

## L'érythropoïétine

L'érythropoïétine est un facteur de croissance protéique spécifique de la lignée érythroïde. Sa cible principale est une cellule déjà engagée irréversiblement dans la différenciation érythroïde. Physiologiquement, l'érythropoïétine est produite par des cellules rénales périlitubulaires, probablement endothéliales ; sa synthèse est contrôlée par la pression partielle en oxygène dans les tissus : elle augmente en cas d'hypoxie tissulaire. Le clonage du gène de ce facteur a permis de parfaire nos connaissances sur sa structure et, disposant en grande quantité de la protéine produite par recombinaison d'ADN, de proposer d'utiliser l'érythropoïétine dans le traitement des anémies des insuffisants rénaux où elle s'est révélée d'une parfaite efficacité.

### Bruno Varet

Professeur au CHU Cochin

### Nicole Casadevall

Chef de travaux au CHU Cochin

### Catherine Lacombe

Chef de travaux au CHU Cochin

Les spécialistes américains de l'érythropoïétine rappellent volontiers que l'hypothèse d'un contrôle de la production des globules rouges par l'hypoxie peut être attribuée à deux Français, P. Bert et D. Jourdanet, au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle et que la première suggestion d'un contrôle hormonal est due à Carnot et Deflandre en 1906. Cependant, l'histoire scientifique de l'érythropoïétine est ensuite une quasi-exclusivité nord-américaine : en 1950, démonstration par Reissmann [1] de la réalité de la régulation hormonale de l'érythropoïèse par une expérience de circulation croisée chez l'animal ; en 1957, démonstration du rôle du rein dans la production de l'érythropoïétine par Jacobson *et al.* [2]. Il faudra ensuite 20 ans à E. Goldwasser, collaborateur de Jacobson, pour parvenir à complètement purifier l'érythropoïétine humaine à partir d'urines de patients anémiques [3]. La détermination de la structure en acides aminés de la molécule a connu de grandes difficultés. C'est en décembre 1983 que l'équipe de génie

génétique californienne d'Amgen est parvenue la première à cloner le gène de l'érythropoïétine humaine à partir de séquences d'acides aminés de l'hormone purifiée par Goldwasser. Dès 1985, les chercheurs d'Amgen ont réussi à faire exprimer le gène de l'érythropoïétine en quantité suffisante pour la purifier et obtenir l'autorisation pour les premiers essais thérapeutiques. L'année 1988 verra probablement les premières autorisations de mise sur le marché de l'érythropoïétine recombinante pour le traitement de l'anémie de l'insuffisance rénale chez les patients dialysés. Parallèlement à ces résultats thérapeutiques, le clonage du gène a permis des progrès spectaculaires dans la biochimie, les méthodes de dosage et la physiologie de l'érythropoïétine.

### Le gène de l'érythropoïétine

Les études du clonage du gène humain de l'érythropoïétine ont été publiées en 1985, simultanément, par les compagnies Amgen et Gene-

### ADRESSE

B. Varet, N. Casadevall, C. Lacombe : Service d'hématologie et Inserm U.152, CHU Cochin, 24, rue du Faubourg-St-Jacques, 75674 Paris Cedex 14, France.

## RÉFÉRENCES

1. Reissmann KR. Studies on the mechanism of erythropoietic stimulating in parabiotic rats during hypoxia. *Blood* 1950 ; 5 : 372-80.
2. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plazed L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 1957 ; 179 : 633-4.
3. Miyake T, Kung CKH, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977 ; 252 : 5558-64.
4. Lin FK, Suggs S, Lin CH et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 7580-4.
5. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, et al. Isolation and characterization of genomic cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985 ; 313 : 806-10.
6. Powells JS, Berkner KL, Lebo RV, Adamson JW. Human erythropoietin gene : high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 6465-9.
7. Law ML, Cai Gy, Link FK, et al. Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 6920-9.
8. Semenza GL, Ladas JAA, Antonarakis SE. An Xba I polymorphism 3' to the human erythropoietin gene. *Nucleic Acids Res* 1987 ; 15 : 67-8.
9. Lai PH, Everett R, Warig Ff, Arakawa T, Goldwasser E. Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 3116-21.

m/s n° 6 vol. 4, juin 88

tics Institute [4, 5]. La stratégie utilisée a été très similaire. Deux peptides issus de la digestion trypsique de l'érythropoïétine ont été choisis pour fabriquer des oligonucléotides synthétiques. Ceux-ci ont servi de sondes pour cribler des banques d'ADN génomique et d'ADN complémentaire dérivées du foie foetal humain (où le gène d'érythropoïétine est exprimé). Les clones positifs ont été insérés dans un vecteur d'expression, puis transfectés dans des cellules de mammifères. La présence d'érythropoïétine active dans le surnageant du milieu de culture a été prouvée par dosages biologiques *in vivo*, *in vitro* et par dosage radioimmunologique.

Le gène de l'érythropoïétine comprend cinq exons, séparés par quatre introns (figure 1). Les exons II, III, IV sont codants ainsi qu'une partie de l'exon I et de l'exon V. En amont du codon d'initiation de la traduction ATG, on ne retrouve aucune des séquences promotrices habituelles telles que TATA box, CCAAT box. La région 5' non traduite comporte au moins de 218 nucléotides, ce qui est inhabituel et pourrait correspondre à des régions régulatrices particulières.

Le gène de l'érythropoïétine est uni-

que. Il n'y a pas de pseudogène, ni de gène de la même famille. En particulier l'angiotensinogène n'a aucune homologie avec l'érythropoïétine contrairement à ce qui avait été suggéré.

Le gène humain a été localisé dans la région q 21 du chromosome 7 [6]. Un polymorphisme de taille des fragments de restriction a été démontré avec les enzymes de restriction Hind III, Hinf I [7] et Xba I [8].

Ce gène a ensuite été cloné chez deux autres espèces, le singe et la souris. Le gène du singe a 94 % d'homologie avec le gène humain, celui de la souris 81 % d'homologie. L'homologie homme-souris est importante pour les exons ainsi que pour le premier intron. La conservation de ces séquences introniques à travers les espèces suggère qu'elles pourraient jouer un rôle fonctionnel, probablement régulateur.

## Structure biochimique

Ce n'est qu'à partir de la séquence nucléotidique de l'ADN que la séquence peptidique complète a pu être déduite. L'érythropoïétine humaine a 80 % d'homologie avec celle de souris et 92 % d'homologie avec celle de singe. Ceci est à rappro-

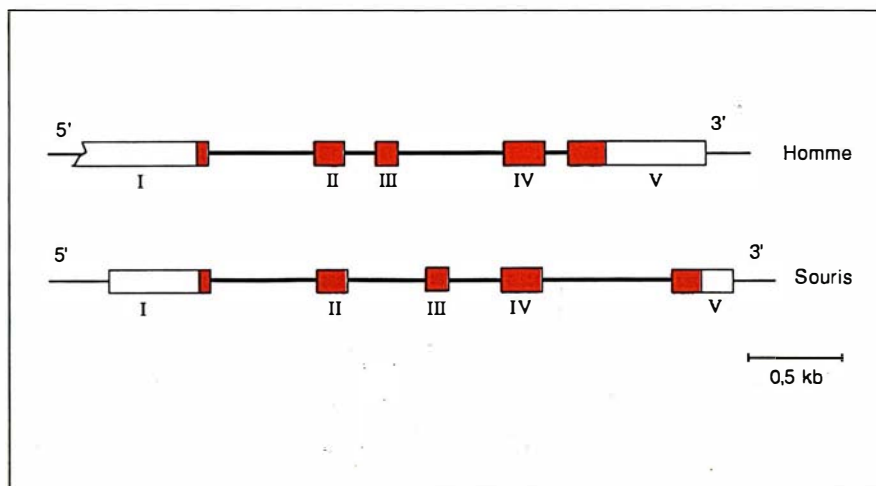


Figure 1. **Le gène de l'érythropoïétine chez l'homme et chez la souris.** Les exons sont numérotés de I à V. Les parties codantes pour la protéine sont colorées en rouge.

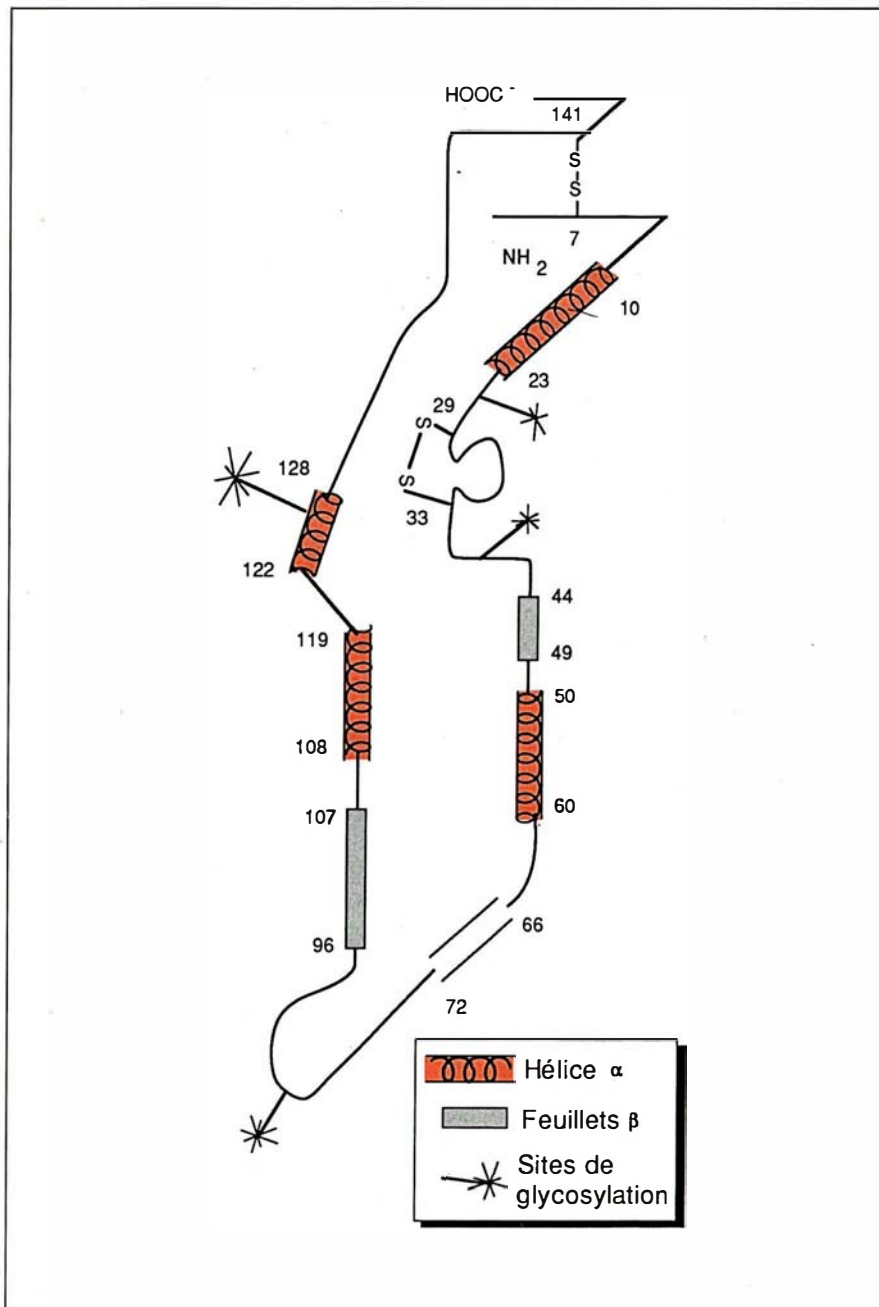


Figure 2. Représentation de la structure secondaire de l'érythropoïétine telle qu'elle peut être prédite par la méthode de Chou et Fasman.

cher de l'absence de spécificité d'espèce dans l'activité biologique. Chez l'homme, le gène de l'érythropoïétine code pour une protéine de 193 acides aminés. Un peptide signal de 27 acides aminés très hydrophobe est clivé lors de la sécrétion. La protéine mature se compose de 166 acides

aminés et a un poids moléculaire de 18 399. Il y a trois sites de N-glycosylation sur les asparagines 24, 38 et 83. La sérine 126 est un site de O-glycosylation [9]. C'est donc une protéine fortement glycosylée qui a alors un poids moléculaire déterminé par électrophorèse en gel d'acrylamide en

conditions dénaturantes de 34 000 à 38 000. La glycosylation est indispensable à l'activité biologique. En effet la simple désialisation entraîne une perte de l'activité *in vivo* sans perte de l'activité *in vitro*; la déglycosylation complète entraîne une perte d'activité aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, probablement par instabilité et agrégation de la molécule. Il y a quatre cystéines créant deux ponts disulfures. L'intégrité de ces ponts disulfures est indispensable à l'activité biologique de la molécule. L'érythropoïétine est une molécule très stable: elle résiste à la chaleur (80 °C), aux pH extrêmes et à différents agents dénaturants.

L'application de la méthode de Chou et Fasman permet de prédire la structure secondaire représentée sur la figure 2. Elle est similaire chez l'homme, la souris et le singe.

L'analyse comparée des érythropoïétines humaine, de singe et de souris permet de déterminer des régions variables. Les régions contenant les acides aminés 1 à 24 et 37 à 56 sont presque invariantes, et devraient donc représenter les déterminants essentiels pour l'activité de la molécule [10].

La purification de l'érythropoïétine recombinante a été progressivement améliorée et on est parvenu à une activité de 216 000 U/mg de protéine déterminée par dosage biologique *in vivo* [11]. L'érythropoïétine urinaire ainsi que la protéine recombinante ont perdu le résidu arginine en position 166, ceci étant dû à une modification post-traductionnelle par une carboxypeptidase intracellulaire ou liée à la membrane. L'érythropoïétine biologiquement active serait donc une érythropoïétine des -Arg<sup>166</sup>.

### Contrôle de l'expression de l'érythropoïétine

Dès 1957, Jacobson et Goldwasser avaient démontré que le rein hypoxique était le site majeur de sécrétion de l'Epo [2]. Ceci a été confirmé en 1986, par la mise en évidence des ARN messagers (ARNm) spécifiques dans les reins de rats et de souris rendus hypoxiques par l'injection de cobalt ou des saignées [12]. L'ARNm apparaît environ trois à six heures après la stimulation. La taille du

messenger de rat et de souris est de 1,8 kb (kilobases), alors que le messenger extrait du foie foetal humain est de 1,6 kb [5]. En hypoxie on peut également mettre en évidence l'ARNm dans le foie mais à un taux beaucoup plus faible que dans le rein (environ 15 à 20 %) [13]. En revanche, aucun message n'est détecté dans les autres organes hypoxiques, en particulier dans les glandes salivaires.

Si la production d'érythropoïétine par le rein est admise depuis longtemps, la fraction cellulaire responsable de la synthèse de l'hormone a été l'objet de nombreuses controverses. Avec des techniques d'immunofluorescence ou de dosages dans les surnageants de culture, la production d'érythropoïétine a été attribuée aux glomérules du rein ou aux cellules mésangiales [14]. Depuis le clonage du gène, Caro *et al.* [15] ont séparé les fractions glomérulaires et tubulaires de rein hypoxique de rat et ont montré une accumulation de messenger d'érythropoïétine dans la fraction tubulaire. Plus récemment les techniques d'hybridation *in situ* ont permis, chez la souris hypoxique, de déceler la présence d'ARNm spécifique dans les cellules périlitubulaires [16, 17]. Les cellules périlitubulaires sécrétant l'érythropoïétine sont localisées dans le cortex et la médullaire externe du rein et non dans la médullaire interne. L'identification de ces cellules n'est pas encore définitive. Il ne s'agit pas de macrophages que certains avaient rendus responsables de la sécrétion d'érythropoïétine dans la moelle [18]. La fluorescence de cellules de même topographie avec un anticorps anti-facteur Willebrand laisse supposer qu'il s'agit de cellules endothéliales [16].

## Dosage

Plusieurs méthodes de dosage *in vivo*, *in vitro* et immunologiques sont utilisées. Les méthodes biologiques *in vivo* et *in vitro* sont longues, peu précises. Un dosage radioimmunologique a été développé dès 1979 [19] mais sa fiabilité était incertaine jusqu'à récemment en raison des difficultés de purification de l'érythropoïétine et de l'absence d'anticorps spécifiques puissants. Le clo-

nage du gène de l'érythropoïétine et son expression ont permis la production en grande quantité d'érythropoïétine pure et l'obtention d'excellents anticorps spécifiques mono- et polyclonaux.

Les résultats du dosage sont exprimés en unités internationales. Une unité a été définie comme l'activité équivalente à l'effet érythropoïétique *in vivo* induit par 5 µmoles de cobalt. Un étalon international est disponible à la division des standards biologiques à Londres.

Sous l'impulsion de l'OMS\* une nouvelle définition de l'unité internationale fondée sur l'activité de l'érythropoïétine recombinante est en cours.

**Les dosages *in vivo*.** Ils utilisent des animaux rendus polyglobuliques par l'hypertransfusion ou l'hypoxie. Remis à une pression atmosphérique normale, ces derniers, comme les animaux hypertransfusés, ont une production endogène d'érythropoïétine quasiment nulle. Ils répondent donc à l'administration exogène d'érythropoïétine en fonction de la dose, en augmentant leur érythropoïèse, ce qui peut être mesuré par l'incorporation globulaire de <sup>59</sup>Fe.

La quantité d'érythropoïétine injectée dans le matériel à tester est déduite d'une courbe obtenue à l'aide de préparations d'érythropoïétine standard.

Ce test reste le test de référence mais il est long et peu sensible. Il n'est donc pas utilisable pour des dosages de routine en pathologie.

**Les dosages biologiques *in vitro*.** Ils utilisent des cultures de cellules hématopoïétiques, moelle de rat ou de souris, foie foetal de souris. Ils sont sensibles, rapides, détectent jusqu'à une milli-unité (mU) d'érythropoïétine et donnent de très bonnes courbes dose-réponse.

Pendant cette méthode peut détecter de l'érythropoïétine sans acide sialique qui est inactive *in vivo*, et surtout, d'autres facteurs présents dans le sérum ou les urines peuvent interférer avec le dosage.

**Les tests immunologiques.** Les premiers tests proposés avec des anticorps de spécificité incertaine utili-

## RÉFÉRENCES

- McDonald JD, Lin FK, Goldwasser E. Cloning sequencing and evolutionary analysis of the mouse erythropoietin gene. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 842-8.
- Recny MA, Scoble HA, Kim Y. Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. *J Biol Chem* 1987; 262: 17156-63.
- Beru N, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E. Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 2571-5.
- Bondurant MC, Koury MJ. Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 2731-3.
- Jelkmann W. Renal erythropoietin: properties and production. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1986; 104: 139-215.
- Schuster Sj, Wilson JH, Erslev AJ, Caro J. Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood* 1987; 70: 316-8.
- Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, *et al.* Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 1988; 81: 620-3.
- Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by *in situ* hybridization. *Blood* 1988; 71: 524-7.
- Rich IN, Heit W, Kubanek B. Extrarenal erythropoietin production by macrophages. *Blood* 1982; 60: 1007-18.
- Sherwood JB, Goldwasser E. A radioimmunoassay for erythropoietin. *Blood* 1979; 54: 885-93.

\* OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

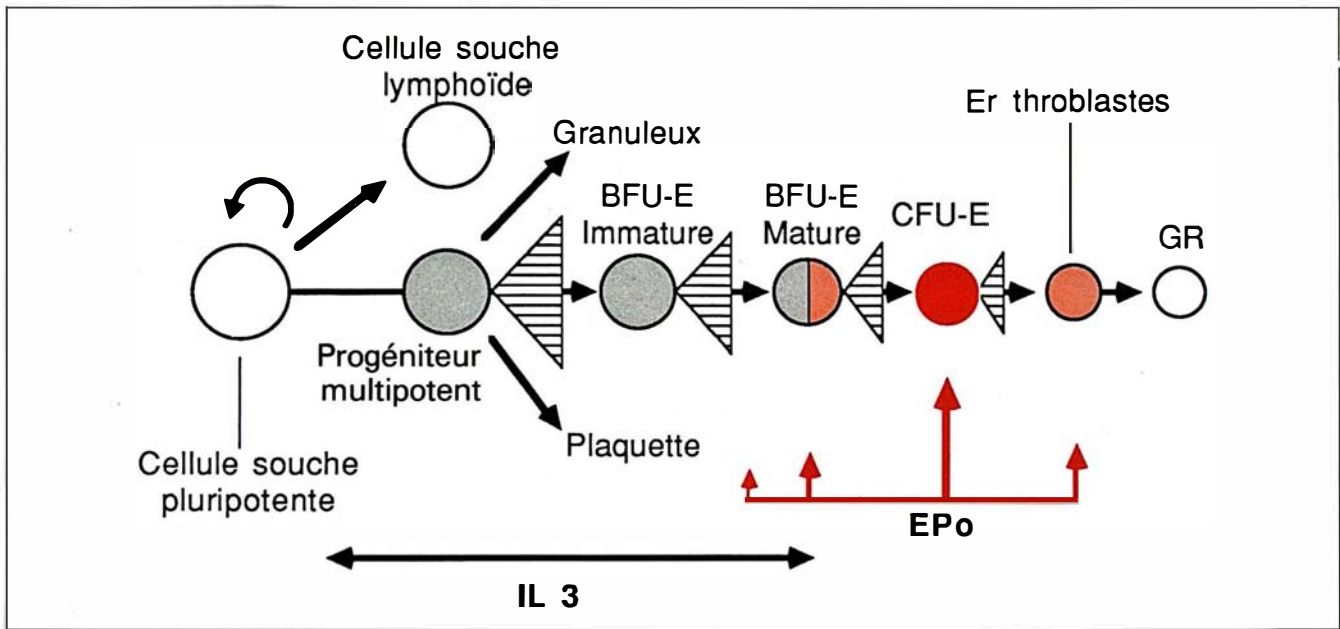


Figure 3. **Les différentes étapes de la cellule souche du globule rouge et l'action des facteurs de croissance.** Epo = érythropoïétine ; IL3 = interleukine 3 ; BFU-E = burst forming unit-erythroid ; CFU-E = colony forming unit-erythroid.

saient les techniques d'inhibition de l'hémagglutination. Les dosages radio-immunologiques actuels utilisent comme traceur l'érythropoïétine recombinante et des anticorps spécifiques très puissants [20]. Dans ces conditions techniques, les valeurs obtenues sont corrélées avec le résultat des dosages *in vivo*. Chez l'homme la quantité normale d'érythropoïétine circulante est estimée entre 10 mU et 20 mU/ml.

### Les cibles de l'érythropoïétine

L'injection d'érythropoïétine à un animal hypertransfusé et dont ni la moelle ni la rate ne contiennent de précurseurs érythropoïétiques identifiables entraîne une vague de proérythroblastos : l'érythropoïétine agit donc *in vivo* sur des cellules indifférenciées morphologiquement, appelées ERC (*erythropoietin responsive cells*). Les techniques de culture clonale *in vitro* ont permis une meilleure définition de la nature de ces cellules et du niveau de l'action de l'érythropoïétine [14]. Deux stades de précurseurs ont été définis, les CFU-E, *colony forming unit erythroid* et les BFU-E, *burst forming unit ery-*

*throid* (figure 3). Parmi les BFU-E, on peut distinguer les BFU-E primitives proches de la cellule souche et les BFU-E matures.

La cible principale de l'érythropoïétine est la CFU-E qui est strictement dépendante de l'érythropoïétine. Elle donne *in vitro* chez l'homme de petites colonies, denses, de 8 à 100 cellules regroupées en un seul amas et qui apparaissent en 7 à 8 jours. Ces colonies sont obtenues avec de faibles concentrations en érythropoïétine.

Les BFU-E les plus primitives sont peu ou pas du tout sensibles à l'érythropoïétine. Leur prolifération est dépendante d'un autre facteur, l'interleukine 3 (IL-3). La sensibilité à l'érythropoïétine augmente avec la maturation des BFU-E. Les colonies dérivées en 15 jours d'une BFU-E sont constituées de plusieurs gros amas érythroblastiques. A partir de la CFU-E, l'érythropoïétine agit tout au long de la lignée érythroblastique. En augmentant la prolifération, elle diminue le temps de transit médullaire. Elle accélère la synthèse des ARN et semble même accélérer la sortie des réticulocytes de la moelle. L'érythropoïétine a aussi un effet sur la croissance *in vitro* des mégacaryo-

cytes. Elle n'est sûrement pas le seul facteur qui agisse sur ces cellules, mais elle a un effet potentialisateur.

### Les récepteurs de l'érythropoïétine

L'érythropoïétine se lie à des récepteurs membranaires. Le relais intracellulaire est encore actuellement totalement inconnu. Les nucléotides cycliques (AMP cyclique, GMP cyclique) ne reproduisent pas l'action de l'érythropoïétine. La voie de la phospholipase C menant à l'activation de la protéine kinase C et à la libération du calcium intracellulaire ne semble pas impliquée.

Krantz et Goldwasser [21] ont été les premiers, en utilisant de l'érythropoïétine purifiée à partir d'urine humaine marquée au tritium, à démontrer, chez la souris, sa liaison spécifique à des progéniteurs érythroblastiques infectés par le virus de Friend. Depuis le clonage du gène, l'étude de l'interaction érythropoïétine-récepteur a été rendue plus facile. De nombreux travaux ont confirmé la présence de récepteurs sur des lignées cellulaires érythroleucémiques [22-24] mais aussi sur des progéniteurs normaux [25-27].

## RÉFÉRENCES

20. Egrie JC, Cotes PM, Lane J, Garnes Das Re, Tam RC. Development of radioimmunoassays for human erythropoietin using recombinant erythropoietin as tracer and immunogen. *J Immunol Methods* 1987 ; 99 : 235-41.
21. Krantz SB, Goldwasser E. Specific binding of erythropoietin to spleen cells infected with the anemia strain of Friend virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 7574-8.
22. Sawyer ST, Krantz SB, Luna J. Identification of the receptor for erythropoietin by cross-linking to Friend Virus infected erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 3690-4.
23. Sasaki R, Yanagawa S, Hitomi K, Chiba H. Characterization of erythropoietin receptor of murine erythroid cells. *FEBS Lett* 1987 ; 168 : 43-8.
24. Todokoro K, Kanazawa S, Amanuma H, Ikawa Y. Specific binding of erythropoietin to its receptor on responsive mouse erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 4126-30.
25. Mufson RA, Gesner TG. Binding and internalization of recombinant human erythropoietin in murine erythroid precursor cells. *Blood* 1987 ; 69 : 1485-90.
26. Sawada K, Krantz B, Kans JS, et al. Purification of human erythroid colony forming units and demonstration of specific binding of erythropoietin. *J Clin Invest* 1987 ; 80 : 357-66.
27. Mayeux P, Billat C, Jacquot R. The erythropoietin receptor of rat erythroid progenitor cells. *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 133985-90.
28. Winearls CG, Oliver Do, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Cotes PM. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* 1986 ; 2 : 1175-7.
29. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *N Engl J Med* 1987 ; 316 : 73-8.

m/s n° 6 vol. 4, juin 88

Dans tous les cas le nombre de récepteurs est très faible, entre 100 et 2 000 par cellule, ce qui rend difficile l'étude du récepteur. Les affinités mesurées sont variables. La majorité des auteurs donnent des valeurs comprises entre 150 et  $500 \times 10^{-12}$  M pour la constante de dissociation. Dans la plupart des cas, il semble exister une seule classe de récepteurs. Cependant certains ont suggéré l'existence de deux classes de récepteurs à affinités différentes. Des études de *cross-linking* en conditions réductrices montrent le plus souvent deux bandes de poids moléculaires 100 et 80 kDa (kilodaltons). En conditions non réductrices on observe une seule bande de haut poids moléculaire qui pourrait correspondre à l'association des deux sous-unités observées en conditions réductrices. Toutes ces données sont récentes, fragmentaires et doivent être confirmées. Les études d'internalisation du récepteur ont montré que le complexe est internalisé et métabolisé dans la cellule cible.

### Pathologie de l'érythropoïétine

L'érythropoïétine est impliquée dans certaines modifications quantitatives de l'érythropoïèse.

**Anémies.** Seule l'anémie de l'insuffisance rénale est clairement due à une anomalie de la production de l'érythropoïétine. Le rôle exact de la diminution de l'érythropoïétine dans l'anémie de l'insuffisance rénale a été longtemps discuté. En effet on a aussi décrit des toxines hémolytiques et des toxines inhibant l'érythropoïèse accumulées dans le sérum au cours de l'insuffisance rénale. D'autre part des taux élevés d'érythropoïétine avaient été retrouvés par certains chercheurs à l'époque où les dosages n'avaient pas la fiabilité actuelle. Le rôle fondamental de la baisse de production de l'érythropoïétine dans les anémies de l'insuffisance rénale a pu être clairement établi grâce à la mise au point depuis 1983 de techniques fiables de dosages radio-immunologiques de l'érythropoïétine (voir ci-dessus). Le résultat des essais thérapeutiques chez les insuffisants rénaux chroniques (voir ci-dessous)

\* Établissement de liaisons covalentes entre deux molécules spécifiques, liées (exemple, un récepteur et son ligand).

ont apporté la preuve que les autres mécanismes d'anémie au cours de l'insuffisance rénale ne jouent qu'un rôle accessoire. Une autre anémie peut, mais en partie seulement, s'expliquer par un défaut de production de l'érythropoïétine : l'anémie des syndromes inflammatoires. En effet le taux d'érythropoïétine y est moins élevé que dans d'autres anémies de même degré. Dans toutes les autres anémies qu'elles soient dues à un défaut de production par la moelle ou à un excès de destruction ou de perte en périphérie, les taux d'érythropoïétine sont élevés et d'autant plus élevés que l'anémie est plus profonde.

**Polyglobulies.** Les polyglobulies peuvent être dues à une augmentation de la production d'érythropoïétine. Cette augmentation peut être la conséquence physiologique de l'hypoxie tissulaire dans les polyglobulies de l'altitude, des insuffisances cardio-respiratoires avec désaturation oxygénée du sang artériel et au cours des rares mutations de l'hémoglobine entraînant une augmentation de l'affinité pour l'oxygène. Il existe aussi des polyglobulies où l'hypersécrétion de l'érythropoïétine est la conséquence d'une sécrétion non régulée de l'hormone par une tumeur maligne (cancer du rein, du foie, hémangioblastome du cervelet) ou bénigne (kyste du rein principalement). Dans la polyglobulie de Vaquez, c'est une anomalie des cellules souches qui explique la polyglobulie : ces cellules échappent à la régulation normale et continuent à se différencier en érythroblastes malgré des taux bas d'érythropoïétine.

### L'érythropoïétine en thérapeutique

Compte tenu du rôle vraisemblable de l'érythropoïétine dans le mécanisme de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique, il était logique de tester d'abord l'efficacité de l'érythropoïétine dans cette indication. Ceci a été entrepris depuis 1986 en Grande-Bretagne [28] et aux États-Unis [29] puis dans le reste de l'Europe avec l'érythropoïétine produite par la compagnie Amgen.

Plus de 200 patients insuffisants rénaux chroniques, transfusés ou non, mais atteints d'anémie profonde ont été traités avec un recul

qui, pour une centaine d'entre eux atteint ou dépasse une année. L'efficacité thérapeutique jugée sur l'élévation du taux d'hémoglobine est constante, à condition que les réserves en fer soient suffisantes avant traitement et que du fer soit administré lorsqu'une déplétion s'installe sous traitement. Cette élévation de l'hémoglobine induite par l'érythropoïétine recombinante permet aux patients d'éviter les conséquences secondaires des transfusions et d'avoir une activité physique beaucoup plus satisfaisante. Les effets bénéfiques sont donc indiscutables. Il existe aussi des effets secondaires. Ils sont tous la conséquence de l'élévation du taux de l'hémoglobine. Le plus important est l'augmentation de la tension artérielle. Cette élévation, induite ou favorisée par l'élévation de l'hémoglobine, est probablement due à une augmentation des résistances vasculaires périphériques, elles-mêmes dues à la vasoconstriction provoquée par l'amélioration de l'oxygénation tissulaire. Un traitement anti-hypertenseur ou une modification du traitement hypertenseur est donc nécessaire chez une partie des patients traités par l'érythropoïétine recombinante. Un autre effet secondaire a été observé mais il n'est pas encore démontré qu'il soit statistiquement plus fréquent chez les patients traités par l'érythropoïétine : des thromboses des fistules artério-veineuses permettant les dialyses. Cette complication paraît cependant logique compte tenu de l'augmentation de la viscosité sanguine et de la diminution du temps de saignement liée à l'augmentation du taux de l'hématocrite.

Globalement les effets positifs de l'érythropoïétine recombinante l'emportent largement sur ses effets secondaires. L'indication du traitement par l'érythropoïétine de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique chez le sujet dialysé est donc indiscutable. Il reste cependant à optimiser : (1) le traitement initial, la plupart des auteurs pensant qu'une augmentation lente du taux d'hémoglobine est préférable à une augmentation rapide ; (2) le taux d'hémoglobine cible qui est probablement entre 10 et 12 g/dl selon les patients sans chercher à corriger

complètement l'anémie ; (3) les modalités du traitement d'entretien qui est indispensable.

Les autres indications potentielles de l'érythropoïétine recombinante en thérapeutique sont encore incertaines. On peut envisager : (a) l'anémie de l'insuffisance rénale chronique chez les patients non dialysés ; (b) l'anémie des syndromes inflammatoires, mais il faut reconnaître que l'augmentation du taux d'hémoglobine n'est souvent qu'accessoire car ces patients ont généralement une maladie chronique et invalidante (rhumatisme inflammatoire) ou d'évolution inéluctable (cancer) ; (c) la drépanocytose homozygote où l'administration de très fortes doses d'érythropoïétine (l'anémie de la drépanocytose homozygote s'accompagne d'une élévation du taux d'érythropoïétine) et d'autres médicaments comme l'hydroxyurée pourraient permettre une augmentation du taux de l'hémoglobine foetale et réduire la fréquence des crises. D'autres indications que les anémies sont à explorer. La plus importante est certainement l'autotransfusion. L'association d'un traitement martial et d'injections d'érythropoïétine doit permettre de recueillir avant une intervention programmée beaucoup plus de globules rouges qu'on ne le fait actuellement. En effet, la baisse du taux d'hémoglobine induite par le prélèvement d'un ou deux dons de sang est insuffisante pour entraîner une augmentation rapide du taux d'érythropoïétine. L'utilisation de l'érythropoïétine dans l'autotransfusion comporte cependant un risque important : celui de thromboses liées à une augmentation excessive et mal contrôlée de l'hématocrite. Le risque de thromboses est bien connu dans les polyglobulies. C'est pour cette raison qu'il faut considérer avec réticence l'utilisation de l'érythropoïétine pour améliorer les performances sportives. Enfin, il faut espérer que les laboratoires qui commercialiseront l'érythropoïétine et les autorités de tutelle trouveront le moyen d'éviter que l'hormone recombinante ne soit utilisée comme « anti-anémique tout terrain » puisque l'on a vu que sauf exception les anémies ne sont pas dues à un défaut de production de l'érythropoïétine ■

## Summary

The human erythropoietin gene has recently been cloned. This was rendered possible by the purification to apparent homogeneity of urinary erythropoietin by Goldwasser's group. Recombinant erythropoietin is now produced in large quantities and available for therapeutic use. The human erythropoietin gene is constituted of five exons and located on chromosome 7. This gene codes for a protein of 193 amino acids with an hydrophobic leader peptide of 27 A.A. and a mature protein of 166 A.A. The protein contains two disulfide bonds and is heavily glycosylated. Molecular weight of the entire molecule is 34 000. Epo production is regulated by tissue oxygen tension. Erythropoietin is produced in the kidney by cells located around the tubules, probably vascular endothelial cells. The production of large amounts of highly purified recombinant erythropoietin allowed the development of specific and sensitive radioimmunoassays, which would be available for clinical use. Erythropoietin acts on the target cell, the colony forming unit erythroid (CFU-E) through the binding to a specific receptor which is not yet characterized. Isolation and purification of the receptor are hampered by the low number of receptors on the cell surface. The anaemia of renal failure is mainly due to a reduced production of erythropoietin. Treatment of the anaemia of haemodialysed patients by recombinant human erythropoietin is constantly efficient provided iron stores are sufficient. Other therapeutic uses are under study.

## TIRÉS A PART

B. Varet : Service d'hématologie et Inserm U.152, CHU Cochin, 24, rue du Faubourg-St-Jacques, 75674 Paris Cedex 14, France.

m/s n° 6 vol. 4, juin 88