

## L'oncogène *v-mpl* est la forme tronquée du récepteur d'une cytokine impliquée dans la régulation de la mégacaryocytopoïèse

Dans une synthèse parue en juillet 1991 [1], nous avons discuté les homologies de séquences entre l'oncogène *v-mpl* naturellement transduit dans le rétrovirus murin MPLV (*myeloproliferative leukemia virus*) [2] et les récepteurs de facteurs de croissance hématopoïétiques appartenant à la superfamille des hématopoïétines [3]. Depuis cette date, les ADN complémentaires des homologues cellulaires humain et murin de l'oncogène *v-mpl* ont été clonés et séquencés [4-6]. Leurs séquences peptidiques, qui présentent plus de 80 % de conservation, ont confirmé l'hypothèse que ce virus avait effectivement transduit une forme tronquée de la plus grande partie du domaine extracellulaire d'un membre de cette famille. Cependant, un ligand putatif pour ce récepteur reste encore inconnu.

N. Methia dans notre laboratoire (Inserm 362, IGR, Villejuif, France) vient d'apporter des résultats convaincants suggérant que ce récepteur pourrait avoir pour ligand une nouvelle cytokine jouant un rôle important, éventuellement spécifique, dans la régulation de la mégacaryocytopoïèse [7]. En utilisant la technique de RT-PCR appliquée à des ARN totaux préparés à partir de populations purifiées ou enrichies de cellules hématopoïétiques humaines, des transcrits spécifiques de *c-mpl* ont été mis en évidence dans la fraction CD34 positive [8], comprenant la plupart des progéniteurs du système hématopoïétique, dans les mégacaryocytes purifiés à partir de cultures de moelle osseuse et dans les plaquettes du sang périphérique

de sujets sains. En revanche, aucun transcrit n'a été révélé par cette méthode extrêmement sensible dans des populations de lymphocytes T ou B, des polynucléaires ou des monocytes purifiés à partir du sang, des érythroblastes en cours de maturation, ou des cellules de stroma médullaire. Récemment, grâce à l'obtention d'un anticorps monoclonal développé par D. Cosman (Immunex Corporation, Seattle, USA) qui reconnaît le domaine extracellulaire de *c-Mpl* humain, nous avons visualisé par immunofluorescence la protéine MPL sur les mégacaryocytes (*figure 1*) et les plaquettes. Pour aborder la fonction de ce récepteur et orienter vers l'identification de son ligand, nous avons utilisé une stratégie d'oligodésoxynucléotides antisens de l'ARN messenger (ARNm). Cette stratégie est basée sur la démonstration qu'une séquence antisens d'un ARNm s'hybride à la séquence homologue et forme un double brin ARNm/antisens qui est probablement détruit dans le cytoplasme des cellules par des RNases spécifiques de ce type de double brin. Plusieurs oligodésoxynucléotides sens ou antisens non modifiés de 18-mer ont été synthétisés et testés pour leur capacité à détruire l'ARNm *c-mpl* dans la population CD34 positive isolée à partir de cytophéréèses effectuées chez des patients atteints de myélome et ayant subi une chimiothérapie en vue d'une greffe autologue. Après une incubation de 20 heures en présence de 10  $\mu$ M d'oligomères, deux de ces antisens ont réduit de plus de 80 % le nombre de transcrits *c-mpl*, alors que les oligonucléo-

tides sens correspondants n'ont eu aucun effet. Lorsque la population cellulaire traitée par ces oligodésoxynucléotides a été cultivée dans des milieux semi-solides dans des conditions de culture permettant la détection des progéniteurs érythroïdes BFU-E (*burst forming unit-erythroid*) et des progéniteurs granulomacrophagiques CFU-GM (*colony forming unit-granulo macrophagic*), aucune réduction significative du nombre des colonies, ni de leur maturation terminale n'a été observée. En revanche, lorsque ces cellules CD34 positives ont été cultivées dans des conditions permettant le développement des colonies issues de progéniteurs mégacaryocytaires CFU-MK (*colony forming unit-megakaryocytic*), les deux oligodésoxynucléotides antisens conduisant à la destruction des transcrits *c-mpl* ont inhibé de manière très significative et reproductible la formation des colonies mégacaryocytaires, alors que les oligonucléotides sens correspondants ou que les antisens inactifs n'ont eu aucun effet biologique.

La régulation de la thrombocytopoïèse est un mécanisme complexe dans lequel interviennent de nombreuses cytokines ou interleukines (II.) dont aucune n'est spécifique de cette lignée sanguine (IL3, GM-CSF, IL6, IL11, LIF, SCF ou *stem cell factor*, EPO) [9-11]. A l'exception de la chaîne  $\alpha$  de fixation d'IL-1, les molécules formant les récepteurs de haute affinité pour ces différentes cytokines ont leurs ADNc clonés. Par comparaison des séquences, on sait que *c-Mpl* ne correspond à aucun d'entre eux. On peut provisoirement éliminer la possibilité que

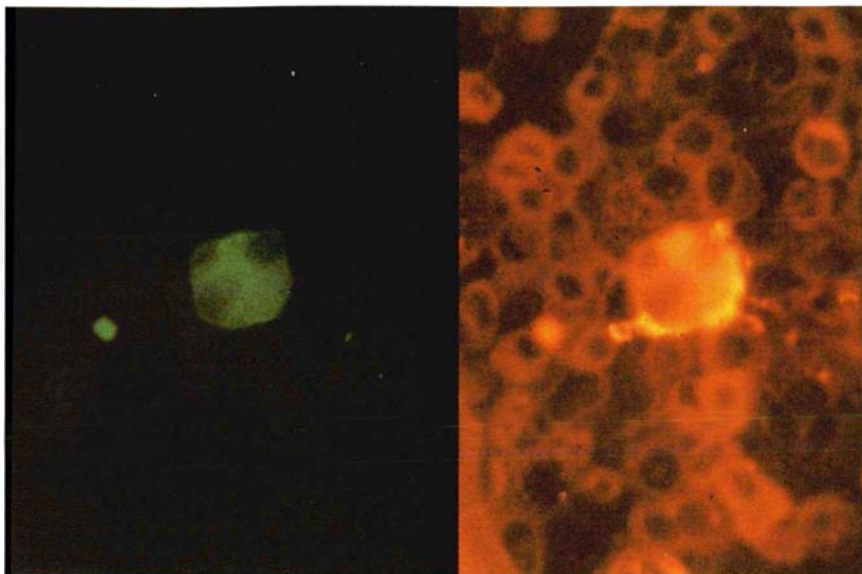


Figure 1. **Marquage par immunofluorescence d'un mégacaryocyte humain.** La protéine c-Mpl membranaire est mise en évidence par l'anticorps monoclonal anti-c-Mpl couplé au FITC (coloration verte). La nature mégacaryocytaire de la cellule est confirmée par le marquage intracellulaire avec un anticorps anti-facteur VIII couplé à la phycoérythrine (PE) (coloration rouge).

c-Mpl soit la sous-unité de fixation d'IL11 pour au moins trois raisons : il a été montré que : (1) IL11 agit sur la formation des colonies érythroïdes ; (2) la gp 130 est la chaîne de transduction du signal mitogénique induit par activation de ce récepteur ; et (3) grâce à la construction de récepteurs hybrides contenant le domaine intracytoplasmique de c-Mpl et le domaine extracellulaire, soit du récepteur au G-CSF, soit du récepteur à l'IL4, on sait que le domaine cytoplasmique de c-Mpl transduit par lui-même un signal de prolifération [5-6]. Par ailleurs, de nombreux travaux ont démontré l'existence d'une activité spécifique de la lignée mégacaryocytaire présente dans le sérum de malades ou d'animaux thrombocytopéniques ainsi que dans les urines de sujets aplasiques [12-14]. Ces activités ont été classées, peut-être artificiellement, en deux groupes : MK-CSF (*megakaryocyte-colony stimulating factor*), facteur qui agirait sur la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires et TPO (*thrombopoïétine*), facteur humoral agissant uniquement sur la maturation méga-

caryocytaire. Plusieurs publications ou communications ont rapporté la purification biochimique de ces diverses activités. Cependant, et jusqu'à présent, le clonage moléculaire du ou des gènes codant pour cette ou ces activité(s) spécifique(s) de la mégacaryocytopoïèse n'a pas été publié [15, 16]. Nos résultats suggèrent que le ligand potentiel de c-Mpl pourrait être une de ces activités.

Le clonage moléculaire et la production par génie génétique de nombreux facteurs de croissance hématopoïétiques ont permis leurs utilisations à visée thérapeutique dans les cytopénies secondaires aux affections malignes et à leurs traitements cytoréducteurs. Certaines anémies sont actuellement traitées avec efficacité par l'érythropoïétine, permettant de réduire les besoins transfusionnels en globules rouges. De même pour la lignée granulomonocytaire, le G-CSF et le GM-CSF permettent de diminuer la durée de l'aplasie post-chimiothérapique et aussi de réduire la morbidité et la mortalité infectieuses. Cependant, la correction des thrombocytopénies

reste un problème majeur, source de morbidité importante. L'isolement d'une cytokine stimulant spécifiquement la prolifération et la différenciation de la lignée mégacaryocytaire serait un apport important pour le traitement des thrombocytopénies.

N.M., F.L.,  
W.V., F.W.

1. Wendling F, Tambourin P. La superfamille des récepteurs de cytokines et l'oncogène *v-mpl*. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 569.
2. Souyri M, Vigon I, Penciolelli JF, Heard JM, Tambourin P, Wendling F. A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell* 1990 ; 63 : 1137.
3. Miyajima A, Mui ALF, Ogorochi R, Sakamaki K. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. *Blood* 1993 ; 82 : 1960.
4. Vigon I, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila MT, Tambourin P, Gisselbrecht S, Souyri M. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the *v-mpl* oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 5640.
5. Skoda RC, Seldin DC, Chiang MK, Peichel CL, Vogt TF, Leder P. Murine *c-mpl*: a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily that transduces a proliferative signal. *EMBO J* 1993 ; 12 : 2645.
6. Vigon I, Florindo C, Fichelson S, Guenet JL, Mattei MG, Souyri M, Cosman D, Gisselbrecht S. Characterization of the murine *m-mpl* proto-oncogene, a new member of the hematopoietic cytokine receptor family: chromosomal location and evidence for a function in cell growth. *Oncogene* 1993 ; 8 : 2607.
7. Methia N, Louache F, Vainchenker W, Wendling F. Oligodeoxynucleotides antisense to the proto-oncogene *c-mpl* specifically inhibit *in vitro* megakaryocytopoiesis. *Blood* 1993 ; 82 : 1935.
8. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG1a cells. *J Immunol* 1984 ; 133 : 157.
9. Mazur EM, Hoffman R, Bruno E. Regulation of human megakaryocytopoiesis. *J Clin Invest* 1981 ; 68 : 733.
10. Leary AG, Zeng HQ, Clarke SC, Ogawa M. Growth requirements for survival in Go and entry into the cell cycle of primitive hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 4013.
11. Gordon MS, Hoffman R. Growth factors affecting human thrombocytopoiesis. Potential agents for the treatment of thrombocytopenia. *Blood* 1992 ; 80 : 302.



12. Schreiner DP, Levin J. Detection of thrombopoietic activity in plasma by stimulation of suppressed thrombopoiesis. *J Clin Invest* 1970; 49: 1709.

13. McDonald TP, Cottrell M, Clift R. Hematologic changes and thrombopoietin production in mice after x-irradiation and platelet-specific antisera. *Exp Hematol* 1977; 5: 291.

14. Enomoto K, Kawakita M, Kishimoto S,

Katayama N, Mikake T. Thrombopoiesis and megakaryocyte colony stimulating factor in the urine of patients with aplastic anemia. *Br J Haematol* 1980; 45: 551.

15. Turner KJ, Fritz IJ, Temple P, Jacobs K, Larson D, Leary AC, Kelleher K, Giannotti J, Caletti J, Fitzgerald M, Kriz M, Ferenz C, Grobholz J, Fraser H, Bean K, Norton CR, Gesner T, Bhatia S, Kriz R, Hewick R, Clark SC. Puri-

fication, biochemical characterization and cloning of a novel megakaryocytes stimulating factor that has megakaryocyte colony stimulating activity. *Blood* 1991; 78: 279 (abstr).

16. Erickson-Miller CL, Parchment HJRE, Murphy MJ. Megakaryocyte colony-stimulating factor (Meg-CSF) is a unique cytokine specific for the megakaryocyte lineage. *Br J Haematol* 1993; 84: 197.

## ■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Vers un traitement de l'hémophilie B par thérapie génique.** L'hémophilie B est une maladie génétique de la coagulation sanguine liée au chromosome X et résultant d'une déficience de production du facteur IX par le foie. Elle est moins fréquente que l'hémophilie A et représente 15 % des hémophilies. Il n'y a pas actuellement de traitement satisfaisant de cette maladie car le traitement est substitutif par du facteur IX obtenu, soit à partir de produits sanguins humains, avec risque d'infection virale, soit par génie génétique, ce qui est très coûteux. Une nouvelle voie thérapeutique pour lutter contre cette maladie pourrait être la thérapie génique par transfert aux patients d'une copie normale et active du gène. Une douzaine de groupes ont jusqu'à présent testé cette approche, utilisant la voie indirecte [1]. Le gène normal est introduit dans des cellules en culture puis, dans un deuxième temps, ces cellules sont transférées à l'animal. Une équipe américaine dirigée par SLC Woo (Houston, Tx) [2] vient de rapporter une étude dans laquelle le gène du facteur IX a été directement introduit dans le foie de chiens hémophiles B, les chiens hybrides beagles, qui ne produisent pas de facteur IX décelable. Kay *et al.* ont utilisé une copie fonctionnelle du gène du facteur IX canin et l'ont cloné dans un rétrovirus. Comme les rétrovirus n'insèrent leur matériel génétique que dans des cellules en division, les chercheurs ont pratiqué une hépatectomie partielle chez les chiens; en effet, les cellules hépatiques ne se divisent que lorsqu'une partie du foie est enlevée

afin de régénérer l'organe. Ils ont ensuite injecté aux animaux le rétrovirus contenant le gène du facteur IX par la veine porte. Sur quatre chiens, l'un est mort pendant l'étape chirurgicale. En revanche, les trois autres produisent du facteur IX. Cette production est de faible quantité puisqu'elle représente 0,1 % de la production normale mais significative car le temps de coagulation des chiens a diminué de 50 minutes avant traitement, à 20 minutes après la thérapie génique, alors que le temps de coagulation normal est compris entre 6 et 8 minutes. Toutefois, fait encourageant, cette production de facteur IX persiste neuf mois après la thérapie génique. S'il était possible de multiplier l'efficacité de la production du facteur IX par 10 à 100, la thérapie génique chez l'homme pourrait être envisagée. Augmenter 100 fois la production de facteur IX aboutirait à une concentration de seulement 10 % de la normale, mais bien suffisante pour aider grandement les patients hémophiles. Lorsque la concentration de facteur IX chez ces malades atteint 1,5 % de la valeur normale, ils ne présentent que très rarement la redoutable complication qu'est l'hémarthrose. Un des moyens d'augmenter la production du facteur IX normal serait d'utiliser des séquences régulatrices plus puissantes que celles rapportées dans cette étude. Une autre voie serait d'augmenter le taux d'infection du rétrovirus utilisé, ou de choisir un meilleur vecteur. L'adénovirus est, évidemment, un autre vecteur auquel pensent de nombreuses équipes travaillant sur la thérapie génique des hémophilies ([1-3] et *m/s*, n° 2,

*vol. 9, p. 236-8*). C'est ainsi que le laboratoire de S. Woo vient également de montrer qu'un ADNc du facteur IX véhiculé par un tel vecteur pouvait efficacement être introduit dans les hépatocytes *in vivo* après administration intra veineuse [4], et permettre la production de facteur IX à une concentration thérapeutiquement utile (8 % de la normale à la 2<sup>e</sup> semaine). Cependant, cette concentration décline ensuite progressivement, pour devenir négligeable au bout de 8 à 9 semaines. Une administration à ce moment d'une nouvelle dose de vecteur ne permet pas de reproduire les résultats initiaux, selon toute évidence du fait d'une immunisation dirigée contre la particule adénovirale ou peut-être, quoique moins probablement, le facteur IX. Par conséquent, beaucoup reste à faire pour parvenir à une thérapie génique crédible de l'hémophilie B humaine, d'autant plus qu'elle devrait être mise en œuvre tôt pour éviter ces complications redoutables des hémarthroses à répétition qui sont les dégénérescences articulaires. Pour les hémophilies comme pour beaucoup d'affections, l'ADN reste donc un médicament... pour demain [5].

[1. Marx J. *Science* 1993; 262: 29-30.]

[2. Kay MA, *et al.* *Science* 1993; 262: 117-9.]

[3. Chasse JF, *et al.* *médecine/sciences* 1989; 5: 331-7.]

[4. Smith TAG, *et al.* *Nature Genet* 1993; 5: 397-402.]

[5. Kahn A, Peschanski M. *médecine/sciences* 1993; 8: 900-1.]