

L Le gène de la thrombopoïétine est cloné

La revue *Nature* (volume 369, 16 juin 1994) publie un éditorial et quatre articles de trois équipes indépendantes (deux équipes américaines et une équipe française de l'Inserm U 362) annonçant l'identification et le clonage moléculaire de la thrombopoïétine humaine et murine. L'existence de ce facteur de croissance avait été suggérée il y a près de 35 ans, mais son clonage avait résisté aux efforts entrepris par de très nombreux laboratoires.

Le succès récent a été obtenu grâce à l'isolement, il y a une dizaine d'années, d'un rétrovirus mutant de la souris (le *myeloproliferative leukemia virus* ou MPLV) qui avait transduit dans son génome l'oncogène *v-mpl*. Cet oncogène codait pour la forme tronquée d'un récepteur de facteur de croissance hématopoïétique [1, 2]. Le clonage moléculaire des ADNc du récepteur normal de l'homme et de la souris, réussit il y a deux ans, a prouvé que le produit du proto-oncogène *c-mpl* était un récepteur, orphelin d'un ligand, appartenant à la superfamille des récepteurs des cytokines (famille comprenant les récepteurs de l'érythropoïétine, G-CSF, GM-CSF, de très nombreuses interleukines, de l'hormone de croissance et de la prolactine) [3-6]. Nos études concernant l'expression et la fonction du récepteur Mpl (Mpl-R) ont mis la communauté scientifique sur la piste du ligand. En effet, nous avons montré que l'ARN messager de Mpl-R était exprimé exclusivement dans les mégacaryocytes et les plaquettes, ainsi que dans la population des progéniteurs hématopoïétiques exprimant l'antigène CD34 (*m/s* n° 1, vol. 10, p. 114, [7]). Ces résultats ont ensuite été confirmés au niveau protéique par l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine extracellulaire de Mpl-R et des analyses couplant des immunomarquages et des tris cellu-

lares au cytomètre de flux. La fonction de Mpl-R a été mise en évidence par la technique des oligodésoxynucléotides antisens de son ARNm. L'addition d'oligonucléotides antisens dans des cultures de progéniteurs hématopoïétiques a inhibé spécifiquement la croissance des progéniteurs mégacaryocytaires alors qu'aucun effet n'a été noté sur les progéniteurs érythrocytaire ou granulocytaire/macrophagique [6, 7]. Ces travaux suggéraient fortement que le ligand de Mpl-R était un facteur humoral jouant un rôle important dans la régulation de la mégacaryocytopoïèse.

Pendant quinze mois, la course a été très serrée entre plusieurs équipes, dont au moins quatre compagnies de biotechnologie, qui ont réussi le clonage moléculaire du ligand de ce récepteur. La stratégie suivie par tous les groupes a été la même au départ. On savait, grâce à la construction de récepteurs chimériques que le domaine intracytoplasmique de Mpl-R était capable de transduire un signal de prolifération [4, 5]. L'hypothèse de travail a été que Mpl-R pourrait, comme les récepteurs du G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) ou de l'érythropoïétine, correspondre à une seule sous-unité capable à la fois de fixer un ligand et de transmettre un signal mitogénique. Genentech (San Francisco, CA), Zymogenetics (Seattle, WA) et nous-mêmes (Inserm U 362) en collaboration avec Immunex (Seattle, WA) avons développé deux outils pour « pêcher » ce ligand. La lignée murine BAF/BO3, totalement dépendante d'IL 3, a été transfectée de façon stable avec l'ADNc de Mpl-R humain ou murin (BAF/mpl). Des tests de prolifération classiques ont permis d'identifier des sources biologiques contenant le ligand et de suivre la protéine au cours des différentes étapes

de purification. Des récepteurs Mpl recombinants solubles, exprimés sous la forme de protéines de fusion formées du domaine extracellulaire de Mpl-R couplé au fragment Fc d'une immunoglobuline humaine, ont été utilisés pour fabriquer des colonnes d'affinité servant à piéger et purifier le ligand. Ces outils créés, Genentech et nous-mêmes avons entrepris une stratégie lourde mais classique de purification à partir de sérums d'animaux irradiés. On savait que le sérum de chiens ou de porcs irradiés contenait une activité stimulant la mégacaryocytopoïèse humaine *in vitro* [8]. Mises en présence de tels sérums, les cellules BAF/mpl proliféraient tandis que les cellules parentales non transfectées mouraient. Après adsorption des sérums sur le récepteur soluble, toute l'activité stimulatrice disparaissait. Mpl-R était donc capable de fixer spécifiquement un ligand et le sérum d'animaux irradiés devenait une source pour isoler cette molécule par passages sur colonnes d'affinité. Zymogenetics a choisi une stratégie subtile mais *a priori* risquée. L'hypothèse était que par mutagenèse des cellules BAF/mpl il serait possible d'isoler une cellule devenue productrice du ligand. La chance a souri à Zymogenetics : sur 24 clones autonomes transformés par mutagenèse, un est devenu producteur du ligand de Mpl-R. L'équipe de Don Metcalf (Australie) fut moins chanceuse puisque, en utilisant la même stratégie et en analysant 180 clones, aucun ne produisit le ligand [9]. La séquence des ADNc des ligands humain, porcine (Genentech) et murin (Zymogenetics) de Mpl-R est publiée [10, 11]. Ces séquences sont très similaires. Les ADNc comprennent un cadre ouvert de lecture codant pour une protéine de 353 acides aminés chez l'homme et 356

acides aminés chez la souris. En N-terminal, les deux protéines ont une région hydrophobe de 21 acides aminés correspondant à un peptide signal. Les protéines humaine et murine peuvent être divisées en deux domaines. Les 153 premiers résidus présentent 23 % de similitude avec l'érythropoïétine (Epo). Si l'on prend en compte les substitutions conservatives, cette région présente 50 % de similitude avec l'Epo. Ce premier domaine est séparé du second par une paire d'arginine qui pourrait représenter un site de clivage. Le second domaine est non conservé et ne semble pas présenter de région hydrophobe laissant supposer une forme transmembranaire. Comme pour l'Epo, le ligand de Mpl-R possède de nombreux sites potentiels de glycosylation. La plus grande partie de l'activité circulant dans le sérum a été trouvée dans une bande migrant à 28-32 kDa, mais la protéine semble exister sous différentes formes (66 kDa, 55 kDa, 30 kDa, 28 kDa et 14 kDa). Chez l'homme comme chez la souris, l'ARNm du ligand de Mpl-R (1,8 Kb) a été mis en évidence sur des *Northern blots* principalement dans le foie de fœtus et d'adulte et dans le rein.

La molécule recombinante, testée *in vivo* chez la souris et *in vitro* sur des cultures de progéniteurs de moelle humaine, possède à la fois les propriétés d'un facteur de croissance stimulant les progéniteurs mégacaryocytaires (MK-CSF) et agissant sur la maturation de ces cellules en leur faisant produire des plaquettes (thrombopoïétine ou TPO). Chez la souris, après sept jours de traitement, le nombre de plaquettes sanguines est augmenté par un facteur quatre et le nombre de progéniteurs mégacaryocytaires de la moelle et de la rate par un facteur vingt. Les autres lignées sanguines ne semblent pas affectées [12]. Par ailleurs, les conditions expérimentales et la cinétique d'apparition de cette molécule suivent exactement celles décrites pour la TPO [13, 14]. Enfin, si le récepteur humain est capable de fixer avec une forte affinité la TPO humaine, porcine et murine, l'inverse n'est pas vrai [13]. L'affinité du

récepteur murin pour la TPO humaine est très faible. Cette notion n'avait pas été suspectée par les nombreuses équipes qui avaient tenté, depuis trois décennies, la purification de la TPO humaine à partir de plasma ou d'urine de sujets aplasiques ou encore à partir de lignées tumorales humaines, en se servant comme tests biologiques de culture de mégacaryocytes de souris. On comprend aujourd'hui les raisons de l'échec de ces nombreuses tentatives.

L'isolement de cette molécule et sa production par génie génétique ouvrent des espoirs pour le traitement des thrombocytopenies liées aux thérapeutiques utilisant une chimiothérapie ou une irradiation. De nombreuses cytokines sont déjà utilisées dans le traitement des thrombocytopenies comme celles appartenant à la famille de l'IL6 (IL6, IL11) ou la molécule PIXY (molécule hybride GM-CSF et IL3). Les limites de l'utilisation de ces cytokines sont leur action très large sur l'hématopoïèse et sur les cellules non hématopoïétiques. L'isolement de la TPO permet, théoriquement, d'avoir, pour la première fois, une cytokine spécifique de la lignée plaquettaire et, apparemment, beaucoup plus active que les cytokines précédentes. Cependant, on ne peut exclure que la TPO, utilisée seule, ait un effet modéré dans le traitement des thrombocytopenies post-chimiothérapie. En effet, des résultats préliminaires suggèrent que l'action de cette hormone prédomine au cours de la différenciation terminale des progéniteurs mégacaryocytaires. Les cellules cibles sont des cellules assez différenciées dont le compartiment peut être effondré en condition pathologique. En revanche, les effets de la TPO devraient être particulièrement nets en association avec d'autres cytokines (en particulier PIXY) ou au cours de greffe de cellules de moelle osseuse ou de cellules souches mobilisées dans le sang périphérique. Mais, comme pour toute nouvelle molécule, la recherche doit continuer pour bien comprendre son mécanisme d'action, déterminer les cibles cellu-

lares normales ou pathologiques capables de répondre à ce facteur et analyser les effets secondaires éventuels provoqués par son utilisation.

Cette découverte est sans conteste importante. Elle devrait poser des problèmes juridiques complexes car la molécule a été obtenue simultanément par vraisemblablement quatre firmes de biotechnologie (trois américaines et une japonaise) et son marché pourrait être comparable à celui de l'Epo et du G-CSF. Ce succès souligne le retard pris par la recherche française en matière de biotechnologie. Au cours des dernières années, deux récepteurs de facteurs de croissance hématopoïétiques ont été isolés et clonés par des équipes françaises financées par des fonds publics, mais l'isolement de leur ligand réalisé par des firmes étrangères. Cela souligne les difficultés rencontrées par les chercheurs du secteur public à développer un partenariat efficace avec les entreprises industrielles françaises ■

RÉFÉRENCES

1. Wendling F, Tambourin P. La superfamille des récepteurs de cytokines et l'oncogène v-mpl. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 569-76.
2. Souyri M, Vigon I, Penciollelli JF, Heard JM, Tambourin P, Wendling F. A putative truncated receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell* 1990 ; 63 : 1137-47.
3. 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 : 5640-4.
4. 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 : 2645-53.
5. Vigon I, Florindo C, Fichelson S, Guenét 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 : 2607-15.

6. Dusanter I, Mayeux P, Gisselbrecht S. Transduction du signal par les récepteurs de cytokines. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 825-35.

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 : 1395-401.

8. Gordon MS, Hoffman R. Growth factors affecting human thrombocytopoiesis : potential agents for the treatment of thrombocytopenia. *Blood* 1992 ; 80 : 302-7.

9. Metcalf D. Thrombopoietin - at last. *Nature* 1994 ; 369 : 519-20.

10. 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 LA, Goeddel DV, Eaton DL. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994 ; 369 : 533-8.

11. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Holpel MD, Burkhead SK, Kramer JM, Bell LA, Sprecher CA, Blumberg H, Johnson R, Prunkard D, Ching AFT, Mathewes SL, Balley MC, Forstrom JW, Buddle MM, Osborn SG, Evans SJ, Sheppard PO, Presnell SR, O'Harra PJ, Hagen FS, Roth GJ, Foster DC. Cloning and expression of murine thrombopoietin and stimulation of platelet production *in vivo*. *Nature* 1994 ; 369 : 565-8.

12. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Balley MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, Roth GJ, Papayannopoulou T, Foster DC. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994 ; 369 : 568-71.

13. Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, Florindo C, Teepe M, Titeux M, Methia N, Breton-Gorius J, Cosman D, Vainchenker W. c-Mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* 1994 ; 369 : 571-4.

14. McDonald TP. Bioassay for thrombopoietin utilizing mice in rebound thrombocytosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973 ; 144 : 1006-11.

**Françoise Wendling, Najet Debili,
Nassia Methia, Monique Titeux,
William Vainchenker**

*Inserm U 362, Institut Gustave Roussy,
PR1, 39, rue Camille-Desmoulins,
94805 Villejuif, France.*

TIRÉS A PART

F. Wendling.