

Anticorps anti-érythropoïétine humaine recombinante : une cause exceptionnelle de résistance à l'érythropoïétine

B. Viron¹, A. Kolta¹, J.-J. Kiladjian², F. Mignon¹, P. Mayeux⁴ et N. Casadevall³

¹Service de néphrologie, Hôpital Bichat, Paris; ²Service d'hématologie, Hôpital Beaujon, Clichy;

³Laboratoire d'hématologie, Hôtel-Dieu; ⁴INSERM U 363 ICGN, Hôpital Cochin, Paris

Résumé • Summary

Nous rapportons l'observation d'un patient de 70 ans, hémodialysé pour une néphropathie glomérulaire primitive, devenu résistant à l'EPO au bout de quatre ans. Après élimination des causes habituelles de résistance, le myélogramme révèle une érythroblastopénie. L'existence d'un anticorps anti-rHu-EPO, évoquée devant un taux sérique indétectable d'EPO, est étayée par l'effet inhibiteur du sérum autologue sur la lignée érythroïde en culture médullaire, et démontrée par immunoprécipitation. Il s'agit d'une IgG reconnaissant l'EPO même déglycosylée, donc dirigée contre la chaîne peptidique; la puissance de l'anticorps et l'absence de toute anomalie immunologique associée excluent cependant un auto-anticorps. L'immunisation anti-rHu-EPO est exceptionnelle. Sa gravité (transfusion-dépendance et risque d'hémosidérose), peut justifier un traitement immuno-modulateur.

Mots clés: Erythropoïétine humaine recombinante – Erythroblastopénie – Anticorps anti-EPO.

In a 70 year old man with primary glomerulonephritis, severe anemia occurred after 4 years on hemodialysis and rHu-EPO. The usual mechanisms of EPO-resistance were excluded. A bone marrow sample showed red cell aplasia. No circulating EPO could be detected; the serum inhibited the growth of erythroid precursors in bone marrow cultures. Immunoprecipitation identified an IgG anti-EPO, still active against deglycosylated EPO, i.e. directed against the peptidic matrix. Its high neutralising capacity and the absence of any immune abnormality rule out an auto-antibody.

Anti-rHu EPO immunisation is a very rare occurrence, made severe by transfusion-dependence and the risk of hemosiderosis. An immuno-modulating treatment can therefore be justified.

Key words: Human recombinant erythropoietin – Red cell aplasia – Anti-EPO antibodies.

● Abréviations

IRC : insuffisance rénale chronique
Hb : hémoglobine
EPO : érythropoïétine

rhu-EPO : érythropoïétine humaine recombinante

PCR : Polymerase Chain Reaction

CFU-E : Colony-Forming Units

GM-CSF : granulocytes/monocytes – Colony Stimulating Factor

■ Introduction

Les grandes études multicentriques des années 1986-88 avaient toutes conclu à l'absence d'immunisation contre l'érythropoïétine humaine recombinante (rHu-EPO).¹ Après plus de douze ans d'une utilisation massive chez l'insuffisant rénal chronique (IRC), cette certitude est encore largement partagée.² Nous rapportons ici un cas où l'apparition d'un anticorps anti-rHu-EPO a pu être clairement démontrée.

■ Observation

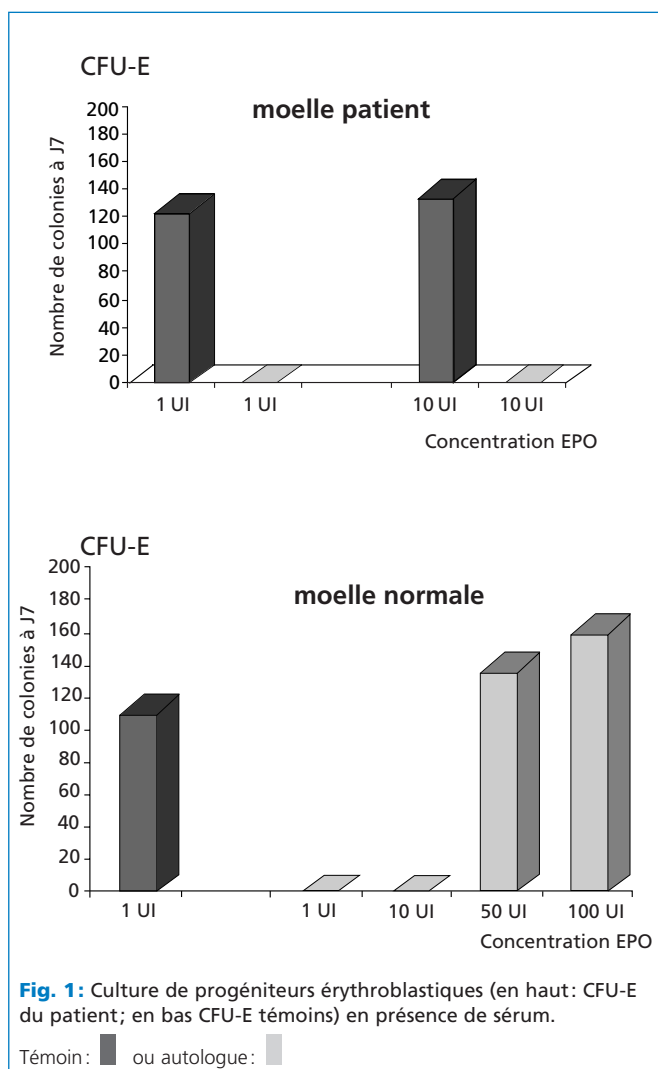
Monsieur CHAR., né en 1927, commence l'hémodialyse en novembre 1993 dans un tableau d'IRC diagnostiquée au stade

terminal chez un patient hypertendu. La néphropathie est considérée comme glomérulaire et primitive; toutes les investigations immunologiques sont négatives. L'hémoglobine est à 8,8 g/dl, et la survenue au cours du premier mois de dialyse d'un méléna massif (transfusion de 8 unités globulaires), révélateur d'angiodysplasies multiples du tube digestif, conduit à instaurer sans attendre un traitement par rHu-EPO qui sera d'emblée administré par voie sous-cutanée.

De janvier 1994 à mai 1998, le patient reçoit en moyenne 3000 UI d'EPO, soit 50 UI/kg, trois fois par semaine, et l'hémoglobine reste stable à 11 g/dl environ, à l'exception (mai 96) d'un épisode d'hématémèse ulcéreuse cataclysmique nécessitant la transfusion en quelques jours de dix-huit culots globulaires; après quoi le patient retrouve très rapidement son niveau d'hémoglobine et ses doses d'EPO habituels.

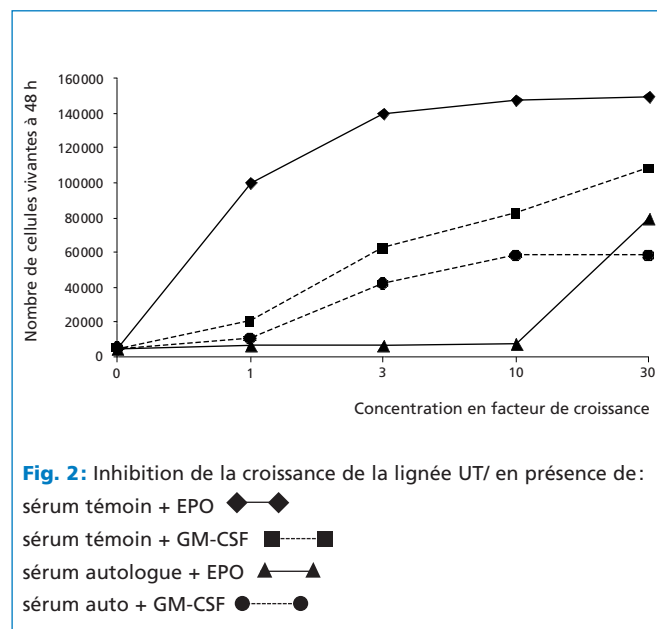
En juin 98, l'hémoglobine chute à 8 g/dl en l'absence de tout événement intercurrent. Une carence martiale et un syndrome inflammatoire sont éliminés; tous les marqueurs immunologiques sont négatifs; les différentes sérologies virales ne révèlent aucune séro-conversion, la PCR du parvovirus B19 est d'ailleurs négative; l'électro-immunophorèse des protéines plasmatiques est normale et un scanner abdomino-thoracique ne montre aucune anomalie. Le myélogramme révèle une érythroblastopénie centrale majeure (lignée rouge = 1%), isolée à la biopsie ostéo-médullaire: absence de fibrose comme d'infiltrat, caryotype médullaire normal; PCR du parvovirus B19 négative sur la moelle.

En dépit de l'augmentation progressive des doses de rHu-EPO (jusqu'à 80 UI/kg x 3), l'EPO circulante est indétectable en ELISA (RD-System). L'existence d'un inhibiteur est mise en évidence par culture in vitro des progéniteurs érythroblastiques (technique du caillot de plasma de bœuf), le milieu contenant différentes concentrations d'EPO. Les CFU-E provenant du patient ont une croissance tout à fait normale en présence de sérum témoin, mais cette croissance est totalement inhibée par l'addition de sérum autologue; celui-ci inhibe également la croissance d'une moelle témoin aux concentrations habituelles d'EPO dans le milieu et il faut atteindre une concentration très élevée pour que les CFU-E échappent à cette inhibition (fig. 1). Au



contraire la croissance des lignées granulocytaire et mégacaryocytaire est normale dans les mêmes conditions.

Il s'agit d'un inhibiteur spécifique de l'EPO, comme le prouve l'étude de la croissance in vitro de la lignée érythroleucémique « UT7 », dont les cellules expriment très fortement le récepteur à l'érythropoïétine. Stimulées par GM-CSF, les cellules UT7 (préablement lavées et incubées quatorze heures sans facteur de croissance) prolifèrent de façon similaire en présence de sérum témoin et de sérum du patient; au contraire, lorsque le facteur de croissance ajouté au milieu est l'EPO, le sérum du patient inhibe la prolifération cellulaire jusqu'à une concentration élevée d'EPO (fig. 2).



Cet inhibiteur est un anticorps qui précipite l'EPO marquée à l'iode 125, un pool de sérums de donneurs sains servant de témoin. Il s'agit d'une IgG, les immuno-précipités étant recueillis sur gel de protéine A sépharose.

Enfin, un test de déglycosylation de l'EPO par application successive de trois enzymes (sialidase, N-glycanase, O-glycanase) selon une technique déjà décrite³ montre que l'anticorps précipite aussi bien l'EPO déglycosylée qu'entière: il est donc dirigé contre le squelette protéique de la molécule.

L'étude de la prolifération de la lignée UT7 comme les tests d'immuno-précipitation permettent d'évaluer la puissance de cet anticorps neutralisant à environ 50 UI d'EPO par ml de plasma. L'arrêt de l'EPO est finalement décidé au vu de tous ces résultats en décembre 1998 et le taux d'anticorps va progressivement baisser (fig. 3). Néanmoins, le patient, devenu transfusion-dépendant dès juin 1998, continue à recevoir six à huit culots globulaires par mois associés à des perfusions per-dialytiques de desferrioxamine. Un traitement immuno-modulateur est donc décidé. En raison des antécédents ulcéreux contre-indiquant les corticoïdes, le patient reçoit en première intention deux doubles cures d'immunoglobulines IV (Tégeline®, 1 g/kg) à quinze jours d'intervalle en avril-mai, puis octobre-novembre 2000. Néanmoins, il n'a pas été observé à ce jour de diminution significative des besoins transfusionnels. En dépit de la décroissance régulière du taux d'anticorps et de la réapparition d'un taux détectable

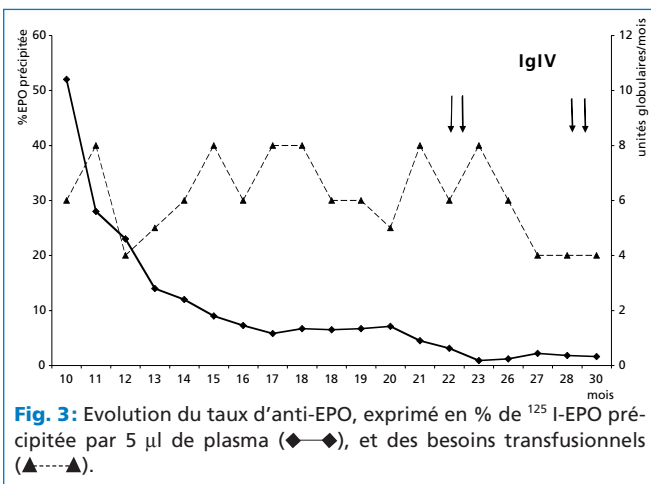


Fig. 3: Evolution du taux d'anti-EPO, exprimé en % de ¹²⁵I-EPO précipitée par 5 µl de plasma (◆—◆), et des besoins transfusionnels (▲---▲).

d'EPO sérique (78 mU/ml en mai 2000; normale en ELISA = 5-25 mU/ml pour des valeurs normales d'hémoglobine), les besoins transfusionnels restent à ce jour majeurs (≥ 4 culots par mois).

Discussion

Il s'agit donc d'une érythroblastopénie centrale acquise après plus de quatre ans de traitement par rHu-EPO, due à l'apparition d'un anticorps de type IgG neutralisant à la fois l'érythropoïétine recombinante et endogène, puisque l'EPO sérique est indétectable. Cet anticorps extrêmement puissant (ce qui explique l'absence d'amélioration malgré la diminution du titre), est exclusivement dirigé contre le squelette protéique et non les chaînes glycosylées, pourtant seules variantes par rapport à l'EPO endogène. Toutefois, il nous paraît peu vraisemblable qu'il s'agisse d'un auto-anticorps, en raison du taux sérique très élevé et de l'absence d'anomalie immunologique associée. En effet, les rares auto-anticorps anti-EPO endogènes décrits dans la littérature concernent le plus souvent, en tout cas chez l'adulte, des patients présentant une dysrégulation immunitaire associée à une infection virale,^{4,5} une hémopathie,⁶ ou un lupus;⁷ l'apparition transitoire d'anti-EPO, responsables d'une érythroblastopénie spontanément résolutive, est en règle l'apanage de l'enfant, à la notable exception de la patiente rapportée par Casadevall et coll.³ Dans tous les cas, les taux d'auto-anticorps anti-EPO endogène cités dans la littérature sont extrêmement faibles.

Rares sont les cas d'immunisation anti-rHu-EPO rapportés à ce jour.⁸⁻¹¹ Ces observations sont malheureusement hétérogènes, aussi bien en ce qui concerne les explorations pratiquées (dans deux d'entre elles, il n'y a eu aucune étude de la moelle !) que l'évolution spontanée ou traitée. Deux patients ont reçu un traitement corticoïde et/ou immunosuppresseur, suivi à brève échéance d'une transplantation, donc d'un traitement immunosuppresseur définitif; à noter qu'une patiente présentait un contexte d'immunisation anti-HLA large. Les Ig IV n'ont semblé-t-il jamais été utilisées dans cette indication, alors que leur efficacité a été rapportée dans les érythroblastopénies par auto-anticorps anti-EPO endogène.^{4,5,7} Récemment, la présence d'anti-rHu EPO a été rapportée dans une population dialysée avec une prévalence de 67%, mais par une technique d'immuno-enzymologie semi-quantitative détectant des anticorps dirigés contre la partie glycosylée qui n'induisent pas de résistance au traitement.¹²

Dans notre observation comme d'après les cas précédents, il est bien difficile de se faire une idée du mécanisme possible de l'immunisation. On peut dans chacune de ces observations, toujours isolées, éliminer aussi bien un contaminant exogène qu'une anomalie de la synthèse industrielle. L'administration successive chez notre patient d'époétine bêta (décembre 93-septembre 97), alpha (octobre 97-juin 98), puis à nouveau bêta (juillet 98-décembre 98) pourrait faire incriminer l'époétine alpha, mais rien ne permet de l'affirmer. De plus, la différence entre ces deux molécules concerne exclusivement la glycosylation, non responsable de l'immunisation chez ce patient. On sait que l'EPO endogène peut être génétiquement variante d'un individu à l'autre, ce qui autoriserait la reconnaissance comme protéine étrangère de la chaîne protéique de rHu-EPO; le délai d'immunisation paraît dans tous les cas, et tout particulièrement dans notre observation, incompatible avec cette hypothèse. En revanche, on ne peut exclure la survenue d'une altération structurale de la chaîne protéique, spontanée ou viro-induite, mais aucun stigmate d'infection virale n'a jamais été mis en évidence chez les différents patients concernés.

Conclusion

L'apparition d'anticorps anti rHu-EPO, bien qu'exceptionnelle, doit être évoquée *en dernier recours* devant une résistance acquise au traitement. Cette hypothèse sera confirmée par l'existence d'un taux sérique effondré d'EPO associé à une érythroblastopénie centrale. L'anticorps lui-même peut être mis en évidence indirectement par son effet inhibiteur sur les progéniteurs de la lignée rouge en culture, mais surtout directement par immuno-précipitation de l'EPO marquée.

Bien que les molécules utilisées en thérapeutique diffèrent très légèrement de l'EPO endogène humaine pour la partie glycosylée, c'est le squelette protéique qui paraît immunogène, mais le mécanisme de cette immunisation reste obscur.

Les implications cliniques sont sévères: transfusion-dépendance et arrêt définitif du traitement par rHu-EPO. En l'absence d'amélioration spontanée, on sera donc amené à discuter l'instauration d'un traitement immuno-modulateur, dont les modalités restent à définir... et l'efficacité à démontrer.

Adresse de correspondance:

Dr Béatrice Viron
Service de néphrologie
Hôpital Bichat
F-75877 Paris Cedex 18



Références

1. Winearls CG. Historical review on treatment use of recombinant human erythropoietin in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10 (Suppl. 2): 3-9.

2. Working Party for European Best Practice Guidelines for the Management of Anemia in patients with Chronic Renal Failure. Guideline 14 = causes of an inadequate response to epoietin treatment. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 25-7.
3. Casadevall N, Dupuy E, Molho-Sabatier P, Tobelem G, Varet B, Mayeux P. Anti-antibodies against erythropoietin in a patient with pure red cell aplasia. *N Engl J Med* 1996; 334: 630-3.
4. Moudgil A, Shidban H, Nast CC, Bagga A, Aswad S, Graham SL, Mendez R, Jordan SC. Parvovirus B19 infection-related complications in renal transplant recipients: Treatment with intravenous immunoglobulin. *Transplantation* 1997; 64: 1847-50.
5. Koduri PR, Kumapley R, Valladares J, Teter C. Chronic pure red cell aplasia caused by parvovirus B19 in AIDS: Use of intravenous immunoglobulins; a report of eight patients. *Am J Hematol* 1999; 61: 16-20.
6. Steinberg JJ, Huang PL, Ljubich P, Lee Huang S. Anti-erythropoietin antibodies in hyperviscosity syndrome associated with giant lymph node hyperplasia (Castelman's disease). *Br J Haematol* 1990; 74: 543-4.
7. Linardaki GD, Boki KA, Tzioufas AG. Pure red cell aplasia as presentation of systemic lupus erythematosus: Antibodies to erythropoietin. *Scand J Rheumatol* 1999; 28: 189-91.
8. Montagnac R, Boffa GA, Schillinger F, Guillaumie J. Sensibilisation à l'érythropoïétine humaine recombinante chez une hémodialysée. *Néphrologie* 1992; 21: 84-5.
9. Bergrem H, Danielson BG, Kaci-Uwe E, Kurtz A, Stridsberg M. In *Erythropoietin Molecular Physiology and Clinical Applications*. New York: Marcel Dekker ed, 1993; 265-75.
10. Prabhakar SS, Muhlfelder T. Antibodies to recombinant human erythropoietin causing pure red cell aplasia. *Clin Nephrol* 1997; 47: 331-5.
11. Peces R, de la Torre M, Alcazar R, Urre JM. Antibodies against recombinant human erythropoietin in a patient with erythropoietin resistant anemia. *N Engl J Med* 1996; 335: 523-4.
12. Castelli G, Famularo A, Semino C, Machi AM, Ceci A, Cannella G, Melioli G. Detection of anti-erythropoietin antibodies in haemodialysis patients treated with recombinant human-erythropoietin. *Pharmacol Res* 2000; 41: 313-8.