bien que ces protéines ne soient pas analogues au niveau de leur séquence en acides aminés (*figure 2*). Ces cytokines se lient à des récepteurs spécifiques qui présentent également de nombreuses analogies

RÉFÉRENCES

12. Loya F, Yang Y, Lin H, Golwasser E, Albitar M. Transgenic mice carrying the erythropoietin gene promoter linked to *lacZ* express the reporter in proximal convoluted tubule cells after hypoxia. *Blood* 1994; 84: 1831-6.
13. Wendling F, Tambourin P. La superfamille des récepteurs de cytokines et l'oncogène *v-mpl*. *médecine/sciences* 1991; 7: 569-77.
14. Dusanter-Fourt I, Mayeux P, Gisselbrecht S. Transduction of the signal par les récepteurs de cytokines. *médecine/sciences* 1994; 10: 825-35.
15. Boissel JP, Lee WR, Presnell SR, Cohen FE, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a model of tertiary structure. *J Biol Chem* 1993; 268: 15983-93.
16. Wen D, Boissel JP, Tracy TE, Gruninger RH, Mulcahy LS, Czelusniak J, Goodman M, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. *Blood* 1993; 82: 1507-16.
17. Wen D, Boissel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships: identification of functionally important domains. *J Biol Chem* 1994; 269: 22839-46.
18. D'Andrea AD, Zon LI. Erythropoietin receptor: subunit structure and activation. *J Clin Invest* 1990; 86: 681-7.
19. Wendling F, Debili N, Methia N, Titeux M, Vainchenker W. Le gène codant pour la thrombopoïétine est cloné. *médecine/sciences* 1994; 10: 874-6.
20. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ, Oles KJ, Hultgren B, Solberg Jr LA, Goeddel DV, Eaton DL. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994; 369: 533-8.
21. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3974-8.
22. Heberlein C, Fischer KD, Stoffel M, Nowock J, Ford A, Tessmer U, Stocking C. The gene for erythropoietin receptor is expressed in multipotential hematopoietic and embryonic stem cells: evidence for differentiation stage-specific regulation. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 1815-26.

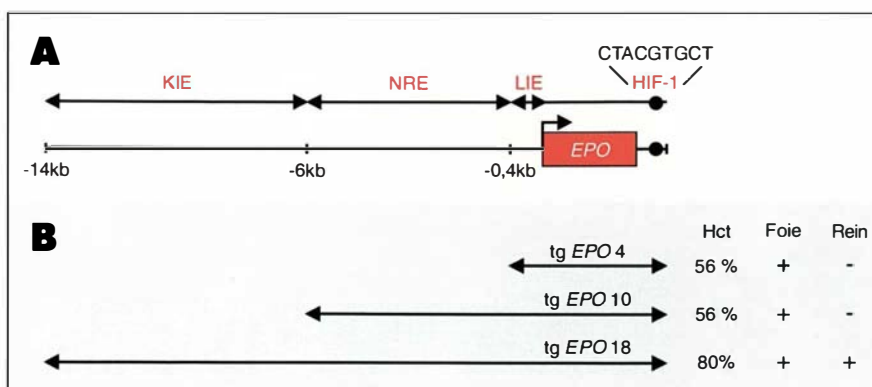


Figure 1. Régulation du gène de l'Epo. A. Séquences d'ADN génomique importantes pour l'expression spécifique du gène dans le rein (KIE: kidney inducibility element), dans le foie (LIE: liver inducibility element), et la séquence qui inhibe l'expression du gène dans les autres organes (NRE: negative regulatory element). La séquence consensus de fixation de la protéine HIF-1 (hypoxia-induced factor) localisée en 3' du gène est aussi indiquée. B. Différents transgènes micro-injectés aux souris: hématocrite de ces animaux et expression du transgène dans le foie et le rein [25].

structurales et appartiennent à la « superfamille des récepteurs des hématopoïétines » [13, 14]. La cristallisation de l'Epo n'a pas encore pu être obtenue, probablement à cause de l'importance de la partie glucidique de la molécule (39 %) et de l'hétérogénéité de ces chaînes glucidiques. Cependant, un modèle de structure tertiaire a été établi [15]. Selon ce modèle, l'Epo adopterait la même structure que les autres cytokines. La structure en quatre hélices antiparallèles est stabilisée par un pont disulfure reliant les extrémités amino- et carboxy-terminales de la molécule. Comme nous l'avons déjà mentionné [1], il n'y a pas de spécificité d'espèce dans l'activité biologique de l'Epo chez les mammifères. Le degré de similitude de la protéine est en effet de 82 % à 91 % selon les espèces; il existe, en particulier, une conservation du pont disulfure liant les extrémités amino- et carboxy-terminales, des sites de N-glycosylation et des régions correspondant aux hélices α [16]. En revanche, le facteur stimulant l'érythropoïèse chez les oiseaux est vraisemblablement de structure assez différente puisque les tentatives de clonage de cette molécule par hybridation avec le gène de l'Epo de mammifère ont toutes échoué. Le modèle de structure tertiaire a été vérifié par Boissel *et al.*, à l'aide de mutations dans les régions impor-

tantes de la molécule [15]. Les quatre hélices présomptives et un seul pont disulfure (cystéines 7 à 161) sont indispensables pour l'activité biologique, les régions amino- et carboxy-terminales peuvent être modifiées sans perte de cette activité. Des mutations ponctuelles ont été réalisées dans les régions correspondant aux hélices dans le but de déterminer les zones d'interaction avec le récepteur. Un petit nombre d'acides aminés, Arg14, Arg103, Ser104 et Gly151, sont essentiels à l'activité biologique de la molécule [17]. Ces résultats permettent de situer deux domaines fonctionnels distincts de l'Epo qui représenteraient les zones de fixation du récepteur (figure 2), modèle très semblable à celui obtenu pour d'autres cytokines. Ces travaux ont également pour but de créer une protéine à activité biologique augmentée qui serait plus efficace en thérapeutique.

Le récepteur de l'Epo

Expression

Les cellules répondent à l'Epo par l'intermédiaire de récepteurs de surface spécifiques. Les progéniteurs érythroïdes sont les cibles principales, les récepteurs étant présents sur un continuum de cellules allant des BFU-E mûres aux érythroblastes, avec un maximum sur les CFU-E et

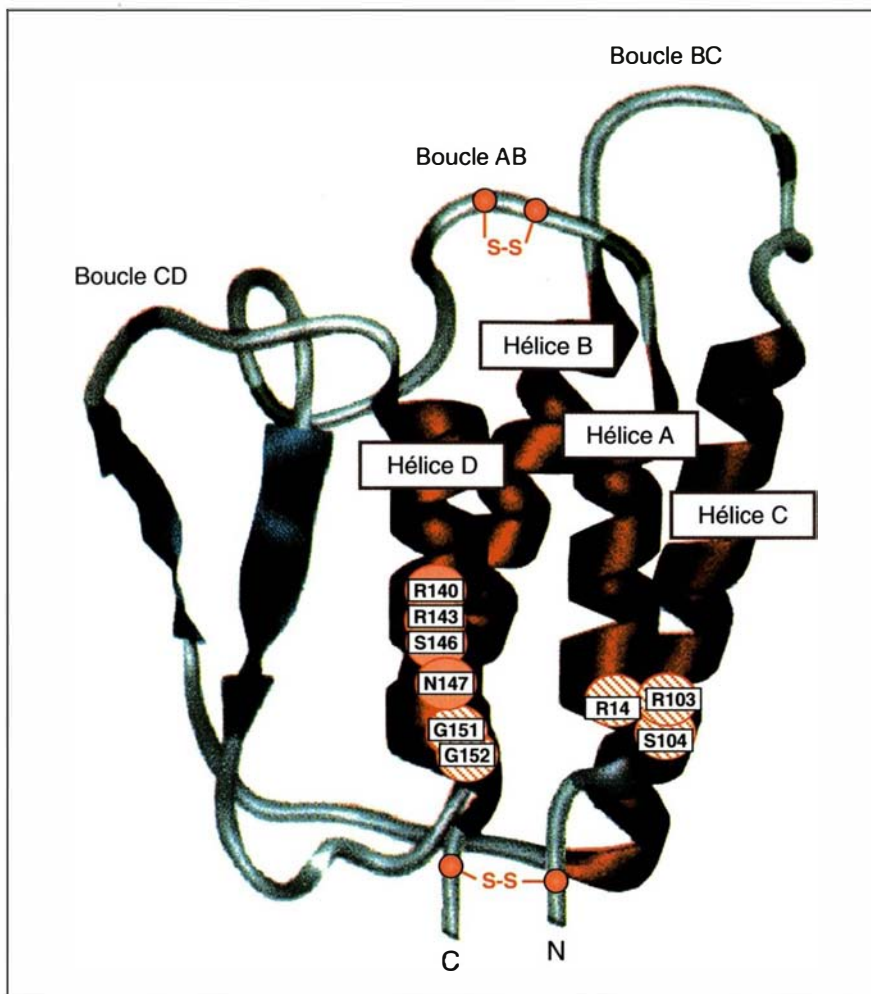


Figure 2. **Modèle de structure tridimensionnelle de l'Epo montrant les quatre hélices et les boucles de raccordement.** Les domaines fonctionnels importants pour l'interaction avec le récepteur sont représentés par les zones hachurées. (D'après [30].)

les proérythroblastes. Il existe des lignées érythroïdes humaines et murines établies en culture continue *in vitro* qui expriment à leur surface des récepteurs de l'Epo (Epo-R) et qui sont des modèles expérimentaux précieux car d'utilisation facile; parmi ces lignées, certaines dépendent d'Epo pour leur prolifération et/ou leur différenciation, leurs récepteurs de surface sont donc fonctionnels; tandis que d'autres lignées, dérivées d'érythroleucémies murines en particulier, ne répondent pas à l'hormone. Une revue détaille les types cellulaires ayant des Epo-R à leur surface [18].

Des Epo-R ont été décrits à la surface

des mégacaryocytes; cela n'est pas surprenant puisque l'Epo joue un rôle *in vitro* dans la croissance des colonies dérivées des CFU-MK et qu'on a décrit plusieurs lignées continues établies *in vitro* exprimant à la fois les deux phénotypes érythrocytaire et mégacaryocytaire; cela suggère qu'il existe très probablement un progéniteur bipotent commun aux deux lignées. Le débat est relancé depuis le clonage de la thrombopoïétine (TPO) [19] qui s'avère être le ligand du proto-oncogène c-Mpl appartenant à la famille des récepteurs de cytokines (*m/s n° 1, vol. 10, p. 114*). La thrombopoïétine est une protéine de 353 acides aminés dont la partie N-

terminale présente plus de 25% de similitude avec l'Epo, et une protéine tronquée ne contenant que cette partie homologe entre les deux cytokines est parfaitement active [20]. Ces communautés structurales entre Epo et TPO font supposer que certains relais en aval (chaîne accessoire d'un récepteur ou molécule de transduction du signal) pourraient être communs aux deux lignées.

Des Epo-R ont été mis en évidence sur le placenta de rat et de souris, ils pourraient jouer un rôle dans le transport de l'Epo au fœtus; les placentas humain et de mouton en sont, en revanche, dépourvus. La présence d'Epo-R sur les cellules endothéliales des veines ombilicales humaines vient d'être confirmée [21]; ce récepteur est aussi exprimé dans les cellules souches embryonnaires, cellules ES, qui sont des cellules pluripotentes encore non différenciées [22]. Enfin, il a été rapporté récemment que des cellules d'origine neuronale comme PC12 et SN6 possédaient des Epo-R d'affinité cent fois plus faible que celle des Epo-R exprimés sur les cellules érythroïdes [23]. Nous reviendrons sur ces récepteurs à localisation non érythroïde dans le chapitre consacré au mode d'action de l'Epo.

Une caractéristique commune à ces récepteurs de facteurs de croissance hématopoïétiques est qu'ils sont présents en petit nombre à la surface des cellules cibles (de 1000 habituellement à 10000 au maximum). En 1989, une chaîne de l'Epo-R de souris a été clonée par D'Andrea [24]; il s'agit d'une protéine de 66 kDa, de type I passant une fois la membrane, fixant l'Epo et appartenant à la famille des récepteurs de cytokines déjà décrite [13, 14]. L'ADNc murin a permis de cloner l'ADNc humain et le gène humain.

Structure

Certaines données expérimentales suggèrent que le récepteur natif situé à la surface des progéniteurs érythroïdes est un complexe multimérique et que, outre la chaîne clonée de l'Epo-R de 66 kDa, il existe des chaînes accessoires donnant au complexe hormone-récepteur une masse moléculaire d'environ 330 kDa [25]. Ces résultats sont confirmés par des expériences de pontage chimique à

RÉFÉRENCES

23. Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F Jr, Tabira T, Sasaki R. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics: comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 11208-16.
24. D'Andrea AD, Lodish HF, Wong GG. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 1989; 57: 277-85.
25. Mayeux P, Casadevall N, Lacombe C, Muller O, Tambourin P. Solubilization and hydrodynamic characteristics of the erythropoietin receptor. Evidence for a multimeric complex. *Eur J Biochem* 1990; 194: 271-8.
26. Mayeux P, Lacombe C, Casadevall N, Chrétien S, Dusanter I, Gisselbrecht S. Structure of the murine erythropoietin receptor complex: characterization of the erythropoietin cross-linked proteins. *J Biol Chem* 1991; 266: 23380-5.
27. Watowich SS, Yoshimura A, Longmore GD, Hilton DJ, Yoshimura Y, Lodish HF. Homodimerisation and constitutive activation of the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2140-4.
28. Chiba T, Nagata Y, Machida M, Kishi A, Anamuna H, Sugiyama M, Todokoro K. Tyrosine kinase activation through the extracellular domain of cytokine receptors. *Nature* 1993; 362: 646-8.
29. Dusanter-Fourt I, Casadevall N, Lacombe C, Muller O, Billat C, Fischer S, Mayeux P. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of its own receptor in human erythropoietin-responsive cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 10670-5.
30. Zhuang H, Patel SV, He T, Sonstebly SK, Niu Z, Wojchowski DM. Inhibition of erythropoietin-induced mitogenesis by a kinase-deficient form of Jak2. *J Biol Chem* 1994; 269: 21411-4.
31. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 1990; 248: 378-81.
32. Miura O, D'Andrea AD, Kabat D, Ihle JN. Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4895-902.
33. Means RT Jr, Krantz SB. Inhibition of human erythroid colony-forming units by tumor necrosis factor requires beta interferon. *J Clin Invest* 1993; 91: 416-9.

la surface de cellules érythroïdes entre de l'¹²⁵I-Epo et le récepteur, et qui montrent la présence de trois protéines de 66, 85 et 100 kDa. L'identification de ces différentes protéines est encore l'objet de nombreuses études. Il paraît clair à l'heure actuelle que la p66 correspond à la chaîne clonée de l'Epo-R, que les chaînes p100 et p85 qui pourraient dériver l'une de l'autre ne correspondent pas à une forme hyperglycosylée de p66, et ne sont pas reconnues par un anticorps dirigé contre la chaîne clonée [26]. Ces deux chaînes accessoires de 85 et 100 kDa sont présentes sur tous les progéniteurs érythroïdes, mais leur clonage s'avère très difficile car ces protéines ne fixent pas l'Epo.

Il est actuellement admis que certains récepteurs de cytokines, comme le récepteur du G-CSF et celui de l'hormone de croissance, sont biologiquement actifs sous la forme d'homodimères; il semble que la p66 de l'Epo-R se dimérise également. En effet, une mutation ponctuelle (Arg129 → Cys) dans la partie extracellulaire du récepteur provoque sa dimérisation par la création d'un pont disulfure interchaîne et entraîne son activation constitutive en l'absence de ligand [27]. En fait, il semble que la structure mutimérique des récepteurs de cytokines puisse être plus complexe que cela avait d'abord été supposé. Ainsi, le récepteur de l'IL-6 est un hexamère, formé de deux molécules d'IL-6, de deux molécules de récepteur de l'IL-6 et de deux molécules de gp130. Par analogie, le récepteur de l'Epo pourrait être constitué d'un dimère de p66 associé à une molécule de p85 et une molécule de p100. La constatation faite par une équipe japonaise que les domaines extracellulaires des récepteurs déterminent les relais intracellulaires de transduction du signal [28] renforce encore l'hypothèse de l'intervention d'une ou plusieurs autres chaînes.

Activités biologiques de l'Epo

Les différentes tyrosine kinases et les autres relais intracellulaires activés par les récepteurs de cytokines, dont celui de l'Epo, ont été décrits récemment dans cette revue [14]. Bien que l'Epo-R ne possède pas d'activité ty-

rosine kinase intrinsèque, sa stimulation dans les cellules hématopoïétiques s'accompagne de sa propre phosphorylation ainsi que de celle d'autres protéines cytoplasmiques [29]. La tyrosine kinase Jak2 s'associe à la région cytoplasmique juxtamembranaire de l'Epo-R. Son activation est indispensable pour la prolifération cellulaire induite par l'Epo [30]. Une région plus distale du récepteur est impliquée dans la fixation de la PI-3 kinase. La voie Ras/MAP kinase est également activée par l'Epo. La tyrosine phosphatase PTP1C serait associée à la région C-terminale de l'Epo-R après fixation de l'Epo et pourrait être responsable de l'inactivation secondaire du récepteur.

Les relais intracellulaires activés par l'Epo commencent donc à être mieux connus mais la régulation par l'Epo des flux de progéniteurs érythroïdes demeure cependant mal comprise. En 1990, Koury et Bondurant ont proposé un contrôle de la production des érythrocytes par l'Epo circulante où la cytokine agirait uniquement en inhibant l'apoptose des progéniteurs présents, leur permettant ainsi de s'engager vers une différenciation érythroïde [31]. Cependant, l'Epo semble également inductrice de la prolifération cellulaire et de la différenciation érythroïde; de nombreux modèles expérimentaux sont actuellement étudiés pour analyser les domaines du récepteur et les voies de transduction du signal qui contrôlent le couple prolifération-différenciation. La transmission d'un signal de prolifération sous l'action de l'Epo a été étudiée dans les cellules lymphoblastoïdes Ba/F3 ou dans des cellules comme 32D ou DA1 qui sont dépendantes de l'IL-3 et capables de répondre à l'Epo après transfection de la chaîne clonée (p66) de l'Epo-R. Dans ces différents modèles cellulaires, il apparaît que l'intégrité du domaine cytoplasmique juxtamembranaire est indispensable pour la prolifération cellulaire; en revanche, ni la région carboxy-terminale du récepteur, ni les différentes tyrosines qui assurent la phosphorylation de ce récepteur ne semblent indispensables pour la prolifération [32]. L'étude du signal de différenciation induit par l'Epo est plus difficile à réaliser et devra envisager des manipulations de l'Epo-R dans les

cellules érythroïdes, cibles spécifiques et physiologiques de l'Epo.

Le mode d'action de l'Epo s'élargit et devient pléiotrope : en effet, comme nous l'avons vu, les messagers de l'Epo et de son récepteur ont été mis en évidence par RT-PCR dans les cellules ES, dans les embryons de souris et également dans le cerveau. Il a été montré que l'Epo, ainsi que d'autres cytokines hématopoïétiques, avaient un effet trophique sur les neurones cholinergiques *in vivo* et *in vitro*; les facteurs hématopoïétiques ont donc peut-être aussi un rôle neurotrophique. Rappelons que le récepteur du facteur neurotrophique ciliaire ou CNTF fait partie de la famille des récepteurs de cytokines.

Pathologie de l'Epo et de son récepteur

L'Epo et/ou son récepteur sont directement impliqués dans certains désordres de l'érythropoïèse.

Anémies

Tous les patients ayant une insuffisance rénale majeure étaient anémiques par défaut de production d'Epo jusqu'à la mise en place du traitement par la molécule recombinante (*m/s n°4, vol. 3, p. 244*). Dans les anémies associées à des infections chroniques, des maladies inflammatoires, des cancers, le taux d'Epo est en général moins élevé que dans des anémies par carence martiale de même degré; il a été montré qu'en effet certaines cytokines toujours présentes dans les syndromes inflammatoires comme l'IL-1 α , IL-1 β , le TNF α et le TGF β inhibaient la production d'Epo. En outre, le TNF et l'interféron β exercent aussi un effet inhibiteur direct sur les précurseurs érythroïdes [33].

Polyglobulies

A côté des polyglobulies secondaires, dans lesquelles le taux d'Epo est augmenté en réponse à l'hypoxie tissulaire comme c'est le cas dans les insuffisances cardiorespiratoires, il existe des polyglobulies associées à des tumeurs d'origine diverse. L'Epo est alors sécrétée par les cellules tumorales comme cela a été montré par des techniques d'hybridation *in situ* dans des adénocarcinomes du rein et également dans de rares cas d'hé-

mangioblastomes et de méningiomes (*m/s n°6-7, vol. 9, p. 817*) [34, 35]. Ces cellules tumorales ne sont pas celles qui produisent normalement la cytokine et cette production aberrante est mal comprise et semble liée au processus de tumorigénèse.

Dans la polyglobulie de Vaquez, les taux d'Epo sont bas, la prolifération anormale des progéniteurs érythroïdes est due à leur hypersensibilité aux facteurs de croissance hématopoïétiques. Les études faites jusqu'à présent n'ont pas décelé de mutations de la chaîne connue p66 du récepteur de l'Epo, ce qui n'exclut pas l'existence d'anomalies au niveau des chaînes accessoires du récepteur ou de protéines en aval qui participent à la transmission du signal.

Récemment, une érythrocytose familiale à caractère dominant a été décrite en Finlande, dans laquelle tous les sujets atteints présentaient une mutation ponctuelle de l'Epo-R conduisant à l'élimination des 70 acides aminés C-terminaux de ce récepteur et à son hypersensibilité à l'Epo. Un des membres de cette famille, dont le taux d'hémoglobine oscillait entre 200 et 236 g/l, est triple champion olympique de ski de fond [36].

Érythroleucémies

La mutation en cystéine de l'arginine 129 située dans la région extracellulaire du récepteur de l'Epo entraîne une activation du récepteur en l'absence de ligand. Cette forme constitutivement activée du récepteur est capable de provoquer des érythroleucémies chez des souris sensibles [37]. Des réarrangements du gène de l'Epo-R entraînant sa surexpression ont aussi été mis en évidence dans des lignées érythroleucémiques murines et humaines [38]. Toutefois, cette surexpression du récepteur n'a pas été retrouvée dans des érythroleucémies *de novo* et son rôle oncogénique reste à établir. Enfin, la prolifération de certaines cellules érythroleucémiques pourrait mettre en jeu un processus autocrine de production d'Epo [39].

Traitement par l'Epo

Rapidement après le clonage du gène, l'Epo a été utilisée sous forme de protéine recombinante en thérapeutique. La production d'Epo étant

essentiellement d'origine rénale, la première indication fut en toute logique le traitement de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique terminale et préterminale (*m/s n°4, vol. 3, p. 244*) [40]. Cette thérapeutique s'avéra très efficace à condition de l'associer à un traitement par le fer afin de restaurer un stock suffisant pour l'érythropoïèse; elle permit d'améliorer nettement la qualité de vie de ces patients. Ce traitement n'a jamais entraîné l'apparition d'anticorps dirigés contre l'Epo recombinante, et l'administration d'Epo en sous-cutané a ensuite permis de réduire les doses pour une efficacité comparable.

Les anémies associées à des «maladies chroniques» telles que rhumatisme inflammatoire, cancer, myélome pourraient bénéficier d'un traitement par l'Epo recombinante. Le taux d'Epo endogène mesuré dans ces situations est plus bas que chez des patients présentant une anémie équivalente due à une carence martiale. En effet, certaines cytokines inflammatoires comme l'IL1, le TNF α et l'interféron β sont présentes chez ces malades et agissent comme suppresseurs de la production d'Epo mais aussi de l'érythropoïèse. Dix-huit protocoles thérapeutiques conduits en double aveugle et contre un placebo ont montré l'intérêt du traitement par l'Epo pour la correction de l'anémie et la réduction des besoins transfusionnels chez 32% à 85% des patients; cette variation dans la réponse s'explique par les critères différents inclus dans les protocoles. Il faut noter que ce traitement n'a jamais stimulé, ni *in vitro* ni *in vivo*, la prolifération des cellules tumorales comme on aurait pu le craindre puisque une équipe japonaise avait mis en évidence la présence de récepteurs de l'Epo sur une lignée de cellules myélomateuses. Toutefois, une telle indication n'est pas actuellement reconnue par les autorités d'enregistrement.

Les anémies du SIDA peuvent aussi bénéficier de l'Epo recombinante avec d'autant plus de chances de succès (autour de 40%) que le taux d'Epo endogène est inférieur à 500 U/l. Dans les myélodysplasies, qui surviennent chez des sujets âgés et s'accompagnent de cytopénies importantes, l'essai de traitement par

RÉFÉRENCES

34. Da Silva JL, Lacombe C, Bruneval P, Casadevall N, Leporrier M, Camilleri JP, Bariéty J, Tambourin P, Varet B. Tumor cells are the site of erythropoietin synthesis in human renal cancers associated with polycythemia. *Blood* 1990; 75: 577-82.
35. Bruneval P, Sassy C, Mayeux P, Belair MF, Casadevall N, Roux FX, Varet B, Lacombe C. Erythropoietin synthesis by tumor cells in a case of meningioma associated with erythrocytosis. *Blood* 1993; 81: 1593-7.
36. De La Chapelle A, Traskelin AL, Juvenen E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4495-9.
37. Longmore GD, Lodish HF. An activating mutation in the murine erythropoietin receptor induces erythroleukemia in mice: a cytokine receptor superfamily oncogene. *Cell* 1991; 67: 1089-102.
38. Chrétien S, Moreau-Gachelin F, Apiou F, Courtois G, Mayeux P, Dutrillaux B, Cartron JP, Gisselbrecht S, Lacombe C. Putative oncogenic role of the erythropoietin receptor in murine and human erythroleukemia cells. *Blood* 1994; 83: 1813-21.
39. Mitjavila MT, Le Couedic JP, Casadevall N, Navarro S, Villeval JL, Dubart A, Vainchenker W. Autocrine stimulation by erythropoietin and autonomous growth of human erythroid leukemic cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1991; 88: 789-97.
40. Eschbach JW, Kelly MR, Haley NR, Abels RI, Adamson JW. Treatment of the anemia of progressive renal failure with recombinant human erythropoietin. *N Engl J Med* 1989; 321: 158-63.
41. Maier RF, Obladen M, Scigalla P, Linderkamp O, Duc G, Hieronimi G, Halliday HL, Versmold HT, Moriette G, Jorch G, Virellen G, Semmekrot BE, Grauel EL, Holland BM, Wardrop CAJ. The effect of Epoetin beta (recombinant human erythropoietin) on the need for transfusion in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med* 1994; 330: 1173-8.
42. Mercuriali F, Adamson JW. Recombinant human erythropoietin enhances blood donation for autologous use and reduces exposure to homologous blood during elective surgery. *Semin Hematol* 1993; 30: 17-21.
43. Naffakh N, Henri A, Villeval JL, Rouyer-Fessard P, Mouillier P, Danos O, Vainchenker W, Heard JM, Beuzard Y. Sustained delivery of erythropoietin in mice by genetically-modified skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3194-8.

l'Epo seule, en général à doses élevées, n'entraîne une stimulation érythroïde que chez 15 % à 20 % des patients, tandis que le taux de réponse s'élève à 42 % quand on associe l'Epo et le G-CSF. Chez les prématurés anémiques de moins de 1 500 g, un traitement par l'Epo dès les premiers jours après la naissance semble bien supporté et réduit de façon significative le recours aux transfusions (*m/s n° 10, vol. 3, p. 619*) [41].

En dehors des anémies, une indication intéressante pourrait être l'auto-transfusion. Les reprises d'interventions orthopédiques, en particulier, nécessitent un support transfusionnel important que les patients ne peuvent souvent fournir en transfusion autologue, car l'anémie provoquée par les quelques dons de sang ne suffit habituellement pas à augmenter efficacement le taux d'Epo endogène. Des études préliminaires montrent que l'administration d'Epo dans les programmes de transfusion autologue pourrait augmenter le nombre d'unités collectées et donc limiter le recours aux transfusions hétérologues avec les risques que cela comporte [42].

Une alternative au traitement par injections d'Epo recombinante pourrait être la thérapie génique par l'Epo (*m/s n° 3, vol. 11, p. 495*). C'est théoriquement réalisable puisque la reconstitution de souris irradiées avec des cellules médullaires infectées par une construction rétrovirale contenant l'ADNc de l'Epo entraîne, chez les animaux receveurs, une polyglobulie fatale en quelques mois, attestant de l'efficacité du système; en outre, aucune transformation maligne n'a été mise en évidence chez ces animaux. Cette thérapie génique par l'Epo pourrait être intéressante dans le traitement des maladies de l'hémoglobine comme la β -thalassémie et/ou la drépanocytose homozygotes où la stimulation de la synthèse d'hémoglobine fœtale peut compenser, au moins partiellement, l'insuffisance de production de chaînes de β -globine adulte. Des injections itératives d'Epo, associées à un traitement par l'hydroxyurée, se sont en effet avérées efficaces dans la drépanocytose. L'équipe de Beuzard (Inserm U. 99, Créteil, France) a donc testé cette approche de thérapie génique « indirecte » et montré qu'un rétrovi-

rus contenant l'Epo et exprimé dans les cellules hématopoïétiques de souris β -thalassémiques, était capable d'améliorer le syndrome thalassémique et, dans certains cas, de normaliser l'hématocrite. D'autres vecteurs comme les adénovirus, ou de nouveaux systèmes de transfert de gènes tels que les fibroblastes autologues génétiquement modifiés et implantés dans la cavité péritonéale de la souris peuvent également produire de l'Epo *in vivo* et pendant plusieurs mois [43].

L'avantage de cette méthode sur les injections d'Epo serait d'obtenir une correction à long terme et de réduire le coût du traitement. Le problème est cependant de régler les quantités d'Epo délivrées à l'organisme en fonction de l'anémie; dans ce but, les mécanismes de régulation de l'expression génique par l'hypoxie doivent être compris et seront peut-être secondairement utilisés pour moduler l'expression du gène. Ces nouvelles perspectives thérapeutiques sont bien entendu très attrayantes mais les applications en clinique humaine demanderont probablement l'adjonction de séquences régulatrices spécifiques du gène de l'Epo afin de contrôler plus finement ce traitement hormonal ■

TIRÉS À PART

C. Lacombe.

Summary

Erythropoietin

Erythropoiesis is regulated by erythropoietin (Epo), a glycoprotein hormone which promotes the proliferation and differentiation of erythroid progenitor cells. Epo production is tightly regulated by hypoxia; the amount of oxygen delivered by erythrocytes to the tissues determines the plasma Epo concentration, and in turn, the Epo concentration controls the rate of erythrocyte production. Epo is mainly produced in the kidney and in the liver in response to hypoxia. *In situ* hybridization studies suggest that in the kidney, Epo mRNA is localized in a subset of peritubular cells positive for ecto-5'-nucleotidase which is expressed on renal interstitial fibroblast-like cells. In the liver, Epo is produced in hepatocytes surrounding the hepatic veins, and in Ito cells. Other minor sites of production include spleen, testis and brain. Epo-producing cells are able to sense oxygen tension and respond to hypoxia with an increased rate of Epo gene transcription. Cis-acting DNA sequences regulating tissue-specific human Epo gene-expression have been localized using transgenic mice. Analysis of the molecular basis for hypoxia-inducibility transcription of the human Epo gene has permitted identification of a hypoxia-inducibility factor 1 (HIF-1) found only in hypoxic extracts,

which bound to an enhancer region located 3' to the Epo polyadenylation site. Furthermore, this oxygen-sensing system is not restricted to Epo expression and is able to regulate other genes in cells not specialized for the production of Epo. Different mutagenesis experiments have identified functionally important domains on the surface of the Epo molecules, at sites comparable with those established for other cytokines. The receptor for erythropoietin (Epo-R) has been cloned and belongs to the cytokine receptor superfamily. In addition to the p66 cloned chain of the Epo-R, two 85 and 100 kDa associated proteins have been described after cross linking with ¹²⁵I-Epo on erythroid cells; these two latter proteins remain to be identified. Intracellular pathways activated by Epo have been extensively studied; nevertheless it is still not known if the cytoplasmic region of the receptor contains both growth-promoting activity and a specific differentiation activity. In erythroid disorders, autosomal dominant primary familial erythrocytoses have been described with mutations in the regulatory domain of the Epo-R gene, whereas polycythemia and/or erythroleukemia have not been found to show Epo-R abnormalities. Various indications for treatment by recombinant Epo are presented.