



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

FACULTE DE PHARMACIE

ERYTHROPOIETINE : DE LA PHYSIOLOGIE AUX UTILISATIONS MEDICALES ET NON MEDICALES ROLE DU PHARMACIEN D'OFFICINE DANS LA DELIVRANCE

THESE



Présentée et soutenue publiquement

Le 1^{er} avril 2008

Pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Maxime DAUBLIN

né le 20 janvier 1982

Membres du Jury

| | | |
|----------------|--------------------------------|--|
| Président : | Mme B. FAIVRE | Maître de conférences |
| Codirecteurs : | Mme B. FAIVRE M. G. TROCKLE | Maître de conférences Maître de conférences |
| Juges | M. C. DIDIER | Docteur en Pharmacie |



FACULTE DE PHARMACIE

ERYTHROPOIETINE : DE LA PHYSIOLOGIE AUX UTILISATIONS MEDICALES ET NON MEDICALES ROLE DU PHARMACIEN D'OFFICINE DANS LA DELIVRANCE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 1^{er} avril 2008

Pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Maxime DAUBLIN

né le 20 janvier 1982

Membres du Jury

| | | |
|----------------|--------------------------------|--|
| Président : | Mme B. FAIVRE | Maître de conférences |
| Codirecteurs : | Mme B. FAIVRE M. G. TROCKLE | Maître de conférences Maître de conférences |
| Juges | M. C. DIDIER | Docteur en Pharmacie |

UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN

Chantal FINANCE

Vice-Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Commission des Relations Internationales

Janine SCHWARTZBROD

Responsable de la Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la Commission Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :

Gérald CATAU

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du CEPH :

(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Jean-Michel SIMON

Doyen Honoraire : Claude VIGNERON

Professeur Emérite : Gérard SIEST

Professeurs Honoraires

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMAN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Louis SCHWARTZBROD

Maîtres de Conférences Honoraires

Marie-Claude FUZELLIER

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Assistante Honoraire

Madame BERTHE

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

| | |
|---------------------------------------|--|
| Alain ASTIER (en disponibilité) | Pharmacie clinique |
| Jeffrey ATKINSON | Pharmacologie |
| Gilles AULAGNER | Pharmacie clinique |
| Alain BAGREL | Biochimie |
| Jean-Claude BLOCK | Santé publique |
| Christine CAPDEVILLE-ATKINSON | Pharmacologie cardiovasculaire |
| Chantal FINANCE | Virologie, Immunologie |
| Pascale FRIANT-MICHEL | Mathématiques, Physique, Audioprothèse |
| Marie-Madeleine GALTEAU..... | Biochimie clinique |
| Christophe GANTZER | Microbiologie environnementale |
| Max HENRY | Botanique, Mycologie |
| Jean-Yves JOUZEAU | Bioanalyse du médicament |
| Pierre LABRUDE | Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile |
| Dominique LAURAIN-MATTAR..... | Pharmacognosie |
| Isabelle LARTAUD..... | Pharmacologie |
| Pierre LEROY..... | Chimie physique générale |
| Philippe MAINCENT..... | Pharmacie galénique |
| Alain MARSURA..... | Chimie thérapeutique |
| Jean-Louis MERLIN..... | Biologie cellulaire oncologique |
| Alain NICOLAS..... | Chimie analytique |
| Jean-Bernard REGNOUF de VAINS..... | Chimie thérapeutique |
| Bertrand RIHN..... | Biochimie, Biologie moléculaire |
| Janine SCHWARTZBROD | Bactériologie, Parasitologie |
| Jean-Michel SIMON..... | Economie de la santé, Législation pharmaceutique |
| Claude VIGNERON..... | Hématologie, Physiologie |

MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|-------------------------|--|
| Monique ALBERT..... | Bactériologie, Virologie |
| Sandrine BANAS..... | Parasitologie |
| Mariette BEAUD..... | Biologie cellulaire |
| Emmanuelle BENOIT..... | Communication et Santé |
| Michel BOISBRUN..... | Chimie thérapeutique |
| Catherine BOITEUX..... | Biophysique, Audioprothèse |
| François BONNEAUX..... | Chimie thérapeutique |
| Cédric BOURA..... | Physiologie |
| Gérald CATAU..... | Pharmacologie |
| Jean-Claude CHEVIN..... | Chimie générale et minérale |
| Igor CLAROT..... | Chimie analytique |
| Jocelyne COLLOMB..... | Parasitologie, Organisation animale |
| Joël COULON..... | Biochimie |
| Sébastien DADE..... | Bio-informatique |
| Bernard DANGIEN..... | Botanique, Mycologie |
| Dominique DECOLIN..... | Chimie analytique |
| Béatrice DEMORE..... | Pharmacie clinique |
| Joël DUCOURNEAU..... | Biophysique, Audioprothèse, Acoustique |
| Florence DUMARCAY..... | Chimie thérapeutique |
| François DUPUIS..... | Pharmacologie |

| | |
|--------------------------------|---|
| Raphaël DUVAL..... | Microbiologie clinique |
| Béatrice FAIVRE..... | Hématologie |
| Luc FERRARI..... | Toxicologie |
| Stéphane GIBAUD..... | Pharmacie clinique |
| Françoise HINZELIN..... | Mycologie, Botanique |
| Thierry HUMBERT..... | Chimie organique |
| Frédéric JORAND..... | Santé et Environnement |
| Francine KEDZIEREWICZ..... | Pharmacie galénique |
| Alexandrine LAMBERT..... | Informatique, Biostatistiques |
| Brigitte LEININGER-MULLER..... | Biochimie |
| Stéphanie MARCHAND..... | Chimie physique |
| Faten MEHRI-SOUSSI..... | Hématologie biologique |
| Patrick MENU..... | Physiologie |
| Christophe MERLIN..... | Microbiologie environnementale et moléculaire |
| Blandine MOREAU..... | Pharmacognosie |
| Dominique NOTTER..... | Biologie cellulaire |
| Francine PAULUS..... | Informatique |
| Christine PERDICAKIS..... | Chimie organique |
| Caroline PERRIN-SARRADO..... | Pharmacologie |
| Virginie PICHON..... | Biophysique |
| Anne SAPIN..... | Pharmacie galénique |
| Marie-Paule SAUDER..... | Mycologie, Botanique |
| Nathalie THILLY..... | Santé publique |
| Gabriel TROCKLE..... | Pharmacologie |
| Mohamed ZAIYOU..... | Biochimie et Biologie moléculaire |
| Colette ZINUTTI..... | Pharmacie galénique |

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER..... Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD..... Anglais

ASSISTANT

Annie PAVIS..... Bactériologie

SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION DE L'UNIVERSITE (SCD)

Anne-Pascale PARRET..... Directeur

Frédérique FERON..... Responsable de la section Pharmacie-Odontologie

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



«LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES,
CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME
PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Je dédie ce travail à mes grands-parents,
Partis trop tôt

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les services documentaires des laboratoires JANSSEN- CILAG, ROCHE et AMGEN pour m'avoir procuré les références bibliographiques dont j'avais besoin.

Je remercie également le centre de Pharmacovigilance de Nancy et Sophie MENETRE, pharmacien à la Pharmacie de l'Hôpital Central de Nancy d'avoir mis à ma disposition leurs services documentaires.

J'adresse mes sincères remerciements aux grossistes répartiteurs et en particulier à Monsieur BECKER de la CERP, Monsieur THEVENET de l'OCP et Monsieur FRANCOIS d'ALLIANCE SANTE pour m'avoir permis de distribuer les questionnaires de l'enquête aux pharmacies par l'intermédiaire de leurs livreurs.

A mon Codirecteur et Président de thèse,

Madame Béatrice FAIVRE,

Maître de Conférences en Hématologie à la Faculté de Pharmacie de Nancy,

Pour l'attention que vous avez portée à cette thèse malgré vos nombreuses obligations,
Pour l'honneur que vous me faites en jugeant ce travail,
Veuillez trouver, en cet ouvrage, l'expression de mes sincères remerciements.

A mon Codirecteur de thèse,

Monsieur Gabriel TROCKLE,

Maître de Conférences en Pharmacodynamie à la Faculté de Pharmacie de Nancy,

Pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée afin de réaliser ce travail,
Pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre patience...,
Pour la qualité de vos enseignements,
Veuillez trouver, en ce travail, l'expression de mon profond respect et de ma vive gratitude.

A mon juge,

Monsieur Christophe DIDIER,

Docteur en pharmacie, co-titulaire de la Pharmacie de la Salle à Nancy,

Pour avoir accepté aussi spontanément de juger mon travail,
Pour m'avoir fait partager ton expérience en officine et m'avoir mis le pied à l'étrier,
Reçois ces remerciements comme ma sincère reconnaissance.

A mes parents,

Pour tout l'amour et toute l'affection que vous me portez,
Pour avoir toujours été présents, attentifs et bienveillants,
Pour le soutien, la confiance et la patience dont vous m'avez entouré tout au long de mon parcours,
Voyez en ce travail, l'aboutissement de vos sacrifices et l'expression de tout mon amour.
Je ne vous remercierai jamais assez.

A Vincent,

Pour le soutien que tu m'as apporté l'année du concours,
Pour toutes ces années de bonheur, d'engueulades, de fous rires,
Tu as toujours pris soin de ton petit frère,
Tu es trop loin de moi mais n'oublie jamais que je t'aime et que tu peux compter sur moi.

A ma tata,

Pour toutes ces années à t'occuper de moi et de Vincent,
Pour tes pommes de terre sautées, tes gâteaux au chocolat,
Tu resteras toujours pour moi « ma 2^{ème} maman ».

A Elodie,

Pour m'avoir soutenu et rassuré en particulier à la fin de ce travail,
Pour la patience dont tu as fait preuve (et dieu sait qu'il en a fallu),
Pour ta présence à mes côtés et l'amour que tu me témoignes chaque jour,
Vois en ce travail, le début d'une longue histoire, Notre Histoire,
Avec tout mon amour...

A Ma Soph (et Younes),

Pour ces 18 années d'amitié sans nuage,
Pour avoir toujours été présente et m'avoir supporté dans les moments difficiles,
Pour tout ce que nous avons partagé,
Juste un grand merci.

A Sarah (et Florent),

Pour tous ces après-midi de dur labeur à réviser la myco, la bota et tous les autres...

Pour ton soutien, ton écoute, ta franchise,

La Fac est finie, mais la vie commence.

A Seb (et Emilie),

Nous sommes devenus pharmaciens la même année,

Te voilà marié, bientôt papa, bientôt docteur,

Merci de me faire partager tous ces moments avec vous.

A Paul et Alexia,

Je vous ai connu simples copains de promo, puis amis, vous voilà mari et femme,

Que votre bonheur déteigne sur nous.

A Jérôme,

Pour toutes les claques que tu m'as données et les conseils qui allaient avec,

Pour ces si bons mais déjà si loin moments à la Marina : Camargue 2000, la soustence et j'en passe...

Merci pour tout.

A Bichon, Cyril, Isa, Delph, Gaëlle, Céline, Sandra, Elisabete, Adeline,

Pour toutes ces années passées sur les bancs de la Fac,

Pour tous ces verres levés,

Pour tous les petits fours qu'ils nous restent à déguster aux soirées de formation...

A David, Aurélien, Cédric, Elodie, Gérald,

Poinca est peut-être loin maintenant mais « qu'est-ce que c'était le bon temps... ! »

A Monsieur MARSAT et à toute l'équipe de l'ex-Pharmacie Marsat à Fains-les-Sources,
Merci pour votre accueil chaleureux et la confiance que vous m'avez témoignée,
Merci de m'avoir fait partager vos connaissances et votre amour du métier.

A toute l'équipe de la Pharmacie de la Salle à Nancy,
Monsieur Christophe DIDIER et Monsieur Pascal LIBERT,
Annick, Greg, Madeleine, Corine, Claire,

Merci pour ces 6 mois passés ensemble (les miens et les vôtres) et pour tous les bons moments à venir,

Merci de m'avoir donné l'opportunité d'exercer en tant que pharmacien,

Merci à Annick pour sa bonne humeur et à Greg, eeeuuuhhh, pour autre chose...

A toute l'équipe de la Pharmacie de la Primatiale à Nancy,
Monsieur Thierry HOLVECK, Marjorie,

Merci pour mon 1^{er} salaire en tant qu'adjoint,

Merci pour la confiance que tu m'accordes en acceptant de te seconder.

A Cathy,

Pour avoir si gentiment accepté de relire ce pavé...

A tous ceux,

Qui d'une manière ou d'une autre, m'ont apporté leur soutien et leur aide.

Table des matières

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| PREMIERE PARTIE : L'ERYTHROPOÏESE ET SA REGULATION..... | 2 |
| I. L'ERYTHROPOÏESE | 2 |
| A. EMBRYOGENESE | 2 |
| 1. Période mésodermique | 2 |
| 2. Période hépatique | 3 |
| 3. Période médullaire..... | 3 |
| B. LA LIGNEE ERYTHROCYTAIRE | 4 |
| 1. Les cellules souches hématopoïétiques..... | 4 |
| 2. Les progéniteurs | 7 |
| 3. Les précurseurs : compartiment de maturation | 9 |
| a) Le proérythroblaste | 11 |
| b) Les érythroblastes basophiles I et II..... | 11 |
| c) Les érythroblastes polychromatophiles..... | 11 |
| d) Les érythroblastes acidophiles | 11 |
| e) Les réticulocytes | 12 |
| f) L'hématie mature | 12 |
| 4. L'îlot érythroblastique | 12 |
| C. CINETIQUE DE L'ERYTHROPOÏESE..... | 14 |
| D. LES MARQUEURS DE LA LIGNEE ERYTHROCYTAIRE | 15 |
| | |
| II. REGULATION DE L'ERYTHROPOÏESE..... | 17 |
| A. DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES ET ORIENTATION VERS UNE LIGNEE DONNEE .. | 17 |
| B. LE MICROENVIRONNEMENT MEDULLAIRE..... | 18 |
| 1. Les facteurs diffusibles stromales..... | 18 |
| 2. Les facteurs contacts..... | 19 |
| a) Un rôle d'attraction..... | 19 |
| b) Un rôle de stockage des facteurs de croissance..... | 19 |
| C. FACTEURS NUCLEAIRES..... | 20 |
| 1. Facteurs de transcription de la famille GATA..... | 20 |
| 2. « Erythroid Kupel like factor » (EKLF) | 20 |
| 3. Autres facteurs de transcription impliqués dans la différenciation érythrocytaire..... | 20 |
| D. FACTEURS SOLUBLES REGULANT L'ERYTHROPOÏESE AUTRES QUE L'EPO | 21 |
| 1. Facteurs de croissance hématopoïétiques | 21 |
| a) Le Stem Cell Factor (SCF ou facteur Steel)..... | 22 |
| b) L'interleukine-3 (IL-3)..... | 23 |
| c) Le Granulocyte / Monocyte - colony stimulating factor (GM-CSF)..... | 23 |
| d) L'interleukine-1 α (IL-1 α) | 23 |
| e) L'interleukine-6 (IL-6)..... | 23 |
| f) L'interleukine-4 (IL-4)..... | 24 |
| g) L'interleukine-9 (IL-9 ou P 40)..... | 24 |
| 2. Facteurs de croissance non hématopoïétiques | 24 |
| a) Insuline et les « insuline like growth factor » (IGF1 et IGF2)..... | 24 |
| b) L'hormone de croissance | 24 |
| c) Les hormones thyroïdiennes | 25 |
| d) L'activine | 25 |
| 3. Facteurs exogènes nécessaires à l'érythropoïèse | 25 |
| 4. Facteurs d'inhibition : régulation négative | 25 |

| | |
|---|-----------|
| E. MECANISMES DE LA REGULATION DE L'ERYTHROPOÏESE..... | 26 |
| III. L'ERYTHROPOÏËTINE..... | 28 |
| A. STRUCTURE MOLECULAIRE | 28 |
| B. LES SITES DE SYNTHÈSE DE L'ERYTHROPOÏËTINE | 31 |
| 1. Le rein..... | 32 |
| 2. Le foie..... | 32 |
| 3. Autres sites de production de l'EPO..... | 32 |
| C. REGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE DE L'ERYTHROPOÏËTINE..... | 33 |
| 1. Le gène de l'EPO..... | 33 |
| 2. Régulation de l'expression du gène de l'EPO | 34 |
| a) Bases moléculaires de la régulation du gène par l'hypoxie | 34 |
| b) Hypoxie et voie de signalisation : découvertes récentes | 38 |
| c) Spécificité tissulaire de la production d'EPO | 40 |
| D. LE RECEPTEUR DE L'ERYTHROPOÏËTINE | 42 |
| 1. Les cellules cibles..... | 42 |
| 2. Structure de l'EPO-R..... | 42 |
| 3. Le récepteur de l'érythropoïétine est un dimère | 44 |
| E. ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'ERYTHROPOÏËTINE | 45 |
| 1. Régulation positive..... | 46 |
| 2. Régulation négative..... | 49 |
| F. ANOMALIES DE L'ERYTHROPOÏËSE | 51 |
| 1. Anémies..... | 51 |
| 2. Polyglobulies | 52 |
| a) Polyglobulies secondaires | 52 |
| b) Polyglobulies primitives | 53 |
| (1) Polyglobulies de Vaquez..... | 53 |
| (2) Polyglobulies primitives familiales..... | 53 |
| (3) Polyglobulies de Chuvash | 54 |
| c) Erythrocytose | 54 |
| 3. Érythroleucémies..... | 55 |
| IV. CONCLUSION | 55 |
| DEUXIEME PARTIE : L'ERYTHROPOÏËTINE HUMAINE RECOMBINANTE..... | 56 |
| I. LA PRODUCTION INDUSTRIELLE OU L'ESSOR DE LA BIOTECHNOLOGIE | 56 |
| A. HISTORIQUE | 56 |
| B. LES GRANDES ETAPES QUI ABOUTIRONT A LA PRODUCTION INDUSTRIELLE DE L'ERYTHROPOÏËTINE..... | 57 |
| II. LES DIFFERENTS AGENTS STIMULANT L'ERYTHROPOÏËSE..... | 58 |
| A. RECAPITULATIF DES SPECIALITES COMMERCIALISEES EN FRANCE..... | 58 |
| B. LES EPOËTINES..... | 59 |
| 1. Glycosylation et activité <i>in vitro/in vivo</i> | 60 |
| 2. Différences entre époétine- α et époétine- β | 61 |
| 3. Époétine- ω et époétine- δ | 62 |
| C. UNE NOUVELLE PROTEINE STIMULANT L'ERYTHROPOÏËSE (NESP) : LA DARBEPOËTINE-A. 63 | |
| D. CERA : CONTINUOUS ERYTHROPOIESIS RECEPTOR ACTIVATOR OU ACTIVATEUR PERMANENT DU RECEPTEUR DE L'ERYTHROPOÏËTINE | 66 |
| III. EFFETS INDESIRABLES DU TRAITEMENT PAR ERYTHROPOÏËTINE..... | 66 |
| A. HYPERTENSION ARTERIELLE | 67 |
| 1. Augmentation du volume de sang | 67 |
| 2. Augmentation des résistances vasculaires périphériques..... | 68 |

| | | |
|------------|---|-------------------|
| a) | Augmentation de la viscosité sanguine | 68 |
| b) | Augmentation rapide de la P _p O ₂ dans les tissus | 68 |
| 3. | Facteurs hormonaux | 69 |
| 4. | Effets vasoconstricteurs | 69 |
| 5. | Conclusion | 69 |
| B. | THROMBOSES VASCULAIRES | 70 |
| C. | CRISES EPILEPTIQUES | 72 |
| D. | HYPERKALIEMIE | 73 |
| E. | DIMINUTION DE LA QUALITE DE LA DIALYSE | 74 |
| F. | SYNDROME PSEUDO-GRIPPAL | 75 |
| G. | REACTIONS ALLERGIQUES ET CUTANÉES | 75 |
| H. | DOULEUR AU POINT D'INJECTION SOUS-CUTANÉE | 77 |
| I. | ALOPECIE | 78 |
| IV. | <u>PERTE D'EFFICACITE DU TRAITEMENT PAR EPO</u> | <u>79</u> |
| A. | RESISTANCE A L'EPO : ANTICORPS ANTI-ERYTHROPOÏÉTINE | 80 |
| 1. | Erythroblastopénie | 81 |
| 2. | Polysorbate 80, responsable mais pas coupable | 82 |
| B. | CARENCE MARTIALE | 84 |
| C. | ÉTATS INFLAMMATOIRES AIGUS OU CHRONIQUES ET NEOPLASIES | 87 |
| D. | SURCHARGE ALUMINIQUE | 89 |
| E. | HYPERPARATHYROÏDIE SECONDAIRE | 90 |
| F. | CONCLUSION | 90 |
| | <u>TROISIEME PARTIE : INDICATIONS MEDICALES ET NON MEDICALES</u> | <u>91</u> |
| I. | <u>INDICATIONS MEDICALES AYANT REÇU UNE AMM</u> | <u>91</u> |
| A. | EN NEPHROLOGIE : TRAITEMENT DE L'ANEMIE DE L'INSUFFISANT RENAL CHRONIQUE | |
| | DIALYSE ET NON-DIALYSE | 91 |
| 1. | Anémie de l'insuffisant rénal chronique | 91 |
| 2. | Traitement par Eprex [®] | 93 |
| 3. | Traitement par Neorecormon [®] | 94 |
| 4. | Traitement par Aranesp [®] | 95 |
| B. | EN ONCOLOGIE : TRAITEMENT DE L'ANEMIE DES CANCERS | 95 |
| 1. | Données épidémiologiques sur l'anémie dans les affections malignes | 95 |
| 2. | Rôle de l'anémie des cancers | 96 |
| 3. | Mécanismes | 98 |
| 4. | Traitement de l'anémie des cancers par l'érythropoïétine | 99 |
| a) | Eprex [®] | 99 |
| b) | Neorecormon [®] | 100 |
| c) | Aranesp [®] | 101 |
| C. | EN CHIRURGIE | 102 |
| 1. | EPO et transfusion autologue programmée (TAP) | 103 |
| a) | Principe de la TAP | 103 |
| b) | Indications de l'EPO | 104 |
| 2. | EPO et chirurgie orthopédique majeure programmée | 107 |
| a) | Indication d'Eprix [®] | 107 |
| b) | Précautions d'emploi | 108 |
| c) | Coût de l'EPO | 109 |
| D. | EN NEONATOLOGIE : PREVENTION DE L'ANEMIE DU NOUVEAU-NE PREMATURE | 110 |
| 1. | Introduction | 110 |
| 2. | Efficacité de l'EPO | 111 |
| II. | <u>INDICATIONS MEDICALES EN DEVELOPPEMENT</u> | <u>112</u> |
| A. | EPO ET NEUROPROTECTION | 112 |
| 1. | EPO et son récepteur EPO-R | 113 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 2. | Études sur culture cellulaire | 113 |
| 3. | Études animales | 113 |
| 4. | Mécanismes possibles..... | 114 |
| a) | Effets neuroprotecteurs directs..... | 114 |
| b) | Effets neuroprotecteurs indirects..... | 115 |
| 5. | Études humaines..... | 115 |
| a) | En cancérologie..... | 115 |
| b) | En hématologie | 116 |
| c) | En néphrologie..... | 116 |
| B. | L'EPO COMME FACTEUR TROPHIQUE POUR L'INTESTIN | 117 |
| 1. | Rôle de l'érythropoïétine au cours du développement fœtal et dans les premières semaines de vie post-natale | 117 |
| 2. | L'EPO en tant que facteur trophique | 118 |
| 3. | Applications pratiques | 119 |
| C. | EPO ET CANCER CHEZ L'ENFANT | 119 |
| D. | EPO ET RADIOTHERAPIE..... | 121 |
| E. | EPO ET ANEMIE DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE..... | 125 |
| 1. | Données épidémiologiques..... | 125 |
| 2. | Mécanismes de l'anémie dans l'insuffisance cardiaque | 126 |
| 3. | Traitement de l'anémie dans l'insuffisance cardiaque..... | 126 |
| 4. | Autres applications possibles du traitement par érythropoïétine dans l'insuffisance cardiaque..... | 127 |
| F. | AUGMENTATION PREOPERATOIRE DE LA STIMULATION ERYTHROPOÏETIQUE DES PATIENTS NE SOUHAITANT PAS ETRE TRANSFUSES..... | 128 |
| G. | CORRECTION DE L'ANEMIE DES MYELODYSPLASIES | 129 |
| 1. | Rationnel de l'utilisation de l'EPO..... | 130 |
| 2. | Traitement de l'anémie par l'érythropoïétine seule | 130 |
| 3. | Traitement de l'anémie par l'association EPO/G-CSF..... | 131 |
| H. | EPO ET PERSPECTIVES TRANSFUSIONNELLES..... | 133 |
| 1. | Contrôler <i>in vitro</i> la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques | 133 |
| 2. | Produire des globules rouges <i>in vitro</i> | 134 |
| 3. | Des applications multidisciplinaires | 136 |
| a) | Transfusion sanguine | 137 |
| b) | Parasitologie..... | 137 |
| c) | Un nouveau vecteur médicamenteux | 138 |
| d) | Perspectives | 138 |
| I. | ANEMIE EN GYNECOLOGIE..... | 138 |
| 1. | Traitement de l'anémie en chirurgie gynécologique | 138 |
| 2. | Traitement de l'anémie pendant la grossesse et le post-partum..... | 140 |
| J. | TRAITEMENT DE L'ANEMIE DES PATIENTS ATTEINTS D'UNE HEPATITE C CHRONIQUE SOUS INTERFERON/RIBAVIRINE | 140 |
| K. | TRAITEMENT DES ANEMIES HEMOLYTIQUES IMMUNES..... | 142 |
| L. | ANEMIE ET INFECTION PAR LE VIH | 142 |
| III. | ÉRYTHROPOÏÉTINE ET DOPAGE SANGUIN..... | 143 |
| A. | TRANSPORT DE L'OXYGENE ET PERFORMANCE SPORTIVE..... | 144 |
| B. | METHODES D'AUGMENTATION DU TRANSPORT D'OXYGENE..... | 145 |
| 1. | L'entraînement en altitude..... | 145 |
| 2. | L'érythropoïétine..... | 146 |
| 3. | Les produits du futur..... | 147 |
| a) | Les mimétiques de l'EPO | 147 |
| b) | Les micro-bioréacteurs..... | 147 |
| c) | La thérapie génique..... | 148 |
| C. | DETECTION DE L'USAGE ILLICITE DE L'ERYTHROPOÏÉTINE | 148 |
| 1. | Dépistage direct | 148 |
| 2. | Dépistage indirect..... | 149 |
| a) | Morphologie érythrocytaire | 149 |
| b) | Fibrinolyse | 150 |
| c) | Récepteurs solubles à la transferrine..... | 150 |

| | |
|--|------------|
| d) Hématocrite..... | 151 |
| <u>QUATRIEME PARTIE : ETAT DES LIEUX DES CONNAISSANCES DES PHARMACIENS D'OFFICINE 154</u> | |
| <u>I. PRESENTATION DE L'ENQUETE.....</u> | 154 |
| A. OBJECTIFS DE L'ETUDE | 154 |
| B. METHODOLOGIE | 154 |
| 1. Élaboration du questionnaire | 155 |
| 2. Cible du questionnaire | 157 |
| <u>II. RESULTATS DE L'ENQUETE</u> | 157 |
| A. LE PHARMACIEN ET LA FORMATION CONTINUE | 157 |
| B. LE PHARMACIEN ET L'ERYTHROPOÏÉTINE | 161 |
| <u>III. DISCUSSION.....</u> | 172 |
| <u>CONCLUSION.....</u> | 175 |
| <u>LISTE DES ABREVIATIONS.....</u> | 178 |
| <u>LISTE DES FIGURES.....</u> | 181 |
| <u>LISTE DES TABLEAUX</u> | 183 |
| <u>ANNEXES.....</u> | 184 |
| <u>BIBLIOGRAPHIE.....</u> | 199 |

Introduction

INTRODUCTION

EPO et dopage sont indissociables dans l'esprit collectif, principalement depuis le tour de France cycliste 1998 et les révélations de l'affaire FESTINA.

Mais l'érythropoïétine est avant tout une hormone naturellement produite dans notre organisme, qui a été découverte il y a un peu plus d'un siècle. C'est le facteur de croissance principal des globules rouges. Ce puissant agent antianémique n'a pu être utilisé en thérapeutique humaine qu'à partir de 1989 grâce aux progrès industriels et au développement des biotechnologies. Utilisée au départ dans le traitement de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique, l'EPO a vu le nombre de ses indications augmenter au cours de ces deux décennies : anémie des cancers, des tumeurs solides mais également programme de transfusions autologues et chirurgie orthopédique majeure programmée.

L'érythropoïèse est un phénomène complexe dont la régulation met en jeu de nombreux facteurs de croissance. Nous aborderons dans la première partie de ce travail l'EPO en tant qu'hormone naturelle. Nous envisagerons sa synthèse, son activité biologique et nous ferons le point sur sa place dans la régulation de l'érythropoïèse. Nous poursuivrons par l'étude de l'EPO recombinante avec la présentation des différents agents stimulant l'érythropoïèse et nous traiterons ensuite des limites d'un traitement par EPO. Dans la troisième partie, nous développerons les différentes utilisations de l'EPO, celles approuvées bénéficiant d'une AMM et celles en étude. Mais nous évoquerons également les dérives liées à l'utilisation de l'EPO dans la pratique sportive, les risques de ce dopage ainsi que les méthodes de dépistage de cette utilisation illicite.

Les spécialités à base d'EPO sont sorties de la réserve hospitalière en 2005. Nous avons réalisé une enquête auprès de pharmaciens d'officine afin de connaître leurs pratiques professionnelles quotidiennes vis-à-vis de ce médicament. Nous exposerons les résultats de cette enquête dans la quatrième partie de cette thèse. Ce travail va permettre de dresser un bilan des connaissances des officinaux deux ans après le passage en ville des EPO. A quelle fréquence sont-ils confrontés à ces nouveaux médicaments ? Quels conseils donnent-ils à leurs patients ? Se sentent-ils suffisamment formés pour réaliser en toute confiance la délivrance de ces produits ?

Première partie :

**L'érythropoïèse et
sa régulation**

Première Partie : L'érythropoïèse et sa régulation

I. L'érythropoïèse

120 jours. C'est la durée de vie moyenne d'un globule rouge dans l'organisme. Cependant, le nombre de globules rouges est constant dans la circulation. Ils sont donc en perpétuel renouvellement. Le processus complexe qui aboutit à la formation de 100 milliards d'hématies par jour est appelé érythropoïèse et a lieu, chez l'homme adulte, dans la moelle osseuse. Cette production est constante et suffisante pour s'adapter aux besoins en oxygène des tissus périphériques. C'est un phénomène qui peut, en cas de besoin accru, être multiplié par 7 ou 8 [88, 112, 151].

A. Embryogenèse

Le tissu hématopoïétique apparaît tôt au cours du développement embryonnaire humain. Il va progressivement évoluer dans ses localisations, ses fonctions et ses aspects cytologiques pour aboutir, à la naissance, à une hématopoïèse de type adulte [184].

On distingue trois périodes :

1. Période mésodermique

Dès le 21^e jour, on peut déceler la présence d'îlots de cellules sanguines, simultanément à l'angiogenèse. Les cellules primitives qui assurent cette production se différencient dans le tissu mésenchymateux extra-embryonnaire, au contact de la vésicule vitelline (îlots de Wolf et Pander). Ces îlots représentent les aspects les plus précocement identifiables des cellules souches hématopoïétiques (CSH). A ce stade, leur différenciation est principalement érythrocytaire [111].

Les cellules érythropoïétiques ainsi formées synthétisent une hémoglobine embryonnaire.

2. Période hépatique

Dès la 6^e semaine, les cellules souches hématopoïétiques migrent par voie sanguine vers le foie qu'elles colonisent : c'est l'hématopoïèse hépatique qui dure pendant la plus grande partie de la vie fœtale. Dans le foie, les cellules hématopoïétiques donnent naissance essentiellement à des cellules érythropoïétiques qui synthétisent une hémoglobine fœtale (Hb F : $\alpha_2\gamma_2$). Il existe aussi une colonisation splénique mais l'érythropoïèse y est moins importante [194]. Ces organes s'hypertrophient en cas de régénération cellulaire pendant la période fœtale, ou dans certaines hémopathies (Vaquez, β -thalassémie...).

3. Période médullaire

A l'approche de la naissance et dans les premiers mois de la vie, les cellules hématopoïétiques migrent à nouveau, abandonnant le foie et la rate pour gagner la moelle osseuse qui s'est formée à partir du 4^e mois. Cette localisation médullaire devient prépondérante vers le 6^e mois. Les hématopoïèses splénique et hépatique décroissent ensuite pour disparaître respectivement trois mois avant la naissance et à la naissance.

Les cellules souches hématopoïétiques sont présentes en grand nombre dans la circulation sanguine pendant la vie embryonnaire et fœtale. A la naissance, le sang du cordon ombilical est encore riche en CSH [20].

Chez le petit enfant, tous les os ont une moelle hématopoïétique active. Dès cinq ans, une transformation adipeuse de la moelle osseuse débute dans les os longs, seuls les os plats et courts (vertèbres, sacrum, os iliaque, côtes, sternum, os du crâne) maintiennent cette activité [111].

Dans la moelle normale adulte, les cellules érythrocytaires représentent 20 à 25% des cellules hématopoïétiques. Elles synthétisent de l'hémoglobine A ($\alpha_2\beta_2$) pour 98%, de l'hémoglobine A₂ ($\alpha_2\delta_2$) pour 2% et des traces d'hémoglobine fœtale.

Au cours de certaines hémopathies (syndromes myéloprolifératifs), le foie ainsi que la rate peuvent récupérer une fonction hématopoïétique.

Chez l'adulte, les CSH sont donc localisées dans la moelle osseuse. Mais un très petit nombre passe dans la circulation sanguine ; ce nombre peut augmenter en cas de stimulation de l'hématopoïèse par des facteurs de croissance et elles peuvent être recueillies pour des greffes [194].

B. La lignée érythrocytaire

La lignée érythrocytaire est une des branches de l'hématopoïèse. La production par la moelle osseuse des cellules différenciées qui apparaissent dans le sang est le résultat d'un processus de différenciation progressif et multiple. Les cellules qui assurent la production de globules rouges peuvent être classées en 3 grandes catégories : les cellules souches pluripotentes, les progéniteurs et les précurseurs, cellules du compartiment de maturation (*Figure 1*).

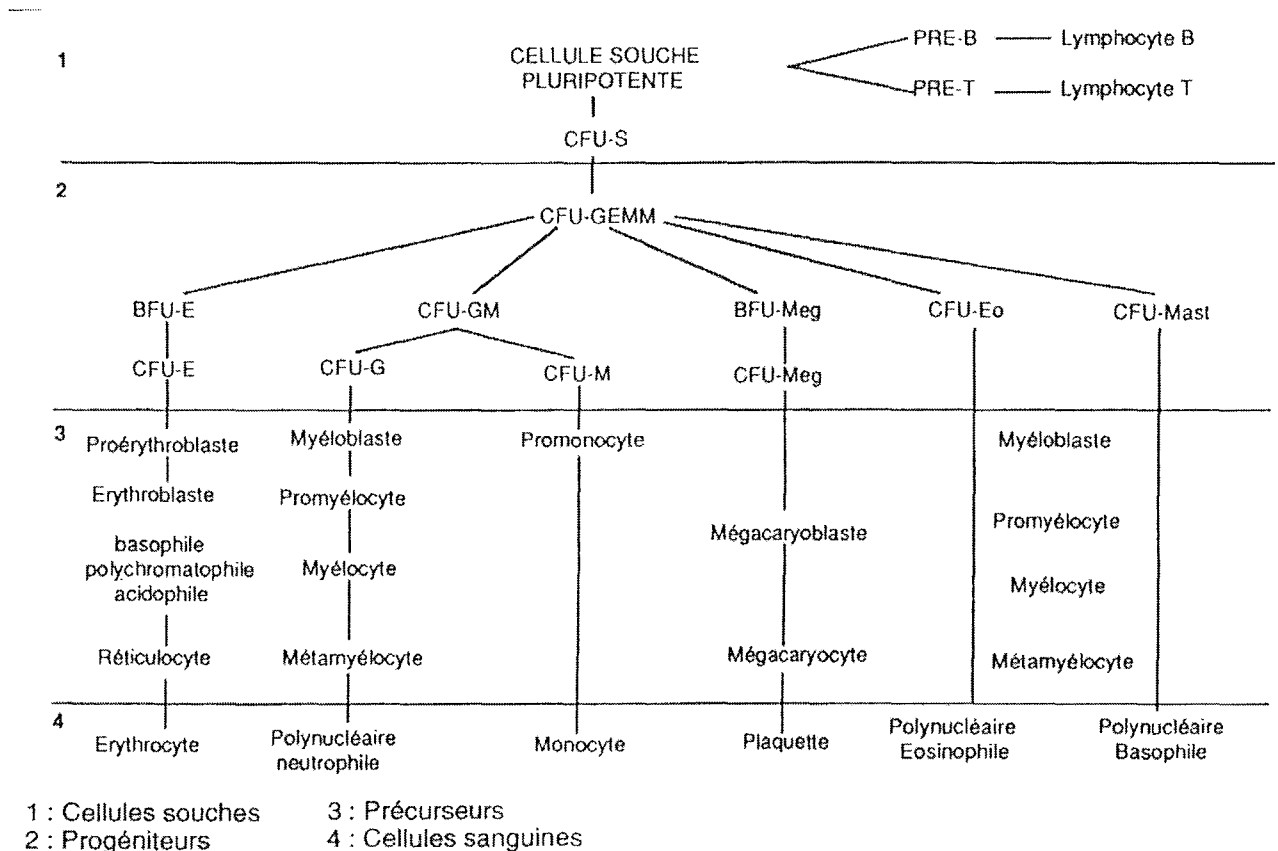


Figure 1 - Représentation schématique de l'hématopoïèse [128].

1. Les cellules souches hématopoïétiques

L'existence d'une cellule souche capable de donner naissance à toutes les lignées sanguines (myéloïde et lymphoïde) a pu être démontrée chez la souris à partir des expériences de Till et Mc Culloch dès 1961. Ceux-ci ont constaté que la restauration hématopoïétique d'une souris irradiée à dose létale (10 Gys) et recevant la moelle d'une souris syngénique (c'est-à-dire

jumelle) non irradiée comporte une étape constante de développement de colonies cellulaires et celle-ci a lieu dans la rate. Chacune de ces colonies provient d'une cellule dite CFU-S (*Colony Forming Unit-Spleen*) [128].

Les travaux de ces dernières années ont montré que les cellules souches hématopoïétiques (CSH) constituaient une population cellulaire très hétérogène composée d'un continuum entre cellules souches et progéniteurs dont les limites ne sont pas toujours faciles à déterminer [189].

Les cellules souches ne sont pas identifiables morphologiquement. Elles ont longtemps été définies par trois caractéristiques : autorenouvellement, multipotence et transplantabilité [83, 111, 151, 184].

- l'autorenouvellement définit la capacité d'une cellule à donner naissance, en se divisant, à des cellules filles qui lui sont identiques. Leur stock ne semble pas diminuer tout au long de l'existence : il existe cependant un phénomène de « vieillissement » des cellules souches les exposant davantage à des accidents chromosomiques.
- la multipotence désigne la capacité de ces cellules à se différencier vers n'importe quelle lignée hématopoïétique (myéloïdes et lymphoïdes). La différenciation conduit à la production de cellules matures et fonctionnelles. Elle comporte des étapes successives de détermination et de maturation :
 - la détermination définit l'orientation progressive d'une cellule souche ou de ses descendances vers une lignée spécialisée. Ceci implique la perte de certaines potentialités et l'acquisition de nouvelles fonctions.
 - le terme de maturation s'utilise surtout pour les étapes terminales de l'hématopoïèse lorsque les cellules affinent les fonctions spécialisées qui vont caractériser leur vie adulte.
- la transplantabilité est la capacité des CSH à donner à long terme un système hématopoïétique complet chez un individu greffé par des CSH.

Mais ces propriétés ont été remises en cause depuis quelques années.

En effet, contrairement à ce que l'on pouvait penser, les capacités d'autorenouvellement sont limitées chez l'adulte alors qu'elles sont beaucoup plus importantes chez le fœtus et le nouveau-né. Pour certains auteurs, il n'y aurait même plus d'autorenouvellement au niveau des CSH adultes : ces cellules seraient seulement capables d'un nombre déterminé de mitoses, limité par un mécanisme de sénescence réplivative. Néanmoins, les capacités de mitose de chaque cellule souche excéderaient les besoins de l'organisme entier expliquant qu'une seule cellule souche serait capable de relancer une hématopoïèse à long terme. Dans ce cas, la durée de vie longue des CSH serait assurée non par leurs propriétés d'autorenouvellement mais par leur capacité à rester à l'état quiescent (stade G0 du cycle cellulaire) [37, 189]. La plupart des CSH est donc en repos mitotique prolongé, seule une faible fraction est active. Cette propriété est cruciale car les cellules souches sont ainsi moins exposées à un risque mutagène.

Les aplasies médullaires induites par une chimiothérapie sont réversibles grâce à cette propriété car les agents antimitotiques utilisés ne peuvent exercer leurs effets toxiques que sur des cellules en cycle cellulaire et n'affectent ainsi qu'une très faible proportion des cellules souches hématopoïétiques [111].

Au cours des deux dernières années, des résultats expérimentaux ont pu montrer qu'une partie des CSH avait des potentialités encore plus larges que le simple fait de pouvoir redonner tous les lignages hématopoïétiques myéloïdes et lymphoïdes. Elles pouvaient également donner par exemple des cellules non hématopoïétiques telles que des cellules musculaires ou hépatiques alors qu'on croyait ce caractère « totipotent » réservé aux cellules embryonnaires.

Encore plus surprenant, et inversement, des cellules souches isolées à partir du système nerveux central (cellules « neurales ») et injectées par voie intraveineuse à une souris irradiée seraient capables de relancer un système hématopoïétique complet.

Il semble donc d'une manière générale, que les potentialités chez l'adulte des CSH présentes dans un organe dépassent largement celles des cellules constituant cet organe. Plus qu'une « transdifférenciation », ce phénomène est désigné actuellement sous le nom de « plasticité des cellules souches » [37, 83, 189].

Il faut rajouter à cela une propriété peu étudiée jusqu'à récemment mais qui est fondamentale pour les cellules souches hématopoïétiques et qui explique leurs capacités à relancer une hématopoïèse : le phénomène de « homing ». Cela correspond à la possibilité d'une migration des CSH d'un territoire médullaire vers un autre via un passage dans le sang. Cette propriété

repose à la fois sur la régulation de l'adhérence cellulaire et sur des processus d'attraction et répulsion. Parmi les molécules impliquées dans ces mécanismes, on trouve les chimiokines attractives dont l'une jouerait un rôle majeur dans la migration et la domiciliation : SDF-1 synthétisé par le stroma médullaire [83, 189].

Les CSH ne représentent qu'un très faible pourcentage des cellules médullaires et ne peuvent donc pas être identifiées sur le myélogramme. Il en existe également dans le sang normal en quantité infime. Cependant le nombre de ces cellules souches dites périphériques (CSP) augmente de façon importante dans la période de reconstitution hématopoïétique qui suit un traitement chimiothérapeutique aplasiant. Le recueil de ces CSP par cytophérèse a maintenant des applications thérapeutiques croissantes et majeures en cas d'autogreffes ou d'allogreffes de moelle osseuse [184].

2. Les progéniteurs

Quantitativement plus importante que la précédente, la population des progéniteurs représente cependant une population restreinte par rapport aux éléments identifiables sur un myélogramme : environ 1 progéniteur pour 1 000 cellules médullaires. Ces cellules se caractérisent par leur capacité de prolifération importante et de différenciation progressive irréversible. Ne possédant pas de caractères morphologiques propres, elles sont identifiées par leur capacité à croître en culture dans un milieu semi-solide (méthyl-cellulose, agar) et à engendrer des colonies de cellules filles différenciées.

Des observations séquentielles de cultures ont permis de définir et de classer par rang d'âge les progéniteurs hématopoïétiques ainsi que d'étudier leur dépendance vis-à-vis de facteurs de croissance déjà connus. Ainsi ont été définis :

- des progéniteurs précoces pluripotents, qui génèrent des colonies de cellules de toutes les lignées myéloïdes. Proches de la cellule souche, ils sont dits « primitifs ». Ils disposent d'une grande capacité de prolifération et doivent franchir de nombreuses étapes de différenciation pour générer une colonie de cellules matures. Parmi ces progéniteurs, on retrouve : [24, 81, 128, 184].
 - les LTC-IC (*Long Term Culture – Initiating Cell*) : nécessitant une culture en milieu liquide, elles sont encore mal connues. Elles représentent la cellule la plus immature

- qu'on puisse mettre en évidence *in vitro*, bien qu'il ne s'agisse pas de véritables CSH [83] mais plutôt des éléments intermédiaires entre le compartiment des cellules souches et celui des progéniteurs.
- les HPP-CFC (*High Proliferative Potential – Colony Forming Cell*) : elles représentent à l'heure actuelle l'étape la plus primitive de la différenciation des progéniteurs et sont un bon reflet du nombre et de la capacité des cellules souches à s'engager dans la différenciation.
 - les CFU-GEMM (*Colony Forming Unit Granulocyte / Erythrocyte / Mégacaryocyte / Macrophage*) ou CFU-Mix : l'individualisation d'un progéniteur exprimant plusieurs potentialités a été permis par le développement des techniques *in vitro*. Ils forment des colonies mixtes en 14 à 21 jours de culture. Cette population est en grande partie quiescente et a une capacité d'autorenouvellement modérée chez le sujet normal : par contre, elle est en prolifération intense au décours d'une greffe de moelle [128].
- des progéniteurs tardifs unipotents, qui génèrent des colonies avec un seul type de cellules myéloïdes ; deux types de colonies érythrocytaires ont dans un premier temps été définis : [24, 36, 128, 188].
 - les BFU-E (*Burst Forming Unit Erythroid*), qui sont les premières cellules orientées vers la lignée érythrocytaire, donnent naissance à des colonies importantes pouvant contenir jusqu'à 30 000 à 40 000 cellules habituellement regroupées en plusieurs sous-unités qui se différencient en 10 à 21 jours. Les BFU-E sont une population hétérogène correspondant à plusieurs étapes de la différenciation. La présence d'une hiérarchie cellulaire à l'intérieur même du compartiment des progéniteurs érythrocytaires a été établie d'après les résultats de culture *in vitro* :
 - les BFU-E primitives (BFU-Ep) : elles ne sont pas toutes uniquement déterminées vers la lignée érythrocytaire, les colonies qui en sont dérivées contiennent souvent des mégacaryocytes ou des cellules d'autres lignées. Le maximum de la différenciation se situe entre le 16^e et le 21^e jour ;
 - les BFU-E matures (BFU-Em) forment de plus petites colonies ne contenant que des cellules érythrocytaires (11^e-12^e jour).

Chez l'homme adulte, seuls les BFU-E et plus particulièrement les « primitives » circulent en nombre important dans le sang périphérique [24, 188].

- les CFU-E (*Colony Forming Unit Erythroid*), résultant des BFU-E sont des cellules peu mobiles et donnent naissance, vers le 7^e jour, à de petites colonies composées de 8 à 100 progéniteurs érythrocytaires habituellement regroupés en un seul amas serré, parfois en 2. Elles sont très proches du proérythroblaste avec de faibles capacités de prolifération (6 à 8 mitoses).

La différenciation des progéniteurs tardifs est contrôlée par deux principaux types de régulateurs présents dans le sérum:

1^e/ les molécules à activité BPA (*Burst Promoting Activity*) qui supportent la prolifération des BFU-E. Les principales cytokines à activité BPA sont l'interleukine-3, -4 et -9, le GM-CSF et le SCF : *Stem Cell Factor*.

2^e/ l'érythropoïétine (EPO) qui assure la différenciation des CFU-E et dont la présence est également nécessaire à la différenciation terminale des BFU-E.

La sensibilité à l'érythropoïétine augmente au cours de la maturation des BFU-E, alors qu'elle diminue pour les facteurs non spécifiques de la lignée érythrocytaire.

Cette description discontinue de la différenciation des progéniteurs ne doit pas faire perdre de vue qu'il s'agit en réalité d'un phénomène progressif et continu.

3. Les précurseurs : compartiment de maturation

Ce sont les premières cellules morphologiquement reconnaissables dans la moelle. Cette identification correspond à l'apparition de l'hémoglobine dans le cytoplasme. Cette maturation s'accompagne initialement de mitoses (3 à 4) au niveau des cellules érythrocytaires immatures (proérythroblastes, érythroblastes basophiles et polychromatophiles) puis s'effectue sans division jusqu'au stade terminal. La maturation se fait en cinq jours environ chez un individu sain et un érythroblaste donne en théorie 16 hématies. En réalité des pertes physiologiques de l'ordre de 10 % sont observées (érythropoïèse inefficace) [24, 158, 194].

Les caractères morphologiques généraux de la différenciation sont :

- la diminution progressive de la taille de la cellule ;

- la chromatine nucléaire, fine en début de lignée (euchromatine principalement) qui devient de plus en plus dense et s'agglomère en mottes (hétérochromatine), ce qui aboutit à la diminution du diamètre du noyau, à sa picnocytose puis à son expulsion.
- le changement de coloration du cytoplasme : aux stades précoces, la basophilie importante du cytoplasme (bleu vif en cytologie courante) est due à une forte concentration en acide ribonucléique, signe d'une intense activité de synthèse protéique et de l'immaturité de la cellule. Graduellement l'ARN ribosomal diminue alors que le cytoplasme se charge et se sature en hémoglobine acidophile (pigment rouge) [194].

Les stades de développement de la lignée érythrocytaire sont les suivants (Figure 2):

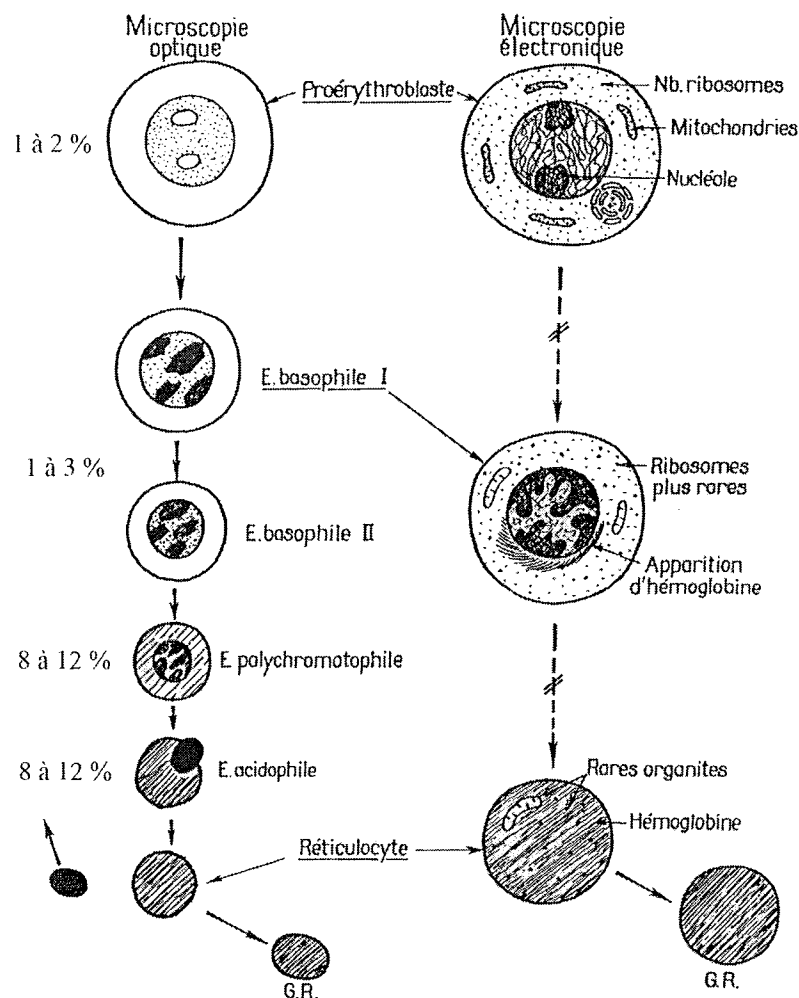


Figure 2 - Les cellules de la lignée érythrocytaire [111, 112].

Les cellules de la lignée érythrocytaire ont des caractéristiques communes :

- un noyau rond central
- un cytoplasme sans granulation
- un rapport nucléo-cytoplasmique (N/C) élevé jusqu'au stade acidophile.

a) Le proérythroblaste

C'est la cellule érythroblastique la plus jeune de la lignée érythrocytaire et elle représente environ 1 % des éléments nucléés de la moelle osseuse. C'est une cellule arrondie de grande taille (20 à 25 μm de diamètre), son rapport N/C est de 8/10. La chromatine est fine : un ou deux nucléoles sont visibles. Le cytoplasme est intensément basophile sauf un halo clair péri-nucléaire. Les grains de ferritine sont très nombreux dans le cytoplasme soit dispersés, soit regroupés par 6 ou 8 (sidéosomes). On trouve aussi des polyribosomes en quantité importante, microtubules, appareil de Golgi et de nombreuses mitochondries [2, 194].

b) Les érythroblastes basophiles I et II

Ils constituent entre 1 et 3 % des cellules nucléées de la moelle. Ces cellules sont plus petites (15 à 18 μm de diamètre). Le noyau présente une chromatine irrégulière, condensée en mottes, sans nucléole visible. Le cytoplasme est très basophile. Très peu de différence existe entre les érythroblastes basophiles de type I et II [2, 194].

c) Les érythroblastes polychromatophiles

Dans ces cellules, la coloration du cytoplasme est modifiée par la concentration croissante d'hémoglobine. La taille de la cellule est de 12 à 15 μm , le noyau est petit, la chromatine est dense et irrégulière. Le nombre de mitochondries, de polyribosomes et de petits grains de ferritine diminue [2, 194].

d) Les érythroblastes acidophiles

Ces cellules mesurent 9 à 12 μm . Leur noyau est petit, rond, très dense, presque noir ; il est dit pycnotique. Le cytoplasme a la même couleur que celui des hématies, il apparaît rouge à la coloration au Giemsa. Les sidéosomes apparaissent en microscopie optique par la coloration

de Perls (nitroprussiate). Seule une partie des érythroblastes ont des sidérosomes visibles à l'état normal : on les appelle des sidéroblastes [2, 194].

e) Les réticulocytes

Le réticulocyte se différencie de l'érythroblaste acidophile par l'expulsion de son noyau (énucléation). Il passe ainsi immédiatement dans le sang. Cette cellule de 8 à 10 μm est arrondie, très déformable, ce qui lui permet de franchir les orifices des capillaires (calibre de l'ordre de 2-3 μm) et de passer dans la circulation. Il est reconnu sur des colorations dites « vitales » (bleu de Crésyl brillant) ou en cytométrie de flux par la mise en évidence de résidus d'ARN qui disparaissent au stade du globule rouge. La numération des réticulocytes est un témoin de l'érythropoïèse. Ils sont encore capables de synthèse protéique. Leur durée de vie est de l'ordre de 48h. L'élimination des organelles cytoplasmiques aboutit à l'hématie mature [2, 194].

f) L'hématie mature

Cette cellule anucléée mesure 7 μm de diamètre en moyenne et est saturée en hémoglobine, ce qui représente environ 32 % de la masse de la cellule. Elle possède une forme caractéristique de disque biconcave. Son épaisseur varie du bord (2,5 μm) à la partie centrale (1 μm). Cette forme correspond à un rapport surface/volume favorable à la déformabilité et aux échanges gazeux.

Après 120 jours, la membrane plasmique du globule rouge est usée à force d'être comprimée dans les capillaires. Privé de noyaux et d'organites, il ne peut pas remplacer ses composants abîmés. La membrane devient donc de plus en plus fragile et la cellule risque l'éclatement, en particulier lorsqu'elle est comprimée dans les vaisseaux étroits de la rate. Les érythrocytes usés sont retirés de la circulation et détruits par les macrophages dans la rate et le foie et les produits de dégradation de l'hémoglobine sont recyclés [2, 194].

4. L'îlot érythroblastique

Dans la moelle osseuse hématopoïétique, les érythroblastes sont disposés autour d'un ou deux macrophages. Ces unités cellulaires anatomiques forment ce que l'on appelle les îlots érythroblastiques (*Figure 3*).

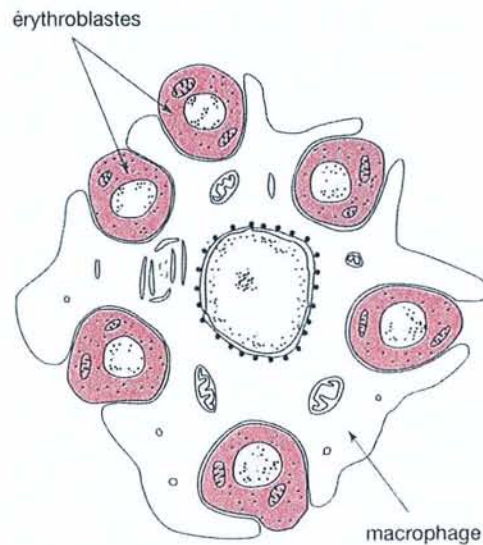


Figure 3 - L'îlot érythroblastique [2].

Le macrophage envoie des pseudopodes cytoplasmiques qui entrent en contact étroit avec de nombreux érythroblastes.

La signification fonctionnelle de la relation entre macrophage et érythroblastes a été le sujet de nombreuses discussions :

- le fait que l'on trouve des noyaux dégradés (pycnotiques) dans le cytoplasme du macrophage central indique un rôle dans l'élimination du noyau expulsé lors de la maturation en réticulocytes. Cependant, il a été démontré que la présence du macrophage n'est pas un prérequis à l'énucléation.
- le macrophage est également impliqué dans la phagocytose des érythrocytes âgés, ainsi que probablement dans la production des cellules rouges, en sécrétant différents facteurs nécessaires à leur maturation (IL-1, IL-6, transferrine).

La nature de l'interaction entre macrophages et érythroblastes est une adhésion qui s'effectue par l'intermédiaire d'une intégrine ($\alpha 4 \beta 1$) présente à la surface des érythroblastes, et d'un contre-récepteur (VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) situé sur la membrane des macrophages. Ces deux molécules sont en effet localisées au point de contact intercellulaire. Il est possible que l'action stimulante de l'érythropoïétine dans l'érythropoïèse s'effectuerait

en partie en favorisant la formation des îlots érythroblastiques à travers l'interaction $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 [2].

C. Cinétique de l'érythropoïèse

Quatre mitoses séparent le proérythroblaste de l'érythroblaste acidophile. Ce dernier ne se divise pas mais sa maturation aboutit au résultat suivant : le noyau, devenu pycnotique et inutile, est expulsé, donnant naissance aux réticulocytes. L'expulsion du noyau a sans doute pour conséquence de réduire les dépenses énergétiques de la cellule et d'accroître sa plasticité. Cette division cellulaire des érythroblastes nécessite un apport en certains facteurs, dont la vitamine B12 et les folates pour la synthèse d'ADN, le fer et la vitamine B6 pour la synthèse de l'hème de l'hémoglobine [112, 158].

La synthèse protéique dans le cytoplasme est très spécialisée, l'hémoglobine étant de très loin la principale protéine synthétisée dans la lignée érythrocytaire. L'augmentation de la concentration en hémoglobine dans le cytoplasme explique l'acidophilie croissante au cours de la maturation. Peu à peu tous les organites cytoplasmiques disparaissent. Au stade de réticulocytes, il ne subsiste que des vestiges d'ARN constituant la substance « granulo-filamenteuse » qui conserve néanmoins une activité encore suffisante pour la synthèse d'hémoglobine. Par contre, tout a disparu dans le globule rouge adulte, il ne peut donc plus synthétiser quoi que ce soit mais peut conserver l'hémoglobine [112, 158].

Par un système encore mal connu, les phénomènes de division et de synthèse d'hémoglobine s'influencent mutuellement : en effet, l'inactivation de la chromatine du noyau (qui perd alors la capacité de se diviser) et son expulsion sont déclenchées dès l'obtention d'une concentration intracellulaire critique en hémoglobine (approchant les 32 %). Environ 10 % des érythroblastes meurent au stade acidophile : c'est l'érythropoïèse inefficace physiologique.

Une rupture du synchronisme mitose-différenciation est toujours pathologique [111, 112, 158]. Ainsi une synthèse d'hémoglobine entravée retarde le processus d'inactivation nucléaire et favorise la poursuite de mitoses additionnelles, engendrant des hématies de volume diminué (microcytose). A l'opposé, un défaut de synthèse d'ADN retarde le processus de mitoses, dont le nombre est alors réduit quand le seuil d'hémoglobine est atteint, engendrant des hématies plus volumineuses (macrocytose). De même, ce phénomène d'inactivation

nucléaire explique le fait qu'il ne peut y avoir dépassement de la concentration d'hémoglobine dans l'érythrocyte (l'hyperchromie est impossible), l'érythrocyte est toujours saturé en hémoglobine [111].

D. Les marqueurs de la lignée érythrocytaire

Les antigènes de surface cellulaire permettent, par leur présence ou leur absence, de définir le profil immunologique et de nombreuses propriétés d'une population cellulaire.

Cette approche immunologique permet de différencier les trois grands compartiments de l'hématopoïèse et de préciser, pour une cellule morphologiquement non identifiable, sa lignée d'appartenance et son degré de différenciation (*Figure 4*) [24, 88, 158, 184, 188].

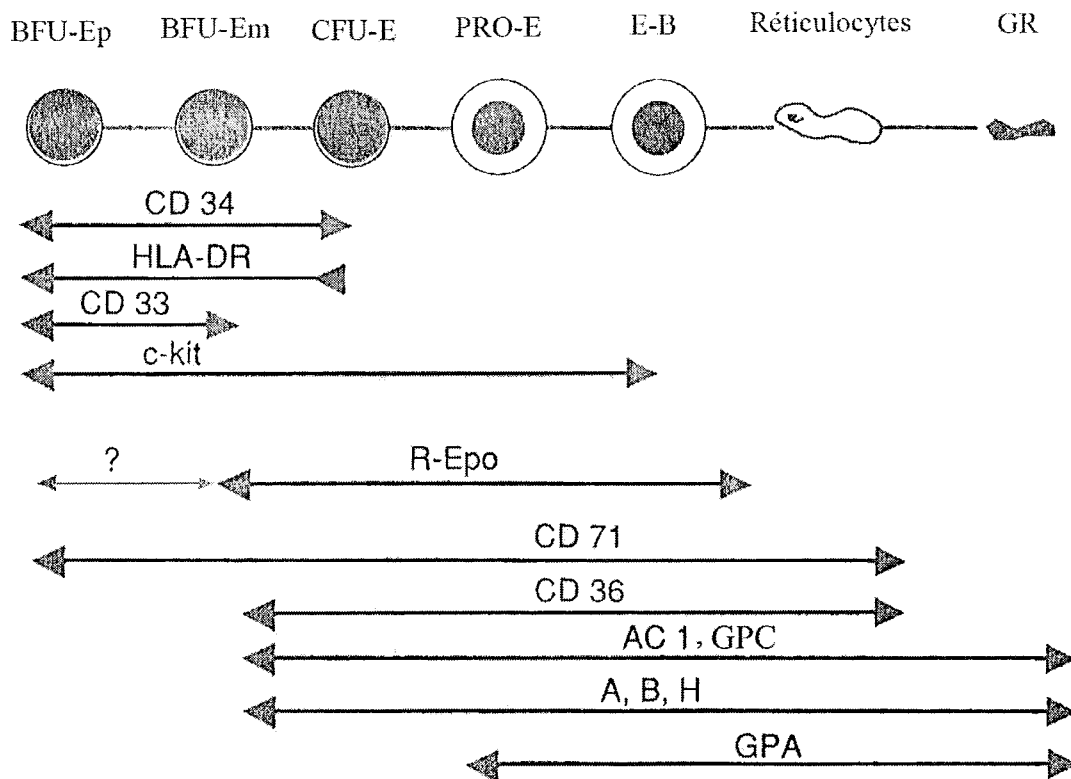


Figure 4 - Évolution des marqueurs membranaires de la lignée érythrocytaire au cours de la différenciation [à partir de 24].

- Le marqueur le plus utilisé pour identifier les progéniteurs, quelle que soit la lignée, est le CD34. Il est utilisé pour purifier les cellules souches et les progéniteurs. Dans ces

compartiments, l'expression du CD34 diminue au fur et à mesure que la cellule se différencie. Il est donc présent sur les BFU-E et faiblement sur les CFU-E. Néanmoins, des données récentes sont venues compliquer cette définition. La population CD34- contient également des cellules à activité CSH, capables de relancer une hématopoïèse à long terme et parmi elles les cellules capables de donner des myocytes et des hépatocytes. La question reste ouverte quant à la nature exacte de ces CSH (population plus primitive que les CSH CD34+ ou état transitoire et réversible ?) [83, 189].

- Associé à l'expression du CD34, c-kit ou récepteur du SCF (CD117) est exprimé sur tous les progéniteurs myéloïdes mais en quantité plus élevée sur les progéniteurs érythrocytaires, dès le stade BFU-E et ce, jusqu'au stade d'érythroblaste basophile.
- Inversement, le CD33, marqueur le plus précoce de l'engagement myéloïde, est faiblement exprimé sur les progéniteurs érythrocytaires.
- Les antigènes du système HLA de classe I et II et le récepteur de la transferrine (CD71) ne sont pas spécifiques de la lignée érythrocytaire. L'HLA-DR (classe II), présent sur les BFU-E, disparaît au stade CFU-E. Le CD71 est présent sur les progéniteurs myéloïdes précoces et sur toutes les cellules en prolifération. Son taux d'expression diminue au cours de la maturation et disparaît quand la synthèse de l'hémoglobine est terminée.
- A partir du stade BFU-E et principalement BFU-Em, le récepteur à l'érythropoïétine commence à être exprimé. Il atteint son maximum d'expression au niveau des CFU-E et des proérythroblastes et est absent du stade réticulocyte.
- Certains marqueurs restreints à la lignée érythrocytaire mais non spécifiques commencent à être exprimés au niveau des BFU-E matures et des CFU-E comme le CD36 (glycoprotéine également exprimée par les monocytes et les mégacaryocytes), la forme érythrocytaire de la glycophorine C (GPC), l'anhydrase carbonique 1 (AC1).
- Les antigènes de groupe ABO apparaissent en même temps que débute la synthèse de l'hémoglobine.

- La glycophorine A (GPA), sialoglycoprotéine majeure de la membrane des hématies, est détectée dès le stade de proérythroblaste. Son expression est maximale au stade érythroblaste basophile puis elle diminue et reste à un taux constant jusqu'à la maturation en globule rouge.

II. Régulation de l'érythropoïèse

La production des cellules sanguines est un processus continu et stable, qui doit cependant pouvoir s'adapter à la demande. Cela implique des mécanismes de régulation suffisamment précis pour augmenter spécifiquement la production de cellules d'une lignée bien définie.

Nous étudierons dans un premier temps le processus permettant d'aboutir, à partir d'une CSH, aux cellules matures spécifiques d'une lignée. Puis dans un deuxième temps, nous aborderons les éléments indispensables intervenant dans cette régulation.

A. Différenciation des cellules souches et orientation vers une lignée donnée

Les mécanismes qui contrôlent l'équilibre entre autorenouvellement et différenciation sont encore mal connus. Ils comportent un ensemble complexe d'interactions entre les CSH, les cellules stromales, des facteurs de transcription qui activent des gènes spécifiques de lignées et de nombreuses cytokines douées d'activité stimulante ou inhibitrice [151].

De très nombreuses molécules régulatrices interviennent dans le contrôle de l'hématopoïèse. Les études de Frindel et coll. démontrent clairement que la différenciation des CSH est la première réponse à un besoin périphérique. Le contrôle de cette régulation s'exerce au niveau de la détermination de leur voie de différenciation [128].

Les cytokines y ont une place privilégiée ; l'action de certaines d'entre elles est restreinte à certaines lignées myéloïdes et, au sein de celles-ci, à certains stades de maturation. Ainsi, il est possible, en sélectionnant des combinaisons de cytokines appropriées, d'induire, *in vitro*, la prolifération et la différenciation des progéniteurs et d'obtenir un grand nombre de précurseurs restreints à une lignée myéloïde. La stabilité numérique des différents compartiments (progéniteurs, précurseurs et cellules matures) peut être assurée par l'entrée en activité (en cycle) de cellules souches quiescentes (en G0), ou dont le temps de cycle cellulaire est très long [37].

Toutefois, le mécanisme de cette orientation est beaucoup plus compliqué que ne le laissent apparaître ces études expérimentales. Les cytokines y ont un rôle permissif et non instructif [188].

Un second niveau de régulation intervient lors du choix que font les cellules souches de s'engager dans une voie de différenciation ou dans une autre. Deux questions peuvent se poser :

- la première concerne l'ordre dans lequel se fait la perte de potentiel des CSH. Cette perte semble ne pas être régie uniquement par les lois du hasard -comme le pensaient Till et Ogawa [128]- puisque certaines associations sont privilégiées : citons pour exemple les voies érythrocytaires et mégacaryocytaires [37],
- la seconde concerne les mécanismes qui régissent ces choix. Ils feraient appel à plusieurs étapes successives d'activation et de répression génique par des facteurs de transcription qui ciblent l'expression des gènes spécifiques d'une lignée. Ce phénomène est facilité par les cytokines spécifiques de ces lignées. L'expression des récepteurs de ces cytokines au niveau des CSH est régulée par ces mêmes facteurs de transcription mais peut être également contrôlée par des signaux provenant de l'environnement des CSH [37, 188].

B. Le microenvironnement médullaire

Le terme de « microenvironnement médullaire » désigne dans la moelle osseuse l'ensemble dans lequel baignent les CSH et qui est formé par la matrice extracellulaire ou MEC (collagène, fibronectine, laminine, protéoglycanes), par les cellules non hématopoïétiques dites cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages, adipocytes), et par les substances qu'elles produisent (cytokines, molécules d'adhésion) [128, 158].

1. Les facteurs diffusibles stromales

Les cellules stromales sont capables de sécréter spontanément ou sous l'effet de molécules inductrices comme le TNF- α ou l'IL-1, un grand nombre de facteurs hématopoïétiques.

Certains d'entre eux, comme l'IL-6, le G-CSF ou le SCF, ont la capacité de relancer le cycle cellulaire des CSH quiescentes (phase G0).

D'autres molécules telles que le GM-CSF, le G-CSF et le M-CSF favorisent la prolifération et la différenciation des progéniteurs myéloïdes.

Les effets stimulants produits par ces molécules semblent pouvoir être contrebalancés par des facteurs inhibiteurs comme le TGF- β ou le MIP-1 α qui empêchent la mise en cycle des progéniteurs et des CSH [128].

2. Les facteurs contacts

Bien que les effets des différentes molécules de la MEC sur la régulation de l'hématopoïèse ne soient pas encore élucidés, des données récentes semblent montrer que la MEC a deux grands rôles :

a) Un rôle d'attraction

Un rôle d'attraction purement mécanique permet de maintenir en contact étroit les cellules stromales et les cellules hématopoïétiques. Il semble que la fibronectine et le collagène de type I soient impliqués dans ce mécanisme et permettent ainsi une meilleure action des facteurs solubles.

Il a été démontré que l'addition de cellules stromales à une population de progéniteurs primitifs se divisant activement sous l'action de cytokines retarderait leur différenciation, et donc favoriserait le maintien du caractère multipotent de la cellule tout en leur permettant de se diviser. Cela témoigne de la capacité de ces cellules à s'autorenouveler. Il semblerait que ce ne soit pas le seul fait des cytokines mais aussi d'interactions complexes avec des molécules présentées par les cellules stromales de l'environnement telles que les molécules d'adhérence et les ligands des récepteurs Notch [37].

Ces dernières années, l'intérêt s'est porté sur la chimiokine SDF-1 synthétisée par le stroma médullaire et sur son récepteur CXCR4 présent sur les cellules souches. Il a été initialement considéré que la molécule SDF-1 était absolument nécessaire à la migration des cellules souches dans la moelle. Des arguments expérimentaux de plus en plus importants suggèrent à présent que le rôle de SDF-1 concerne la rétention dans la moelle des cellules souches. Une perte de réponse à SDF-1 aboutit en fait à la mobilisation dans le sang des CSH [20, 189].

b) Un rôle de stockage des facteurs de croissance

Certains facteurs de croissance existent à la fois sous forme soluble et sous forme liée. Cette dernière forme serait liée aux protéoglycanes qui semblent pouvoir la stocker. C'est le cas de

l'IL-3, du G-CSF et du GM-CSF qui peuvent être accrochés aux protéoglycanes et être relargués en fonction des besoins à proximité des cellules hématopoïétiques [128].

C. Facteurs nucléaires

L'engagement d'une CSH dans l'érythropoïèse est le résultat de l'expression de plusieurs gènes régulateurs (facteurs de transcription), qui confère à la CSH le phénotype érythrocytaire [184].

1. Facteurs de transcription de la famille GATA

L'engagement des progéniteurs multipotents vers la voie érythrocytaire semble s'effectuer grâce à des facteurs de transcription et en particulier du facteur GATA-1 se fixant sur le motif GATA qui est retrouvé dans toutes les régions régulatrices des gènes de l'érythropoïèse [188] et qui permet la régulation positive des gènes codant pour la glycophorine, l'hémoglobine et le récepteur à l'érythropoïétine. Ce motif GATA est reconnu par une famille de protéines nucléaires comprenant actuellement 7 membres (GATA 1 à 7), seuls GATA-1 et 2 semblent nécessaires à l'érythropoïèse. Le motif GATA est nécessaire à amener la spécificité d'expression érythrocytaire mais pas suffisant. Il faut qu'il soit associé à d'autres motifs CCACC ou CCGCC reconnus par d'autres facteurs. Mais en son absence, la production de globules rouges est impossible [88].

2. « Erythroid Kupel like factor » (EKLF)

Le motif CCACC associé au motif GATA peut lier un facteur érythrocytaire spécifique, appelé EKLF, jouant un rôle important dans l'expression des gènes β de la globine.

3. Autres facteurs de transcription impliqués dans la différenciation érythrocytaire

TAL 1 est exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques en général et parmi les cellules plus matures par les érythroblastes ou les mégacaryocytes. Trois protéines nucléaires jouent un rôle dans l'érythropoïèse primitive et terminale (TAL 1, Rbtn 2) ou terminale (c-myb).

D. Facteurs solubles régulant l'érythropoïèse autres que l'EPO

Les facteurs solubles régulant l'érythropoïèse peuvent être séparés en deux catégories :

- les facteurs permettant une régulation positive (facteurs activateurs).
- les facteurs de la régulation négative (facteurs inhibiteurs).

Nous détaillerons dans un premier temps la régulation positive avec les facteurs de croissance hématopoïétiques concernés en insistant sur les plus importants. Nous verrons ensuite les facteurs de croissance non hématopoïétiques ainsi que les facteurs exogènes nécessaires à l'érythropoïèse. Pour finir nous aborderons les facteurs de la régulation négative.

1. Facteurs de croissance hématopoïétiques

L'activité de la moelle osseuse sera conditionnée par la balance entre signaux positifs et signaux négatifs. Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont des facteurs solubles assurant la régulation positive. Deux d'entre eux dominent la régulation de l'érythropoïèse : l'un spécifique de la lignée érythrocytaire, l'érythropoïétine (EPO), l'autre non spécifique, le SCF. En outre, plusieurs facteurs de croissance comme l'interleukine-3 (IL-3) jouent un rôle important dans les temps précoces de cette lignée (*Figure 5*). Des facteurs non hématopoïétiques pourraient également être impliqués dans cette régulation.

Nous aborderons le cas de l'EPO dans un prochain chapitre du fait de sa découverte beaucoup plus ancienne et de ses particularités par rapport aux autres facteurs de croissance hématopoïétiques mais également du fait de son importance considérable en pratique médicale.

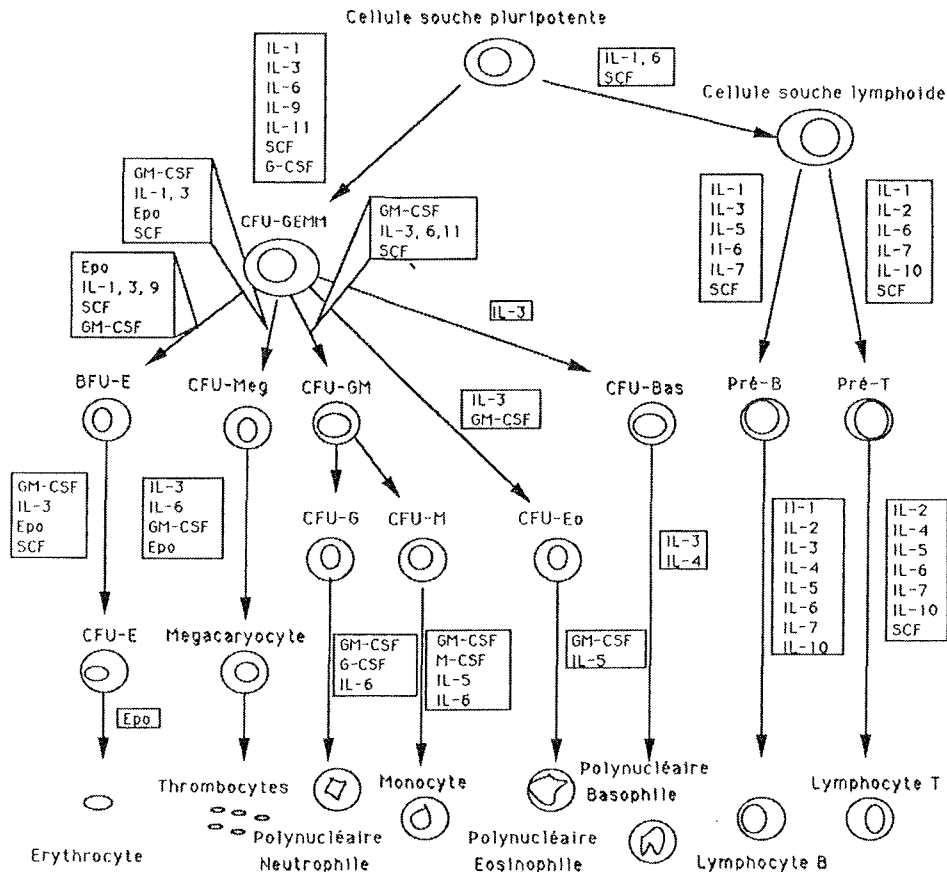


Figure 5 - Niveau d'intervention des facteurs de régulation de l'érythropoïèse [128].

a) Le Stem Cell Factor (SCF ou facteur Steel)

Le gène du SCF code au minimum pour deux protéines, l'une soluble, l'autre transmembranaire, synthétisées par les cellules stromales de la moelle. La protéine soluble a un poids moléculaire d'environ 30 kDa et est peut-être présente dans le plasma sous forme dimérique. La forme transmembranaire semble être physiologiquement la plus importante car une mutation aboutissant à la seule forme soluble entraîne une anémie.

Le proto-oncogène *c-kit* code pour le récepteur du SCF. Ce récepteur de 145 kDa possède une activité tyrosine-kinase. La liaison du SCF entraîne la dimérisation de *c-kit* qui active sa fonction tyrosine-kinase, induisant sa phosphorylation et celle d'autres protéines.

Le SCF a une action synergique avec l'EPO pour les temps tardifs de la différenciation de la lignée érythrocytaire (CFU-E) et avec l'IL-3 dans les temps précoces. Il semblerait que le SCF soit impliqué dans la régulation de l'adhésion des cellules érythrocytaires avec les éléments du stroma médullaire [2, 24, 88, 187, 188].

b) L'interleukine-3 (IL-3)

Parfois appelé multi-CSF, elle est produite essentiellement par les lymphocytes T activés. Son gène est localisé sur le chromosome 5 dans une région importante pour la régulation de l'hématopoïèse puisque s'y trouvent également les gènes du GM-CSF, du M-CSF, de l'IL-4 et de l'IL-5. La molécule contenant un pont disulfure a un poids moléculaire de 14 à 30 kDa. Ces variations sont liées à des différences dans les O-glycosylations.

L'IL-3 agit sur toutes les CSH et en particulier sur les BFU-E. L'IL-3 forme avec le SCF, le GM-CSF et les IL-4 et -9 les molécules à activité BPA (*Burst Promoting Activity*) qui supportent la prolifération des BFU-E. Administrée à la souris normale, l'IL-3 augmente également le nombre de CSH et de CFU-E spléniques et médullaires. En revanche, la différenciation terminale et la formation de colonies de globules rouges nécessitent une action synergique avec l'érythropoïétine. [7, 24, 36, 188].

c) Le Granulocyte / Monocyte - colony stimulating factor (GM-CSF)

Le GM-CSF est une glycoprotéine de 127 acides aminés de poids moléculaire 22 kDa glycosylée. Il a été initialement défini comme un facteur stimulant la formation des colonies de neutrophiles et de monocytes. Il possède cependant une capacité à stimuler les BFU-E mais à un niveau moindre que l'IL-3. Il agirait sur la sous-population de progéniteurs sensibles à l'IL-3 [24, 36].

d) L'interleukine-1 α (IL-1 α)

Produite par les monocytes, elle agit très tôt dans l'hématopoïèse. Elle peut exercer de nombreux effets indirects, par exemple en induisant la sécrétion de GM-CSF, d'IL-2, d'IFN- γ ou d'IL-6 par les lymphocytes T qu'elle active. *In vivo*, les observations sont probablement le reflet de la résultante de ces multiples effets. Ainsi, administrée à la souris, elle augmente le nombre de BFU-E médullaires [36].

e) L'interleukine-6 (IL-6)

Autrefois appelé IFN- β 2, l'IL-6 est produite principalement par les fibroblastes, les monocytes et les lymphocytes T. Seule, elle semble inactive sur l'hématopoïèse. Elle peut

cependant interagir avec plusieurs facteurs de croissance hématopoïétiques : en potentialisant les effets de l'IL-3 au niveau des CSH ou en potentialisant ceux de l'IL-4 et de l'EPO au niveau des progéniteurs érythrocytaires [36].

f) L'interleukine-4 (IL-4)

Facteur de croissance et d'activation pour les lymphocytes B, l'IL-4 exerce sur la croissance des colonies dérivées des CFU-E une action en synergie avec certains facteurs de croissance spécifiques de la lignée rouge, en particulier l'EPO [36].

g) L'interleukine-9 (IL-9 ou P 40)

Reconnue comme facteur de croissance des lymphocytes T, l'IL-9 a été récemment isolée sur son activité à induire la prolifération d'une lignée mégacaryocytaire. Elle est active néanmoins sur les temps précoces de la différenciation érythrocytaire normale avec une action assez proche de celle de l'IL-3 [24].

2. Facteurs de croissance non hématopoïétiques

Un grand nombre de facteurs de croissance ou d'hormones interfèrent avec la formation des colonies dérivées des CFU-E et des BFU-E. Pour la plupart d'entre eux, cette action est une action potentialisatrice et nécessite la présence d'érythropoïétine [24, 36, 158, 184].

a) Insuline et les « insuline like growth factor » (IGF1 et IGF2)

Ils seraient capables, pour certains, d'induire la formation de colonies érythroblastiques BFU-E et CFU-E en l'absence d'EPO, y compris dans des cultures sans sérum. Pour d'autres auteurs, leur action serait purement potentialisatrice de celle de l'érythropoïétine.

b) L'hormone de croissance

Elle aurait une action potentialisatrice directe sur la formation des colonies dérivées des BFU-E et des CFU-E.

c) Les hormones thyroïdiennes

Elles ont aussi un net effet potentialisateur *in vitro* en agissant plus spécifiquement sur la différenciation des cellules érythrocytaires.

d) L'activine

L'activine est une protéine de la famille du TGF- β . Elle potentialise l'effet de l'érythropoïétine sur les temps tardifs et précoces de l'érythropoïèse *in vitro* et *in vivo*.

3. Facteurs exogènes nécessaires à l'érythropoïèse

L'érythropoïèse nécessite simultanément la synthèse d'ADN et la synthèse d'hémoglobine.

La vitamine B12 et l'acide folique (vitamine B9) interviennent dans la synthèse des acides nucléiques. Les réserves sont très importantes pour la vitamine B12 (plusieurs années), faibles pour l'acide folique (1 à 2 mois). Les carences donnent des anémies mégalo-blastiques.

Le fer, apporté par l'alimentation ou provenant de la dégradation des hématies vieilles (hémolyse), est indispensable pour la synthèse de l'hème. Le fer est transporté par la transferrine (ou sidérophiline) : c'est une glycoprotéine spécifique, qui se fixe électivement sur la membrane des érythroblastes. Les réserves mobilisables en fer sont très peu abondantes et les anémies les plus fréquentes sont dues à des carences en fer [111, 112].

4. Facteurs d'inhibition : régulation négative

L'existence d'inhibiteurs de la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques a été démontrée (*Figure 6*). Certains sont des petites molécules de nature peptidique : un térapeptide, Acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP), isolé à partir de moelle de fœtus de veau et un pentapeptide, pyro-Glu-Glu-Asp-Lys-Cys (pEEDCK), isolé des granulocytes humains. Ces peptides obtenus par synthèse chimique inhibent l'entrée en synthèse d'ADN des CSH. Ils ne sont pas spécifiques puisqu'ils inhibent indifféremment la prolifération des progéniteurs des lignées granulo-macrophagiques et érythrocytaires. Il faut mentionner que le pentapeptide, inhibiteur sous forme de monomère, acquiert en se dimérisant des propriétés stimulantes. Ce système pourrait jouer un rôle important dans l'équilibre du système hématopoïétique [23].

D'autres molécules, connues pour leurs effets multiples, participent également à la régulation négative : TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*), MIF-1 α (*Macrophage Inflammatory Proteine- α*), interféron- γ , TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*).

Leur mécanisme d'action n'est pas toujours clair. Ils agissent tous sur des cellules CD34+, en bloquant leur prolifération par inhibition de la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Le TGF- β pourrait être produit de façon autocrine et jouerait un rôle de maintien à l'état quiescent des cellules CD34+. Cependant leur rôle en situation pathologique reste mal connu [23, 36, 111, 128, 184].

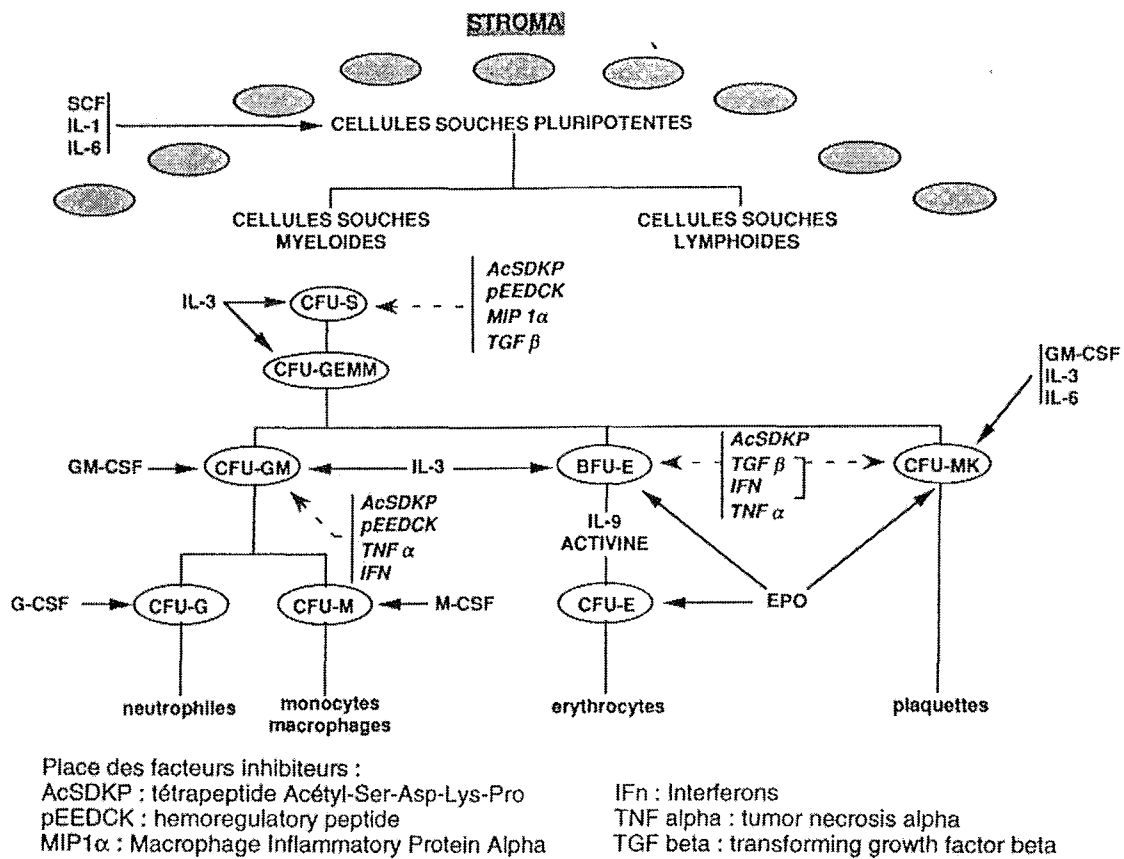


Figure 6 - Place des facteurs inhibiteurs dans la régulation de l'érythropoïèse [128].

E. Mécanismes de la régulation de l'érythropoïèse

La régulation de l'érythropoïèse a été un modèle pour l'étude de l'ensemble de l'hématopoïèse. L'existence de deux grands types de progéniteurs (BFU-E et CFU-E) et le facteur de croissance bien caractérisé, l'érythropoïétine, ont permis de comprendre très

rapidement que les régulations des temps précoces et tardifs au cœur de cette lignée étaient différentes.

- Ainsi, l'IL-1, l'IL-6 ou le SCF agissent sur les progéniteurs très primitifs, pluripotents, les BFU-E quiescents (BFU-Ep), pour les faire entrer dans les phases actives du cycle cellulaire. Ces cytokines « précoces » sont cependant incapables d'induire à elles seules une prolifération prolongée et une différenciation. Elles préparent la cellule à recevoir un signal de prolifération.
- La prolifération de ces progéniteurs « activés » nécessite la réception d'un deuxième signal via l'IL-3, le GM-CSF ou encore l'IL-9. Incapables de recruter les BFU-Ep, ces cytokines vont induire la prolifération des cellules BFU-E « activées ». Cette prolifération s'accompagne d'une différenciation progressive obligatoire.

L'enchaînement des effets des cytokines « précoces » et de l'IL-3 est de type séquentiel. L'absence, dans un délai limité, du second signal délivré par l'IL-3 entraîne la mort cellulaire du progéniteur activé.

L'IL-3 fait proliférer des progéniteurs pluripotents activés et va les rendre répondeurs à des facteurs plus spécialisés. Ainsi, le stimulus apporté par l'EPO est d'abord facultatif et ne participe pas à l'engagement définitif des progéniteurs dans la lignée érythrocytaire ; dans un deuxième temps, les stimuli combinés de l'IL-3 et de l'EPO deviennent obligatoires (synergie), avec mort cellulaire si l'un d'eux disparaît du milieu ; enfin, dans un troisième temps, le signal EPO devient exclusif et la dépendance vis-à-vis de l'IL-3 disparaît totalement [158, 184, 188].

Pour d'autres auteurs, le SCF joue un rôle important aussi bien dans la régulation des temps précoces que tardifs. Il augmente le nombre et la taille des BFU-E. Il aurait une action synergique à l'IL-3 et au GM-CSF, permettant ainsi l'apparition du récepteur à l'érythropoïétine.

Les BFU-E matures répondent ainsi à l'érythropoïétine mais, en présence de cette seule hormone, elles donnent des colonies composées d'un faible nombre de cellules (<500). Par contre, en présence à la fois du SCF et d'EPO, les colonies prolifèrent et contiennent plusieurs milliers d'érythroblastes et un grand nombre de colonies peut alors être obtenu [24, 188].

Ce système de régulation apparaît de plus en plus complexe et doit faire face à deux situations très différentes entre lesquelles se répartissent les diverses propriétés décrites.

A l'état physiologique, la moelle osseuse doit renouveler les cellules vieilles. Il est possible que ce renouvellement s'effectue sous l'effet des facteurs libérés à faibles concentrations par les cellules du stroma médullaire, à proximité des cellules hématopoïétiques.

Lorsque la production doit augmenter au cours de divers états pathologiques, on observe une production augmentée des facteurs à large activité qui induisent une sécrétion et une libération de molécules plus spécifiques selon un phénomène d'amplification en cascade.

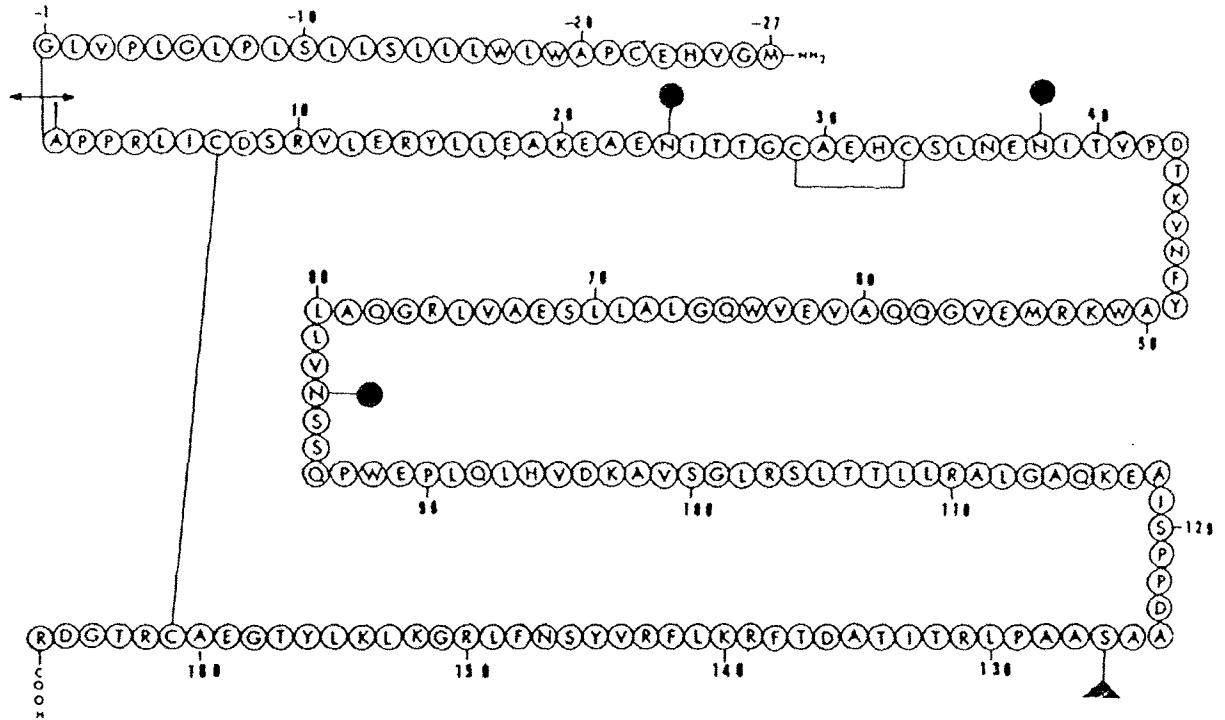
Dans tous les cas, des facteurs inhibiteurs protègent les ressources en CSH ou en progéniteurs hématopoïétiques en empêchant une mise en cycle inutile des cellules quiescentes [128].

III. L'érythropoïétine

Clé de la régulation de l'érythropoïèse, l'érythropoïétine appartient à la grande famille des cytokines dont on découvre de nouveaux membres chaque année. Parmi ces cytokines, l'EPO fait figure de pionnier puisque son rôle a été suggéré dès 1906.

A. Structure moléculaire

L'érythropoïétine humaine naturelle a été purifiée la première fois à partir de sujets de lapins anémiques avant même les techniques de culture *in vitro*. C'est une glycoprotéine formée d'une seule chaîne polypeptidique comprenant 166 acides aminés après que le peptide signal de 27 acides aminés eut été excisé. La protéine recombinante ainsi que la protéine urinaire purifiée perdent l'arginine en position 166. Ce squelette protéique de 165 acides aminés a un poids moléculaire de 18 400 Da [14, 24, 25, 151, 188].



Structure primaire de l'érythropoïétine humaine. La double flèche indique le point de coupure entre le peptide signal et l'hormone. ● = site de N-glycosylation; ▲ = site de O-glycosylation.

Figure 7 - Structure primaire de l'EPO [103].

La molécule mature d'EPO est fortement glycosylée : trois sites de N-glycosylation (sur les asparagines en position 24, 38 et 83) et un site de O-glycosylation (sur la sérine en position 126) (Figure 7) [14, 24, 25, 188]. La structure des chaînes glycosylées n'est pas identique dans toutes les molécules naturelles d'érythropoïétine. En effet, les chaînes sont polyantennées, comportant entre trois et quatre antennes de glycosylation terminées le plus souvent par un acide sialique sur leur extrémité réductrice et contenant des unités N-acétylglucosamine en nombre variable ce qui entraîne l'existence dans le sang d'une population hétérogène de molécules d'érythropoïétine [14]. Le contenu en carbohydrates de la molécule est de 39 % et confère à l'EPO un poids moléculaire estimé à 30 400 Da [25].

Il faut noter que la glycosylation de la molécule est indispensable à son activité biologique *in vivo*. Si l'EPO perd ses acides sialiques, les galactoses des antennes glycosylées sont mis à nu, ils sont alors reconnus par des récepteurs hépatiques spécifiques et la molécule est très rapidement extraite de la circulation. Cependant, sous cette forme, cette molécule est encore active *in vitro*. Par contre, si elle est complètement déglycosylée, elle devient inactive *in vivo* et *in vitro* [24, 25].

Le point isoélectrique très faible de l'érythropoïétine (environ 3,5) résulte de sa richesse en acides sialiques (charge négative) et caractérise cette molécule comme l'une des plus acides du sérum humain. D'autre part, la séquence de la chaîne polypeptidique rend la molécule très hydrophobe. Ces deux dernières propriétés, charge électrique négative et hydrophobicité, sont exploitées lors du choix des méthodes de purification de l'hormone [14].

La glycoprotéine n'a pu être cristallisée probablement à cause de l'importance de sa glycosylation et de l'hétérogénéité de ces chaînes de glycosylation. Mais un modèle de structure tertiaire a été établi par analogie avec d'autres cytokines. Ainsi, l'EPO serait formée de 2 couples d'hélices α antiparallèles reliées par deux boucles. Cette structure est stabilisée par deux ponts disulfures dont l'un relie les extrémités amino- et carboxy-terminales (*Figure 8*). Ce modèle de structure tertiaire a été vérifié par Boissel et al., à l'aide de mutations introduites dans les régions importantes de la molécule. Les quatre hélices et le pont disulfure Cys7-Cys161 sont indispensables pour l'activité biologique, les extrémités amino- et carboxy-terminales peuvent être modifiées sans perte de cette activité [25, 104].

Le site actif de la molécule est encore mal connu, mais des anticorps monoclonaux dirigés contre les résidus 99-118 et 111-129 sont neutralisants, suggérant que cette région de la molécule est impliquée dans la liaison à son récepteur [25]. D'autres auteurs ont réalisé des mutations ponctuelles dans les régions correspondantes aux hélices α dans le but de déterminer les zones d'interaction avec le récepteur. Un petit nombre d'acides aminés, Arg14, Arg103, Ser104, Gly151 et Gly152, apparaissent ainsi essentiels à l'activité biologique de la molécule [104].

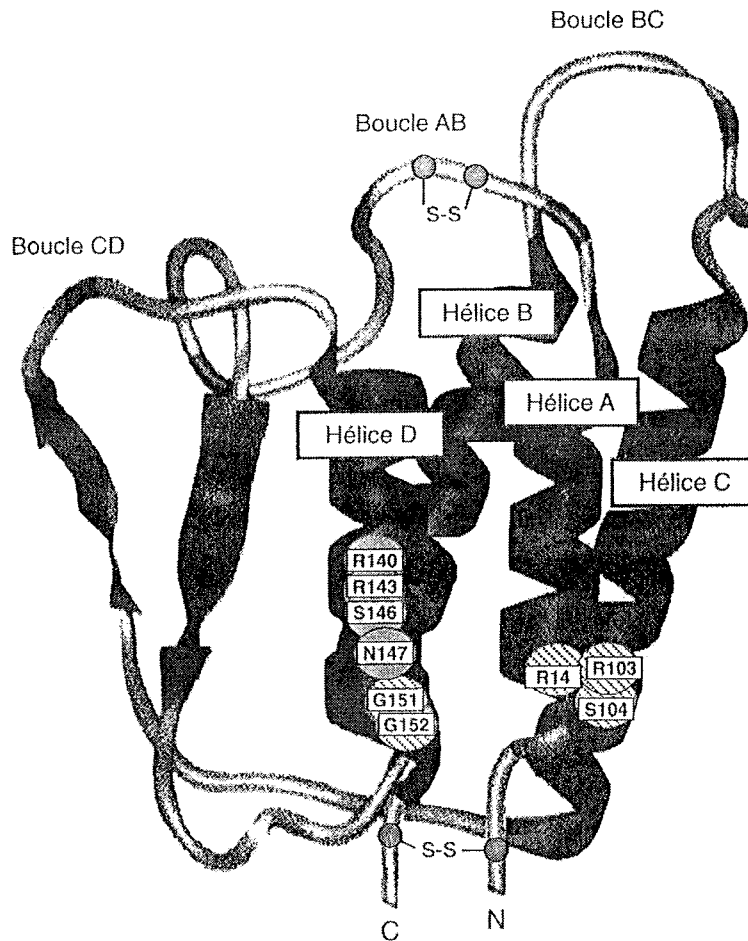


Figure 8 - Modèle de structure tridimensionnelle de l'EPO montrant les quatre hélices et les boucles de raccordement [104].

Les domaines fonctionnels importants pour l'interaction avec le récepteur sont représentés par les zones hachurées.

B. Les sites de synthèse de l'érythropoïétine

Contrairement aux autres facteurs de croissance qui sont produits de façon ubiquitaire par de nombreux types cellulaires et qui agissent localement au niveau de la moelle, l'EPO est produite chez l'adulte essentiellement par le rein (90 % de la production) et plus accessoirement par le foie (10 % de la production). Elle est ensuite relarguée dans la circulation où elle se comporte comme une véritable hormone [25]. D'autres sites ont été retrouvés pour une action locale de l'EPO.

1. Le rein

On sait depuis les travaux de Jacobson en 1957 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 dès 1988 comme une sous-population de cellules interstitielles fibroblastiques pérیتubulaires situées dans le cortex rénal et la médullaire externe. Toutefois certains auteurs ont décrit une production d'EPO par les cellules tubulaires proximales [24, 36, 102, 104, 188]. Cependant, la production d'EPO par ces cellules nécessite une fonction rénale efficiente.

La production rénale d'EPO est constitutive et selon une loi du « tout ou rien ». L'augmentation de la production en EPO se fait par augmentation du nombre des cellules productrices. Les cellules tubulaires joueraient un rôle de sensor à l'O₂ et transmettraient aux cellules interstitielles voisines des signaux O₂ dépendants induisant la production d'EPO [25, 151, 158].

2. Le foie

Une petite production (10 %) est assurée par les cellules du foie chez l'adulte (alors que chez le fœtus, cette production hépatique assure, au début, la totalité de la production d'EPO). L'identification précise des cellules hépatiques intervenant dans cette production 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 : un contingent majoritaire d'hépatocytes distribués autour des veines centro-lobulaires du foie et un contingent plus faible de cellules interstitielles situées en position pérисinusoidale dans les espaces de Disse [24, 36, 102, 104, 158]. Il existe de nombreuses analogies entre ces cellules et les cellules interstitielles fibroblastiques du rein [104]. Ces cellules sont moins sensibles que les cellules rénales à l'hypoxie mais elles peuvent faire varier individuellement leur taux de production d'EPO [158].

3. 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 produite 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 fonctionnel. 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 a été mise en évidence par une équipe japonaise : ce sont les astrocytes qui sécrètent l'hormone et cette production cérébrale d'érythropoïétine serait aussi stimulée par l'hypoxie [104].

L'érythropoïétine se retrouve présente dans le sang et les urines. Il est possible de mesurer les variations de sa concentration sérique et de son excrétion par 24h. Chez les sujets adultes sains les valeurs retrouvées sont de 5 à 25 mUI¹ d'EPO/mL de sérum et 1 UI d'EPO/24h dans les urines. La masse totale d'EPO circulante est d'environ 40 à 50 unités. La teneur sérique en EPO varie dans le cycle des 24 heures avec un minimum observé le matin vers 8h et un maximum vers 20h qui est évalué à 60 % au-dessus du taux matinal. Sa demi-vie est de 4 à 7 heures ; elle est éliminée par le rein après déglycosylation au niveau du foie. Les taux chez l'enfant et l'adolescent sont comparables à ceux chez l'adulte alors que pendant la période périnatale les taux sont souvent supérieurs [14, 158].

C. Régulation de l'expression du gène de l'érythropoïétine

1. Le gène de l'EPO

Les résultats des premiers travaux portant sur le gène de l'érythropoïétine humaine datent de 1985. Le clonage du gène a pu être réalisé en utilisant comme sonde des oligonucléotides de synthèse déduits de la séquence en acides aminés de la protéine purifiée partiellement par Miyake et coll. Il existe une seule copie du gène par génome haploïde, celui-ci est situé sur le bras long q21 du chromosome 7. L'ARN messager de l'érythropoïétine contient 1 600 nucléotides ; or la séquence codant pour l'EPO est contenue dans 582 nucléotides. Le gène de l'EPO est formé par cinq exons (zones d'ADN transcrites), séparés par quatre introns (zones d'ADN non transcrites et pouvant jouer un rôle de régulateur) (*Figure 9*). Les exons II, III et IV dans leur totalité et une partie seulement des exons I et V codent pour la protéine. En amont du codon d'initiation de la traduction ATG, on ne retrouve aucune des séquences promotrices habituelles telles que TATA box, CCAAT box [24, 193, 194].

¹ Une unité internationale d'érythropoïétine est définie comme l'activité qui a produit le même effet stimulateur sur l'érythropoïèse que 5 µmol de cobalt durant les expérimentations animales [90].

La structure du gène est conservée tout au long des espèces, spécialement au niveau des exons : il existe 79 % d'homologie entre les parties codantes de la souris et de l'homme, 94 % entre l'homme et le singe. Cela explique l'absence de spécificité d'espèce dans l'activité biologique [25, 193].

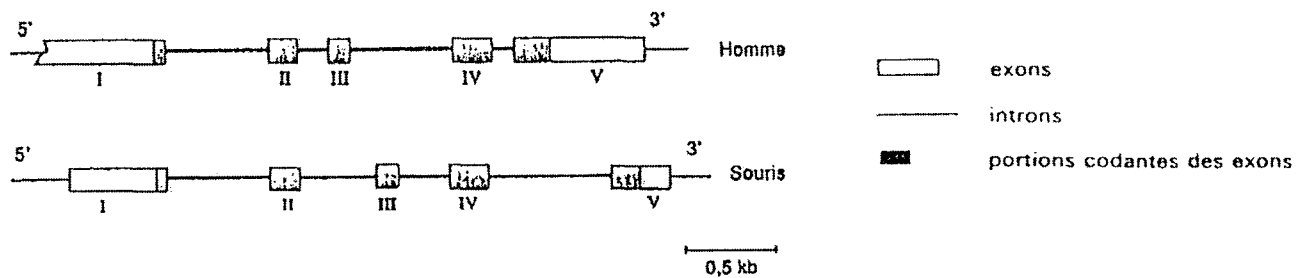


Figure 9 - Le gène de l'érythropoïétine chez l'homme et la souris [193].

2. Régulation de l'expression du gène de l'EPO

a) Bases moléculaires de la régulation du gène par l'hypoxie

L'érythropoïétine constitue un modèle remarquable de l'induction de la synthèse d'une protéine par l'hypoxie. En effet, l'hypoxie ou l'anémie sont capables de multiplier par 100 le taux d'EPO plasmatique. Inversement, le retour à la normoxie arrête la production d'EPO et ramène rapidement à la normale son taux plasmatique [39].

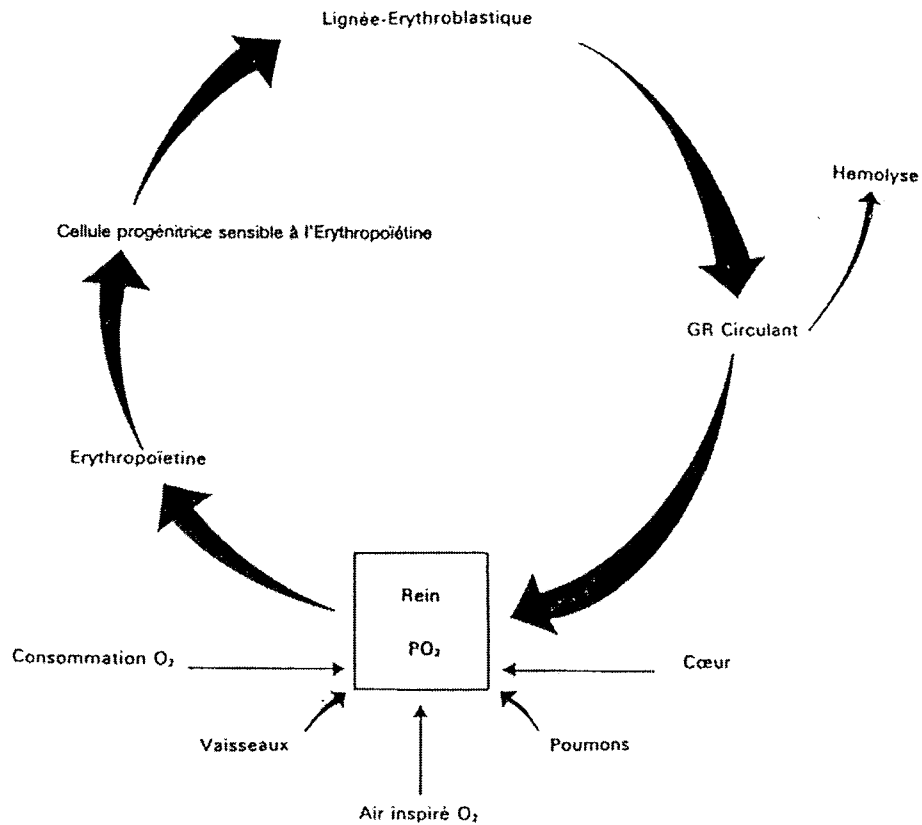


Figure 10 - Régulation de la production d'EPO [99].

La régulation transcriptionnelle du gène de l'EPO commence à peine à être élucidée, elle est complexe et associe des zones de régulation positive et négative qui semblent être différentes dans le rein et le foie [104].

N'étant pas stockée dans les cellules productrices, hépatiques chez le fœtus et para tubulaires rénales après la naissance, l'EPO est produite grâce à une activation de la transcription et à la durée de vie allongée de l'ARN messenger qui la code [39, 158]. L'étude des séquences géniques promotrices et/ou amplificatrices qui confèrent une réponse, aussi bien à l'hypoxie qu'au chlorure de cobalt², a été entreprise par divers groupes ; l'avancée majeure dans ce domaine a été la mise en évidence d'une courte séquence d'ADN de 50 nucléotides (enhancer), située en 3' du gène immédiatement après le site de polyadénylation et ayant un rôle d'amplification de la transcription durant l'hypoxie [13, 39]. Cette région amplificatrice multiplie par 20 la transcription du gène de l'EPO dans des cellules Hep3B (lignées

² Les ions cobalt (et nickel) peuvent remplacer le fer au cours de la synthèse de l'hème. Ils fixent l'hémoglobine dans sa conformation T (désoxygénée). Ces ions parviennent à mimer ainsi les conséquences de l'hypoxie.

cellulaires humaines dérivées d'hépatomes, sécrétant de l'érythropoïétine) cultivées sous une atmosphère contenant 1 % d'oxygène.

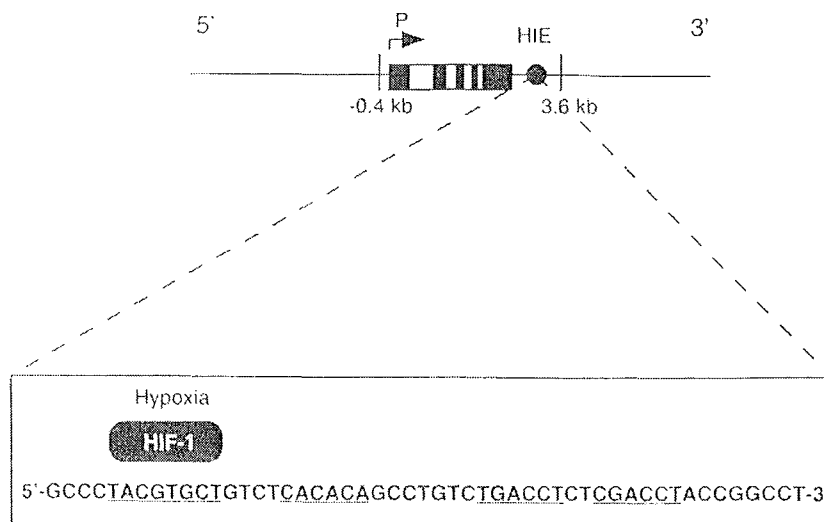


Figure 11 - Gène de l'érythropoïétine et du segment en 3' qui contient la séquence enhancer à laquelle le facteur de transcription HIF-1 se lie pour induire l'expression du gène [13].

Semenza décrit un facteur HIF-1 pour *hypoxia-induced factor*, synthétisé par les cellules hypoxiques lors d'une stimulation par le chlorure de cobalt, et qui a la capacité à se fixer spécifiquement sur cet *enhancer* (Figure 11) [13, 25, 26, 104, 158]. Ce facteur HIF-1 activateur, de poids moléculaire d'environ 120 kDa, est une protéine hétérodimérique formée d'une sous-unité α dont l'expression est fortement régulée, en particulier par l'oxygène, et d'une sous-unité β exprimée de façon constitutive, qui est le facteur transcriptionnel ARNT (Aryl Hydrocarbone Receptor Nuclear Transcativator). Ces sous-unités font partie de la famille des facteurs transcriptionnels PAS (Per-ARNT-Sim) [34]. La séquence de reconnaissance, l'*Hypoxia Responsive Element* (HRE) est courte (TACGTGCTG). Dans les cellules de la lignée hépatique Hep3B, la concentration des sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β est faible à pO₂ atmosphérique (20 %) et augmente considérablement à faible pO₂ (1 %). Cette induction est parallèle à l'activation du gène de l'EPO. Inversement la sous-unité HIF-1 α et son ARN messenger reviennent rapidement au niveau basal après le retour des cellules à la pO₂ atmosphérique [39].

Il existe donc au niveau des cellules productrices d'EPO, ou dans leur environnement immédiat, un système permettant de déceler les variations d'oxygène (*oxygen sensor*). Dans la lignée Hep3B, ce sensor est caractérisé par cinq propriétés [39] :

- 1 - il est activé par l'hypoxie et inactivé par le retour à une pO_2 élevée.
- 2 - le cobalt et le nickel activent l'expression de l'EPO et de HIF à pO_2 élevée car ils peuvent remplacer le fer au cours de la synthèse de l'hème et figent ainsi l'hémoglobine dans sa conformation T (désoxygénée).
- 3 - l'oxyde de carbone qui stabilise la conformation R (oxygénée) de l'Hb abolit l'effet de l'hypoxie.
- 4 - les inhibiteurs de la synthèse de l'hème abolissent les effets activateurs du cobalt.
- 5 - une baisse de l'ATP cellulaire, par le blocage de la chaîne respiratoire mitochondriale par le cyanure, n'induit pas l'expression de l'EPO. Le cyanure ne se fixe que sur la forme ferrique Fe^{3+} de l'hème.

Un modèle de régulation de l'expression du gène de l'EPO a été proposé par Goldberg et coll. Selon les auteurs, cette régulation mettrait en jeu une protéine contenant de l'hème et dont le fer est ferreux (Fe^{2+}). 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 la conformation « désoxy » active. Ces protéines pourraient augmenter la production du facteur de transcription HIF-1 et positivement l'expression du gène de l'EPO [39, 88, 104, 158].

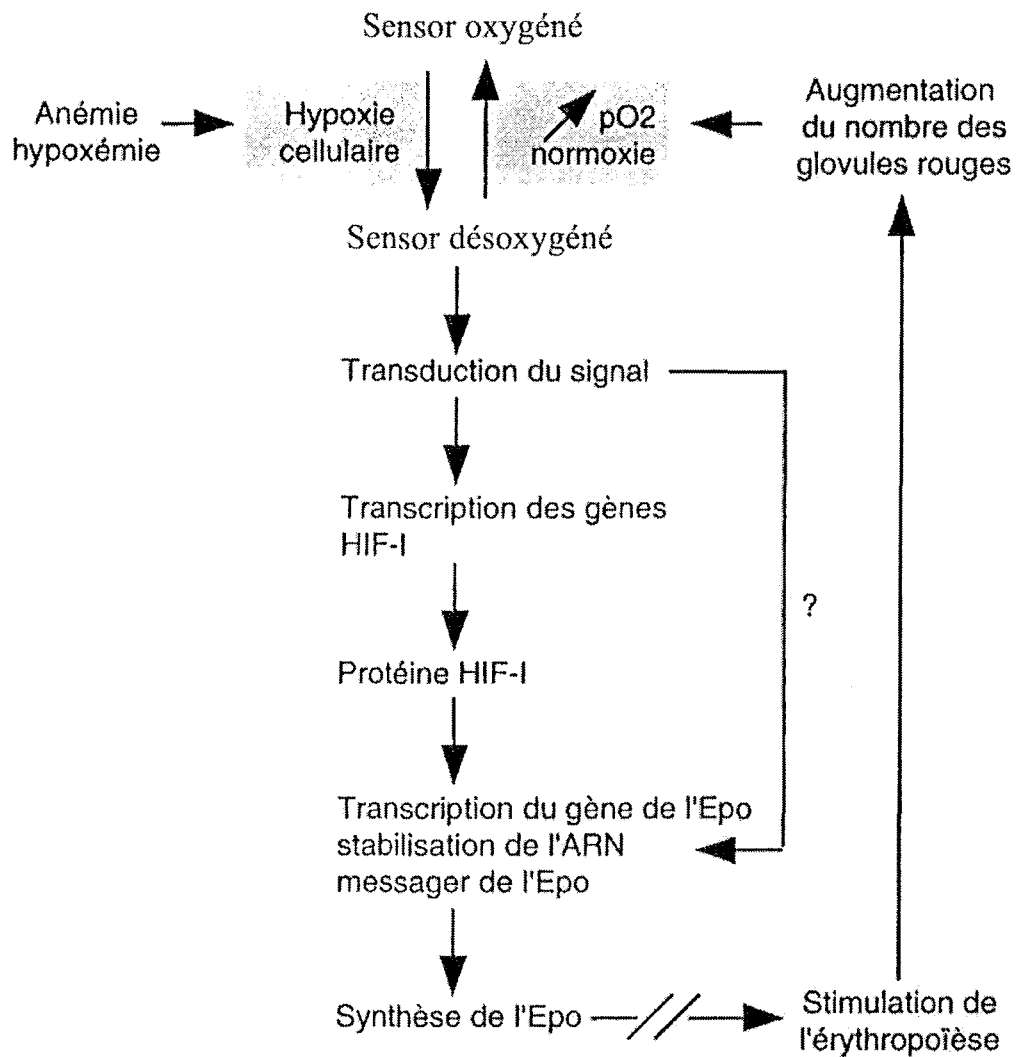


Figure 12 - Régulation cellulaire de l'expression de l'érythropoïétine [39].

b) Hypoxie et voie de signalisation : découvertes récentes

Très récemment, les mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire à l'hypoxie ont fait l'objet de plusieurs articles dans les revues scientifiques (*Figure 13*) [34, 117, 137].

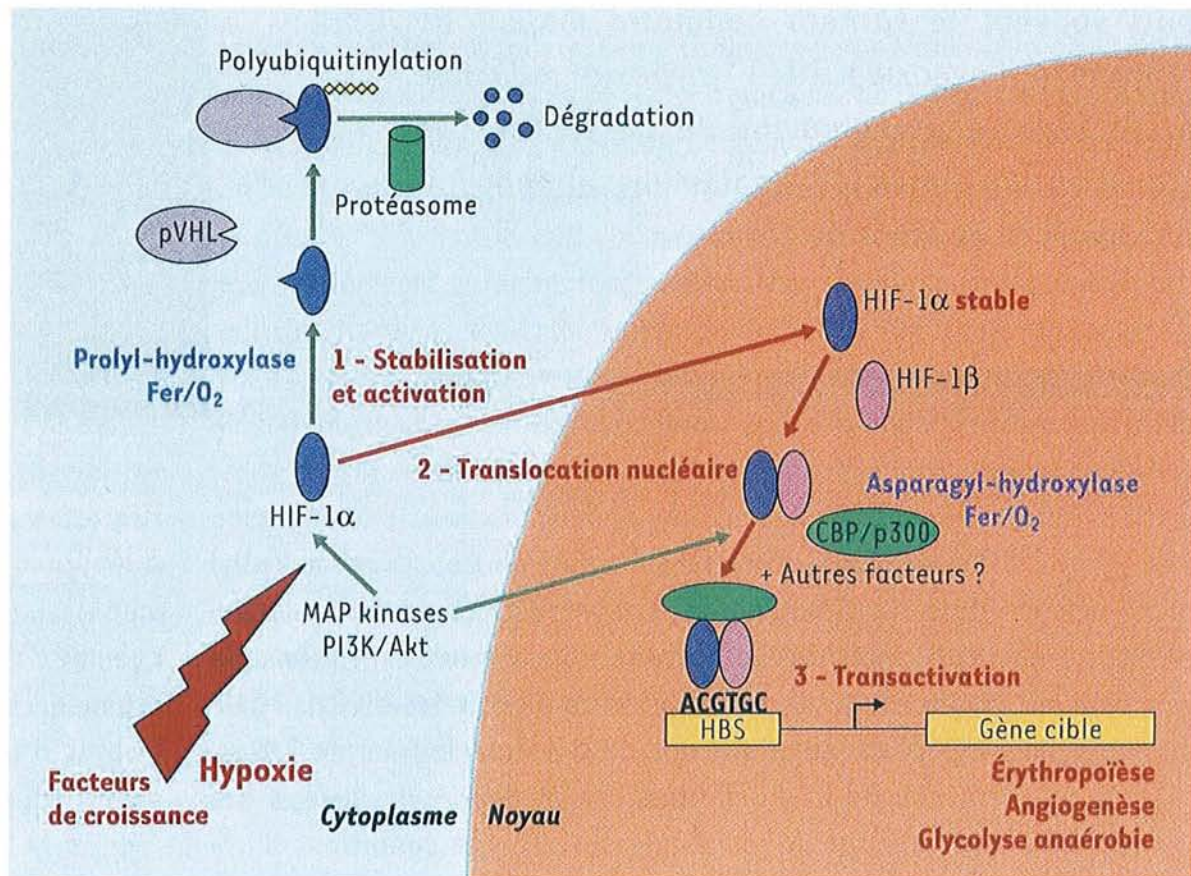


Figure 13 - Régulation de l'activité de la protéine HIF-1 α par la concentration intracellulaire en oxygène [137].

En condition de normoxie, la protéine HIF-1 α est très instable. Elle est rapidement dégradée et sa demi-vie est inférieure à cinq minutes. En effet, le catabolisme de la sous-unité α est régulé par trois prolyl-hydroxylases (PHD 1-3). Ces trois protéines sont les détecteurs d'oxygène qui permettent à la cellule de produire HIF à bon escient. En normoxie, les PHD utilisent l' O_2 comme substrat et hydroxylient un résidu proline de la protéine HIF-1 α . L'utilisation du fer comme cofacteur explique comment les ions cobalt et nickel ou la déféroxamine, un agent chélateur du fer parviennent à mimer les conséquences de l'hypoxie. L'hydroxylation de ces prolines favorise l'interaction de la sous-unité α avec la protéine de Von Hippel-Lindau (pVHL), un composant du protéasome multiprotéique VHL-E3-ubiquitine ligase. HIF-1 α ubiquitinylée est alors reconnue par le protéasome et dégradée. Par ailleurs, la fonction de transactivation de HIF-1 α est régulée par une hydroxylase O_2 -dépendante. FIH-1 (facteur inhibant HIF-1) hydroxyle la protéine et prévient ainsi son interaction avec ses coactivateurs p300 et CBP. Ce mécanisme empêche en seconde ligne

HIF-1 de fonctionner en normoxie, dans le cas où la synthèse de la sous-unité α surpasserait les capacités de dégradation de HIF-1 par le système VHL-E3 ubiquitine ligase-protéasome.

En hypoxie, les enzymes hydroxylases ne trouvent plus suffisamment d'oxygène pour modifier la sous-unité α qui n'est plus alors reconnue par pVHL : elle s'accumule donc, interagit avec le chaperon Hsp90 et migre dans le noyau où elle s'associe à son partenaire HIF-1 β . Le complexe ainsi formé recrute d'autres partenaires, en particulier CBP/p300, se fixe sur la séquence nucléotidique spécifique HRE située dans la région promotrice du gène de l'EPO et augmente ainsi sa transcription.

Notons que de nombreuses autres modifications post-traductionnelles interviennent dans la régulation de l'activité de HIF-1 α . Parmi celles-ci, les phosphorylations par les MAP-kinases (mitogen activated protein-kinase) et la PI3-kinase (phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT de HIF-1 α et de ses partenaires permettent l'activation de la voie HIF en réponse à de nombreux facteurs de croissance, même en condition de normoxie.

De façon plus générale, la protéine HIF-1 est présente et inductible par l'hypoxie dans toutes les cellules de mammifères et pas seulement dans les cellules productrices d'EPO. D'une part, cela implique que la production d'EPO nécessite d'autres mécanismes afin d'assurer la spécificité tissulaire restreinte de l'expression du gène ; d'autre part, la protéine HIF-1, ubiquitaire, pourrait transactiver d'autres gènes cellulaires lors de l'hypoxie comme celui de la phosphoglycérate kinase 1 et celui de la lactate déshydrogénase A [104].

c) 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 groupes de souris transgéniques ont été établis 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 (*Figure 14*) : une région de 6 kb située en 5' du

gène (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 -16 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 : HRE, la séquence de fixation de HIF-1 [104].

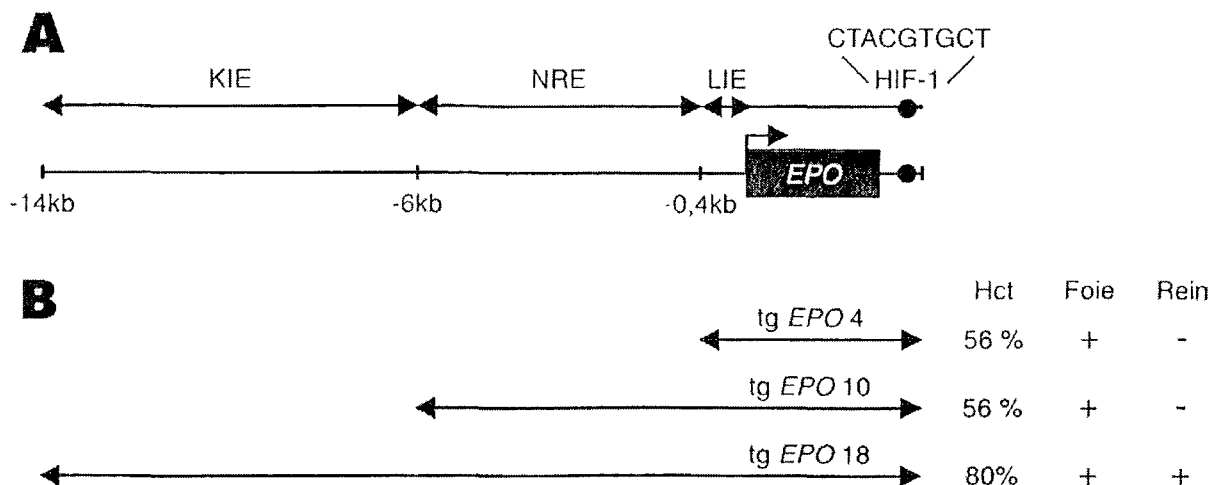


Figure 14 - Régulation du gène de l'EPO [104].

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.

Il semble donc que la spécificité tissulaire de production de l'EPO dépende de la longueur et de l'emplacement de certaines séquences. Ainsi, une longue séquence régulatrice d'ADN située à plus de 6 kb en 5' du site d'initiation du gène est indispensable à l'expression rénale d'EPO en réponse à l'hypoxie. Mais, la région enhancer 3' contenant le site de fixation de HIF-1 conditionne la régulation par l'hypoxie.

D. Le récepteur de l'érythropoïétine

1. Les cellules cibles

L'érythropoïétine agit sur ces cellules-cibles par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique (EPO-R) présent en faible nombre sur les cellules hématopoïétiques. Les progéniteurs érythrocytaires sont les cibles principales mais les récepteurs sont présents sur un continuum de cellules allant des BFU-E matures aux érythroblastes, avec un maximum sur les CFU-E et les proérythroblastes [24, 36, 104, 151].

Initialement, les récepteurs à l'EPO n'étaient connus présents que sur les précurseurs érythrocytaires de la moelle osseuse mais ils ont également été décrits à la surface des mégacaryocytes, 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). C'est une protéine de 353 acides aminés dont la partie N-terminale présente plus de 25 % de similitude avec l'EPO. Ces analogies structurales entre EPO et TPO font supposer que certains relais en aval pourraient être communs aux deux lignées [104].

Le récepteur à l'EPO a également été localisé sur de nombreux types cellulaires : cellules endothéliales, entérocytes, cellules de Leydig du testicule et enfin sur les neurones aminergiques et cholinergiques et sur les astrocytes [104, 121]. Nous reviendrons sur ces récepteurs à localisation non érythrocytaire dans le chapitre consacré à l'utilisation de l'érythropoïétine en thérapeutique [121].

2. Structure de l'EPO-R

Il a été démontré à l'aide d'érythropoïétine radiomarquée qu'il existait un seul type de récepteur à haute affinité. Cependant, certains auteurs soulignent qu'il en existerait un second type, de basse affinité [24]. En 1989, chez la souris, le gène codant pour une chaîne protéique transmembranaire p66 (66 kDa) a été cloné [40]. Ce récepteur fixant l'EPO appartient à la famille des récepteurs aux facteurs de croissance hématopoïétique qui comprend les récepteurs à la plupart des cytokines à l'exception du SCF et du M-CSF [24, 104, 188].

Les récepteurs des cytokines présentent tous un domaine transmembranaire unique et des analogies de structure dans leur domaine extracellulaire (*Figure 15*). En effet, ils ont en commun un module de 210 acides aminés comportant de nombreux acides aminés conservés

et en particulier un motif WSXWS (Trp-Ser-acide aminé quelconque-Ser-Trp) proche du domaine transmembranaire et deux paires de cystéines dans la région N-terminale formant deux ponts disulfures nécessaires à la fixation du ligand [56].

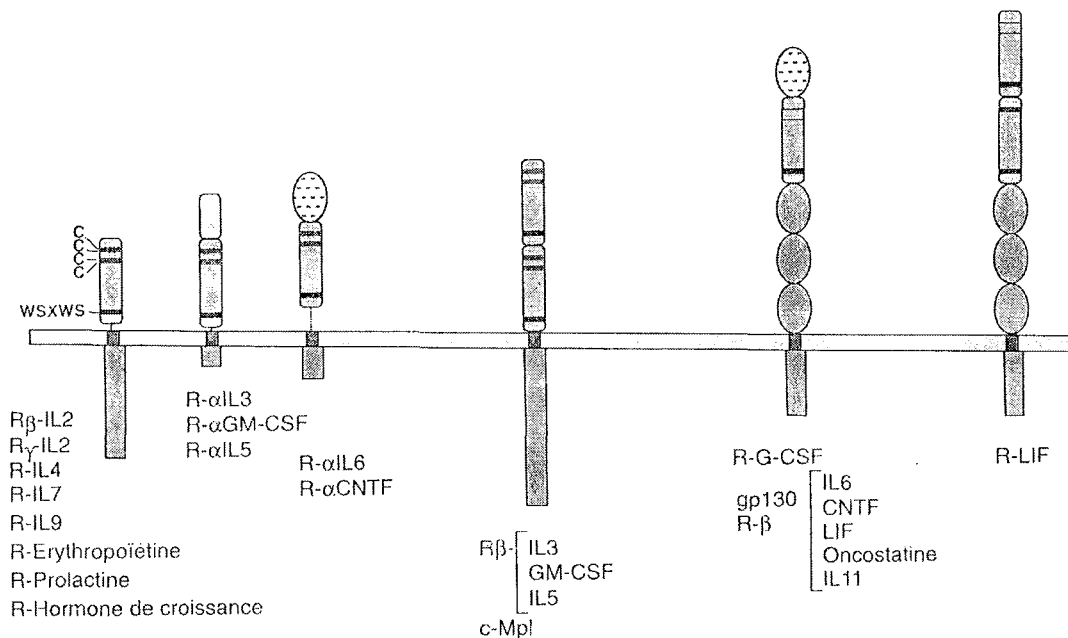


Figure 15 - Représentation schématique des différentes chaînes des récepteurs de cytokines [56].

Les expériences de pontage, qui fixent l'EPO de façon irréversible sur son récepteur par des agents chimiques, ont suggéré que l'EPO-R avait une structure multimérique et que, outre la chaîne clonée p66, il existe des chaînes protéiques accessoires donnant au complexe cytokine-récepteur une masse moléculaire finale de 330 kDa [24, 25, 104, 188]. Les chaînes accessoires p85 (85 kDa) et p100 (100 kDa) ne correspondent pas à une forme hyperglycosylée de p66, et ne sont pas reconnues par un anticorps dirigé contre la chaîne clonée. Ces deux chaînes accessoires sont présentes sur tous les progéniteurs érythrocytaires, mais leur clonage s'avère très difficile car ces protéines ne fixent pas l'EPO [56, 104].

Certains récepteurs de cytokines sont biologiquement actifs sous la forme d'homodimères ; c'est le cas de la p66. En effet, une mutation ponctuelle (Arg129 → Cys) dans la partie extracellulaire du récepteur provoque la dimérisation de p66 par la création d'un pont disulfure interchaîne et entraîne son activation constitutive en l'absence de ligand.

Le récepteur de l'EPO pourrait donc être constitué d'un dimère de p66 associé à une molécule de p85 et une molécule de p100 [104].

3. Le récepteur de l'érythropoïétine est un dimère

Ce processus de dimérisation que personne ne conteste aujourd'hui fut longtemps opposé à une théorie selon laquelle l'activation du récepteur et la stimulation de l'activité tyrosine kinase résultaient de la modification conformationnelle du récepteur induite par la fixation du ligand. Deux articles publiés dans *Science* réconcilient en partie ces deux conceptions. Les résultats démontrent très clairement qu'en l'absence d'érythropoïétine, le récepteur est déjà dimérisé et que l'EPO ne provoque pas la dimérisation du récepteur mais change l'orientation relative des deux molécules du récepteur entrant en liaison avec le ligand, permettant ainsi le rapprochement des tyrosines kinases JAK2 associées à leur partie intracellulaire [104].

Livnah et coll. ont montré que l'organisation spatiale du récepteur était très différente en présence ou non d'EPO. En l'absence d'EPO, le dimère adopte une structure en croix qui éloigne considérablement les extrémités carboxy-terminales de la partie extracellulaire du récepteur. Puisque, dans le récepteur complet, ces extrémités sont suivies de la partie transmembranaire puis de la partie intracellulaire, on pouvait supposer que cette organisation éloignait fortement les parties intracellulaires l'une de l'autre [113, 118].

C'est ce que démontre de façon très élégante l'article de Rémy et coll. Ils ont greffé les extrémités amino- et carboxy-terminales de la DHFR (dihydrofolate réductase) juste après la région transmembranaire du récepteur de l'EPO et ont tenté de reconstituer l'enzyme fonctionnelle en intercalant un espaceur flexible de longueur variable (résultant de la liaison de plusieurs acides aminés). Les résultats de cette étude sont schématisés sur la *figure 16*. L'ensemble de ce travail montre donc que le récepteur de l'érythropoïétine forme un dimère en l'absence de ligand et que la fixation de l'EPO ne provoque pas la dimérisation du récepteur comme on le supposait mais simplement un rapprochement des parties intracellulaires [118, 144].

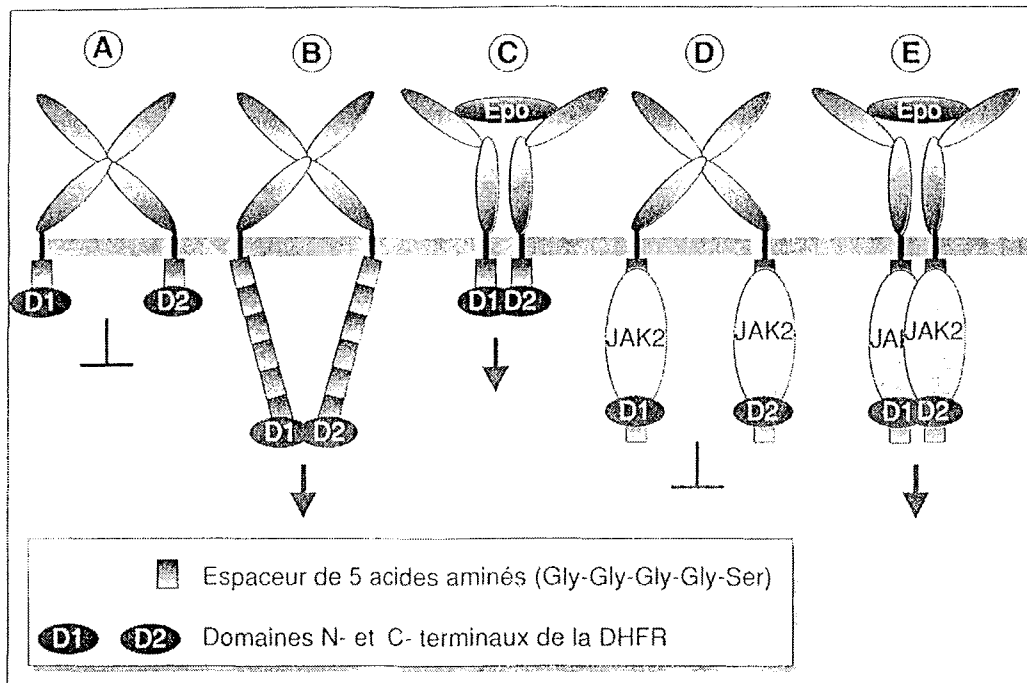


Figure 16 - Schéma explicatif des expériences de Rémy et al [118].

Si les deux domaines (D1 et D2) de la DHFR ne sont espacés de la partie transmembranaire que par 5 acides aminés, une enzyme active est reconstituée en présence d'érythropoïétine (C) mais pas en son absence (A). En revanche, la présence d'un espaceur de 30 acides aminés permet la reconstitution de l'enzyme en l'absence d'EPO (B). Si les fragments de la DHFR sont fixés à l'extrémité carboxy-terminale des kinases JAK2, la reconstitution de l'activité DHFR n'est possible qu'en présence d'érythropoïétine (D et E).

E. Activités biologiques de l'érythropoïétine

En 1990, Koury et Bondurant ont proposé un contrôle de l'érythropoïèse par l'EPO circulante. Elle agirait en inhibant l'apoptose des progéniteurs érythroblastiques, leur permettant ainsi de s'engager vers une différenciation érythrocytaire. Cependant, l'EPO semble être également capable d'induire la prolifération et la différenciation érythrocytaire : de nombreux modèles expérimentaux sont actuellement étudiés pour analyser les domaines du récepteur et les voies de transduction du signal [104].

1. Régulation positive

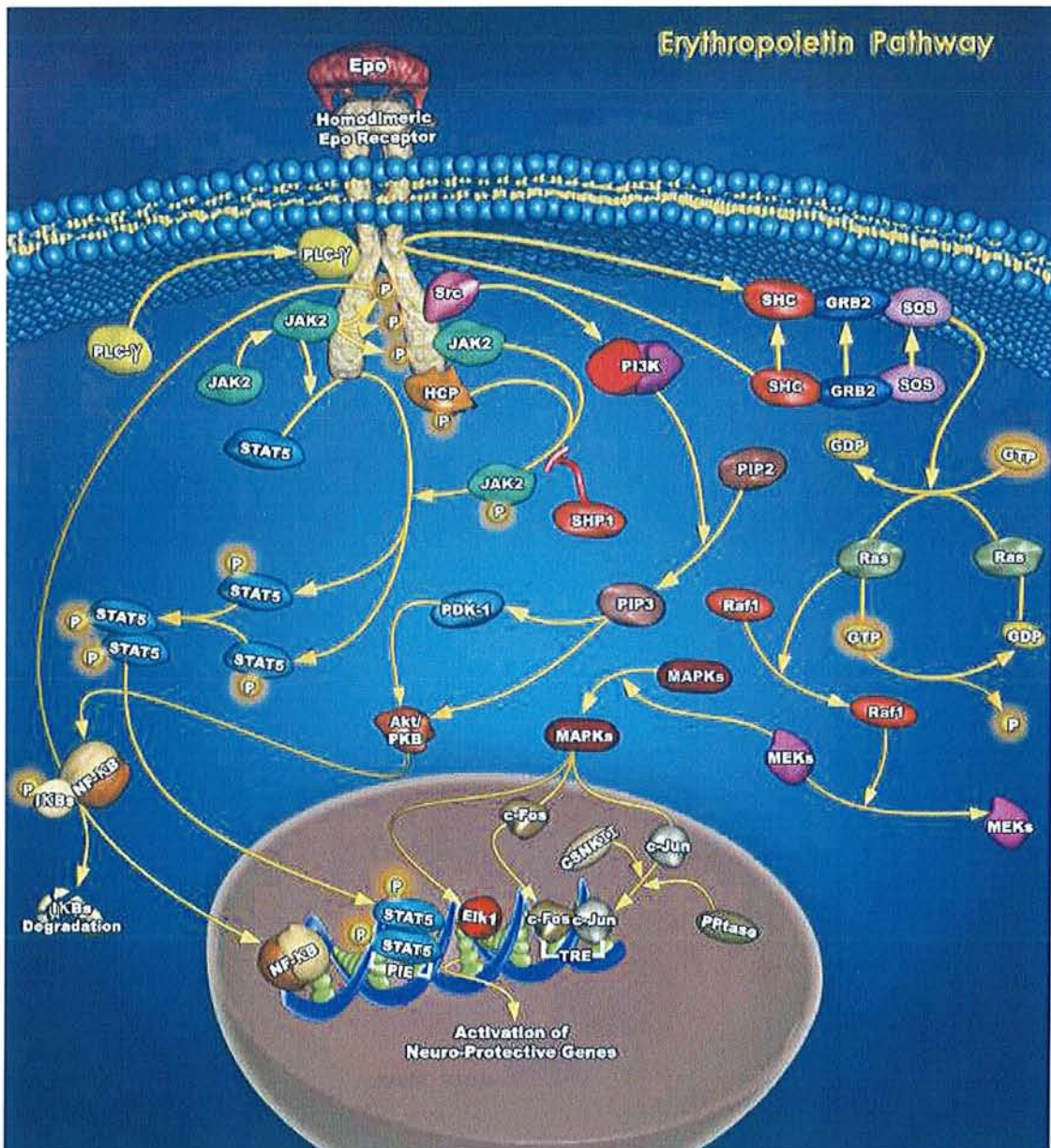


Figure 17 - Représentation schématique des voies de signalisation induites par l'EPO [4].

Les voies de signalisation activées par l'EPO commencent à mieux être connues (*Figure 17*) : il a été démontré, que bien que le récepteur à l'EPO ne possède pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque, sa stimulation induit spécifiquement sa phosphorylation sur tyrosine ainsi que celle d'autres protéines cytoplasmiques. Toutefois, cette phosphorylation du récepteur ne semble pas indispensable à la prolifération cellulaire puisque l'élimination des tyrosines de la

partie intracellulaire des récepteurs à l'EPO ne détruit pas leur potentialité de transduction du signal de prolifération cellulaire [56].

Suite à la fixation de l'EPO, la tyrosine kinase JAK2 préassociée à la région cytoplasmique juxtamembranaire de l'EPO-R est activée suite à un changement conformationnel affectant le complexe récepteur/JAK2 comme décrit dans l'hypothèse de Rémy. Cette activation aboutit à la phosphorylation de la région cytoplasmique de l'EPO-R [25, 56, 88, 118].

Il semble bien établi que les voies activées par le récepteur de l'EPO permettent la prolifération et la survie des cellules par l'intermédiaire de l'activation de la PI3-kinase, une région distale de l'EPO-R est impliquée dans la fixation de cette enzyme. Néanmoins, les mécanismes de cette activation restent obscurs. Ils pourraient mettre en jeu une association entre la sous-unité régulatrice de cette enzyme, les tyrosines phosphorylées des récepteurs ainsi que des kinases de la famille Src. L'activation de la PI3-kinase pourrait jouer un rôle dans l'internalisation du récepteur activé et/ou être impliquée dans la prolifération cellulaire [56, 88].

La voie Ras/MAP kinase est également activée par l'EPO et pourrait être responsable, selon certains auteurs, de l'inactivation secondaire du récepteur ou pour d'autres, de la prolifération induite par les cytokines. Elle conduirait à l'expression des facteurs transcriptionnels c-Fos et c-Jun. Les kinases de la famille Src pourrait être impliquées dans l'activation de la voie Ras/MAP kinase. Mais cette voie de signalisation reste cependant encore mal comprise [25, 56].

- **Survie cellulaire :**

Le récepteur à l'EPO activé recruterait également les protéines STAT et en particulier STAT 5A et STAT 5B, qui vont être phosphorylées par la protéine JAK2. Ces facteurs de transcription STAT5 une fois phosphorylés vont s'hétérodimériser, puis migrer dans le noyau pour augmenter l'expression de certains gènes. Actuellement, il n'y a pas de gène de différenciation érythrocytaire spécifiquement induit par STAT5 [56]. En revanche, elle agit en synergie avec GATA-1 pour augmenter l'expression de Bcl-X_L, augmentant ainsi la survie cellulaire. Il semble que l'action principale de l'EPO soit d'augmenter la survie des progéniteurs érythrocytaires. Le modèle proposé actuellement est un modèle où les progéniteurs tardifs, essentiellement les CFU-E, auraient un seuil de sensibilité à l'EPO

variable. Certains seraient très sensibles à l'érythropoïétine et pourraient survivre à faibles taux d'EPO et d'autres au contraire seraient très peu sensibles et pour survivre nécessiteraient des taux élevés d'EPO. Les mécanismes définissant les niveaux de sensibilité de ces progéniteurs ne sont pas connus. On sait qu'ils ne sont pas liés à une variation du nombre de récepteurs ni à une variation de leur affinité [88].

Ce modèle permettrait de rendre compte de la synergie entre le SCF et l'EPO. Le SCF, en activant fortement l'activité de la PI-3 kinase, permettrait la phosphorylation d'AKT qui elle-même phosphorylerait des protéines telles que BAD permettant ainsi la libération de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L. De son côté, l'érythropoïétine en activant STAT5 permettrait d'augmenter l'expression de Bcl-X_L [88].

- **Prolifération cellulaire**

D'autres auteurs ont étudié de nombreux modèles expérimentaux pour analyser 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'intégralité du domaine cytoplasmique juxtamembranaire est indispensable pour la prolifération cellulaire ; en revanche, ni la région carboxy-terminale, ni les différentes tyrosines qui assurent la phosphorylation de ce récepteur ne semblent indispensables pour la prolifération [104].

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 érythrocytaires, cibles spécifiques et physiologiques de l'EPO [104].

Au total, la régulation positive de l'érythropoïèse se ferait essentiellement par inhibition de l'apoptose des progéniteurs et des précurseurs érythrocytaires par l'intermédiaire de la protéine Bcl-X_L. La prolifération et la différenciation s'effectueraient ensuite de façon non régulable, une fois assurée la survie des progéniteurs. Il ne semble pas que le récepteur à l'érythropoïétine puisse envoyer des signaux spécifiques de différenciation. En effet, en remplaçant les EPO-R par d'autres récepteurs de cytokines spécifiques d'autres lignages (TPO, G-CSF, prolactine), la différenciation, à partir du moment où la survie est possible, s'effectue normalement [13, 88].

2. Régulation négative

A l'inverse, pour éviter une trop forte production de globules rouges, l'érythropoïèse doit être régulée de façon négative. Cette régulation s'effectue essentiellement par le taux d'EPO circulante comme nous venons de l'expliquer. Plus récemment, il vient d'être démontré que la régulation négative de l'érythropoïèse s'effectue par un mécanisme paracrine faisant jouer les récepteurs de mort tels que FAS. Dans ce modèle, il a été proposé que les érythroblastes en fin de différenciation (polychromatophiles et acidophiles) au niveau de la moelle osseuse, au sein des îlots érythroblastiques expriment FAS ligand et interagissent ainsi directement avec les progéniteurs et les précurseurs érythroblastiques plus précoces exprimant le récepteur FAS afin d'induire l'arrêt de maturation et l'apoptose de ces progéniteurs et précurseurs. Ainsi le taux d'érythroblastes « matures » de la moelle pourrait contrôler rétroactivement l'érythropoïèse [88].

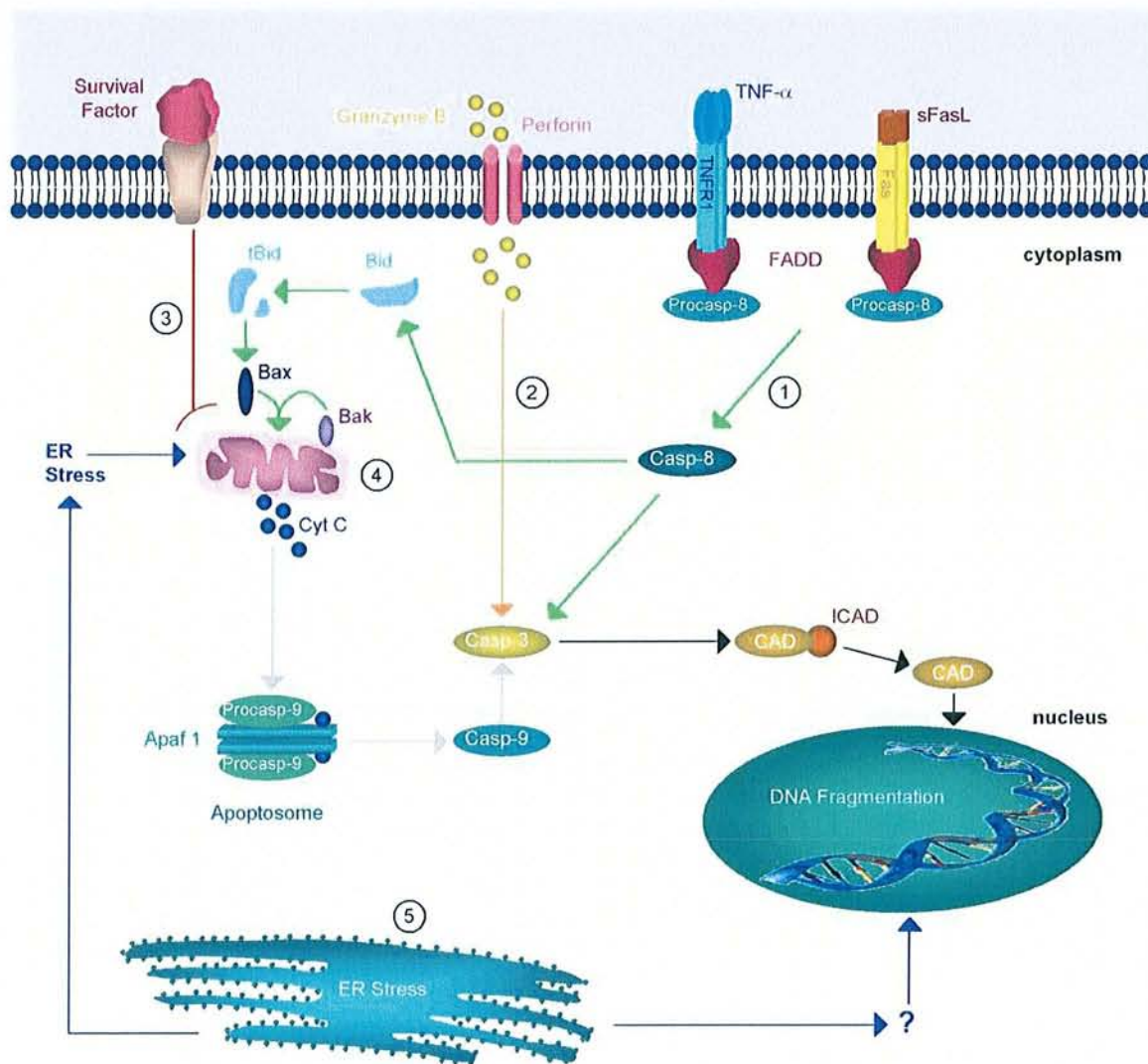


Figure 18 - Représentation schématique des voies impliquées dans l'apoptose [44].

Pour rappel, FAS ligand en agissant sur son récepteur FAS induit le recrutement de caspases (Figure 18) essentiellement de la caspase 8, qui elle-même en retour va activer la caspase 3 pour induire le clivage des protéines nécessaires à la structure et à l'intégrité du noyau et de la chromatine. Cette activation de la caspase 3 va conduire à l'apoptose. De plus l'activation de la caspase 8 clive et active la protéine BID qui peut alors induire la dépolérisation de la membrane mitochondriale. Une fois dépolérisée, la mitochondrie va libérer du cytochrome C dans le cytoplasme, ce qui aboutit à la formation d'apoptosome comprenant la pro-caspase 9, et le facteur APAF-1. L'apoptosome va induire l'activité de la caspase 9 qui va cliver la caspase 3 et conduire également à l'apoptose par cette voie mitochondriale. Cette deuxième voie d'apoptose induite par FAS ligand peut être inhibée par de forts taux de la protéine Bcl-X_L. Au niveau de l'érythropoïèse, la protéine GATA-1 est une des cibles de la caspase 3. Son

clivage va induire un arrêt de l'expression des gènes nécessaires à la maturation et induire ainsi un blocage de la différenciation érythrocytaire. De plus le clivage de GATA-1 va conduire à une diminution de l'activité du promoteur du gène de Bcl-X_L.

Dans ce modèle FAS/FAS ligand, l'EPO pourrait agir en bloquant les effets apoptotiques de FAS ligand. En effet, en augmentant les taux de Bcl-X_L, elle permettrait de bloquer la dépolérisation de la mitochondrie induite par BID et ainsi de diminuer l'activation de la capsase 9 et donc de la capsase 3, et finalement de l'apoptose [88].

Par ailleurs, la tyrosine phosphatase PTP1C (ou SHP-1 ou HCP pour *hematopoietic cell phosphatase*) est associée au récepteur de l'IL-3 activée et également au récepteur de l'EPO. La SHP-1 se lie au récepteur par ses domaines SH₂. Cette enzyme pourrait être impliquée dans le processus de désactivation de EPO-R en inhibant la phosphorylation de la protéine JAK2 ce qui diminue la survie cellulaire [56].

F. Anomalies de l'érythropoïèse

L'EPO et/ou son récepteur sont directement impliqués dans certaines anomalies de l'érythropoïèse.

1. Anémies³

Comme nous l'avons déjà vu, le site de synthèse prépondérant de l'érythropoïétine est le rein. Il n'est donc pas surprenant que tous les patients ayant une insuffisance rénale majeure soient anémiques par défaut de production d'EPO jusqu'à la mise en place d'un traitement à l'EPO [47, 104].

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 en effet que certaines cytokines toujours présentes dans les syndromes inflammatoires tels que l'IFN- γ , l'IL-1, le TNF- α ou le TGF- β avaient un effet nocif sur la production d'EPO. En outre, des travaux récents ont démontré que ces mêmes cytokines inhibent la formation des colonies érythrocytaires humaines *in vitro*. Tous ces mécanismes ont constitué le rationnel pour l'utilisation de l'EPO en cas d'anémie inflammatoire [13, 104, 153].

³ On parle d'anémie lorsque la concentration sanguine en Hb est inférieure à 13 g/dL chez l'homme, 12 g/dL chez la femme.

En néonatalogie, l'anémie demeure un problème important qui peut conduire à des transfusions répétées. Le mécanisme principal dans la genèse de l'anémie post-natale du prématuré est la croissance rapide du compartiment vasculaire, en parallèle direct avec la croissance pondérale, alors que l'érythropoïèse n'arrive pas à assurer de façon adéquate le remplissage de ce compartiment. Il existe une réponse inappropriée de la production d'EPO due à l'immaturité des reins, accompagnée fréquemment d'un épuisement rapide des réserves en fer. Plusieurs grandes études cliniques ont documenté le bien-fondé du traitement par l'EPO pour éviter les transfusions chez le prématuré anémique [13].

2. Polyglobulies⁴

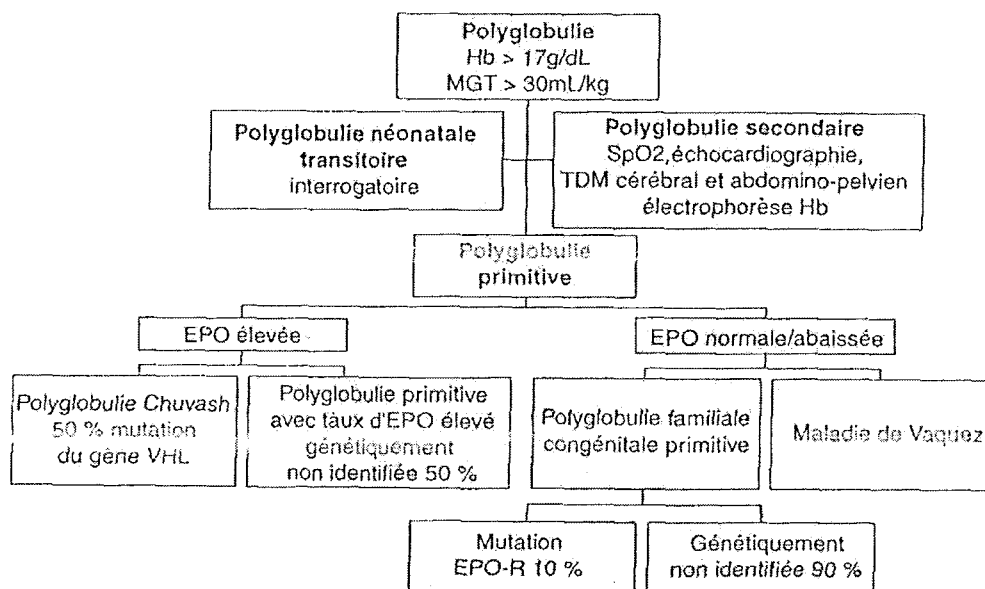


Figure 19 - Étiologie des polyglobulies [175].

a) Polyglobulies secondaires

Les polyglobulies secondaires correspondent à une hypersécrétion d'érythropoïétine physiologique en réponse à la baisse de la saturation en oxygène du sang artériel, comme c'est le cas lors des séjours en haute altitude ou dans certaines maladies cardio-respiratoires.

Il existe aussi des polyglobulies secondaires à des tumeurs d'origine diverse induisant une hypersécrétion pathologique d'EPO. Cependant, les causes sont surtout les tumeurs

⁴ On parle de polyglobulie lorsque l'hématocrite Ht est supérieur à 54 % chez l'homme (47 % chez la femme) et lorsque la masse globulaire totale est supérieure à 36 ml/kg chez l'homme (32 ml/kg chez la femme).

sécrétantes du rein (adénocarcinomes) ou du cervelet (hémangioblastomes), ou plus rarement d'autres cancers (hépatomes), voire des tumeurs bénignes (kystes rénaux, fibromes utérins). Ces cellules tumorales ne sont pas celles qui produisent normalement la cytokine et cette production supplémentaire est mal comprise et semble liée au processus de tumorigénèse [104, 112, 128].

b) Polyglobulies primitives

(1) Polyglobulies de Vaquez

Dans la polyglobulie de Vaquez, les taux d'EPO sont bas, la prolifération anormale des progéniteurs érythrocytaires est due à leur hypersensibilité aux facteurs de croissance hématopoïétiques ou à leur prolifération spontanée indépendante de l'EPO. Les études faites jusqu'à présent n'ont pas décelé de mutation 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 [104, 112, 128].

Récemment des polyglobulies primitives à taux élevé en EPO ont été trouvées. Elles restent encore génétiquement non identifiées. Les polyglobulies primitives sont très rares et ne doivent être envisagées qu'après avoir éliminé une polyglobulie secondaire. Le mécanisme de la plupart des polyglobulies primitives reste inconnu. (*Figure 19*) [175].

(2) Polyglobulies primitives familiales

Le groupe des polyglobulies primitives familiales congénitales (PPFC) est caractérisé par son caractère familial, un mode de transmission autosomique dominant, un taux d'EPO normal ou abaissé et une hypersensibilité des précurseurs érythrocytaires à l'EPO. Des études génétiques réalisées chez des familles atteintes ont pu mettre en évidence dans 10 % des cas une mutation à l'état hétérozygote du gène du récepteur de l'EPO situé sur le chromosome 19. Il existe une dizaine de mutations qui conduisent toutes à la perte de la partie intra-cytoplasmique carboxy-terminale du récepteur qui comporte le site de liaison pour l'*hematopoietic cell phosphatase* (HCP ou SHP1). Or l'HCP a un rôle dans la régulation négative physiologique de la transduction du signal de l'EPO-R. Ces mutations entraînent donc un emballement de la transduction du signal, une augmentation de la survie et donc une hypersensibilité à l'EPO

[56]. Toutefois, on ne retrouve ces mutations que dans 10 % des PFC, 90 % restent génétiquement non étiquetées.

(3) Polyglobulies de Chuvash

Un autre type de polyglobulie primitive à taux élevé en EPO a été décrit pour la première fois dans une ethnie d'Asie centrale : les *Chuvash*, chez laquelle on retrouvait une incidence de polyglobulie particulièrement élevée. Des études génétiques ont pu mettre en évidence une mutation homozygote du gène VHL (Von Hippel-Lindau) chez les sujets atteints. Ce phénotype *Chuvash* est caractérisé par une PFC de transmission autosomique dominant avec un taux d'EPO élevé. Il est toutefois classé dans les polyglobulies primitives puisqu'il semble que la sensibilité des progéniteurs érythrocytaires à l'EPO soit également inadaptée. L'origine provient d'une dysrégulation au niveau moléculaire de la sensibilité cellulaire à la pression artérielle en O₂. En effet, la protéine VHL joue un rôle dans la régulation de la réponse à l'hypoxie par l'intermédiaire de HIF-1. Les mutations du gène VHL représenteraient aujourd'hui une cause importante de polyglobulie primitive à taux élevé en EPO, soit près de 50 % des cas [175].

c) Erythrocytose

L'érythrocytose pure a été séparée des polyglobulies primaires et secondaires par de nombreux auteurs. Il s'agit d'une vraie polyglobulie ne comportant qu'une augmentation de la lignée rouge dont l'étiologie est hétérogène. La mise en évidence de progéniteurs anormaux amène à considérer qu'une partie de ces érythrocytoses sont des maladies de Vaquez de présentation atypique. Les autres cas sont vraisemblablement des polyglobulies dont la cause reste à démontrer [128].

En 1993, a été décrite en Finlande une érythrocytose familiale à caractère dominant, dans laquelle tous les sujets atteints présentaient une mutation ponctuelle de l'EPO-R (mutation au niveau du domaine de régulation [56]) 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 239 g/L, est triple champion olympique de ski de fond [104].

3. Érythroleucémies⁵

La mutation en cystéine de l'arginine 129 située dans la région extracellulaire du récepteur de l'EPO entraîne l'activation de celui-ci en l'absence de ligand. Cette forme constitutivement activée de l'EPO-R est capable de provoquer des érythroleucémies chez les souris sensibles. Des réarrangements du gène de l'EPO-R entraînant sa surexpression ont été aussi mis en évidence dans des lignées érythroleucémiques murines et humaines. 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 [104].

IV. Conclusion

L'érythropoïèse est un phénomène complexe dont la régulation n'est pas encore complètement élucidée. Néanmoins, elle a été un modèle pour l'étude de l'ensemble de l'hématopoïèse. En effet, l'existence de deux grands types de progéniteurs (BFU-E et CFU-E) et du facteur de croissance bien caractérisé qu'est l'EPO, a permis de comprendre que les régulations des temps précoces et tardifs au cœur de cette lignée étaient différentes et nécessitaient un enchaînement séquentiel des différentes cytokines. Clé de voute de cette régulation, l'EPO a fait l'objet de nombreuses études depuis sa découverte. Les mécanismes impliqués dans l'induction de sa synthèse protéique par l'hypoxie font d'ailleurs encore couler beaucoup d'encre. Toutefois, le rôle des trois prolyl-hydroxylases, comme détecteurs d'oxygène permettant à la cellule de produire le facteur transcriptionnel HIF à bon escient, semble indéniable. Ainsi, en cas d'hypoxie, l'EPO serait produite en plus grande quantité et la régulation positive de l'érythropoïèse se ferait essentiellement par inhibition de l'apoptose des progéniteurs et des précurseurs érythrocytaires. La prolifération et la différenciation s'effectueraient ensuite de façon non régulable.

⁵ Il s'agit de poussées polyglobuliques spontanées qui surviennent exceptionnellement à la phase ultime de certaines leucémies.

Deuxième partie :

**L'érythropoïétine
humaine
recombinante**

Deuxième partie : L'érythropoïétine humaine recombinante

I. La production industrielle ou l'essor de la biotechnologie

A. Historique

[58, 99, 97, 140, 193]

Quarante ans après la découverte de l'Amérique par Christophe Colomb, Pizarro remarqua, lors des combats contre les Incas, une plus grande vaillance chez les soldats ayant préalablement séjournés sur les hauts plateaux.

Il faut ensuite attendre 1863 pour que, à la suite des travaux d'Antoine Lavoisier sur l'oxygène et des travaux des physiologistes allemands dont ceux de Hope-Seiler sur le rôle des globules rouges dans le transport de l'oxygène, soit remarquée par un médecin français Denis Jourdanet une identité de symptômes (asthénie, pâleur, dyspnée, maux de tête) entre les patients anémiques et les habitants polyglobuliques des hauts plateaux mexicains. Il attribue les symptômes observés à la diminution de la teneur en oxygène des globules rouges et donc du sang, qu'il nomme *anoxémie*.

Cette observation est reprise quelques années plus tard, en 1882, par un élève de Claude Bernard, Paul Bert, dans son travail sur « la Pression Barométrique », qui reste un des fondements de la médecine aéronautique.

En 1890, E. Viault constate, lors d'une expédition au Pérou, « le taux considérable de globules rouges dans le sang des habitants des hauts plateaux d'Amérique de Sud » et la polyglobulie survenue chez ses compagnons de voyage, plus ou moins importante selon l'altitude et la durée du séjour.

En 1906, peu de temps après la découverte de la première hormone par Bayliss et Starling, Paul Carnot et son assistant C. Deflandre mettent en évidence chez le lapin sain auquel ils ont préalablement injecté du sérum provenant d'un lapin anémique, une nette augmentation du nombre des globules rouges ; ils en déduisent que cette augmentation est médiée par une substance circulante qu'ils appellent *l'hémopoïétine*, présente dans le sang du lapin anémié en réponse à l'hypoxie mais ces travaux ne seront pas poursuivis.

L'existence d'une régulation hormonale de l'érythropoïèse sera confirmée en 1943 par Krumdieck reprenant l'expérience de Carnot, puis par Kurt Reissmann en 1950 en utilisant

une expérience de circulation croisée entre le rat et enfin par Erslev en 1953. Ce dernier met en évidence la survenue d'une réticulocytose franche chez le lapin sain perfusé avec de grandes quantités de sérum provenant d'un lapin rendu anémique par saignées, confirmant ainsi l'action de cette hormone sur l'érythropoïèse. En 1948, E. Bonsdorff nomma cette hormone *érythropoïétine*.

B. Les grandes étapes qui aboutiront à la production industrielle de l'érythropoïétine

[58, 97, 99, 140]

En 1957, L. Jacobson *met en évidence* le rôle joué par le rein dans la synthèse de l'érythropoïétine.

En 1977, l'érythropoïétine humaine est *purifiée* à partir d'urines de patients anémiques par Miyake et Goldwasser et *les premiers dosages radio-immunologiques* sont possibles à partir de 1979 (Goldwasser).

La structure de la molécule. En décembre 1983, l'équipe de génie génétique californienne d'Amgen parvient à cloner le gène de l'érythropoïétine humaine à partir de l'hormone purifiée par Goldwasser et dont il connaît la séquence d'acides aminés. Malheureusement, la concentration urinaire de l'hormone est extrêmement faible rendant toute production industrielle irréalisable.

Les premiers essais thérapeutiques. Dès 1985, l'équipe de Kenneth Jacobs et coll. et, simultanément celle de Fu-Kuen Lin et coll., réussissent à faire exprimer le gène par des cellules de mammifères transfectées par le gène de l'EPO humaine. Ce procédé de recombinaison génétique permet d'obtenir en quantité illimitée une glycoprotéine pure analogue de l'EPO endogène : l'érythropoïétine humaine recombinante ou r-HuEPO. La production industrielle de l'érythropoïétine peut alors commencer avec pour 1^{ère} indication thérapeutique le traitement de l'anémie chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique. Les premiers essais sont rapportés dans le *Lancet* du 22 novembre 1986 par Christopher Winearls et coll. et dans le *New England Journal of Medicine* du 8 janvier 1987 par Joseph Eschbach et coll.

II. Les différents agents stimulant l'érythropoïèse

A. Récapitulatif des spécialités commercialisées en France

| <i>Spécialités</i> | <i>Laboratoire</i> | <i>Dosages</i> | <i>Voie d'administration</i> | <i>Conditionnements</i> |
|--------------------|--------------------|--|------------------------------|--|
| EPREX | JANSEN-CILAG | 1 000 UI / 0.5 ml 2 000 UI / 1 ml 3 000 UI / 0.3 ml 4 000 UI / 0.4 ml 5 000 UI / 0.5 ml 6 000 UI / 0.6 ml 8 000 UI / 0.8 ml 10 000 UI / 1 ml | Voie SC et IV | 6 seringues préremplies (verre) |
| | | 20 000 UI / 0.5 ml 40 000 UI / 1 ml | | 1 seringue préremplie (verre) |
| NEORECORMON | ROCHE | 500 UI / 0.3 ml 1 000 UI / 0.3 ml 2 000 UI / 0.3 ml 3 000 UI / 0.3 ml 4 000 UI / 0.3 ml 5 000 UI / 0.3 ml 6 000 UI / 0.3 ml 10 000 UI / 0.6 ml 20 000 UI / 0.6 ml | Voie SC et IV | 6 seringues préremplies (verre) |
| | | 30 000 UI / 0.6 ml | | 4 seringues préremplies (verre) |
| | | 10 000 UI / 1 ml 20 000 UI / 1 ml 60 000 UI / 1 ml | Voie SC | 1 cartouche à deux compartiments : poudre et solvant (verre) |
| ARANESP | AMGEN | 10 µg / 0.4 ml 15 µg / 0.375 ml 20 µg / 0.5 ml 30 µg / 0.3 ml 40 µg / 0.4 ml 50 µg / 0.5 ml 60 µg / 0.3 ml 80 µg / 0.4 ml 100 µg / 0.5 ml 150 µg / 0.3 ml 300 µg / 0.6 ml 500 µg / 1 ml | Voie SC et IV | 1 seringue préremplie (verre) |
| | | 20 µg / 0.5 ml 40 µg / 0.4 ml 60 µg / 0.3 ml 80 µg / 0.4 ml 100 µg / 0.5 ml 150 µg / 0.3 ml | | Voie SC |

| | | | | |
|--------|-------|---|---------------|------------------------------------|
| | | 300 µg / 06 ml 500 µg / 1 ml | | |
| DYNEPO | SHIRE | 1 000 UI / 0.5 ml 2 000 UI / 0.5 ml 3 000 UI / 0.3 ml 4 000 UI / 0.4 ml 5 000 UI / 0.5 ml 6 000 UI / 0.3 ml 8 000 UI / 0.4 ml 10 000 UI / 0.5 ml | Voie SC et IV | 6 seringues préremplies (verre) |

B. Les époétines

Les époétines sont des érythropoïétines humaines recombinantes (r-HuEPO) composées de la même séquence d'acides aminés que l'EPO endogène. Cependant leur glycosylation, essentielle à l'activité biologique *in vivo*, varie en fonction de la souche de cellules transfectées dans laquelle l'EPO est synthétisée ainsi que des facteurs physiologiques incluant les conditions de culture auxquelles ces cellules sont soumises [174]. Ainsi les différents types d'époétine actuellement disponibles dans le commerce contiennent une plus grande proportion de résidus d'acide sialique que l'EPO endogène et diffèrent légèrement entre elles. L'époétine- α (EPREX[®]) et l'époétine- β (NEORECORMON[®]) sont disponibles en France et largement utilisées. L'époétine- ω (EPOMAX[®]) est la plus récemment lancée et est disponible dans certains pays mais pas en France [42].

Tableau 1 - Paramètres clés des différents agents stimulant l'érythropoïèse [174].

| | Epoetin- α | Epoetin- β | Epoetin- ω | Darbepoetin- α |
|--|-------------------|---------------------|---------------------|---|
| Carbohydrate proportion (%) | 40 | 40 | ND | 52 |
| Number of N-linked carbohydrates | 3 | 3 | 3 | 5 |
| Number of sialic acid residues per molecule | ≤ 14 | ≤ 14 | ND | ≤ 22 |
| Proportion of tetra-sialylated carbohydrate residues (%) | 19 | 46 | 21; 50 ^a | ND |
| Proportion of isoforms with O-linked carbohydrates (%) | 95 | ND | 60 | ND |
| Half-life (h): | | | | |
| IV route | 4–11 | 8.8–10.4 | ND | 18–25.3 |
| SC route | 19–25.3 | 24 | ND | 48.8 |
| Clearance (IV route) [mL•h ⁻¹ •kg ⁻¹] | 8.1–8.6 | 7.9 | ND | 2.0 |
| Bioavailability (SC route) [%] | 30–36 | 15–50 | ND | 37 |
| Frequency of administration (x/week) | 1–3 | 0.5 ^b –3 | 1–2 | 0.5 ^b –1 |
| Relative potency ^c : | | | | |
| thrice weekly | 1 | 1–1.2 | ~1.3 | 3.6 |
| once weekly | 1 | ND | ND | 13–20 |
| Conversion factor | 1 | ND | ND | 200IU : 1 μ g (up to 433 : 1 ^d) |

a Divergent reports.^[30,33]

b 0.5x/week = once every 2 weeks.

c As assessed from animal studies.

d Depending on dose of epoetin- α (up to 33 999 U/week).

IV = intravenous; ND = no data; SC = subcutaneous; x/week = times per week.

1. Glycosylation et activité *in vitro/in vivo*

La glycosylation de l'EPO endogène est nécessaire à sa sécrétion par les cellules productrices et améliore sa solubilité.

Au plan pharmacologique, la glycosylation de l'EPO n'est pas indispensable à son activité *in vitro*, elle la diminue même, mais elle est nécessaire à son activité biologique *in vivo* ; l'EPO non glycosylée, obtenue soit en supprimant les hydrates de carbone de l'EPO, endogène ou recombinante produite sur cellules CHO, soit à partir d'une EPO non glycosylée produite par *Escherichia coli*, est active *in vitro* mais pas *in vivo* [167].

Pour expliquer cet apparent paradoxe et préciser le rôle des chaînes glycosylées dans l'activité de l'EPO, les différentes isoformes ont été séparées et isolées par chromatographie d'échange et leurs activités ont été testées.

In vitro, l'affinité relative des isoformes de l'EPO pour les récepteurs de l'EPO situés à la surface des précurseurs érythrocytaires dans la moelle osseuse, est d'autant plus grande que le nombre de molécules d'acide sialique est faible. Par exemple, les affinités des isoformes 6 et 8 pour le récepteur à l'EPO sont 7 et 3,4 fois plus importantes que celle de l'isoforme 14. La r-HuEPO est un mélange des isoformes 9 à 14 et a une affinité 2 fois plus importante que celle de l'isoforme 14 seule, mais 3,6 et 1,8 fois plus faible que celles des isoformes 6 et 8 [42, 77, 167].

A l'inverse, *in vivo*, l'activité biologique des isoformes est d'autant plus grande que le nombre d'acide sialique est élevé. C'est ainsi que, chez la souris, l'isoforme 14 permet une augmentation de l'hématocrite 4,2 fois plus importante que l'isoforme 8, à doses équimolaires. La r-HuEPO augmente l'hématocrite 3,5 fois plus que l'isoforme 8, mais cette augmentation ne représente que 85 % de celle permise par l'isoforme 14 seule [77, 167].

Ces différences *in vitro/in vivo* sont dues à l'instabilité de l'EPO non glycosylée, dont la demi-vie plasmatique n'est que de quelques minutes. En effet, l'EPO non glycosylée est captée très rapidement par le foie, où elle est dégradée. La glycosylation protège donc la molécule d'EPO et sa demi-vie plasmatique est d'autant plus longue que le nombre de molécules d'acide sialique est élevé. Par exemple, chez la souris, la demi-vie de l'isoforme 14 est 3,2 fois plus longue que celle de l'isoforme 6 [77, 167].

Pris ensemble, ces éléments indiquent qu'il existe une relation directe entre le contenu en acide sialique et la demi-vie plasmatique et par conséquent l'activité biologique *in vivo*, mais une relation inverse avec l'affinité pour les récepteurs comme en témoigne l'activité *in vitro* où la demi-vie n'intervient pas [42, 58].

Ces considérations ont conduit à augmenter la glycosylation de l'EPO de façon à obtenir une « EPO » à demi-vie plasmatique plus longue permettant une administration moins fréquente [167].

2. Différences entre époétine- α et époétine- β

Le procédé d'obtention de l'époétine- α et de l'époétine- β est très similaire. Néanmoins de légères différences existent. Lors de la production d'époétine- β (NEORECORMON[®]), après l'insertion de l'ADN complémentaire (ADNc) dans le plasmide, l'étape de multiplication est réalisée dans d'autres cellules que celles de transfection du gène. Cette étape a lieu dans les cellules *d'Escherichia coli*, permettant une amplification de l'information génétique par un facteur 10⁶. Après seulement survient l'étape de transfection du gène de l'EPO dans le patrimoine génétique des cellules cancéreuses d'ovaires de hamster chinois CHO-K1 afin d'inclure les modifications post-traductionnelles indispensables à l'activité biologique [102].

Les conditions de culture cellulaire et l'étape de purification des protéines déterminent en grande partie la taille de la molécule et la charge du produit ainsi obtenu. De là, la glycosylation des produits recombinants diffère de l'EPO endogène. L'époétine- α et - β diffèrent selon leur taille et leur charge [42].

L'époétine- β a un poids moléculaire plus élevé et contient un plus large spectre d'isoformes que l'époétine- α (mélange 9 à 14). Sa plus grande proportion en isoformes basiques (mélange 1 à 8) lui confère un plus petit nombre de résidus sialylés. Néanmoins, aucune différence dans les demi-vies biologiques n'a été notée entre l'époétine- α et - β chez des patients atteints d'insuffisance rénale chronique en hémodialyse ou en dialyse péritonéale.

De nombreuses études ont montré que l'époétine- β avait une demi-vie d'élimination plus longue que l'époétine- α aussi bien après administration intraveineuse que sous-cutanée. De plus, une absorption prolongée après l'administration sous-cutanée a été observée, suivie d'une réticulocytose plus prononcée. Ces différences de propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de l'époétine- β peuvent contrebalancer son degré inférieur de sialylation [42, 174].

Toutefois, aucun rapport ne fait état que ces deux molécules diffèrent en termes d'efficacité clinique [174].

3. Epoétine- ω et époétine- δ

L'époétine- ω est produite par une autre souche de cellules que pour les deux autres époétines, ainsi la glycosylation et les propriétés pharmacocinétiques de cette molécule sont différentes [42].

L'époétine- ω est produite dans des cellules BHK (Baby Hamster Kidney). Contrairement aux époétines dérivant des cellules CHO, seulement 60 % de la molécule est O-glycosylée sur la sérine en position 126. La majeure partie des chaînes oligosaccharidiques est à 4 branches et une plus grande proportion des hydrates de carbones est tétrasialilée comparativement à l'EPO endogène. De plus, un des sites N-glycosylés contient un résidu phosphorylé sur une partie de la chaîne. Des études cliniques à faible échelle ont constaté que l'époétine- ω serait légèrement plus puissante que l'époétine- α . Mais ces données cliniques restent à approfondir [42].

En mars 2002, les autorités européennes ont approuvé la mise sur le marché par le laboratoire Shire d'une nouvelle érythropoïétine dans le traitement de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique. L'époétine- δ aussi appelée activateur du gène de l'EPO (DYNEPO[®]) est produite par des cellules humaines, génétiquement modifiées pour transcrire et traduire le gène de l'EPO sous le contrôle d'une nouvelle séquence d'ADN régulatrice. L'introduction de cette nouvelle séquence a été réalisée par recombinaison homologue des zones non-codantes de

l'ADN. Le terme « gene-activation » signifie en fait le contrôle de l'expression du gène par l'introduction de nouvelles séquences promotrices permettant de coder des séquences d'ADN natif. L'utilisation des cellules humaines dans le procédé d'obtention de l'époétine- δ permet de lever des problèmes en termes de conformation de protéines et de modifications post-traductionnelles. L'AMM de DYNEPO[®] a été renouvelée en mars 2007 et le produit est disponible en ville depuis le 16 octobre 2007 [42, 62].

C. Une nouvelle protéine stimulant l'érythropoïèse (NESP) : la darbépoétine- α

Par rapport à l'EPO, humaine ou recombinante, la NESP est constituée d'une séquence fixe de 165 acides aminés, voisine de celle de l'EPO, sur laquelle sont greffées en plus des 3 chaînes N-glycosydiques en position 24, 38 et 83 et de la chaîne O-glycosydique en position 126 de l'EPO, 2 chaînes N-glycosydiques en position 30 et 88 (*Figure 19*). Les positions de ces 2 chaînes additionnelles de glycosylation ont été choisies et définies de façon à ne pas modifier la structure tertiaire, et donc les capacités de fixation au récepteur de l'EPO [42, 58]. Cela a nécessité une modification de la séquence d'acides aminés, puisque la N-glycosylation ne peut se faire que sur une séquence asparagine-acide aminé α -sérine/thréonine. L'alanine en 30 et le tryptophane en 88 de l'EPO ont donc été remplacés par de l'asparagine ; l'histidine en 32 et la proline en 90 ont été remplacées par de la thréonine et la proline en 87 par de la valine.

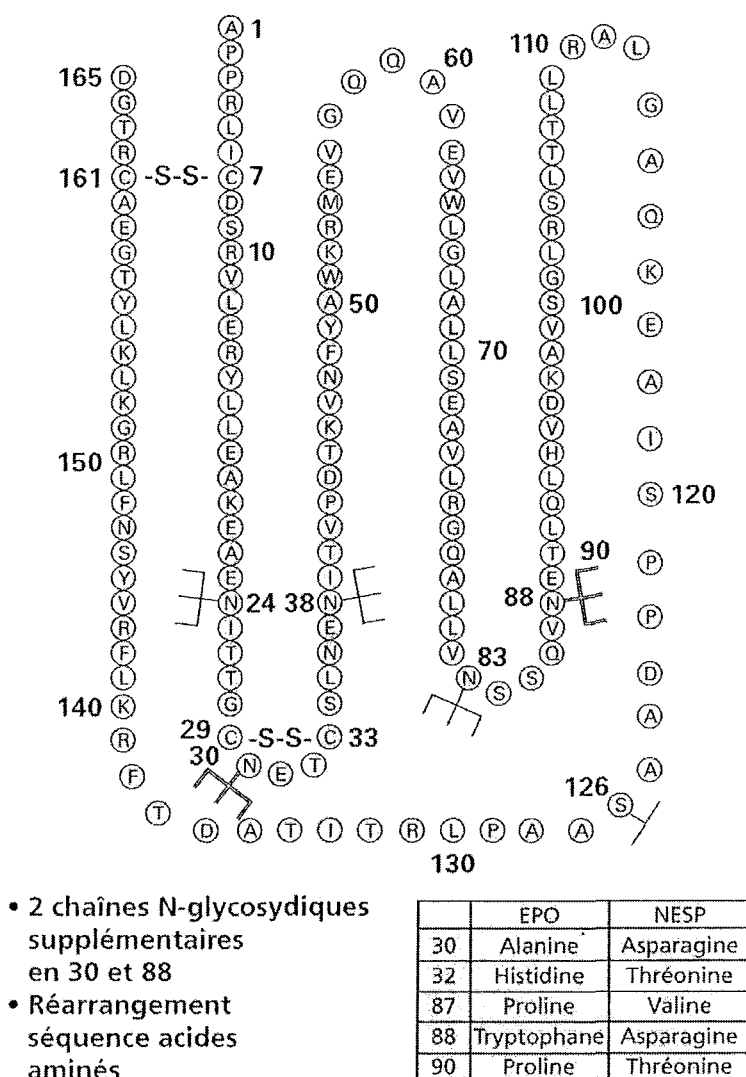


Figure 19 - Structure de la darbépoétine alfa ou NESP [167]

Ainsi une molécule à 5 chaînes N-glycosydiques a été créée : la darbépoétine- α .

Afin, de parvenir à ce résultat et pouvoir introduire de nouvelles chaînes glycosydiques, la séquence d'ADN du gène codant pour l'EPO a dû aussi être modifiée. Plusieurs douzaines d'analogues de r-HuEPO sont produits, contenant une ou plusieurs substitutions d'acides aminés qui donnent une ou plusieurs chaînes additionnelles. Ensuite, les étapes de fabrication ressemblent beaucoup à celles de l'époétine- α et - β . A partir de ces séquences d'ADN sont synthétisés des clones d'ADNc. Chaque clone est ensuite transfecté via un vecteur d'expression dans les cellules CHO où la protéine sera alors produite. Mais une partie seulement sur la douzaine d'analogues produite est convenablement glycosylée, à la bonne structure ternaire et a conservé une activité biologique [58, 96].

La séquence d'acides aminés de la darbépoétine- α étant différente de celle de l'EPO native, ce n'est pas de l'érythropoïétine mais une protéine voisine, stimulant également l'érythropoïèse. Compte tenu des 2 chaînes supplémentaires de glycosylation, le contenu en hydrate de carbone de la darbépoétine- α représente 51 % du poids moléculaire versus 40 % pour l'EPO, et son poids moléculaire moyen est plus élevé : 37 100 daltons versus 30 400 Da. Le nombre de molécules d'acide sialique de la darbépoétine- α est de 22 versus 14 pour l'EPO [167].

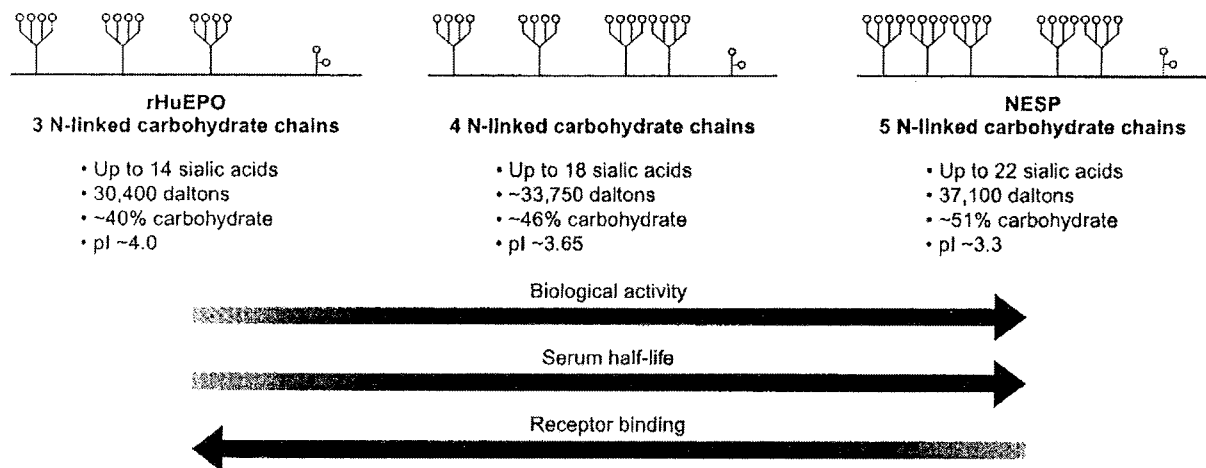


Figure 20 - Propriétés biologiques et biochimiques de la r-HuEPO et de ses analogues [58]

La darbépoétine- α ayant été élaborée dans l'objectif de prolonger sa durée d'action en ralentissant son élimination, plusieurs études ont été entreprises chez l'homme de façon à vérifier cette hypothèse de départ. Par voie intraveineuse, la demi-vie plasmatique de la darbépoétine- α apparaît 3 fois plus longue que celle de l'époétine- α (25,3 h vs 8,5 h) et sa clairance est 2,5 fois plus faible (1,6 vs 4,0 ml/h/kg). Les volumes apparents de distribution de la darbépoétine- α et de l'époétine- α sont comparables et voisins du volume plasmatique. La demi-vie plasmatique par administration sous-cutanée de la darbépoétine- α (48,8 h) est 2 fois plus longue que par administration intraveineuse [42, 167]

La biodisponibilité absolue par voie sous-cutanée de la darbépoétine- α est de 37 %. Cette biodisponibilité absolue non complète est comparable à celle des époétine- α et - β (respectivement 32 et 33 %) et est due à la taille des molécules et à leur dégradation par les peptidases de la peau [167].

La résorption par voie sous-cutanée de la darbépoétine- α (T_{\max} =54 h) est plus lente que celle des deux r-HuEPO (15 h), en rapport avec un poids moléculaire plus élevé et une hydrophobicité plus importante.

Dans le but de quantifier l'activité de l'EPO endogène en unités d'époétine, les concentrations et les doses de darbépoétine- α sont données en μg de protéine (la partie glucidique n'étant pas prise en compte). Basée sur le poids moléculaire, 200 UI d'époétine- α sont équivalentes à 1 μg de darbépoétine- α [42, 58, 167].

D. CERA : Continuous Erythropoiesis Receptor Activator ou Activateur permanent du récepteur de l'érythropoïétine

La recherche de nouveaux agents stimulant l'érythropoïèse a conduit au développement d'une nouvelle molécule : la méthoxy polyéthylène glycol-époétine- β ou CERA, activateur permanent du récepteur de l'érythropoïétine, qui sera commercialisé sous le nom de MIRCERA[®]. Cette nouvelle molécule est la conjugaison d'une protéine produite par la technique de l'ADN recombinant dans des cellules d'ovaire de hamster chinois et d'un méthoxypolyéthylène glycol (PEG) linéaire. Le poids moléculaire moyen est d'environ 60 000 Da. La fraction protéique plus l'hydrate de carbone représentent environ 30 000 Da.

In vitro, CERA est un agoniste du récepteur à l'érythropoïétine mais s'en dissocie plus rapidement que l'EPO, ne lui permettant pas d'être internalisé mais de se fixer à nouveau sur les récepteurs entraînant ainsi des stimulations répétées, ce qui est confirmé par une demi-vie plasmatique plus grande. Ces stimulations successives s'additionnent et permettent d'obtenir une activité pharmacologique soutenue et prolongée comparativement à l'EPO [42, 110].

Les deux études de phase III ont été présentées en novembre 2006 au 39^e Congrès annuel de l'American Society of Nephrology, à San Diego.

En juillet 2007, la Commission européenne a délivré, au laboratoire ROCHE, pour MIRCERA[®], une AMM valable dans toute l'Union européenne [63].

Cette molécule est l'unique antianémique ayant été étudié avec des intervalles posologiques prolongés (administration toutes les quatre semaines) dans tous les sous-groupes de patients et ce, dans le cadre de son dossier d'homologation initial [42, 110, 139].

III. Effets indésirables du traitement par érythropoïétine

Les prescriptions d'érythropoïétines humaines recombinantes ou de protéines stimulant l'érythropoïèse ont considérablement augmenté ces dernières années, en particulier chez les malades en hémodialyse et les malades traités par chimiothérapie anticancéreuse. Les trois

premières molécules disponibles (nous n'aborderons pas dans ce travail la dernière molécule commercialisée, l'époétine- δ en raison de sa trop récente mise sur le marché) ont apporté un bénéfice très important pour la qualité de la vie des malades. Cependant, son utilisation requiert un suivi clinique et biologique quotidien car de nombreux effets indésirables ont été observés au cours des différentes études cliniques [106].

A. Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est l'effet indésirable le plus fréquemment observé chez les patients traités par EPO et surtout chez les insuffisants rénaux. Elle est due le plus souvent à une augmentation trop rapide du taux de globules rouges et s'observe surtout dans les trois premiers mois du traitement [71, 97, 99]. La plupart des études estime entre 10 et 30 % le nombre de patients qui développent une hypertension artérielle ou aggravent celle préexistante [71, 132]. Cet effet indésirable nécessite pour les patients à risque l'addition d'un traitement antihypertenseur ou le réajustement de celui préexistant. Cette augmentation de la pression artérielle ne concerne pas les patients normotendus, les volontaires sains et les patients traités pour des anémies de cause extrarénale (myélome multiple, arthrite rhumatoïde ou infection par le VIH) et ne serait observée que chez les patients insuffisants rénaux [71, 166].

Par ailleurs, deux études portant sur des patients atteints d'anémie traitée selon un protocole de transfusion autologue n'ont révélé aucune différence significative entre le groupe traité par EPO et le groupe placebo, en termes d'apparition d'une hypertension artérielle [166]. Les causes précises de cette augmentation de la pression artérielle ne sont pas actuellement parfaitement élucidées mais elles semblent être la combinaison de différents mécanismes qui pourrait faire intervenir le volume sanguin, la viscosité sanguine, l'hypoxie, le myocarde, différents facteurs hormonaux et le tonus vasculaire.

1. Augmentation du volume de sang

A première vue, il semble raisonnable de penser que l'augmentation du nombre de globules rouges va conduire à une augmentation du volume intravasculaire. Cependant une telle augmentation n'existerait pas : tandis que l'hématocrite augmente, le volume plasmatique diminue aboutissant à un volume total inchangé. Le changement de volume sanguin ne peut donc pas être incriminé dans l'augmentation de la pression artérielle [166].

2. Augmentation des résistances vasculaires périphériques

a) Augmentation de la viscosité sanguine

L'augmentation de la masse de globules rouges va entraîner une élévation de la viscosité sanguine et par conséquent une augmentation des résistances vasculaires périphériques. Yamakado et al. décrivent une corrélation significative entre la pression artérielle moyenne et la viscosité sanguine. Cependant, comme Canaud et coll. le montrent, une augmentation de la viscosité (de l'ordre de 33 %) peut être sans conséquence hypertensive. Cette augmentation de la viscosité survient en effet chez tous les patients, mais seulement un sur quatre ont vu apparaître une hypertension artérielle [71, 166].

Mais si, en réponse à cette augmentation de viscosité, l'adaptation hémodynamique n'est pas appropriée, les résistances vasculaires peuvent devenir exagérément élevées et produire une hypertension [71, 166].

Chez les patients insuffisants rénaux, l'hypertension artérielle est fréquente suite à l'EPO. Par ailleurs, la soustraction rapide de 5 % du volume plasmatique en quelques heures augmente encore sa viscosité et pourrait alors expliquer les poussées hypertensives constatées par certains auteurs après la dialyse [71]. De telles conséquences ont déjà été démontrées lors de transfusions sanguines chez des patients dialysés, faisant passer l'hématocrite de 20 à 40 %. Chez ces patients, l'augmentation des résistances vasculaires périphériques était de l'ordre de 80 % et la pression artérielle diastolique augmentait de 20 mm de mercure [71, 200]. Canaud suggère, pour comprendre cela, que l'on s'intéresse également aux analogies structurales entre la rénine et l'érythropoïétine [71].

b) Augmentation rapide de la P_pO_2 dans les tissus

L'hypothèse physiopathologique la plus retenue pour expliquer l'hypertension artérielle survenant lors des traitements par l'érythropoïétine est résumée dans le travail de Jacquot. La correction rapide de l'hypoxie serait due à l'augmentation des résistances vasculaires périphériques. En effet, l'hypoxémie a un effet vasodilatateur. Elle induirait la synthèse par l'endothélium vasculaire de l'agent vasodilatateur : l'oxyde nitrique (NO), qui augmentant l'activité de la Guanylate cyclase, entraîne un relâchement des cellules musculaires lisses. La correction rapide de l'hypoxie par une augmentation massive du nombre de globules rouges et donc de l'Hb induirait la perte de ce stimulus vasodilatateur, apporterait un agent

vasoconstricteur : l'O₂ et un piègeur de NO : l'Hb, ce qui conduit à une augmentation du tonus artériolaire avec augmentation de la pression artérielle [71, 166, 168, 200].

Cette hypothèse est confirmée par Martin et Moncada qui ont montré que l'administration d'EPO entraînait la réduction de la production d'oxyde nitrique. Ce puissant vasodilatateur semble être produit en excès dans l'insuffisance rénale. Partant de cette hypothèse, serait-il possible alors de traiter cette hypertension induite par l'EPO en administrant de la trinitrine, molécule qui fournit de l'oxyde nitrique [200] ?

3. Facteurs hormonaux

Le rôle des différents facteurs hormonaux dans l'HTA induite par l'EPO n'est pas facile à évaluer et plus particulièrement chez les patients hémodialysés en raison de l'altération de ces hormones dans le circuit de dialyse. Tepel et coll. ont montré que l'érythropoïétine augmentait le taux de calcium libre dans le cytosol des plaquettes des rats spontanément hypertendus (SHR) alors qu'elle était sans effet chez les rats normotendus [97, 99] et Schiffel a montré chez l'homme qu'une augmentation de la pression artérielle moyenne était associée à cette augmentation du taux de calcium libre dans le cytosol des plaquettes [166].

4. Effets vasoconstricteurs

L'administration d'érythropoïétine à dose « normale » n'a jamais entraîné de vasoconstriction au cours des expériences animales ; jusqu'ici aucun récepteur à l'EPO n'a été identifié sur les muscles lisses des vaisseaux. Toutefois, l'administration de fortes doses d'EPO (20-200 UI/ml) semble être capable d'entraîner la vasoconstriction d'un vaisseau rénal et mésentérique isolé de son endothélium [166].

5. Conclusion

En dépit de la variété des mécanismes qui interviennent dans la genèse de cette hypertension, aucun concept clair n'a été proposé jusqu'ici. Cela semble plutôt être la combinaison de plusieurs de ces mécanismes. L'augmentation de la viscosité sanguine accompagnée d'une augmentation des résistances périphériques reste la théorie la plus documentée à ce jour ; la correction de l'hypoxie et donc de la vasodilatation réflexe ainsi que les mécanismes hormonaux sont encore très discutés. Toutefois, il convient de rappeler que les patients en

phase terminale d'insuffisance rénale sont, en soi, prédisposés à développer une hypertension artérielle, indépendamment de toute médication supplémentaire [166].

L'élévation de la pression artérielle est un effet indésirable important car l'hypertension artérielle est un facteur de risque cardiovasculaire (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral et à terme insuffisance cardiaque). La moitié des décès chez des insuffisants rénaux chroniques étant attribuée à des complications cardiovasculaires, il est vital de pallier cet effet secondaire. De plus, des complications liées à une augmentation rapide de la pression sanguine ont été mises en évidence dans certaines études, comme l'encéphalopathie hypertensive et les crises comitiales [43, 71, 102].

Même si le risque semble plus grand chez les patients ayant des antécédents d'hypertension ou chez des patients hypertendus au moment du traitement par l'EPO, il n'est pas possible de prédire quels patients développeront une hypertension. Par le fait, un suivi régulier de la pression sanguine en cours de traitement est indispensable. De plus pour minimiser le risque d'accentuation ou de développement de l'hypertension artérielle, la dose d'EPO devra être augmentée progressivement, afin d'éviter une élévation trop rapide de l'hématocrite et permettre ainsi une correction de l'anémie sur un minimum de 3 mois. De la même manière, un hématocrite maintenu légèrement en dessous de la normale (30-35 %) limitera le problème de l'hypertension artérielle [71, 200].

L'hypertension artérielle est un effet indésirable important du traitement par érythropoïétine. Cependant, elle ne constitue pas en elle-même une contre-indication si un suivi tensionnel régulier est réalisé et si un traitement antihypertenseur approprié est institué lorsque l'hypertension se développe.

B. Thromboses vasculaires

Les thromboses représentent 70 % des complications de l'abord vasculaire des hémodialysés et lors des essais thérapeutiques, l'utilisation de l'érythropoïétine recombinante a augmenté leur fréquence. En revanche, le traitement des anémies chez les patients participant à un protocole de transfusion autologue programmée ou la prévention et le traitement des anémies en oncologie n'augmentent pas la fréquence des thromboses [102, 166, 178].

L'EPO contribuerait à modifier l'hémostase des patients traités [97, 99, 168, 183] :

- elle augmenterait la viscosité sanguine totale parallèlement au taux d'hématocrite.

- elle augmenterait l'adhésivité et l'agrégabilité de plaquettes, non liée à l'augmentation du taux des plaquettes restant dans les normes physiologiques.
- elle diminuerait le taux des protéines C et S anticoagulantes ce qui favorise la survenue de thromboses [5, 198].
- elle baisserait significativement les flux sanguins au niveau des membres par veino-constriction.

Cas particuliers des hémodialysés :

Les études comparatives concernant le problème des thromboses de l'abord vasculaire chez les hémodialysés permettent de constater que [183] :

- le pourcentage moyen de thrombose varie entre 5,3 et 25 %.
- le type d'accès aux vaisseaux conditionne le risque de thrombose. Le taux de risque s'accroît dans l'ordre progressif avec les dispositifs médicaux suivants : fistule artérioveineuse, pontage artérioveineux, shunt externe et cathéter, pontage de type PTFE ou carotide de bœuf [97, 99, 183].
- l'historique des abords vasculaires est également un facteur à considérer car entre 5 et 10 % des patients hémodialysés présentent des complications à répétition de leur accès aux vaisseaux. Ce groupe est donc plus exposé que les autres sous traitement par EPO et nécessite des interventions de type thrombectomie ou l'administration de fibrinolytique [200].
- l'état fonctionnel de l'accès aux vaisseaux est un troisième facteur de risque de thrombose. Les sténoses préexistantes et les épisodes de thromboses antérieures constituent des facteurs favorisants indéniables. La prévention des thromboses des abords vasculaires des patients bénéficiant d'un traitement par EPO peut être réalisée par une connaissance précise des antécédents de l'abord vasculaire, du type et de l'état fonctionnel grâce à un examen clinique minutieux avant la mise en route du traitement [168, 183].

Ainsi, le type de l'abord vasculaire, son état fonctionnel à la période initiale du traitement par EPO, son débit et sa surveillance sont les principaux facteurs à considérer pour limiter le risque thrombotique.

L'augmentation de la viscosité sanguine totale constitue un facteur prédisposant à la thrombose.

Le maintien d'un hématocrite de l'ordre de 30 % et d'un taux d'hémoglobine avoisinant les 10 g/dl devrait assurer une perméabilité durable et satisfaisante de l'abord vasculaire [183].

Dans ces conditions, l'érythropoïétine ne semble pas majorer de manière significative la fréquence des thromboses des abords vasculaires.

C. Crises épileptiques

Au cours de la quasi-totalité des études cliniques portant sur l'administration d'érythropoïétine, le système nerveux central a été le siège de complications sévères en particulier à type de convulsions. L'incidence de survenue de cet effet indésirable sous traitement par EPO varie entre 0,8 et 10 % avec une moyenne située autour de 4,5-5 %. L'interprétation de ces données chez les dialysés est compliquée du fait même de l'existence de crises sous-jacentes chez ces patients. Raine souligne que les patients anémiques dépendant des transfusions ont un risque plus élevé de crises convulsives. Cependant, l'augmentation de l'hématocrite et donc la correction rapide de la concentration en Hb ne serait pas responsable car chez les patients non atteints de crise, cette augmentation était plus élevée que chez les patients atteints. D'autres facteurs doivent donc être impliqués. Néanmoins, Eschbach et coll. observent environ 50 % de survenue de crises dans les 3 premières semaines de traitement par EPO, là où l'augmentation de l'hémoglobine est la plus importante [57, 200].

Quant aux mécanismes sous-jacents, il n'y a aucune preuve évidente d'une action pro-épileptique de l'EPO. Les études n'ont jusqu'à présent révélé aucune modification de l'EEG des volontaires sains sensibilisés par une déprivation de sommeil, une hyperventilation et une stimulation lumineuse intermittente. De plus, les bases expérimentales disponibles soulignent l'absence de franchissement de la barrière hémato-encéphalique par l'EPO chez l'animal due à son poids moléculaire élevé, l'absence de potentialisation des convulsions induites par le métrazol et l'absence de modifications de l'environnement ionique du SNC [106, 200]. Les mécanismes d'apparition de ces convulsions restent, encore à l'heure actuelle, incertains.

Les prodromes précédant les crises épileptiques chez les patients sous EPO sont semblables à ceux observés en cas d'encéphalopathie hypertensive ou d'éclampsie : maux de tête, gêne visuelle, perturbations neurologiques suivis d'une altération de la conscience et des crises

convulsives répétées. Une hypothèse de la pathogénie de ces convulsions serait alors l'augmentation brutale et importante de la pression sanguine par augmentation de la résistance vasculaire périphérique, suivie d'une perte de l'autorégulation cérébrale ainsi que de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. Les conséquences sont donc la pénétration de plasma dans le tissu cérébral entraînant un œdème (avec ou sans augmentation de la pression intracrânienne) suivi des perturbations neurologiques (prodromes) et aboutissant finalement aux convulsions [166, 179, 200]. Il est probable que ce soit la rapidité d'augmentation de la pression sanguine plus que le niveau atteint qui soit le critère le plus important dans l'apparition de ces crises.

Pour empêcher cette complication, une attention particulière devra être portée aux patients hypertendus, à ceux qui développent une élévation soudaine de la pression artérielle et aux patients qui se plaignent de maux de tête. De plus, il est prudent d'inciter une correction graduelle de la concentration d'hémoglobine afin de permettre à la circulation de s'adapter aux changements d'hématocrite et de délivrance d'oxygène [200].

D. Hyperkaliémie

La plupart des études ont observé une augmentation significative du taux de potassium plasmatique chez les patients dialysés traités par EPO. Delano et coll. enregistrent une hyperkaliémie dans 16 % des cas, augmentation qui varie entre 0,1 et 0,5 mmol/l. Cette élévation du potassium est plus importante en début de traitement lorsque l'hématocrite augmente pour atteindre le niveau cible.

La tendance à l'hyperkaliémie est due à l'amélioration de l'appétit avec une augmentation de la consommation d'aliments riches en potassium [168, 200]. Certains patients refusent de se soumettre, après l'amélioration de leur qualité de vie, à une restriction du potassium et parfois refusent l'allongement du temps de dialyse. Le relargage du potassium dans le plasma par les globules rouges hémolysés dont le nombre augmente sous EPO peut aussi être incriminé dans la genèse de l'hyperkaliémie. L'augmentation de la concentration de bilirubine non conjuguée chez les patients traités par EPO confirme ce fait [200].

Pour prévenir cet effet indésirable et éviter les complications cliniques pouvant aller jusqu'à la mort, la kaliémie doit être surveillée régulièrement chez tous les patients recevant de l'érythropoïétine. Avec des conseils appropriés et un contrôle diététique, l'hyperkaliémie ne devrait pas poser de problème, mais, chez quelques patients dialysés, certains paramètres

devront être modifiés, comme, par exemple, la concentration en potassium du dialysat qui devra être diminuée, la surface de dialyse et/ou le temps de dialyse qui devront être augmentés [200].

E. Diminution de la qualité de la dialyse

L'épuration des solutés par hémodialyse est directement en rapport avec le flux de l'eau plasmatique du sang total à travers la membrane de dialyse. A débits sang et dialysat constants, la diminution du flux, due à l'augmentation de la viscosité sanguine ainsi que l'augmentation de la formation de caillots au niveau du dialyseur, serait à l'origine d'une diminution de l'épuration des substances dissoutes et donc d'une baisse d'efficacité de la dialyse [97, 99, 166, 200].

En fait, tous les solutés ne sont pas affectés de façon identique. En effet, leur solubilité à travers une membrane semi-perméable, qu'il s'agisse de la membrane érythrocytaire ou de la membrane du rein artificiel, varie d'un soluté à l'autre. Ainsi, plus le soluté est diffusible, moins son épuration est affectée par une augmentation de l'hématocrite : cela est le cas par exemple pour l'urée.

L'effet d'une augmentation de l'hématocrite est, par contre, plus sensible pour les solutés mal dialysés comme le phosphore, ou ceux à forte concentration intracellulaire tel le potassium [97, 99].

Plusieurs études sur des patients hémodialysés présentant une augmentation de leur hématocrite de 21,5 à 34,3 % sous EPO ont montré une diminution d'épuration d'environ 15 % pour la créatinine, 9 % pour le potassium et 17 % pour le phosphore sans modification du poids post-dialytique, de l'épuration de l'urée ni du taux du catabolisme protéique. Les auteurs ont conclu qu'une augmentation de 60 % de l'hématocrite n'entraînait en fait qu'une modeste diminution de la qualité de dialyse, pouvant être facilement compensée par des mesures thérapeutiques simples telle que l'augmentation des doses des résines échangeuses d'ions, l'augmentation du temps de dialyse, des surfaces de dialyse plus importantes ou l'utilisation de dialyseurs de haute performance avec des débits sanguins suffisants [97, 99, 200].

Dans le cas des dialyses péritonéales, on dispose de peu d'informations sur l'impact de l'EPO sur la membrane péritonéale. Les qualités de cette dernière pourraient être exacerbées par

l'emploi de l'EPO du fait d'une amélioration du flux capillaire expliquée soit par l'augmentation du débit cardiaque, soit par le recrutement de nouveaux capillaires augmentant ainsi la surface d'échange [97, 99, 200].

F. Syndrome pseudo-grippal

Un syndrome pseudo-grippal a été rapporté dans différentes études. Eschbach et al. ont noté des maux de tête, des myalgies ainsi que des douleurs abdominales. La fréquence de survenue de ces symptômes après administration d'érythropoïétine varie entre 6 et 21 %. Ils apparaissent environ 1 à 2 h après l'administration et disparaissent en 10 à 12 h. Sundal estime à 6,5 % des cas la survenue concomitante de douleurs osseuses. Winearls a enregistré, deux heures après injection d'érythropoïétine, des douleurs des membres et du bassin, accompagnées de frissons, de transpiration mais sans fièvre. Tandis que d'autres études ont révélé ces mêmes symptômes associés à de la fièvre [166, 200].

Il a été montré que ce syndrome pseudo-grippal survenait plus fréquemment après des injections intraveineuses que des injections sous-cutanées [94]. Ainsi, des précautions doivent être prises si la voie IV est choisie ; l'administration doit se faire très lentement sur une durée de 1 à 2 minutes [166].

Généralement ces symptômes sont légers et disparaissent spontanément sans recourir à l'arrêt du traitement. Toutefois, des cas de syndromes pseudo-grippaux prolongés ont été rapportés chez des femmes traitées pour anémie dans un contexte d'insuffisance rénale chronique. Les symptômes ont persisté plus de 24 mois. Néanmoins, les symptômes ont pu être diminués par réduction de la dose d'EPO et par l'administration d'aspirine à 500 mg immédiatement et 3 h après l'injection, ce qui laisse supposer que ces symptômes étaient probablement médiés par des prostaglandines [79].

G. Réactions allergiques et cutanées

Des réactions de type allergique avec prurit et rash érythémateux, survenant chez des patients traités par érythropoïétine, ont été décrites dans de nombreuses études. Des cas d'œdèmes palpébraux ont été rapportés par Sundal et coll. 15 heures après la dernière injection d'EPO [200], tandis que l'administration d'époétine- β chez un homme de 66 ans insuffisant rénal chronique a révélé l'apparition d'un eczéma maculopapulaire très prurigineux 6 semaines

après le début du traitement. L'arrêt des injections d'EPO complété par l'administration locale d'un puissant corticostéroïde a permis de corriger cette réaction [85].

Dans la majorité des cas, ces réactions allergiques sont légères et transitoires et ne nécessitent pas l'arrêt du traitement [97, 99]. Néanmoins, des événements beaucoup plus graves ont été rapportés.

En 2005, un homme de 59 ans a développé un syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse (ou DRESS syndrome) après avoir reçu de l'époétine- α avant une hémodialyse. Dans les 12 heures, il a présenté de la fièvre, des frissons, un prurit et un malaise généralisé suivis de l'apparition d'une éruption cutanée en moins de 24 heures. Il a été hospitalisé et placé sous antibiotiques. Mais malgré cela, la situation s'est détériorée : l'éruption cutanée a progressé, le bilan hématologique a montré une hyperleucocytose avec 24 % d'éosinophiles, un taux d'hémoglobine à 8,4 g/dL et une saturation en oxygène à 60-70 %. Il a été transféré en soins intensifs et intubé. La découverte d'une pneumopathie a conduit à modifier l'antibiothérapie. Mais son état est resté critique. La famille s'est opposée à la poursuite de thérapeutiques agressives et des soins palliatifs ont été entrepris [131].

L'auteur a attribué ce syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse à l'administration antérieure d'époétine- α . Bien que l'échelle de Naranjo ne révèle qu'une probabilité de réaction indésirable médicamenteuse « possible », l'apparition de cette réaction, et l'absence d'autres agents causaux prouvés permettent d'amener à cette conclusion [131].

Après l'initiation d'un traitement par érythropoïétine, deux enfants sous dialyse péritonéale ont présenté des éruptions cutanées suite à une exposition au soleil : vésicules et bulles inflammatoires sur les zones exposées, fragilité cutanée et élévation des enzymes hépatiques. Le diagnostic de « pseudoporphyria cutanea tarda » a été posé. Cet effet indésirable est connu chez l'adulte mais c'est la première fois qu'il survient chez des enfants. L'EPO a pu favoriser une photosensibilisation chez ces patients même si le mécanisme d'action reste encore inconnu et la possibilité que d'autres médicaments photosensibilisants aient été associés ne peut pas être écartée [86].

Une femme insuffisant rénal chronique est hémodialysée depuis 12 ans. Le lendemain d'une injection sous-cutanée d'époétine- α , elle développe de la fièvre et de multiples papules érythémateuses au site d'injection et sur d'autres endroits du corps. 5 jours après l'administration, la fièvre persiste et un ulcère s'est formé sur un bras, une cuisse et ses deux

chevilles : une hospitalisation est nécessaire. Une septicémie est suspectée et une antibiothérapie est débutée.

Le 3^{ème} jour d'hospitalisation, une biopsie cutanée révèle un pyoderma gangrenosum nécessitant des corticoïdes et un pansement des lésions. Au 12^{ème} jour, les lésions cutanées commencent à guérir. Mais à partir du 19^{ème} jour, elle se plaint de violentes lombalgies, de fièvre et d'une faiblesse au niveau de sa jambe droite. De plus un érythème persiste au point d'injection. Un abcès épidual spinal est alors découvert et la biopsie montre un syndrome inflammatoire ainsi que du tissu de granulation. L'antibiothérapie a été renforcée et une intervention neurochirurgicale a été recommandée. Toutefois le patient a refusé l'intervention. Aucun cas de pyoderma gangrenosum sous traitement par érythropoïétine n'avait jusqu'alors été décrit ; une association fortuite ne peut cependant pas être exclue [136].

H. Douleur au point d'injection sous-cutanée

Dès son utilisation thérapeutique, l'EPO a été injectée indifféremment par voie intraveineuse ou sous-cutanée.

La voie d'injection sous-cutanée a été dans un premier temps réservée aux patients chez lesquels il n'y avait pas d'accès direct aux vaisseaux : patients traités par dialyse péritonéale, patients urémiques non arrivés au stade terminal d'évolution de leur néphropathie.

Puis un certain nombre de publications ont fait état d'une plus grande efficacité du produit lorsqu'il était injecté par voie sous-cutanée, cela pouvant être expliqué par une ascension plus lente mais plus prolongée, et donc plus physiologique, du taux plasmatique du médicament. Cette plus grande efficacité permettait, pour un objectif thérapeutique identique, d'envisager une réduction des besoins en EPO, de 10 à 50 % selon les auteurs, et de réduire ainsi le coût du traitement [97, 99].

Au cours des études réalisées, il semblait exister des différences de tolérance entre les différentes érythropoïétines recombinantes, α et β . Les différents excipients de ces époétines ont été mis en cause. L'albumine contenue dans l'époétine- α a ainsi été incriminée alors même que l'injection d'albumine à 2 % seule est indolore. L'hypothèse d'un excipient aux vertus analgésiantes contenu dans l'époétine a été avancée alors qu'aucun anesthésique n'est retrouvé dans sa formulation galénique et que l'injection sous-cutanée d'époétine- α reste plus douloureuse que celle du placebo [38, 97, 99, 180]. D'autre part, le volume injecté peut expliquer ces douleurs. Les études sont donc en faveur d'une meilleure tolérance de

l'époétine- β car les volumes injectés sont de 0,5 ml contre 0,5 à 1,5 ml pour l'époétine- α pour laquelle le score douloureux a été le plus élevé [97, 99].

D'autres résultats cliniques ont montré que le profil de tolérance de la darbépoétine- α est similaire à celui de la r-HuEPO, excepté le fait que par voie SC la darbépoétine- α a provoqué fréquemment une douleur au point d'injection [96].

Il existe avant tout une grande difficulté d'évaluation d'un critère aussi subjectif que la douleur : les mesures d'évaluation utilisées dans la littérature ont été faites à partir d'échelles analogiques visuelles ou verbales et d'échelles descriptives dont les résultats varient, qu'ils soient interprétés en termes de moyenne ou de médiane et, ce d'autant plus, que la différence de tolérance entre ces trois époétines reste faible et que les études n'intéressent qu'un petit nombre de patients.

Il semble donc que de simples précautions comme utiliser les préparations sous les volumes d'injection les plus faibles et ramener le produit à température ambiante avant son injection permettront d'atténuer les phénomènes douloureux observés par voie sous-cutanée. Cette voie facilite le traitement ambulatoire des patients grâce notamment au développement par les laboratoires de nouveaux systèmes d'injection, et doit donc être conservée.

1. Alopécie

Les causes d'alopecie sont très généralement idiopathiques. Néanmoins, quelques études ont révélé un lien de causalité entre l'administration d'érythropoïétine chez des patients hémodialysés et l'existence de désordre dans la pousse capillaire.

Environ trois semaines après le début du traitement par Eprex[®], un patient a commencé à perdre des cheveux et quatre mois plus tard, il présentait une alopecie généralisée de la tête et du corps. Cette personne n'avait aucun symptôme d'un quelconque déséquilibre endocrinien, la seule anomalie était un niveau légèrement bas en zinc. Deux mois après une supplémentation en sulfate de zinc, aucune amélioration de l'alopecie n'était décelée.

Après avoir éliminé toutes les causes reconnues d'alopecie, les soupçons se tournèrent vers Eprex[®] qui fut alors remplacé par Neorecormon[®].

Six mois plus tard, une légère repousse des cheveux apparut [142].

D'autres cas ont été récemment rapportés chez trois femmes, ce qui suggère un possible effet dû à l'époétine- α .

Les mécanismes responsables restent encore à confirmer mais des auteurs soulignent une diminution du taux de cortisol chez les patients pouvant mener à la perte de l'inhibition de l'activité folliculaire par le cortisol ou la stimulation d'un phénomène compensatoire avec l'augmentation des taux d'androgènes [93].

IV. Perte d'efficacité du traitement par EPO

Les essais cliniques d'utilisation de l'érythropoïétine ont clairement montré l'efficacité de ce produit dans la très grande majorité des cas. Néanmoins, certains patients « non répondeurs » en début de traitement ne corrigent pas leur anémie dans les délais habituels et avec les doses communément utilisées, et peuvent nécessiter soit des doses plus élevées, soit un temps de correction plus long. D'autres, après une réponse initiale correcte, voient leur hématoците stagner, voire diminuer [52, 97, 99]. Selon le guide européen des Bonnes Pratiques, on parle de résistance à l'érythropoïétine lorsque les besoins sont supérieurs à 300 UI/kg/semaine quand l'administration se fait par voie sous-cutanée, tandis que le seuil est de 400 UI/kg/semaine quand il s'agit de la voie intraveineuse [53]. Toutefois, exceptionnels sont les cas où une résistance absolue à l'administration d'EPO est observée.

Tableau 2 - Les causes d'une baisse d'efficacité de l'EPO [18].

| Carence martiale | Autres causes |
|---|---|
| Carence absolue ou relative par : • pertes de sang : coagulation du dialyseur | Surcharge aluminique |
| Hémorragie extériorisée ou occulte | |
| Prélèvements multiples | Infections/inflammations chroniques (Parvovirus B19), malnutrition, etc. |
| Hémolyse • anémie hémolytique • hémoglobinopathie • médicamenteuse • chloramines dans le dialysat • hémolyse mécanique (CEC) | Affections malignes |
| Défaut d'apports | Malnutrition |
| | Déficit vitaminique |
| | Interactions médicamenteuses |
| | Dialyse inadéquate |
| | Fibrose médullaire par hyperpara- thyroïdisme secondaire |
| | Hyposensibilité à l'EPO (facteur humoral absorbable sur certaines membranes de dialyseur) |
| | Anticorps anti-EPO |

A. Résistance à l'EPO : Anticorps anti-érythropoïétine

De 30 % dans les années 90, le pourcentage de dialysés pouvant bénéficier de traitement par EPO est actuellement évalué à plus de 50 %, voire 80 % par les industriels de ce médicament. A une telle échelle, il n'est guère étonnant que les effets indésirables, dont la résistance à l'EPO, soient considérés. Par analogie, la résistance à l'insuline par auto-anticorps pour les anciennes insulines extractives d'origine animale n'a pas totalement disparu avec l'avènement des nouvelles insulines recombinantes ou biogéniques. C'est dire la crainte que nous pouvions avoir vis-à-vis de l'EPO [18].

La cause principale de perte d'efficacité de l'EPO rapidement identifiée était la carence martiale et les premières études multicentriques avaient toutes conclu en l'absence

d'immunisation contre l'érythropoïétine humaine recombinante. Douze ans et plus d'une utilisation massive chez l'insuffisant rénal chronique ne modifient pas cette affirmation.

Cependant, en 2002, dans le monde, 179 cas d'érythroblastopénie soupçonnés chez des insuffisants rénaux chroniques, traités par érythropoïétine étaient répertoriés. 165 ont été confirmés par biopsie médullaire et 112 patients présentaient des anticorps anti-EPO. Dans le cas des autres indications thérapeutiques de la molécule (en oncologie, en chirurgie, en néonatalogie...), les essais cliniques n'ont révélé jusque là aucune apparition de tels anticorps mais il n'y a pas, à l'heure actuelle, suffisamment de recul par rapport à ces utilisations. [15, 60].

1. Erythroblastopénie

La « pure red cell aplasia » ou PCRA est caractérisée par la survenue soudaine d'une anémie normochrome, normocytaire, sévère et progressive, avec absence presque complète dans la moelle osseuse des seuls éléments précurseurs de la lignée rouge. Elle s'exprime au niveau sanguin par une réticulocytopénie ($< 10\,000/\text{mm}^3$), sans anomalie notable des globules blancs et des plaquettes. Le taux d'hémoglobine diminue au rythme de près de 1 g/dl/semaine. La PCRA peut relever de causes variées telles que les affections lymphoprolifératives, en particulier des leucémies lymphoïdes chroniques B, des infections virales, dues surtout au parvovirus B19, des maladies auto-immunes systémiques, des intoxications médicamenteuses (chloramphénicol, azathioprine, tacrolimus) ou des thymomes. 50 % des PCRA sont cependant idiopathiques [60].

Dans le cas qui nous intéresse, il s'agit d'une érythroblastopénie centrale acquise après plusieurs mois, voire plusieurs années, de traitement par érythropoïétine, due à l'apparition d'anticorps de type IgG neutralisant à la fois l'érythropoïétine recombinante et endogène, l'EPO sérique étant indétectable. Cet anticorps extrêmement puissant est exclusivement dirigé contre le squelette protéique et non les chaînes glycosylées [16, 17, 28, 197], pourtant seules variantes par rapport à l'EPO endogène, produisant ainsi une aplasie de la lignée des globules rouges [16, 17, 28]. Toutefois, il paraît peu vraisemblable qu'il s'agisse d'un auto-anticorps, en raison du taux sérique très élevé rencontré chez la plupart des patients 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, une hémopathie, ou un lupus. L'apparition transitoire d'anticorps 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. Dans tous les cas, les taux d'auto-anticorps anti-EPO endogène cités dans la littérature sont extrêmement faibles [197].

Par rapport au nombre de patients bénéficiant de ce traitement, rares sont les cas d'immunisation anti-EPO rapportés à ce jour. Ces observations sont malheureusement hétérogènes, aussi bien en ce qui concerne les explorations pratiquées que l'évolution spontanée ou traitée.

Récemment, la présence d'anticorps anti-EPO a été rapportée dans une population dialysée avec une prévalence de 67 % par une technique d'immuno-enzymologie semi-quantitative détectant des anticorps dirigés contre la partie glycosylée qui n'induisent pas de résistance au traitement [197].

En effet, la différence entre les trois molécules commercialisées concerne principalement la glycosylation, non responsable de l'immunisation chez les patients.

2. Polysorbate 80, responsable mais pas coupable

Le taux de survenue de ces érythroblastopénies varie selon la molécule mais également selon la spécialité comme le révèle une étude du Dr Macdougall. L'incidence de cet effet indésirable a été calculée pour 100.000 patient-années traités par voie SC sur les périodes 1989-1998 et 1999-2002 pour l'époétine- α (Eprex[®] et Epogen[®]) et l'époétine- β (Neorecormon[®]). Pour la période 1989-1998 les taux étaient respectivement de 0.22, 2.6 et 0.32 pour Epogen[®], Eprex[®] et Neorecormon[®] et pour la période 1999-2002 : 0.98, 25.6, 0.66. Les résultats révèlent une fréquence de survenue significativement plus élevée pour Eprex[®] par rapport aux deux autres spécialités avec une augmentation très importante durant la deuxième période [115].

La seule explication avancée actuellement pour comprendre ces différences et cette brusque montée des PCRA est le changement de formulation d'Eprex[®] imposé en 1998 pour des raisons de préventions infectieuses, par les instances sanitaires européennes. En effet, avant 1998, les préparations d'Eprex[®] contenaient de la sérum-albumine humaine (SAH) utilisée comme agent stabilisant. La SAH fut remplacée par du polysorbate 80 [16, 17, 60]. Le risque de survenue de PRCA ne fit qu'empirer depuis, ce qui conduisit Janssen-Cilag à modifier la monographie de son produit et à contre-indiquer la voie SC chez les patients insuffisants rénaux chroniques.

Cette constatation avait déjà été faite par Gershon et coll. en 2002 concernant spécifiquement les différences observées entre les différentes spécialités d'époétine- α . Sur 82 cas d'érythroblastopénie survenus de par le monde, 78 étaient dus à Eprex[®], 4 à Epogen[®] et aucun rapport n'avait été fait avec Procrit[®]. Les deux dernières spécialités, commercialisées sur le marché américain, présentent toutes les deux la même formulation, tandis qu'Epex[®], uniquement disponible en dehors des États-Unis, est la seule possédant du polysorbate 80 comme excipient [16, 17, 28].

La concentration en polysorbate 80 dans Epex[®] (0,03 %) est relativement plus élevée que celle retrouvée dans les autres spécialités du marché européen : 0,005 % de polysorbate 80 dans la formulation d'Aranesp[®] et 0,01 % de polysorbate 20 pour Neorecormon[®]. Cela pourrait être une des raisons pour laquelle la fréquence de survenue d'érythroblastopénie est très inférieure pour ces deux dernières spécialités. Toutefois, des essais réalisés sur des souris avec des concentrations en polysorbate 80 dix fois plus élevées que dans les formulations commercialisées n'ont révélé aucune augmentation de l'immunogénicité de l'époétine- α . Le polysorbate 80 ne peut donc, par lui-même, être incriminé dans l'apparition de PCRA [16, 17].

Dans les premières formulations d'Epex[®], les seringues préremplies pour l'administration SC possédaient un joint de piston en latex non recouvert. Il semble que ce latex interfère avec le polysorbate 80 en formant des composés organiques (« leachates » en anglais).

Des analyses CLHP d'une solution d'Epex[®] contenant du polysorbate 80 ont montré la présence de dix pics bien distincts de celui de l'EPO. Neuf d'entre eux ont été identifiés et sont des formes ou des dérivés potentiels d'agents utilisés dans la fabrication du joint de piston des seringues. La quantité de ces composés augmente avec le temps de stockage du produit, de l'exposition à des températures inférieures à 4°C et représente 1 à 2 μg /seringue après 1 à 3 ans de stockage [16, 17].

L'apparition, chez des souris, d'anticorps anti-EPO après administration d'époétine- α associée à ces « leachates » n'a pas été facile à détecter alors que de tels anticorps ont été rapidement mis à jour lorsque l'animal recevait en plus l'adjuvant incomplet de Freund. En revanche, l'injection simultanée d'ovalbumine aux deux autres produits fait apparaître une réponse immunitaire dose-dépendante. Il semble donc que les composés organiques dérivant du joint de piston aient une légère activité d'adjuvant de l'immunité. La baisse de l'hématocrite observée chez un certain nombre de souris est cohérente avec la production d'anticorps anti-érythropoïétine [16, 17].

En 2003, le laboratoire rappela tous les lots de seringues préremplies avec des joints de piston non recouverts pour les remplacer par des seringues dont le joint de piston a été recouvert de Téflon[®]. La fréquence de survenue de PCRA a été ainsi réduite de façon considérable.

Les découvertes de l'enquête technique, les données animales et l'enquête clinique suggèrent fortement que ces « leachates » soient le facteur contribuant à l'incidence accrue d'érythroblastopénie attribuée ces dernières années à Eprex[®]. En effet, les seringues contenant l'époétine-β et la darbépoétine-α ont été commercialisées bien après celles pour l'époétine-α ; elles présentaient un piston dont le joint était recouvert et donc l'EPO ne pouvait pas interférer avec l'agent stabilisant [16, 17]. C'est probablement pour cette raison que très peu de cas de PCRA ont été observés avec Neorecormon[®] ou Aranesp[®]. Mais depuis le début de l'utilisation de l'EPO en thérapeutique, l'exposition totale à ces deux molécules reste de beaucoup inférieure à celle avec l'époétine-α et, avec le temps, nous obtiendrons des données plus fiables.

Dans toutes les observations qui ont été faites, il est bien difficile de se faire une idée du mécanisme possible de l'immunisation. On peut dans chacune d'elles, toujours isolées, éliminer aussi bien un contaminant exogène qu'une anomalie de synthèse industrielle. Néanmoins, la nature de l'EPO incriminée, notamment de l'époétine-α, nous interroge sur d'éventuelles modifications très subtiles du processus de synthèse mais cela reste du domaine du secret de fabrication industrielle.

B. Carence martiale

La carence martiale (carence en fer) est la cause la plus fréquente de diminution de réponse à l'EPO. Elle peut exister au début du traitement ou survenir secondairement comme conséquence de l'utilisation accrue de fer associée à la formation des nouveaux érythrocytes [102, 200].

De nombreux paramètres ont été proposés pour évaluer le statut martial des patients traités :

- Le dosage du fer sérique et de la capacité totale de fixation du fer par la transferrine est indispensable pour déterminer le coefficient de saturation de la transferrine. Ce paramètre, normalement compris entre 20 et 40 %, permet d'estimer la quantité de fer disponible pour les précurseurs érythrocytaires matures. Des valeurs inférieures à 20 % indiquent une carence en fer qui est sévère lorsque le coefficient de saturation de la transferrine est

inférieur à 15 %. A l'opposé, en cas de surcharge en fer, le coefficient de saturation de la transferrine augmente [97, 99, 200].

- La ferritine sérique fournit de façon non invasive une bonne approximation des réserves en fer. Mais son dosage a des limites qu'il faut connaître : la ferritinémie est augmentée dans les syndromes inflammatoires et dans les hépatopathies chroniques. Une carence en fer fonctionnelle ou relative peut donc exister alors même que le taux de ferritine est encore dans des valeurs considérées comme normales.

Les valeurs seuils de la ferritinémie traduisant une carence ferrique varient selon les études. Le seuil est plus élevé chez les patients dialysés que chez les sujets sains ($\leq 15 \mu\text{g/l}$). La constatation chez un dialysé d'un taux de ferritine inférieur à $50 \mu\text{g/l}$ est très évocatrice d'une carence martiale [97, 99].

Une diminution des stocks en fer ou une capacité réduite de leur mobilisation sont les causes les plus fréquentes d'une résistance relative ou absolue à l'EPO. Néanmoins, il n'est pas aisé d'établir le diagnostic d'une carence martiale dans tous les cas. Les taux de ferritine sérique et la saturation de la transferrine ne reflètent pas de façon fidèle la biodisponibilité du fer chez bon nombre de patients [52].

- Devant l'absence de fiabilité des marqueurs usuels, en dehors de la réaction de Pearls sur le myélogramme, d'autres dosages ont été proposés : le dosage de l'hémoglobine réticulocytaire, le dosage de la protoporphyrine libre érythrocytaire et surtout le dosage des récepteurs solubles de la transferrine qui paraissent comme le plus fiable et surtout le plus accessible aux praticiens [18].

Nomogramme de Van Wyck [192]

Il permet d'évaluer les réserves en fer et de prédire les besoins pour la correction de l'anémie sous EPO en tenant compte des taux de ferritine et d'hémoglobine initiaux et du taux d'hémoglobine final (*Figure 23*).

Ce nomogramme est basé sur le fait que :

- $1 \mu\text{g/l}$ de ferritine correspond à 8 à 10 mg de fer stocké,
- et une augmentation de 1 g pour 100 ml d'hémoglobine nécessite 150 mg de fer.

Les réserves en fer sont calculées par la formule suivante : $[400 - (\log \text{ferritine} - \log 30)]$ où 400 est une constante empirique et 30 la valeur inférieure de la normale pour la ferritine (en $\mu\text{g/l}$).

Les besoins en fer sont calculés par la formule : $150 \times (\text{Hb cible} - \text{Hb de départ})$.

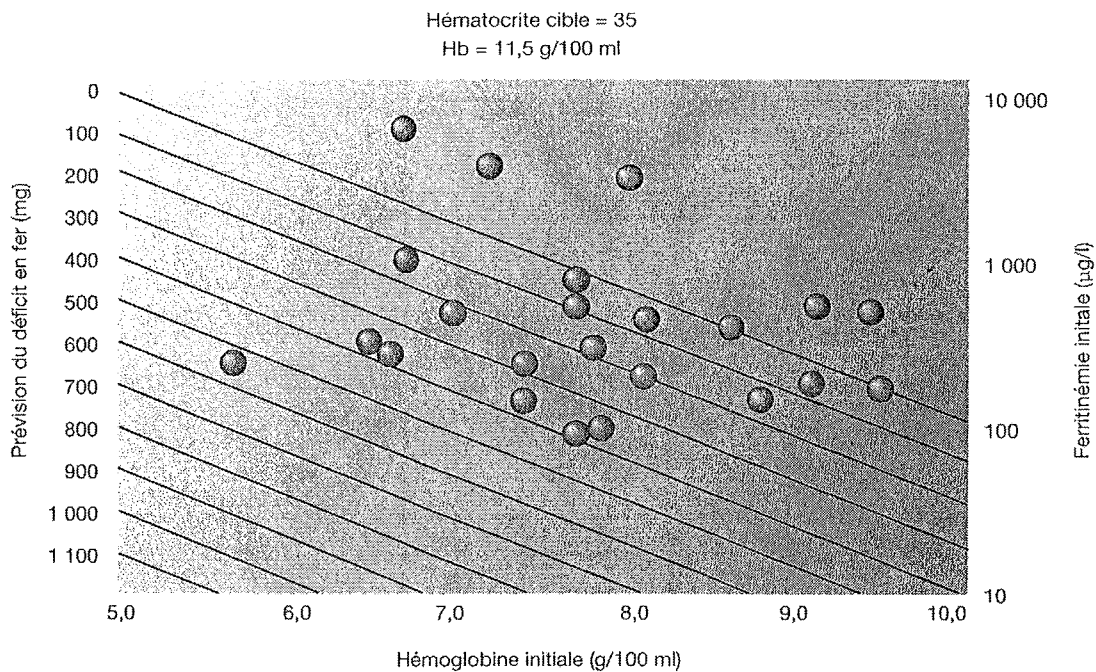


Figure 21 - Nomogramme établi par Van Wyck permettant de prédire les besoins en fer au cours d'un traitement par EPO [192]

Les différentes études cliniques ont montré que, tôt ou tard, près de 50 % des patients traités par EPO développent une carence martiale absolue ou relative [200].

Une carence martiale absolue est définie par un taux sérique de ferritine inférieur à 100 µg/l et un coefficient de saturation de la transferrine inférieur à 20 %.

Une carence martiale relative ou fonctionnelle peut exister avec un taux de ferritine normal ou légèrement élevé, un coefficient de saturation de la transferrine inférieur à 20 % et une diminution de la réticulocytose. Dans ce contexte, la présence d'un taux sérique normal de ferritine peut être due soit à une augmentation de sa synthèse en rapport avec une pathologie inflammatoire par exemple, soit à une distribution anormale des stocks ferriques (plus importante au niveau du foie et de la rate qu'au niveau de la moelle). L'avidité de la moelle dépasse alors les possibilités de relargage du fer par le système réticulo-endothélial [168, 200].

Une carence martiale relative peut également se développer au cours du traitement par EPO chez les patients polytransfusés ayant des stocks ferriques augmentés. Cela a été démontré dans une étude multicentrique européenne incluant 123 patients polytransfusés ayant des taux de ferritinémie supérieurs à 700 ng/ml. Au cours de la correction de l'anémie, les taux de

ferritine ont diminué, passant de 1531 ng/ml à 1100 ng/ml. Chez 25 % des patients, le coefficient de saturation de la transferrine s'est abaissé en dessous de 20 % [97, 99].

En dépit des stocks ferriques importants, certains patients peuvent donc probablement ne pas avoir suffisamment de fer disponible pour l'érythropoïèse.

A l'inverse, une réponse correcte à l'EPO chez des patients ayant un taux de ferritine bas a été décrite par S. Casati. Ces patients sont probablement capables de réduire leur taux sérique de ferritine sans qu'il existe une carence martiale ; cela serait dû à une meilleure biodisponibilité du fer à partir des réserves [97, 99].

A côté de l'utilisation accrue du fer, associée à la synthèse des nouveaux érythrocytes, la carence martiale peut être aussi le fait de pertes sanguines essentiellement chez les patients urémiques. Les causes de ces pertes sont multiples : saignement clairement identifié par hémorragie des points de ponction, hémorragie digestive, coagulation des dialyseurs, prélèvements multiples dans le cadre des analyses, hémorragie occulte dont le diagnostic est beaucoup plus difficile [18, 168].

D'un point de vue sémantique, l'inclusion de la carence martiale dans le chapitre de la résistance à l'action de l'EPO peut se discuter car le fer est un élément indispensable à l'érythropoïèse. Si l'on considère cependant la disponibilité du fer souvent limitée, par quelque mécanisme que ce soit, comme une condition qui est associée à une réponse diminuée à l'hormone, alors l'inclusion de la carence martiale paraît justifiée [52].

C. États inflammatoires aigus ou chroniques et néoplasies

Des infections aiguës ou chroniques, d'origine bactérienne, virale ou fongique peuvent toutes s'accompagner d'une diminution de la réponse à l'érythropoïétine ou une aggravation de l'anémie après une réponse initialement satisfaisante. La recherche d'un foyer occulte d'infection paraît donc souhaitable dans ce cas. Les causes les plus fréquentes sont une infection de la fistule artério-veineuse chez le patient dialysé, une phlébite, une cystite, une pneumonie, une tuberculose et des abcès superficiels ou profonds. Les réactions inflammatoires après une intervention chirurgicale peuvent également diminuer l'efficacité de l'EPO et parfois même l'annuler entièrement. La présence de désordres auto-immuns tels qu'une polyarthrite rhumatoïde, une vascularite ou une affection maligne peut également entraîner une résistance à l'érythropoïétine [52, 97, 99].

Cette résistance est sans doute liée à plusieurs mécanismes :

- Le rôle de l'inflammation et des cytokines pro-inflammatoires (comme par exemple l'IL-1, IL-6, le TNF- α le TGF- β et l'IFN- γ) est de plus en plus reconnu. Leurs effets sur les progéniteurs sont plus ou moins directs. Par exemple, l'IL-1 agit en stimulant des lymphocytes T qui produisent de l'IFN- γ qui est lui-même un inhibiteur des progéniteurs hématopoïétiques. D'autre part, l'IL-1, le TGF- γ et le TNF- α inhibent la production d'érythropoïétine. Il semble qu'il existe une réponse inadéquate de l'érythropoïétine face à l'anémie dans ce cadre [52, 53, 97, 99, 151]. Elles sont sécrétées soit au cours de maladies inflammatoires chroniques ou certaines néoplasies, soit au décours d'infections aiguës, bactériennes, virales (Parvovirus B19). Leur action est directe sur les cellules souches mais aussi indirecte par séquestration du fer dans les macrophages. C'est dans ces conditions que la ferritine devient un marqueur inadapté pour évaluer les réserves en fer car elle est également une molécule de la réaction inflammatoire aiguë [18].

Plusieurs études ont montré que les marqueurs de l'inflammation sont fréquemment retrouvés lors d'une diminution de la réponse à l'EPO. En particulier, des taux élevés de la protéine-C réactive (CRP) peuvent être utilisés pour prévoir la résistance au traitement. En effet, la dose hebdomadaire d'EPO des patients ayant un taux de CRP ≥ 20 mg/l était, en moyenne, 80 % plus élevée que celle chez les patients avec un taux de CRP ≤ 20 mg/l [53].

- Les cytokines pro-inflammatoires peuvent également influencer la non-réponse à l'EPO par action sur le métabolisme du fer. Une hyposidérémie est souvent observée dans les phénomènes infectieux et inflammatoires malgré des réserves de fer adéquates. La non-disponibilité du fer stocké dans le système réticulo-endothélial constitue probablement la cause la plus fréquente de non-réponse [53]. Cette résistance ne paraît pas pouvoir être levée même en cas d'utilisation de doses élevées comme cela a été le cas dans l'observation rapportée par Muirhead [97, 99].

On peut noter qu'il a été rapporté au moins une exception à cette règle concernant la relation négative entre érythropoïèse et infection. Il s'agit du cas de l'hépatite virale au cours de laquelle une augmentation de la production endogène d'érythropoïétine peut être observée. Cela s'explique probablement par la capacité des hépatocytes nouvellement formés à synthétiser des quantités accrues d'érythropoïétine, ce qui rappelle le stade embryonnaire du développement au cours duquel le foie est le principal site de la synthèse d'érythropoïétine [52].

D. Surcharge aluminique

Une surcharge aluminique sévère est une autre cause de diminution de l'efficacité d'un traitement par EPO chez les patients urémiques. Suite à la contamination de l'eau de dialyse dans les années 60-70, cette complication de l'insuffisance rénale a vu son incidence diminuer notablement au cours des dernières années, en raison de l'introduction généralisée de systèmes performants de purification de l'eau de dialyse, du moins dans les pays dits « développés ». Elle représente néanmoins encore un problème même dans les pays occidentaux car les sels d'alumine sont encore largement utilisés pour le traitement de l'hyperphosphorémie [18].

Plusieurs études suggèrent que l'intoxication aluminique s'accompagne d'une diminution de la réponse à l'EPO chez le malade hémodialysé. Dans la plupart des cas, la résistance est seulement relative et pouvait être surmontée par une augmentation de la posologie de l'hormone recombinante [52].

La surcharge aluminique interviendrait par l'intermédiaire d'une carence fonctionnelle en fer. Deux observations supportent cette hypothèse :

- les études expérimentales chez l'animal démontrent que l'aluminium plasmatique se lie à la transferrine et, *in vitro*, les cultures de progéniteurs érythrocytaires humains montrent que la présence de transferrine est indispensable pour éliminer l'inhibition de l'érythropoïèse par l'aluminium ;
- les doses d'EPO nécessaires pour corriger l'anémie au cours de l'insuffisance rénale chronique sont corrélées positivement au tau d'aluminium mesuré après administration de desferrioxamine [97, 99].

Des preuves supplémentaires pour une interférence de l'aluminium avec l'action de l'érythropoïétine ont été fournies par Bia et al. Ces auteurs ont soumis des patients intoxiqués par l'aluminium à un traitement par la desferrioxamine. Ils ont pu montrer que les malades répondant à ce traitement par une correction de leur anémie, avaient des taux d'érythropoïétine plasmatique plus élevée que ceux qui étaient non répondeurs. Ainsi, même les malades ayant une érythropoïétine circulante appropriée, ne pouvaient répondre à l'hormone que lorsque leur surcharge aluminique était corrigée par le chélateur de l'aluminium [52].

Lorsque la concentration plasmatique d'aluminium dépasse 250 µg/l (9 µmol/l), au cours du test à la desferrioxamine (30 mg/kg), il semble préférable de traiter d'abord la surcharge aluminique avant de débiter le traitement par l'EPO [97, 99].

E. Hyperparathyroïdie secondaire

L'hyperparathyroïdie secondaire peut être partiellement responsable d'une anémie de par l'induction d'une hémolyse ou un effet direct de la parathormone (PTH) sur les progéniteurs de la lignée rouge au niveau de la moelle osseuse érythropoïétique [53]. Dans une étude préliminaire, il a été montré que l'état d'hyperparathyroïdie sévère pouvait s'accompagner d'une résistance à l'EPO : des patients ayant des signes biologiques et histologiques d'un excès de PTH circulante nécessitaient des doses d'EPO plus importantes que des malades peu ou pas hyperparathyroïdiens. Les auteurs d'une autre étude sont cependant parvenus à la conclusion opposée, c'est-à-dire qu'un excès de PTH plasmatique ne modifiait pas la réponse à l'érythropoïétine [52].

Il est également intéressant de noter que chez des hémodialysés atteints d'une hyperparathyroïdie sévère, une augmentation notable des taux d'érythropoïétine circulante, une à deux semaines après parathyroïdectomie chirurgicale, a été observée. Cette élévation était parfois extrêmement marquée, pouvant atteindre des concentrations de 500 mU/ml ou plus chez un petit nombre de malades. Une autre étude a permis de montrer l'amélioration de l'anémie chez deux groupes de patients : l'un recevant de l'EPO avant la parathyroïdectomie et l'autre n'en recevant pas. Ces observations suggèrent qu'un excès de PTH peut exercer un effet négatif sur la production d'érythropoïétine endogène [52, 53]. Ainsi, l'augmentation de cette production endogène, a permis de réduire de 30 à 45 % les besoins hebdomadaires en EPO dans le premier groupe de patients [53].

F. Conclusion

Depuis les années 90, l'utilisation de l'érythropoïétine a totalement transformé la qualité de vie des patients anémiques. L'efficacité de l'EPO s'est largement confirmée au cours du temps. Les effets bénéfiques de la sécurité de l'EPO au long terme ont permis d'élargir ses indications : anémie de l'insuffisance rénale chronique sévère, anémie des cancers, anémie lors de protocole de chirurgie orthopédique majeure programmée...

Troisième partie :

**Érythropoïétine,
indications
médicales et non
médicales**

Troisième partie : Indications médicales et non médicales

L'érythropoïétine est utilisée en thérapeutique humaine depuis 1989. Au départ, réservée au traitement de l'anémie de l'insuffisant rénale chronique, elle a vu le nombre de ses indications augmenter au cours de ces deux décennies. Nous aborderons dans un premier temps les indications médicales de l'EPO ayant reçu une AMM puis celles faisant l'objet d'études en cours de développement. Nous terminerons cette troisième partie en abordant l'EPO en tant que substance dopante et nous recenserons les méthodes de dosage dont dispose le corps médical pour détecter son utilisation illicite par les sportifs de haut niveau.

I. Indications médicales ayant reçu une AMM

A. En néphrologie : Traitement de l'anémie de l'insuffisant rénal chronique dialysé et non-dialysé

La transplantation rénale, lorsqu'elle est viable, constitue le seul traitement étiologique possible des patients souffrant d'une insuffisance rénale au stade terminal. Le nombre de transplantations est toutefois limité par le manque de donneurs. C'est pourquoi une gamme importante de techniques de dialyse a été développée pour suppléer les fonctions excrétrices déficientes afin de maintenir en vie les patients en insuffisance rénale terminale.

L'hémodialyse et la dialyse péritonéale sont devenues des traitements de routine. Néanmoins, il n'y a que quelques patients qui soient parfaitement réhabilités par la dialyse seule. La qualité de vie peut être fortement altérée par une diminution évidente des performances physiques. L'anémie d'origine rénale est un des facteurs fondamentaux de l'altération de la qualité de vie du patient urémique [102].

1. Anémie de l'insuffisant rénal chronique

L'anémie qui s'installe lors des insuffisances rénales a plusieurs origines (*Figure 22*), le déficit en érythropoïétine étant le phénomène le plus important. C'est donc naturellement que la première utilisation thérapeutique a été celle du traitement de l'anémie de l'insuffisance

rénale [26]. D'autres facteurs viennent cependant l'accentuer : spoliation sanguine suite aux dialyses ou aux multiples ponctions veineuses, toxicité due à l'urémie, tendance hémorragique des patients urémiques favorisée par l'héparinisation des circuits de dialyse. Plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'origine du déficit en érythropoïétine. La plus évidente est la disparition des cellules productrices d'EPO en même temps qu'il y a perte de masse rénale. Cependant, le rein semblerait toujours capable de produire de l'érythropoïétine mais soit il n'est plus capable de l'excréter, soit ses capteurs sont moins sensibles aux variations de pO_2 [102, 151].

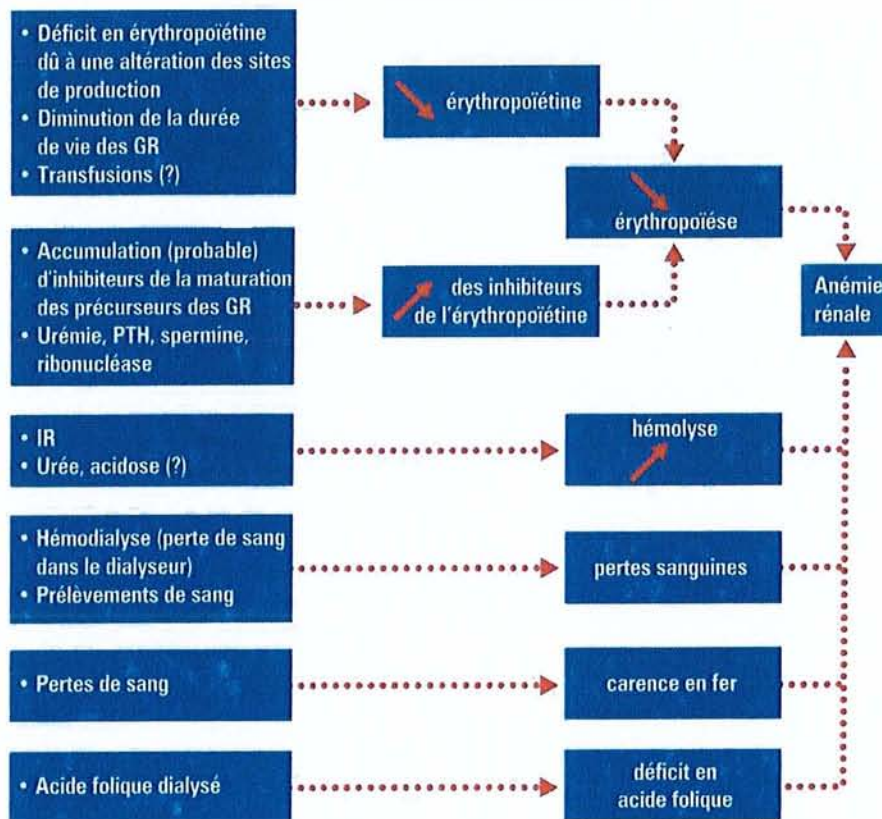


Figure 22 - Principaux facteurs physiopathologiques impliqués dans l'anémie rénale [102].

Avant la mise sur le marché de l'EPO, le seul moyen de pallier l'anémie sévère des insuffisants rénaux était de pratiquer des transfusions sanguines régulières aux effets toutefois temporaires et qui exposent les patients aux risques transfusionnels (infections, surcharge en fer, sensibilisation HLA) (*Annexes Tableau 8*). La production par biotechnologie de l'érythropoïétine est considérée comme une avancée thérapeutique importante dans le domaine de la néphrologie. L'EPO représente un traitement substitutif et étiologique de l'anémie rénale, permettant de compenser le déficit existant et contribue, non seulement à

améliorer l'état général des patients et leur qualité de vie, mais également à supprimer les besoins transfusionnels [102, 151].

2. Traitement par Eprex®

Lorsque les patients sont en hémodialyse, le traitement par Eprex® débute par une phase correctrice pendant laquelle l'EPO est administrée à la dose de 50 UI/kg trois fois par semaine à la fin de la séance de dialyse, en intraveineux uniquement, la voie sous-cutanée étant contre-indiquée chez les patients insuffisants rénaux chroniques. Si un ajustement des doses est nécessaire, il est recommandé de procéder par paliers d'au moins 4 semaines. A chaque palier, l'augmentation ou la diminution de dose préconisée est de 25 UI/kg trois fois par semaine. Le but est d'atteindre 10 à 12 g/dl d'hémoglobine pour les adultes et 9,5 à 11 g/dl chez les enfants. Une phase d'entretien fait suite avec une posologie de 30 à 100 UI/kg trois fois par semaine. La dose totale recommandée par semaine est comprise entre 75 et 300 UI/kg.

Généralement les enfants de moins de 30 kg nécessitent des doses d'entretien plus importantes que ceux de plus de 30 kg et que les adultes. A titre d'exemple, les doses d'entretien suivantes ont été utilisées dans les essais cliniques, après six mois de traitement [125, 168] :

Tableau 3 - Doses d'entretien utilisées chez les enfants en hémodialyse [125].

| DOSE (UI/kg/3 fois par semaine) | | |
|------------------------------------|---------|-----------------------------|
| Poids (kg) | Moyenne | Dose habituelle d'entretien |
| Inférieur à 10..... | 100 | 75-150 |
| 10 à 30..... | 75 | 60-150 |
| Supérieur à 30..... | 33 | 30-100 |

Les études cliniques disponibles suggèrent que les patients dont le taux d'hémoglobine initial est très bas (inférieur à 6,8 g/dl) peuvent avoir besoin de doses d'entretien plus importantes que ceux dont l'hémoglobine initiale est plus élevée (supérieure à 6,8 g/dl) [125].

Le schéma thérapeutique des adultes en hémodialyse est équivalent pour les adultes en pré-dialyse. La dose d'entretien se situe généralement entre 17 et 33 UI/kg trois fois par

semaine. La posologie maximale ne devrait pas excéder 200 UI/kg trois fois par semaine [151].

Pour ceux qui subissent des dialyses péritonéales, les posologies sont de 50 UI/kg deux fois par semaine pour la phase correctrice et de 25 à 50 UI/kg pour la phase d'entretien [97, 99, 125, 151].

3. Traitement par Neorecormon®

Les schémas thérapeutiques de Neorecormon® et d'Aranesp® sont semblables, à ceci près que la voie sous-cutanée n'est pas contre-indiquée et permet de réduire la posologie de 20 à 30 % par rapport à celle en intraveineux. En effet, les essais menés par voie sous-cutanée ont montré que la correction de l'anémie requiert des doses plus faibles que par voie IV, avec un profil pharmacocinétique plus favorable. La voie sous-cutanée, par une résorption et une élimination prolongées, conduit à une augmentation progressive mais plus durable des taux sériques d'érythropoïétine comparativement à la voie intraveineuse. Ces taux sériques prolongés sembleraient mieux répondre aux besoins physiologiques [102, 150, 152, 186].

Pour Neorecormon®, la posologie initiale est de 3×20 UI/kg/semaine en SC. La posologie peut être augmentée toutes les quatre semaines de 3×20 UI/kg et par semaine, si l'augmentation de l'hématocrite n'est pas satisfaisante ($< 0,5$ % par semaine). Par voie IV, la posologie initiale est de 40 UI/kg, trois fois par semaine. Après quatre semaines, la posologie peut être augmentée à 80 UI/kg, trois fois par semaine et, si nécessaire, par de nouvelles augmentations de doses de 20 UI/kg, trois fois par semaine, à un mois d'intervalle. Pour les deux voies d'administration, la dose maximale ne doit pas dépasser 720 UI/kg et par semaine. Pour maintenir l'hématocrite entre 30 et 35 %, la posologie est d'abord réduite de moitié par rapport à la dernière dose administrée. Celle-ci est ensuite ajustée à intervalles d'une ou deux semaines pour chaque malade (dose d'entretien). Dans le cas d'une administration par voie sous-cutanée, la dose hebdomadaire peut être administrée en une injection par semaine ou répartie en 3 ou en 7 injections par semaine. Les patients stables sous un rythme d'administration d'une injection par semaine peuvent passer à une injection toutes les deux semaines. Dans ce cas, une augmentation de la dose peut être nécessaire. Chez l'enfant, les essais cliniques ont montré que les doses nécessaires d'époétine- β sont d'autant plus élevées que le sujet est jeune. Cependant, sachant que l'on ne peut préjuger de la réponse individuelle, il convient de respecter le schéma posologique recommandé [102, 123, 151].

4. Traitement par Aranesp®

Pour Aranesp®, la dose initiale est de 0,45 µg/kg, administrée par voie sous-cutanée ou intraveineuse, en une injection unique hebdomadaire. A titre de comparaison, la dose de darbépoétine-α peut être calculée à partir de la dose de r-HuEPO précédemment citée par une formule d'équivalence de masse protéique des deux molécules permettant la conversion de dose : 200 UI de r-HuEPO = 1 µg de darbépoétine-α). Chez les patients non dialysés, une dose initiale de 0,75 µg/kg peut être administrée par voie sous-cutanée, en une injection unique une fois toutes les deux semaines. Si l'augmentation du taux d'hémoglobine est insuffisante, la dose peut être augmentée d'environ 25 %. Pendant la phase d'entretien, Aranesp® peut continuer à être administré en une injection unique hebdomadaire ou une injection une fois toutes les deux semaines. Chez les patients non dialysés, une fois le taux d'hémoglobine cible atteint par l'administration d'une dose toutes les deux semaines, Aranesp® peut être administré par injection sous-cutanée une fois par mois en utilisant une dose initiale équivalente au double de la dose utilisée toutes les deux semaines. Pour la suite du traitement, la dose administrée doit être évaluée de façon à maintenir le taux d'hémoglobine cible [96, 124, 186].

B. En oncologie : Traitement de l'anémie des cancers

1. Données épidémiologiques sur l'anémie dans les affections malignes

L'anémie est une des complications fréquentes au cours des pathologies cancéreuses. Dans une étude multicentrique européenne portant sur plus de 15 000 patients cancéreux issus de 750 centres de traitement appartenant à 24 pays différents, le taux d'anémie est supérieur à 66 % au cours de l'évolution des tumeurs solides et à 72 % au cours de celle des tumeurs malignes [60].

L'état général des patients ou *performance status* est lié de manière significative au taux d'hémoglobine. L'étude multicentrique européenne a révélé un déficit particulier de prise en charge de l'anémie. Chez une majorité de patients cancéreux, aucun traitement n'est prescrit en dépit du lien entre niveau d'hémoglobine et qualité de vie, et cela aussi bien en cas de tumeurs solides que de myélomes multiples ou de lymphomes. Au total, 46 % seulement des patients ont reçu un traitement quelconque pour leur anémie durant cette étude, celui-ci

n'étant initié qu'à des niveaux d'abaissement très sévères de l'hémoglobine : 8,3 g/dl en moyenne pour les transfusions, 9,4 g/dl pour les traitements par EPO [60].

Initialement, une chute du taux d'hémoglobine peut être bien tolérée, du fait de mécanismes compensateurs, comme l'augmentation du 2,3-diphosphoglycérate intra-érythrocytaire, permettant de relibérer un surcroît d'oxygène vers les tissus. Une diminution progressive du taux d'hémoglobine est, le plus souvent, bien tolérée jusqu'à environ 10 g/dl, taux en dessous duquel le débit cardiaque doit augmenter pour compenser le déficit en transport d'oxygène.

Chez les patients ayant une production rénale intacte d'érythropoïétine, la stimulation de la production d'hématies par l'EPO est un autre mécanisme compensateur. Toutefois, lorsque le taux d'hémoglobine chute en dessous de 8 g/dl, un recours aux transfusions est souvent nécessaire du fait d'une hypoxie plus sévère [102].

2. Rôle de l'anémie des cancers

L'anémie des cancers joue un rôle à plusieurs niveaux : elle est une composante importante de la fatigue des patients, ses manifestations cliniques participent au diagnostic et influent sur la qualité de vie. Elle est un facteur pronostique propre, influence le choix des traitements et peut en diminuer les effets et la tolérance [169, 170].

- La fatigue liée à l'anémie est un symptôme très fréquent et souvent la première manifestation du cancer. Les symptômes sont les mêmes que ceux des anémies chroniques d'autres étiologies : dyspnée, palpitations et autres complications cardio-vasculaires, fatigue, malaises, vertiges, dépression, troubles cognitifs, nausées, anorexie, troubles du sommeil, dysménorrhée, baisse de la libido. La température cutanée est abaissée, la peau et les conjonctives sont pâles. Mais les symptômes sont d'autant plus sévères que l'anémie survient rapidement ou qu'il existe un terrain fragilisé (insuffisance cardio-pulmonaire, sujets âgés...). L'altération de la qualité de vie se mesure par le questionnaire Fact ou, plus simplement par des échelles visuelles d'évaluation. La correction de l'anémie permet son amélioration [169].
- Il existe un lien entre l'existence d'une anémie et l'oxygénation tissulaire tumorale dans les cancers du col utérin, du sein et des voies aéro-digestives supérieures. Les conséquences de l'hypoxie générée par l'anémie sont diverses et de mieux en mieux connues [8, 11, 60] :

- augmentation de l'instabilité génétique des cellules tumorales avec pression de sélection des clones cellulaires à faible potentiel apoptotique et à haut potentiel métastatique,
 - induction de l'expression de plusieurs cytokines angiogéniques (VEGF, TNF α ...) stimulant la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales permettant le développement d'une néovascularisation tumorale. Avec la croissance tumorale, les zones hypoxiques augmentent, de même que les signaux angiogènes participant au développement métastatique,
 - induction du facteur transcriptionnel HIF-1 régulé par la concentration en oxygène et impliqué dans l'activité de transcription du gène de l'érythropoïétine.
- Outre son rôle sur la prolifération tumorale, l'hypoxie tissulaire intervient sur l'efficacité des traitements, par l'induction de mécanismes de résistances cellulaires vis-à-vis des traitements conventionnels de radiothérapie ou de chimiothérapie anticancéreuse [60, 120]. L'hypoxie favorise le développement de populations mutées plus résistantes aux traitements cytotoxiques. Elle entraîne également une inhibition de la prolifération cellulaire par accumulation des cellules en phase G₀ du cycle cellulaire et diminue l'efficacité des agents cytotoxiques. De plus, ces cellules, en phase non proliférante, restent viables et pourraient donc potentiellement être sources d'échec thérapeutique [11]. Il est envisagé que la correction de l'anémie limite l'hypoxie tumorale et restaure une sensibilité au traitement. Des arguments cliniques existent en ce sens. Néanmoins, la parution de l'étude récente de Henke et al. montrant une survie diminuée dans le bras EPO chez des patients recevant une radiothérapie exclusive pour cancer ORL a relancé le débat [120]. Nous aborderons ce problème ultérieurement dans le chapitre « EPO et radiothérapie ».

Concernant la chimiothérapie, nous disposons de peu d'expériences cliniques publiées et les modèles expérimentaux sont contradictoires. De nombreuses lignées tumorales présentent des récepteurs à l'EPO et se développent plus rapidement sous EPO. Toutefois, l'association d'EPO à la chimiothérapie peut augmenter l'efficacité antitumorale envers des tumeurs humaines xénogreffées. En clinique, l'étude de Littlewood et al. a montré une tendance non significative vers une amélioration de la survie globale des patients traités par EPO *versus* placebo en cours de chimiothérapie sans platine [120]. Il n'existe pas d'argument en défaveur de l'EPO. Toutefois, les résultats de l'étude de Henke nous montrent bien le risque qu'il y aurait à généraliser les résultats positifs sans tenir compte des localisations tumorales et des

particularités thérapeutiques. Des essais stratifiés selon les pathologies et les traitements administrés pourront peut-être répondre précisément aux questions restant en suspens [120].

3. Mécanismes

Les anémies rencontrées au cours des cancers peuvent avoir des présentations biologiques variées. Elles sont souvent normochromes, normocytaires et arégénératives mais, dans les cancers digestifs où les saignements sont fréquents, elles sont souvent microcytaires avec fer sérique diminué. En outre, certains cancers peuvent s'accompagner d'une carence en folates ou en vitamine B12, l'anémie étant alors macrocytaire. Enfin les précurseurs érythrocytaires (BFU-E et CFU-E) semblent normaux à l'examen de la moelle osseuse, et ils sont normalement sensibles à l'érythropoïétine [13, 26, 151].

Les causes sont plurifactorielles (*Figure 23*). Les mécanismes physiopathologiques des anémies normocytaires observées au cours des néoplasies sont fréquemment ceux de l'anémie inflammatoire comme nous l'avons vu dans le chapitre sur les résistances à l'EPO : relargage de cytokines de l'inflammation comme l'IL-1, le TNF- α et l'IFN- γ , qui modifient le métabolisme du fer et limitent la réponse physiologique à l'anémie médiée par l'EPO [60]. Toutefois, la chimiothérapie reste le principal facteur de développement ou d'exacerbation d'une anémie. En effet, il a été bien démontré dans les premières études publiées que les sels de platine altèrent la production de globules rouges par trois mécanismes principaux [120, 169] :

- myléosuppression,
- toxicité directe sur la lignée érythrocytaire par inhibition du système glutathion dont la fonction est d'inactiver le platine,
- toxicité sur les cellules de l'endothélium péri-tubulaire productrices d'EPO entraînant une chute des taux d'EPO endogène. La diminution de la réponse rénale à l'hypoxie ne permet plus une sécrétion d'érythropoïétine suffisante en regard du degré de l'anémie.

L'indication de l'EPO a logiquement été établie, dans un premier temps, dans le cadre du traitement de l'anémie des cancers traités par chimiothérapie contenant du platine mais a très rapidement été étendue à d'autres chimiothérapies antitumorales. En effet, L'EPO peut offrir une alternative thérapeutique permettant de compenser le déficit observé. Compte-tenu de la pathogénie multifactorielle de l'anémie liée au cancer, l'utilisation de doses plus élevées

d'EPO est souvent nécessaire pour, d'une part, relancer la réponse des cellules cibles et, d'autre part, compenser la durée de vie réduite des hématies [26, 151].

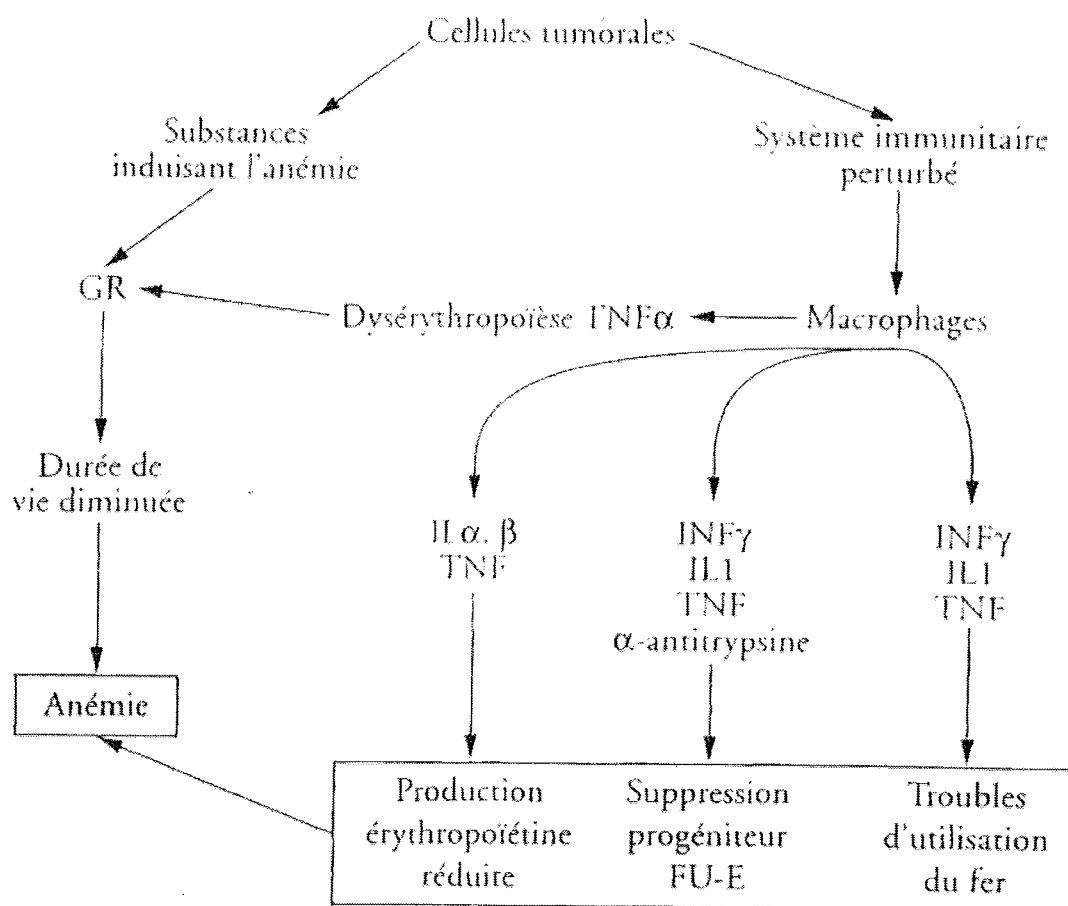


Figure 23 - Mécanismes physiopathologiques de l'anémie liée au cancer [169].

4. Traitement de l'anémie des cancers par l'érythropoïétine

a) Eprex®

L'AMM d'Eprex® recommande une dose initiale de 150 UI/kg trois fois par semaine ou 450 UI/kg une fois par semaine par voie sous-cutanée. Le taux d'hémoglobine à atteindre est d'environ 12 g/dl. Le taux à ne pas dépasser est de 13 g/dl. Si l'augmentation de l'hémoglobine est trop importante (> 2 g/dl par mois), il faut réduire la dose de 25 % à 50 %. Si elle dépasse 14 g/dl, il faut arrêter le traitement jusqu'à retour à un taux de 12 g/dl et reprendre le traitement par époétine- α à une dose de 25 % inférieure à la dose précédente. Enfin, après quatre semaines de traitement, si aucune réponse n'est observée, on doit augmenter les doses à 300 UI/kg trois fois par semaine. Si aucune réponse n'est observée à la

fin du même délai, on doit abandonner le traitement. En revanche si l'hémoglobine a augmenté d'au moins 1 g/dl, ou si les réticulocytes ont augmenté d'au moins 40 000/ μ l par rapport aux valeurs initiales après quatre semaines de traitement, la dose doit être maintenue. L'époétine- α doit continuer à être administrée pendant un mois après la fin de la chimiothérapie [125, 151].

b) Neorecormon[®]

Le protocole d'administration de Neorecormon[®] varie selon le type de cancer.

Dans le cas du traitement de patients ayant une tumeur solide, la solution d'époétine- β est administrée par voie sous-cutanée, la posologie hebdomadaire peut être fractionnée en 3 ou 7 injections. Neorecormon[®] est indiqué si l'hémoglobine est inférieure à 13 g/dl au début de la chimiothérapie. La dose initiale recommandée est de 450 UI/kg et par semaine. Elle devra être doublée si, après quatre semaines de traitement, le malade ne présente pas de réponse satisfaisante en termes de taux d'hémoglobine et de fréquence des transfusions. Après arrêt de la chimiothérapie, le traitement devra être poursuivi pendant trois semaines. Sa poursuite n'est plus utile si, malgré l'époétine- β , le taux d'hémoglobine chute de plus de 1 g/dl dans le premier cycle de la chimiothérapie. L'augmentation de l'hémoglobine ne doit pas dépasser 2 g/dl par mois ou une valeur de 14 g/dl. Si l'hémoglobine augmente de plus de 2 g/dl et par mois, la dose d'époétine- β doit tout d'abord être réduite de moitié. Si la valeur d'hémoglobine dépasse 14 g/dl, le traitement par Neorecormon[®] doit être interrompu jusqu'à atteindre une valeur inférieure à 12 g/dl. L'administration sera effectuée à nouveau, à la moitié de la dose hebdomadaire précédente [102, 123, 151].

Dans le cadre du traitement par Neorecormon[®] des patients ayant un myélome multiple, un lymphome non hodgkinien de bas grade ou une leucémie lymphoïde chronique, la cause principale de l'anémie devrait être une insuffisance relative en érythropoïétine active. Le déficit est défini par un taux d'EPO anormalement bas par rapport au degré de l'anémie :

- Taux d'EPO sanguin \leq 100 mU/ml et un taux d'hémoglobine compris entre 9 et 10 g/dl.
- Taux d'EPO sanguin \leq 180 mU/ml et un taux d'hémoglobine > 8 ou ≤ 9 g/dl.
- Taux d'EPO sanguin \leq 300 mU/ml et un taux d'hémoglobine ≤ 8 g/dl

Les taux ci-dessus doivent être dosés au moins 7 jours après la dernière transfusion sanguine et après le dernier cycle de chimiothérapie.

La solution d'époétine- β est administrée par voie sous-cutanée ; la dose hebdomadaire peut être administrée en une seule injection par semaine ou répartie en 3 à 7 injections par semaine. La dose initiale recommandée est de 450 UI/kg et par semaine. Si, après quatre semaines de traitement, le taux d'hémoglobine a augmenté d'au moins 1 g/dl, la dose en cours doit être poursuivie. Si le taux d'hémoglobine n'a pas augmenté d'au moins 1 g/dl, une augmentation de la dose à 900 UI/kg, répartie en 2 à 7 injections par semaine, peut être envisagée. Si, après huit semaines de traitement, le taux d'hémoglobine n'a pas augmenté d'au moins 1 g/dl, une réponse est peu probable et le traitement doit être interrompu [102, 123].

La dose maximale ne doit pas dépasser 900 UI/kg et par semaine. Si l'hémoglobine augmente de plus de 2 g/dl en quatre semaines, la dose de Neorecormon[®] doit être réduite de moitié. En revanche, si elle dépasse 14 g/dl, le traitement doit être interrompu jusqu'à ce qu'une valeur \leq 13 g/dl soit atteinte. L'administration est ensuite reprise à une dose correspondant à la moitié de la dose hebdomadaire précédente. Le traitement ne peut être repris que si le déficit en érythropoïétine est la cause la plus probable de l'anémie [123].

Les études cliniques ont montré que la réponse au traitement par époétine- β est retardée d'environ deux semaines chez les patients présentant une LLC, par rapport aux patients atteints de myélome multiple, de lymphome non hodgkinien et de tumeurs solides. Le traitement doit être poursuivi quatre semaines après la fin de la chimiothérapie [123].

c) Aranesp[®]

Dans le cadre du traitement de l'anémie des patients cancéreux (tumeurs solides et hémopathies malignes non myéloïdes) recevant une chimiothérapie, Aranesp[®] doit être administré par voie sous-cutanée à des patients présentant un taux d'hémoglobine \leq 11 g/dl. La dose initiale recommandée est de 6,75 μ g/kg de poids corporel, administrée une fois toutes les trois semaines. Si la réponse clinique (fatigue, taux d'hémoglobine) n'est pas satisfaisante après neuf semaines de traitement, la poursuite du traitement peut s'avérer inefficace. Il est également possible d'administrer une dose hebdomadaire de 2,25 μ g/kg de poids corporel. Les études cliniques ont montré une même efficacité de la darbépoétine- α , qu'elle soit administrée en une seule injection toutes les trois semaines, une fois toutes les deux semaines, ou une fois par semaine sans augmenter la quantité totale de produit. Pour les patients recevant Aranesp[®] une fois par semaine, si l'augmentation du taux d'hémoglobine est insuffisante (moins de 1 g/dl après quatre semaines), la dose doit être doublée. La poursuite du traitement peut s'avérer inefficace si l'augmentation du taux d'hémoglobine demeure

insuffisante quatre semaines après le doublement de la posologie. Une fois l'objectif thérapeutique individuel atteint, la dose doit être réduite de 25 à 50 % afin de maintenir le taux d'hémoglobine à sa valeur optimale. Il pourra être nécessaire de réduire à nouveau la dose afin que le taux d'hémoglobine ne dépasse pas 13 g/dl. Si le taux d'hémoglobine augmente de plus de 2 g/dl en quatre semaines, la dose devra être réduite de 25 à 50 %. Le traitement par Aranesp[®] doit être interrompu environ quatre semaines après la fin de la chimiothérapie [96, 124].

La correction de l'anémie survient en l'espace de deux à six semaines par EPO recombinante, l'efficacité non immédiate de ce traitement, comparativement à la transfusion, étant compensée par une durée d'efficacité plus longue puisqu'il induit des réticulocytes et des hématies avec une durée de vie normale. De plus, l'EPO est très bien tolérée et supprime le risque de réactions secondaires post-transfusionnelles [169]. Néanmoins, l'anémie reste souvent négligée et non traitée. Pourtant, l'hypoxie qu'elle entraîne influe sur l'agressivité tumorale. L'anémie est donc un facteur pronostique défavorable dans de nombreuses tumeurs et peut limiter les résultats positifs des traitements anticancéreux [8, 120].

Aussi il importe de la corriger, ne serait-ce que pour améliorer la qualité de vie des patients et leur tolérance aux thérapeutiques.

C. En chirurgie

La mise sur le marché de l'érythropoïétine recombinante a modifié les stratégies transfusionnelles habituelles. La transfusion dépend de la perte sanguine totale liée à l'intervention, du seuil transfusionnel fixé (en fonction de l'état pathologique du patient) et de la masse érythrocytaire préopératoire du patient ($VST \times Ht$ où $VST =$ volume sanguin total : 70 ml/kg chez l'homme, 65 ml/kg chez la femme ; $Ht =$ hématocrite). On estime actuellement à 25 % le nombre de patients modérément anémiques devant subir une intervention chirurgicale suffisamment hémorragique pour nécessiter une transfusion. Lorsque les besoins transfusionnels sont couverts par deux à trois unités de sang, comme dans la chirurgie orthopédique la plus fréquente, le taux d'hématocrite préopératoire est le facteur déterminant de la nécessité d'une transfusion. Pour augmenter la masse érythrocytaire préopératoire d'un patient, il suffit donc d'augmenter l'hématocrite préopératoire. En effet, la perte sanguine autorisée par l'abaissement du seuil transfusionnel augmente parallèlement à l'hémoglobine ou à l'hématocrite préopératoire. Son calcul repose sur la différence entre le volume

érythrocytaire à l'entrée et le volume érythrocytaire à la sortie, soit $VST \times (Ht \text{ initial} - Ht \text{ final})$ [148, 149].

Il est facile de déduire que plus l'hématocrite est élevé à J-1, plus la masse érythrocytaire du patient est élevée, et plus le recours à la transfusion sera tardif. En augmentant l'hématocrite avant l'intervention, l'EPO permet une perte plus importante de globules rouges avant que le seuil transfusionnel ne soit atteint [148, 149].

1. EPO et transfusion autologue programmée (TAP)

La transfusion de sang autologue est une ancienne technique qui connaît un nouvel essor du fait des divers risques transfusionnels (*Annexes Tableaux 8 et 9*). Face à ces risques, malgré les mesures visant à les minimiser et à les maîtriser, les techniques compensatoires aux pertes de sang lors d'actes chirurgicaux se sont développées afin d'éviter le recours aux transfusions homologues. Elle est, en outre, la seule possible dans certains cas, comme ceux des patients avec des groupes sanguins rares, des anticorps irréguliers multiples ou un anticorps dirigé contre une protéine plasmatique (antifacteur VIII par exemple) [102, 151].

a) Principe de la TAP

Parmi les techniques recommandées, la transfusion autologue différée ou programmée (TAP) permet de recueillir en période préopératoire, dans le cadre d'intervention chirurgicale programmée et à haut risque hémorragique, plusieurs concentrés globulaires autologues, en vue de les restituer aux patients en périodes pré et postopératoires. Elle a pour avantage d'éliminer les risques de transmission virale, les conséquences immunologiques de la transfusion homologue et de stimuler l'érythropoïèse pendant la phase périopératoire.

La TAP repose sur le principe selon lequel des prélèvements sanguins itératifs préopératoires, avec une baisse de l'hémoglobine de 1 à 1,5 g/dl après chaque don, peuvent rapidement s'accompagner d'une régénération et d'une restauration de la masse sanguine. L'anémie modérée stimule la sécrétion d'érythropoïétine par le rein, activant la différenciation médullaire des précurseurs des érythrocytes. L'augmentation dans le sang des réticulocytes atteint son maximum le 15^e jour après le début des prélèvements hebdomadaires. Cette technique d'économie de sang, dans des indications et des contre-indications très précises, a ses règles de programmation. Les volumes et les rythmes des prélèvements sanguins sont souvent proposés par habitude, en tenant compte de façon empirique des besoins

transfusionnels des patients et des délais opératoires. Habituellement, il est préconisé deux, trois ou quatre prélèvements de 400 ml en respectant deux, trois ou quatre semaines, ce qui permet de disposer de volumes allant de 800 à 1600 ml. Le volume prélevable dépend de l'hématocrite initial et de la volémie [89].

Les indications des programmes de TAP doivent être réservées à certaines interventions chirurgicales. Il est clairement montré que la TAP est très performante en orthopédie. Ses limites sont uniquement liées aux patients (âge, inaptitude au déplacement, maladies associées). En chirurgie cardiaque, seulement 20 % des patients sont éligibles, ce qui rend leur sélection très dépendante des centres impliqués. Par ailleurs, 20 à 30 % du sang prélevé au cours de programmes de TAP ne sont pas retransfusés, ce qui veut dire que les besoins ont été incorrectement évalués. Les indications de la TAP ne sont pas identiques à celles de la transfusion homologue et la restitution des produits prélevés doit être large, à condition de respecter scrupuleusement les bonnes pratiques transfusionnelles. En effet, la TAP n'est pas exempte de complications (erreurs de groupe, d'étiquetage, distribution défectueuse, infection) [89].

Cependant, parmi les patients participant à un programme de TAP, un certain nombre va devoir interrompre prématurément les prélèvements en raison d'une anémie, et recevoir un complément de sang homologue. Les prélèvements itératifs de sang entraînent une diminution progressive et modérée de l'hémoglobine. Malgré cette diminution, les taux de l'EPO sérique n'augmentent que très modérément et ne s'élèvent pas de façon significative au-dessus des valeurs normales. Le degré de l'anémie induite par les prélèvements et donc l'hypoxie sont insuffisants pour stimuler la production rénale d'EPO [26, 151].

Devant cette constatation, il est donc logique d'envisager l'utilisation de l'érythropoïétine afin de prévenir le développement de l'anémie et de permettre le prélèvement de quantités suffisantes de sang lorsque le délai opératoire est proche [13, 26, 151].

b) Indications de l'EPO

Seul Eprex[®] et Neorecormon[®] peuvent être utilisés pour augmenter les dons de sang autologue chez des malades participant à un programme de transfusions autologues différées.

Aranesp[®] ne possède pas cette indication dans son AMM. L'utilisation dans cette indication doit tenir compte du risque accru d'accidents thromboemboliques.

Le traitement est indiqué chez les malades présentant une anémie modérée (Hb : 10-13 g/dl) et sans carence martiale, s'il n'existe pas ou peu de méthodes d'épargne du sang lorsqu'une intervention chirurgicale programmée importante nécessite de grandes quantités de sang (4 unités de sang ou plus chez les femmes et 5 unités de sang ou plus chez les hommes) [123, 125, 148, 149]. En effet, la grande étude multicentrique de Price, portant sur 204 patients, a confirmé que c'était uniquement dans le groupe de patients dont la concentration initial d'hémoglobine était comprise entre 10 et 13 g/dl, que l'EPO diminuait significativement le risque relatif d'exposition au sang homologue. En revanche, elle s'avère généralement insuffisante pour limiter l'exposition au sang homologue des patients dont l'hémoglobine est inférieure à 10 g/dl et qui ont besoin de plus de 5 ou 6 unités de sang [148, 149].

Selon l'AMM de l'Eporex[®], 600 UI/kg deux fois par semaine pendant trois semaines avant l'intervention sont nécessaires. La voie intraveineuse doit être utilisée et Eprex[®] doit être administrée après la fin du prélèvement de sang. En utilisant cette posologie, il a été possible d'obtenir au moins 4 unités de sang chez 81 % des patients traités par l'époétine- α comparé à 37 % des patients du groupe placebo. L'époétine- α a réduit les risques d'exposition au sang homologue de 50 % par comparaison aux patients ne recevant pas l'époétine- α . Tous les patients traités par époétine- α doivent recevoir une supplémentation en fer appropriée (par exemple, 200 mg/jour de fer élément per os) pendant toute la durée du traitement. La supplémentation en fer devra être commencée le plus tôt possible, voire plusieurs semaines avant le début du prélèvement autologue, afin d'atteindre des réserves en fer importantes avant de commencer le traitement par l'époétine- α [125, 151]

Le schéma thérapeutique proposé dans l'AMM de Neorecormon[®] préconise deux injections par semaine pendant quatre semaines. Lorsque l'hématocrite du malade permet un don de sang (hématocrite \geq 33 %), Neorecormon[®] est administré à la fin du don soit par voie intraveineuse en deux minutes, soit par voie sous-cutanée. Pendant toute la durée du traitement, l'hématocrite ne doit pas dépasser 48 %. La posologie doit être établie pour chaque malade par l'équipe médico-chirurgicale en fonction de la prévision du nombre d'unités autologues nécessaires et de la réserve globulaire endogène :

- Le nombre d'unités autologues nécessaires dépend de la perte sanguine anticipée, de l'emploi de méthodes d'épargne sanguine ainsi que de l'état général du malade. Elle

correspond à la quantité supposée être suffisante pour éviter les transfusions homologues. La quantité requise de sang autologue est exprimée en unités, une unité du nomogramme correspond à 180 ml de globules rouges.

- La capacité du malade à fournir des dons autologues dépend essentiellement du volume sanguin et de l'hématocrite initial. Ces deux paramètres déterminent la réserve globulaire endogène qui peut être calculée d'après la formule suivante :

$$\text{Réserve globulaire endogène} = \text{volume sanguin (ml)} \times (\text{hématocrite} - 33)/100.$$

Chez la femme : volume sanguin (ml) = 41 (ml/kg) × poids (kg) + 1200 (ml).
 Chez l'homme : volume sanguin (ml) = 44 (ml/kg) × poids (kg) + 1600 (ml).
 (Poids corporel ≥ 45 kg.)

Si l'indication du traitement par Neorecormon[®] est posée, les doses unitaires doivent être déterminées en fonction de la quantité nécessaire de sang autologue et de la réserve globulaire endogène à l'aide des graphiques, ci-dessous (Figure 24), disponibles auprès du laboratoire.

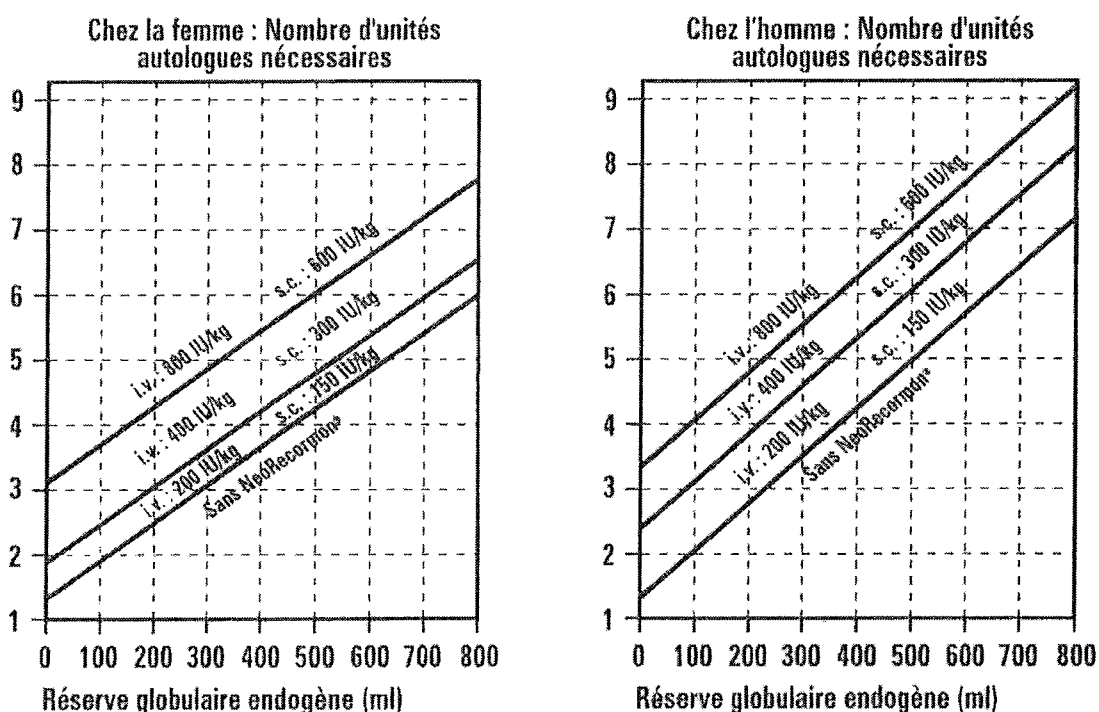


Figure 24 - Calcul de la dose d'époétine-β (IV, SC) au cours d'un programme de TAP selon le sexe [102].

La dose unitaire ainsi déterminée doit être administrée deux fois par semaine pendant quatre semaines. La posologie maximale ne doit pas dépasser 1600 UI/kg/semaine pour la voie intraveineuse, et 1200 UI/kg/semaine pour la voie sous-cutanée [102, 123].

L'association thérapeutique TAP-EPO a véritablement démontré son efficacité. Toutefois, il faut rappeler qu'actuellement 12,5 % des prélèvements de TAP sont excédentaires. Il est donc fondamental de bien cibler les indications de la prescription de l'EPO dans les programmes de TAP et notamment de respecter les conditions de l'AMM quant à l'inclusion des patients dans ce programme [89].

2. EPO et chirurgie orthopédique majeure programmée

a) Indication d'Eporex[®]

L'époétine- α ou Eprex[®] peut être également utilisée en vue d'une diminution du recours transfusionnel chez les patients bénéficiant d'une chirurgie orthopédique majeure programmée. Cette administration s'adresse à des patients présentant une anémie modérée (taux Hb : 10-13 g/dl) qui n'ont pas accès à un programme de prélèvement autologue différé et chez lesquels on s'attend à des pertes de sang modérées (900 à 180 ml).

La voie sous-cutanée doit être choisie dans cette indication. La dose recommandée est de 600 UI/kg une fois par semaine pendant les trois semaines (jours J-21, J-14, J-7) précédant l'intervention chirurgicale et le jour de l'intervention. Dans le cas où la période d'intervention doit être réduite pour des raisons médicales à moins de trois semaines, l'époétine- α doit être administrée à la dose de 300 UI/kg tous les jours, pendant dix jours consécutifs avant l'intervention, le jour de l'intervention et pendant quatre jours suivant l'intervention. Lors du bilan biologique préopératoire, si le taux d'hémoglobine atteint 15 g/dl ou plus, l'administration d'Eporex[®] doit être arrêtée et les doses ultérieures initialement prévues ne doivent pas être administrées.

Il faut s'assurer que les patients ne sont pas déficients en fer à l'instauration du traitement. Tous les patients traités doivent recevoir une supplémentation en fer appropriée (par exemple, 200 mg/jour de fer élément per os) pendant toute la durée du traitement par Eprex[®]. Si possible, la supplémentation en fer devra être commencée avant le traitement pour constituer des réserves en fer suffisantes [125, 148, 149].

Chaque injection d'Eporex[®] augmente en moyenne l'hématocrite de 2 % par semaine. Cependant, la régénération des globules rouges est beaucoup plus importante après la 3^{ème} injection en comparaison avec la 1^{ère} injection. En effet, la fabrication des globules rouges, par l'intermédiaire des réticulocytes, demande un certain temps avant d'obtenir l'efficacité

maximale. Cela explique les résultats de l'étude de Goldberg : même efficacité sur l'hématocrite finale en injectant 2400 UI/kg (600 UI/kg/semaine pendant trois semaines + une le jour de l'intervention) *versus* 4500 UI/kg (300 UI/kg/jour pendant 15 jours), à condition de commencer beaucoup plus tôt [148, 149].

L'efficacité croît exponentiellement avec la durée du traitement, si bien qu'une dose totale deux fois moins élevée mais administrée sur quatre semaines est aussi efficace qu'une dose double mais seulement administrée sur les deux dernières semaines. Il faut donc commencer le traitement le plus tôt possible avant l'intervention [148, 149].

b) Précautions d'emploi

Chez les patients devant bénéficier d'une intervention chirurgicale orthopédique majeure programmée, la cause de l'anémie doit être établie et traitée, si possible, avant l'instauration du traitement par l'époétine- α .

Lorsque l'on administre l'EPO en dehors d'un programme de TAP, cela implique que le but recherché est une augmentation de l'hémoglobine avant l'intervention, donc une polyglobulie réelle ou relative. La question qui se pose concerne alors le risque d'hypertension artérielle et de thrombose veineuse profonde, risques qui avaient été très bien authentifiés lors du traitement des insuffisants rénaux chroniques traités [148, 149]. En effet, les événements thromboemboliques peuvent être un risque éventuel dans cette population et cette éventualité doit être soigneusement évaluée en fonction du bénéfice du traitement attendu. Une prophylaxie antithrombotique appropriée doit être administrée, dans la mesure où des événements thromboemboliques peuvent survenir, particulièrement chez ceux ayant une pathologie cardio-vasculaire sous-jacente.

De plus, des précautions particulières doivent être prises chez les patients risquant de développer des thromboses veineuses profondes.

A ce jour, il n'est pas ressorti des études concernant l'administration d'EPO en préopératoire, que ce traitement majorait le risque de survenue de ces effets indésirables. Il faut néanmoins retenir que ces études concernaient généralement des actes chirurgicaux où le saignement prévisible était modéré (2-2,5 l). L'objectif pour l'hématocrite préopératoire était de l'ordre de 45 % [148, 149].

Enfin, chez les patients ayant un taux initial d'hémoglobine supérieure à 13 g/dl, la possibilité que le traitement par époétine- α soit associé à un risque accru d'événements

thromboemboliques postopératoires, ne peut être exclue. En conséquence, Eprex[®] ne doit pas être utilisé chez les patients qui ont un taux d'hémoglobine initial supérieur à 13 g/dl [125].

c) Coût de l'EPO

Le prix de l'EPO dans cette indication n'a plus rien à voir avec le prix de l'EPO pour un programme de TAP. En effet, en périchirurgie, seules 2 ou peut-être 3 injections (en fonction de l'hémoglobine du patient) seront nécessaires pour obtenir un hémocrite à 45 %, alors que l'AMM ancienne associée à un programme de TAP repose sur 2 injections par semaine, donc le double. En considérant que le patient qui aura reçu de l'EPO en périchirurgie n'aura plus besoin de transfusion, 2 à 3 injections ne seront pas beaucoup plus chères qu'un programme de TAP, en évitant les déplacements du patient, les examens sérologiques, et les risques transfusionnels de la transfusion autologue (erreurs d'attribution, infections). Les trois injections faites à domicile sont prises en charge par la caisse maladie du patient, seule l'injection de J-1 est à la charge de l'établissement de soins. Cependant, la seule façon d'optimiser le bénéfice/coût de cette technique est de s'adapter à chaque patient en fonction de son saignement prévisible et de son hémocrite en consultation préopératoire. Cette stratégie transfusionnelle demande aussi de connaître quelle est la production de globules rouges en fonction des techniques d'épargne sanguine homologe et du délai préopératoire.

Chez les patients modérément anémiques, la transfusion autologue programmée est moins efficace que l'érythropoïétine pour permettre une réserve préopératoire de globules rouges. En effet, la possibilité de prélever du sang chez un patient modérément anémique est limitée. Non seulement l'EPO diminue les risques transfusionnels (autologue et homologe) mais améliore probablement la qualité de vie des patients. Cependant, toute technique a ses propres risques et contraintes et doit s'intégrer dans une vraie stratégie transfusionnelle. L'EPO est donc destinée à prendre une place croissante dans cette stratégie [148, 149].

D. En néonatalogie : prévention de l'anémie du nouveau-né prématuré

1. Introduction

Chez le nouveau-né, il existe une anémie dite physiologique atteignant un maximum vers un mois de vie. Elle est liée aux changements importants qui surviennent en période néonatale :

- l'oxygénation des tissus devient dépendante de ses poumons et non du placenta ,
- l'hémoglobine fœtale va progressivement être remplacée par l'hémoglobine adulte,
- le lieu de synthèse de l'EPO passe du foie au rein.

Cela aboutit à une baisse de l'hémoglobine avec ensuite stimulation de la synthèse d'érythropoïétine et augmentation du nombre de réticulocytes pour compenser l'anémie [154].

Chez les nouveau-nés prématurés, cette anémie est plus sévère avec souvent nécessité de transfusions. En France, environ 50 à 60 % des enfants prématurés d'âge gestationnel inférieur à 32 semaines d'aménorrhée et/ou poids inférieur à 1500 g sont transfusés au moins une fois pendant la durée de leur hospitalisation néonatale [6] et ce pour plusieurs raisons. Dans les premières semaines de vie, l'anémie observée chez le prématuré est principalement due aux saignements périnataux (délivrance, hématome) et aux nombreux prélèvements sanguins effectués à des fins diagnostiques. Malgré l'utilisation de micro-méthodes, les prélèvements répétés de sang pour les examens de laboratoire peuvent représenter en quelques jours plus de 10 % du volume sanguin, voire la totalité du volume sanguin chez les prématurés de très petit poids au cours des premières semaines de vie [102, 154]. Un autre mécanisme important dans la genèse de l'anémie post-natale du prématuré est la croissance rapide du compartiment vasculaire, en parallèle direct avec la croissance pondérale, alors que l'érythropoïèse n'arrive pas à assurer le remplissage de ce compartiment [13].

Pendant de nombreuses années, la seule thérapeutique disponible était la transfusion sanguine, avec le plus souvent des transfusions multiples, de donneurs différents ; cette pratique a été fortement remise en question avec l'émergence des risques de transmission d'agents infectieux au cours des années 1980. De ce fait, l'émergence de l'érythropoïétine recombinante à partir de 1985, a été jugée très intéressante comme traitement préventif de l'anémie secondaire du prématuré [146].

2. Efficacité de l'EPO

L'EPO est utilisée chez l'adulte et l'enfant pour le traitement étiologique de l'anémie de l'insuffisance rénale. Dans cette population, la cause principale de l'anémie est un déficit relatif ou absolu en érythropoïétine. L'anémie du prématuré est également une anémie hyporégénérative, caractérisée par un nombre de réticulocytes bas et une réponse inappropriée de la production d'EPO, aboutissant souvent à la nécessité de transfuser. Les prématurés présentent des taux d'EPO sérique inférieurs à ceux de l'adulte, pour une valeur d'hémoglobine identique ou plus basse. Par contre les précurseurs érythrocytaires du prématuré anémique peuvent répondre, *in vitro*, à la stimulation par l'EPO de la même manière que ceux de l'adulte et des nouveau-nés à terme. Le but du traitement des prématurés par EPO est de prévenir le développement d'une anémie symptomatique au cours des premières semaines de vie, mettant en cause le risque vital, tout en supprimant les transfusions et leurs risques associés, et en améliorant la qualité de vie de ces patients [102, 154].

Seuls les nouveau-nés non encore transfusés bénéficient au mieux du traitement par l'époétine- β (Neorecormon[®]) qui est le seul ASE possédant l'AMM pour cette indication. L'administration se fait par voie sous-cutanée (plus efficace que la voie intraveineuse [146, 154]) à la posologie de 250 UI/kg, trois fois par semaine. Il est recommandé d'instaurer le traitement aussitôt que possible, de préférence avant le 3^e jour de vie, le traitement devant durer en principe six semaines. Dans la plupart des cas, on observe une chute du fer. En conséquence, une supplémentation martiale *per os* doit être effectuée dès que possible (au plus tard au 14^e jour de vie), soit 2 mg de fer *per os* et par jour [123, 151, 154].

Enfin, l'effet de l'EPO étant décalé de plusieurs semaines, la prévention de l'anémie du prématuré est utilement renforcée par des méthodes complémentaires (*Figure 25*), dans le but également de limiter le besoin transfusionnel précoce : clampage retardé du cordon ombilical, diminution des pertes sanguines dues aux prélèvements à des fins diagnostiques par l'utilisation de micro-méthodes de laboratoire et l'augmentation des méthodes de surveillance transcutanée, et administration optimale de nutriments pour améliorer la croissance et l'hématopoïèse [6, 102, 146].

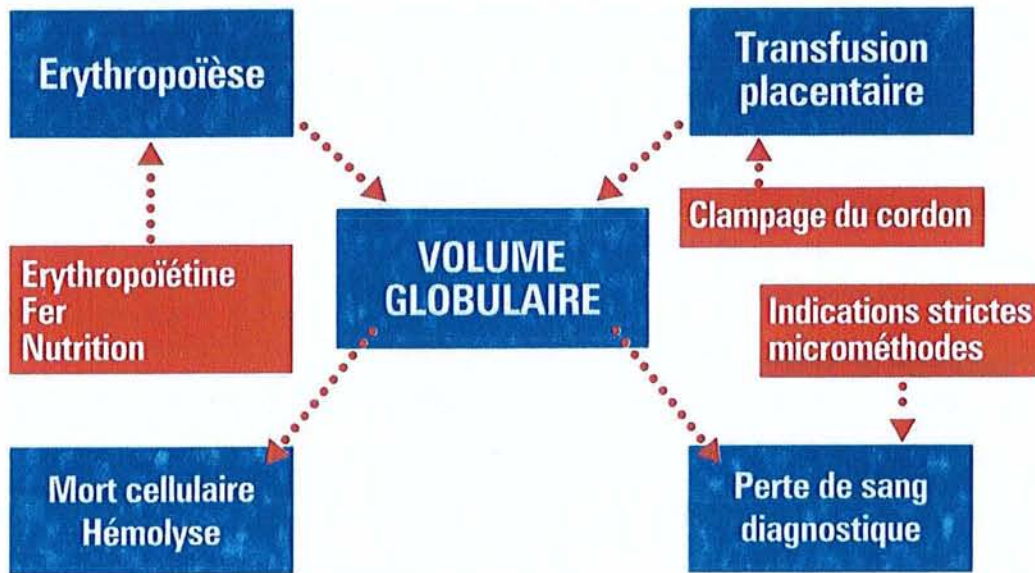


Figure 25 - Mesures à prendre pour augmenter le volume globulaire des hématies et diminuer l'anémie des nouveau-nés prématurés [102].

II. Indications médicales en développement

Disponible depuis 1985, l'érythropoïétine humaine recombinante représente le traitement étiologique de l'anémie de l'insuffisance rénale, réduit les besoins transfusionnels du prématuré, participe au traitement de l'anémie des cancers et joue un rôle de plus en plus important dans les stratégies transfusionnelles.

Cependant, ses effets ne se limitent pas aux organes hématopoïétiques. En effet, de même que ses sites de productions ne sont pas univoques, de même ses récepteurs sont présents sur de nombreux organes et en particulier le cerveau, l'intestin, le cœur et le tissu endothélial. La mise en évidence de ces faits pourrait conférer à l'érythropoïétine un intérêt dans la protection de ces organes [121].

A. EPO et neuroprotection

Après stimulation hypoxique, l'EPO est synthétisée dans le foie fœtal puis, après la naissance, par le rein, et également dans d'autres sites en particulier l'utérus et le cerveau. On a longtemps cru qu'elle n'exerçait son action que sur le système hématopoïétique. La multiplication des études entreprises depuis la synthèse par génie génétique de l'EPO et de son récepteur (EPO-R) a permis de se rendre compte que l'érythropoïétine est aussi un facteur trophique doué de multiples propriétés [121].

1. EPO et son récepteur EPO-R

Comme nous l'avions déjà mentionné au chapitre sur le récepteur à l'EPO, initialement, ces récepteurs n'étaient connus que sur les précurseurs érythrocytaires de la moelle osseuse. On les a ultérieurement localisés sur de nombreux types cellulaires non hématopoïétiques : cellules endothéliales, entérocytes, cellules de Leydig du testicule et enfin sur les neurones aminergiques et cholinergiques et sur les astrocytes.

L'EPO et son récepteur sont présents dans le cerveau en développement. Il est suggéré dans des études récentes que les astrocytes sont les principaux producteurs d'EPO dans le cerveau et que les sites de liaison de l'EPO sont situés dans diverses zones du cerveau, incluant le cortex, l'hippocampe et le cervelet [32]. L'EPO est présente dans le liquide céphalorachidien (LCR) des prématurés et des enfants à terme ; sa quantité semble diminuer avec l'âge aboutissant à des concentrations faibles chez l'adulte. La présence d'EPO et d'EPO-R dans le cerveau en développement et sa persistance à un degré moindre à l'âge adulte suggèrent un rôle au cours du développement cérébral et éventuellement dans l'homéostasie cérébrale. L'hypoxie paraît être le facteur stimulant de la synthèse d'EPO cérébrale semblant agir comme dans le rein, par le biais de l'« Hypoxia inductible factor-1 » (HIF-1) [121].

2. Études sur culture cellulaire

Les récepteurs à l'EPO ont été identifiés dans des cultures de cellules animales et humaines incluant neurones et astrocytes. Les expériences menées prouvent que l'EPO peut être un agent neuroprotecteur : l'EPO ajoutée au moment de la lésion cérébrale à des neurones en cultures exposés à l'hypoxie les protège partiellement. La mort neuronale induite par le glutamate est évitée si l'on prétraite à l'EPO. Campana et al. ont identifié une séquence de 17 acides aminés sur la molécule d'EPO qui a une activité neurotrophique *in vitro* et *in vivo* mais pas d'activité érythropoïétique. Ainsi diverses portions de la molécule d'EPO pourraient avoir des fonctions différentes [22, 121].

3. Études animales

Dans le cerveau de souris et de singes, l'induction d'une hypoxie par le monoxyde de carbone à 0,1 % provoque une augmentation jusqu'à 20 fois de l'ARN messager de l'EPO, dépendant de la sévérité du stimulus hypoxique [116]. Les études sur le cerveau adulte lésé chez la souris, le rat et le mouton ont montré le rôle protecteur de la molécule dans l'ischémie focale

et globale, dans la toxicité due au glutamate, dans l'encéphalomyélite auto-immune et dans la genèse de convulsions par l'acide kaïnique. Une injection intraventriculaire d'EPO préalable limite l'ischémie corticale et améliore la survie neuronale. De plus, l'EPO-R soluble administré pour neutraliser l'EPO exacerbe les dommages ischémiques tissulaires, confirmant le rôle neuroprotecteur de l'EPO endogène dans le SNC [19, 121].

Certaines études ne révèlent pas de corrélation entre les concentrations d'EPO dans le plasma et le LCR, faisant penser que l'EPO ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique aux doses couramment utilisées pour l'érythropoïèse (200 à 400 UI/kg/dose) [121]. Ce qui confirme l'idée communément admise que la barrière hémato-encéphalique (BHE) prévient du passage de molécules glycosylées, telles que l'EPO, de la circulation périphérique vers le SNC. Néanmoins, des études récentes ont établi que quelques grosses molécules peuvent être transportées au travers de la BHE par liaison à des récepteurs sur la surface luminale des cellules endothéliales initiant l'endocytose, conduisant en fin de compte à une translocation au travers de la BHE. Ainsi il est suggéré que l'administration périphérique d'Epex[®] à doses suprapharmacologiques (2000 à 5000 UI/kg/dose) peut traverser la barrière hémato-encéphalique et exercer un effet neuroprotecteur contre les lésions cérébrales [19].

4. Mécanismes possibles

Marti et al. rapportent plusieurs mécanismes possibles pour expliquer l'effet neuroprotecteur de l'EPO. Certains points ont déjà été abordés dans les précédents chapitres, mais il est bon de les rappeler ici [116, 121] :

a) Effets neuroprotecteurs directs

Comme effets neuroprotecteurs directs, l'EPO supprime l'apoptose des cellules neuronales soit en maintenant l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-E ou Bcl-X_L, soit en inactivant les capsases, protéines impliquées dans le processus d'apoptose. De plus, l'EPO augmente le taux de calcium intracellulaire des cellules neuronales, augmentant ainsi la production d'oxyde nitrique, inhibiteur du fonctionnement des capsases. En outre, l'EPO inhibe la libération et augmente la recapture du glutamate, ou désensibilise des récepteurs au glutamate, et prévient ainsi la neurotoxicité induite par le glutamate. Le transport du glutamate aux récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) induit un énorme flux calcique et un apport d'eau provoquant un dysfonctionnement mitochondrial, un excès de radicaux libres, un

gonflement et la mort des cellules neuronales. Enfin, l'EPO exerce un rétrocontrôle positif sur les enzymes qui consomment les radicaux oxygénés et un rétrocontrôle négatif sur les enzymes qui épuisent de grandes quantités d'adénosine triphosphate (ATP) comme par exemple la polyadénosine ribose polymérase (PARP).

b) Effets neuroprotecteurs indirects

Comme effets neuroprotecteurs indirects, la production d'EPO, résultant de l'hypoxie ou de l'ischémie, peut stimuler l'angiogenèse au niveau cérébral, accroissant ainsi l'oxygénation tissulaire. De plus, l'EPO peut prévenir l'apoptose en activant le système VEGF/Récepteur au VEGF. Le VEGF est un régulateur spécifique de la croissance et de la différenciation des cellules endothéliales. Il est aussi un facteur majeur de l'angiogenèse. Il est exprimé dans le cerveau adulte normal et son expression est induite lors de l'ischémie cérébrale.

5. Études humaines

a) En cancérologie

O'Shaughnessy et al. ont réalisé une étude pilote, randomisée, en double aveugle, versus placebo, chez 100 patientes anémiées, atteintes d'un cancer du sein stade I-III et recevant une chimiothérapie adjuvante contenant une anthracycline ou une chimiothérapie néoadjuvante, dont l'objectif était le maintien du taux d'hémoglobine entre 12 et 14 g/dl. 51 patients ont reçu 40.000 UI d'Epex[®] en injection hebdomadaire sous-cutanée et 49 patientes ont reçu un placebo.

Il a été observé une augmentation statistiquement significative du taux d'hémoglobine en fin d'étude à 13,6 g/dl dans le groupe Epex[®] versus une diminution à 10,9 g/dl dans le groupe placebo. Il a été également observé une moindre diminution des scores de qualité de vie FACT-An (*Functional Assessment of cancer Therapy-anemia*) et LASA (*Linear Analog Self-Assessment*), suggérant moins d'atteintes de la qualité de vie dans le groupe Epex[®].

Par ailleurs, les effets d'Epex[®] versus placebo sur l'atteinte des fonctions cognitives liée à la chimiothérapie ont été évalués avec les tests CLOX 1 et 2 (*Clock Drawing Task*) et le test EXIT 25 (*Executive Interview*). Les tests CLOX ont été insuffisamment sensibles dans la mesure des troubles cognitifs dans ce contexte. Pour le test EXIT 25, il a été observé une diminution moyenne du score de -1,3 dans le groupe Epex[®] entre les valeurs basales et les

valeurs avant le 4^{ème} cycle de chimiothérapie, suggérant une amélioration du contrôle des fonctions exécutives (une valeur négative démontre une amélioration), alors que ce score était augmenté de +0,3 dans le groupe placebo.

Ces données préliminaires sont à confirmer avec les données collectées six mois après la fin de la chimiothérapie et en cours d'analyse. [133]

b) En hématologie

Tesch et al. ont réalisé une étude ouverte, prospective et multicentrique chez 383 patients anémiés ($Hb \leq 12$ g/dl) atteints de lymphomes non hodgkiniens, de myélomes multiples, de maladie de Hodgkin et de leucémies lymphocytiques chroniques et recevant une chimiothérapie. Tous les patients avaient une atteinte des fonctions cognitives par rapport à des volontaires sains de même âge. Les patients ont reçu Eprex[®] à la posologie de 40.000 UI en une fois par semaine, la posologie étant ensuite ajustée pour maintenir un taux d'hémoglobine entre 11,5 et 13 g/dl. Les résultats préliminaires ont montré une amélioration des fonctions cognitives, associée à l'augmentation du taux d'hémoglobine, passant de 10,5 g/dl en début d'étude à environ 12 g/dl à partir de la 8^{ème}-12^{ème} semaine de traitement et se poursuivant jusqu'à la 24^{ème} semaine [181].

c) En néphrologie

La majorité des études sur l'anémie chez les insuffisants rénaux tendent à montrer que la correction de celle-ci par l'érythropoïétine humaine recombinante permet d'améliorer les fonctions cognitives [163, 173].

Alors que l'on croyait l'urémie seule responsable des troubles des fonctions supérieures chez les sujets insuffisants rénaux, il s'avère maintenant que l'anémie y participe également. En effet, de nombreux auteurs ont montré une amélioration des tests cognitifs avec l'augmentation du taux d'hématocrite, contribuant ainsi à améliorer la qualité de vie des patients.

Divers stratégies de neuroprotection sont très étudiées chez l'homme, qu'il s'agisse de molécules comme le sulfate de magnésium, les calcibloquants, l'allopurinol ou d'une mesure physique comme l'hypothermie dans l'asphyxie périnatale. Pour l'EPO ces études sont délicates car les doses élevées nécessaires pour la faire parvenir jusque dans le cerveau

pourraient exercer des effets systémiques autres. Des études de phase I sont en cours chez l'adulte et le nouveau-né. Chez l'adulte, l'étude dite de Göttingen est un essai randomisé en double aveugle contrôlé qui cherche à évaluer les effets de doses élevées d'EPO sur l'infarctus cérébral dû à l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne. Les résultats sont encourageants lors de l'étude préliminaire. Des essais se préparent également chez des patients atteints de rétinite pigmentaire. En néonatalogie, le NIH a initié une étude de phase I utilisant de fortes doses d'EPO (4000 UI/kg/injection) chez des nouveau-nés ayant une asphyxie périnatale, au cours d'une fenêtre thérapeutique de quelques heures après l'agression. Les injections seront limitées à une ou deux, ce qui rend très improbable un effet érythropoïétique. Par ailleurs, les études se poursuivent chez l'animal afin d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de l'EPO dans des modèles néonataux d'hypoxie et d'ischémie, chez les rongeurs et les primates non humains [121].

B. L'EPO comme facteur trophique pour l'intestin

Les facteurs de croissance du tube digestif sont très nombreux. Citons l'*Epidermal growth factor* (EGF), les *Insulin-like growth factor* (IGF-I et II), le *Transforming growth factor* (TGF), l'EPO et le G-CSF. Plusieurs sont contenus dans le liquide amniotique et le lait maternel. Près du terme, le fœtus déglutit jusqu'à 200 ml/kg de liquide amniotique par 24 heures et met donc son tube digestif en relation avec ces facteurs. Il en est de même du nouveau-né et du nourrisson qui sont allaités par leur mère. Les concentrations d'EPO dans le liquide amniotique et le lait maternel sont proches : environ 9 mU/ml dans le liquide amniotique avant terme et 11,7 mU/ml dans le lait maternel mature [21].

1. Rôle de l'érythropoïétine au cours du développement fœtal et dans les premières semaines de vie post-natale

Le fait d'empêcher des fœtus de lapin de déglutir le liquide amniotique, inhibe le développement de l'estomac et de sa sécrétion acide. Quand un volume équivalent de *Ringer Lactate* est avalé, le même résultat est observé. Ce n'est donc pas le volume de liquide amniotique qui est important mais sa nature et son contenu, éventuellement en facteur de croissance. La ligature de l'œsophage du fœtus de lapin diminue de façon significative le poids du tube digestif. Des résultats analogues ont été enregistrés pour les fœtus de mouton. Les études faites sur des fœtus humains après interruption médicale de grossesse et chez des

nouveau-nés ont montré que les cryptes intestinales ne sont pas identifiables chez les nouveau-nés ayant des anomalies congénitales du tube digestif. De plus, la hauteur des villosités est très réduite. Par ailleurs, il est connu qu'une atrophie villositaire s'installe rapidement en l'absence d'alimentation entérale. C'est pourquoi on conseille d'administrer de faibles quantités de lait de mère (20 ml/24 h) aux nouveau-nés ne pouvant tolérer une alimentation complète [121].

On a un certain nombre de connaissances en ce qui concerne l'effet des cytokines sur le développement du tube digestif. Il en est ainsi de l'EGF, de l'IGF, de nombreuses interleukines et du TGF. Qu'en est-il pour l'EPO ?

2. L'EPO en tant que facteur trophique

Des récepteurs à l'EPO sont présents dans les cellules muqueuses de l'intestin fœtal et néonatal et la liaison spécifique de l'EPO à son récepteur a été documentée dans les cellules muqueuses de l'estomac chez le rat. La stimulation d'entérocytes en culture avec de l'EPO entraîne une augmentation de la migration cellulaire et une diminution des morts cellulaires après exposition à des cytokines toxiques. Les récepteurs présents sur le tube digestif paraissent fonctionnels et le ligand est disponible. Pour pouvoir être absorbée, l'EPO doit en premier lieu résister à la dégradation gastrique acide. Kling et al. ont pu démontrer que l'EPO provenant du lait maternel peut rester intacte dans des environnements comparables à celui réalisé par l'intestin grêle en résistant à la digestion protéolytique. Des essais d'utilisation de l'EPO per os à visée érythropoïétique ont été tentés, sans grands résultats. Néanmoins, une absorption modérée a pu être constatée. Des études complémentaires sont nécessaires [121].

Une étude a été menée chez des rats de 5 jours nourris pendant une semaine avec un substitut de lait contenant du sérum physiologique ou des doses modérées d'EPO (200 UI/kg/j) ou des doses plus élevées (1000 UI/kg/j). Les animaux recevant des substituts de lait contenant de l'EPO ont des villosités intestinales plus longues et de densité plus importante par mm³ d'intestin que les contrôles [91].

Ledbetter et Juul ont montré que les prématurés recevant de l'EPO pour prévention de l'anémie ont une incidence diminuée d'entérococolite ulcéronécrosante par rapport aux enfants non traités [109].

L'EPO stimule la migration et diminue la mort cellulaire des entérocytes et, donnée par voie entérale, augmente la longueur et la surface des villosités intestinales. Au total, des récepteurs

fonctionnels à l'EPO sont présents dans l'intestin humain fœtal et post-natal. L'EPO pourrait donc avoir des effets bénéfiques sur le tube digestif lésé en favorisant sa restauration [121].

3. Applications pratiques

Une équipe américaine a mis au point une solution substitut de liquide amniotique pour administration entérale. Cette solution contient de l'EPO et du G-CSF. Deux essais cliniques ont jusqu'à présent été menés. Le premier a consisté à administrer cette solution à des prématurés entre 750 et 1250 g pendant leurs trois premiers jours de vie : la conclusion est qu'elle est bien tolérée jusqu'au moins 20 ml/kg/j [177]. La deuxième étude consiste à apporter la même solution à des enfants convalescents d'une entérocolite nécrosante. Là encore, son administration a été bien tolérée chez ces enfants. Des études de phase 2 et 3 pourraient maintenant commencer afin d'apprécier l'innocuité, l'efficacité et le rapport bénéfice-risque pour améliorer la tolérance digestive chez les nouveau-nés prématurés [73].

Au total, la présence dans le liquide amniotique et le lait de mère de ces facteurs et la mise en évidence de récepteurs fonctionnels dans le tube digestif du fœtus et du nouveau-né n'est pas un simple concours de circonstances. Le lait maternel paraît être le relais physiologique du liquide amniotique pour apporter des facteurs de croissance au nouveau-né permettant son adaptation gastro-intestinale post-natale. La présence de ces facteurs de croissance est un argument de plus en faveur de l'alimentation maternelle et ne devrait pas laisser indifférents les fabricants de lait artificiel [121].

C. EPO et cancer chez l'enfant

L'anémie touche environ 80 % des enfants atteints de cancer, avec une incidence annuelle d'environ 150 nouveaux cas par million d'enfants diagnostiqués chaque année. Alors que la leucopénie et la thrombopénie sont des préoccupations majeures en raison du risque vital qu'elles induisent, l'anémie est considérée comme une moindre complication. Malgré sa menace sur le pronostic vital, l'anémie est souvent minimisée dans son impact physique, psychologique et social chez l'enfant. Le traitement principal actuel de l'anémie chez l'enfant atteint de cancer reste la transfusion de culots de globules rouges pour des taux d'hémoglobine souvent très bas. Cette pratique n'est pas dénuée de risques infectieux ou hémolytiques [82].

L'anémie liée aux cancers de l'enfant ne diffère pas énormément de celle du patient adulte. Elle est normochrome, normocytaire et hyporégénérative, plus rarement hypochrome, microcytaire, et ses causes sont multiples. La première cause de diminution de l'érythropoïèse est l'infiltrat de la moelle osseuse par des cellules leucémiques ou des métastases de tumeurs solides. Ainsi, l'anémie est très fréquemment présente lors du diagnostic initial.

Un autre élément que l'on retrouve également chez l'adulte cancéreux est l'action des cytokines pro-inflammatoires. Nous avons déjà abordé ce sujet à deux reprises dans le chapitre sur les résistances à l'EPO et dans celui sur les indications en oncologie ayant reçu une AMM.

D'autres facteurs interviennent également dans le mécanisme physiopathologique de l'anémie chez le sujet atteint de cancer : les traitements anticancéreux, certains virus dont le Parvovirus B19, l'hyperhémolyse extracorporelle et enfin les carences en facteurs nutritionnels nécessaires au métabolisme érythrocytaire [60, 82].

Contrairement à l'adulte chez qui il a été mis en évidence une production inappropriée d'EPO en réponse à la diminution du taux d'hémoglobine, avec une augmentation de la production moins marquée que ne le voudrait le degré de l'anémie, chez l'enfant atteint de cancer, il existe une augmentation significative de la production d'EPO, soit une réponse adéquate du mécanisme de feedback de l'érythropoïèse. Cela a été décrit sur de faibles cohortes de patients [82].

De nombreuses études depuis 1990 ont démontré l'efficacité et la bonne tolérance du traitement par EPO chez l'adulte atteint de cancer, permettant une diminution du nombre de transfusions sanguines et une nette amélioration de la qualité de vie des patients. Selon la mise à jour de 2003 des standards, options et recommandations de la fédération nationale de lutte contre le cancer pour l'utilisation de l'EPO en cancérologie, il n'existe pas d'attitude consensuelle en pédiatrie. Cette prescription n'est pas prévue par l'AMM [68, 69]. Pourtant l'EPO a fait la preuve de son efficacité et son utilisation peut être considérée au cas par cas, particulièrement lorsqu'il existe une contre-indication relative ou absolue à la transfusion sanguine (facteurs culturels ou religieux, groupes sanguins exceptionnels, patients immunisés, etc...). En effet, même si les études publiées ne concernent que des cohortes de patients de faible effectif, l'usage de l'EPO a montré des résultats encourageants chez l'enfant cancéreux avec une diminution du nombre de transfusions sanguines et l'absence d'effets indésirables notables [82, 141, 201, 202].

En revanche, chez l'enfant, aucune étude n'a à ce jour réellement pris en considération cette notion primordiale de qualité de vie. Toutefois, une amélioration de l'index de Karnofsky (échelle évaluant l'activité et les gestes de la vie quotidienne chez les sujets atteints de pathologies chroniques) a été noté par Léon et al., ainsi qu'un bénéfice sur l'état nutritionnel avec une stabilité du poids durant le traitement [82, 141].

Le traitement par EPO chez l'enfant atteint de cancer apparaît donc comme une option thérapeutique à envisager et semble doué d'innocuité. En effet, dans l'ensemble, seuls des effets indésirables mineurs ont été rapportés. Toutefois certains points restent à étudier :

- le choix de la voie d'administration, IV ou SC,
- les modalités de prescriptions,
- l'étude de la qualité de vie chez l'enfant,
- l'intérêt de la supplémentation en fer en complément du traitement par EPO,
- le choix de la molécule.

La réalisation d'études pédiatriques multicentriques cherchant à répondre à ces objectifs s'avère nécessaire afin de faire du traitement par EPO l'un des défis de l'oncologie pédiatrique dans un futur proche, dans le souci d'optimiser la prise en charge hématologique et psychosociale de nos jeunes patients [46, 82].

D. EPO et radiothérapie

En octobre 2003, paraissait dans Lancet un article qui allait faire grand bruit dans le domaine de l'oncologie radiothérapie. Depuis 50 ans les radiothérapeutes travaillent sur le concept de l'effet oxygène, qui correspond à la diminution de l'effet biologique observé avec les rayonnements à faible transfert d'énergie linéique (TEL) utilisés en routine clinique lorsque les cellules irradiées sont exposées à une faible concentration en oxygène (< 10 mmHg). Pour contrer cet effet, de très nombreux essais cliniques ont été menés entre 1960 et 1990, mélangeant des études sur la correction de la concentration d'hémoglobine circulante, l'augmentation de la concentration en O₂ dans les tissus ou l'utilisation de molécules radiomimétiques, simulant la présence d'oxygène dans les tissus [45, 67, 107]. Une méta-analyse publiée par J. Overgaard a permis de démontrer que, même si l'effet individuel de ces études restait faible, la compilation des résultats obtenus confirmait l'obtention d'un bénéfice au moins de contrôle local dans les tumeurs de la tête et du cou. Bien sûr, les limites à

l'utilisation de ces procédés étaient nombreuses et connues : risques transfusionnels, intolérance à l'oxygène hyperbare ou impossibilité à obtenir des concentrations suffisantes de radiosensibilisateur sans toxicité pour le patient. L'ensemble de ces arguments faisait que la lutte contre l'hypoxie tissulaire n'entraînait plus l'adhésion des chercheurs cliniciens au début des années 1990, en plein essor de la chimioradiothérapie [45, 107].

L'arrivée des érythropoïétines au début des années 1990 a relancé le débat : des molécules « propres » sans risque transfusionnel, ayant le soutien de laboratoires pharmaceutiques puissants, permettant d'augmenter rapidement la concentration d'hémoglobine chez nos patients cancéreux, comme elles l'avaient fait chez les insuffisants rénaux. Pendant les premières années de leur développement en oncologie, ces molécules sont restées du domaine de la qualité de vie (fatigue et anémie) avant que les principaux laboratoires ne se décident à investir le champ de la thérapeutique anticancéreuse après de longues et amicales pressions de la part des cliniciens. La question clé avant d'entreprendre d'éventuelles études cliniques était de s'assurer de la corrélation entre la correction de la concentration d'hémoglobine circulante et la concentration intratumorale (intratumorale) en oxygène. Cette corrélation, non mise en évidence dans les modèles tumoraux animaux, n'était pas aussi évidente qu'il y paraissait. Connue depuis plus d'un siècle, la dissociation active du couple O₂-hémoglobine en fonction des variations de pO₂ entre le sang et les tissus sains n'avait jamais été démontrée en clinique humaine. D'autres inconnues persistaient (présence ou pas de récepteurs aux EPO sur les cellules cancéreuses...). En revanche, bien que, chez des patients atteints de cancer, il ait été démontré l'absence de corrélation inverse entre la concentration d'hémoglobine circulante et la réponse endogène à la sécrétion d'EPO, il a été observé chez ces mêmes patients des réponses à des injections d'EPO exogène. Toute tumeur solide s'adapte à son environnement et notamment à une hypoxie en partie liée aux troubles de la vascularisation tumorale et à la faible consommation tissulaire en oxygène. De plus, les très fortes pressions interstitielles, caractéristiques du tissu tumoral, limitent aussi les phénomènes d'échanges entre l'environnement tumoral et les cellules cancéreuses. L'anémie découverte au moment du diagnostic de cancer aurait un rôle pronostique dans différents types de tumeurs solides (cancers du poumon, du col utérin, de la prostate, tumeurs de la tête et du cou), avec respectivement une augmentation de risque de décès de 19, 56, 47 et 75 %. Le bénéfice attendu de la correction de l'anémie pouvait être important compte-tenu de la chimio et de la radiosensibilisation théorique espérée, à condition seulement que cette correction de la

concentration d'hémoglobine circulante s'accompagne d'une augmentation de l'oxygénation tumorale [45, 107].

Dans cet environnement, Henke et al. ont publié leur étude en octobre 2003. Trois cent cinquante et un patients avaient été inclus, 171 traités par placebo et 180 par EPO. Tous les patients étaient atteints de tumeurs ORL traités par irradiation exclusive ou postopératoire. La concentration médiane d'hémoglobine à l'inclusion était de 11,8 g/dl dans les deux groupes avec une stratification prévue au départ (type 0 : radiothérapie postopératoire avec résection complète R0, type 1 : radiothérapie postopératoire avec résection incomplète R1 et R2, type 3 : radiothérapie exclusive). La dose d'époétine- β était de 300 UI/kg trois fois par semaine avec administration concomitante de fer par voie intraveineuse. Dans le bras expérimental (EPO), 64 % des tumeurs ont progressé contre 54 % dans le bras placebo avec un risque relatif de progression de 1,69 et un risque relatif de décès de 1,22 [11, 45, 67, 107]. Cette différence était surtout nette pour les patients en situation de résection incomplète ou traités par irradiation exclusive. Même si les taux de contrôle local dans le bras placebo semblent très faibles, cette étude doit être considérée comme valide et pose un certain nombre de questions. L'injection intraveineuse de fer représente un risque d'activation tumorale connu pour les tumeurs hématopoïétiques, mais non démontré sur les carcinomes. La question essentielle est l'éventualité d'un effet activateur de l'érythropoïétine sur les cellules cancéreuses. Considérée comme improbable, la présence de récepteurs membranaires actifs à la surface de cellules cancéreuses a été mise en évidence en 2003 dans de nombreux types de cancer (sein, prostate, col utérin, poumon). L'expression d'EPO et de son récepteur semble assez spécifique des cellules cancéreuses (notamment dans les cancers du sein et du col utérin) et pourrait faire partie intégrante du processus de transformation maligne. *In vitro*, la fixation de l'EPO à son récepteur sur les cellules cancéreuses (dont l'expression est favorisée par l'hypoxie) induit une cascade activatrice de la prolifération cellulaire contribuant à la survie des tumeurs solides en condition d'hypoxie. Le blocage des récepteurs à l'EPO par des antagonistes semble inhiber la néoangiogenèse et la survie des cellules tumorales. A l'échelle d'un individu atteint d'une tumeur solide, la signification de la présence de récepteur membranaire à l'EPO est inconnue tant sur le plan pronostic que thérapeutique [11, 45, 107].

L'anémie est associée à un pronostic péjoratif sur le contrôle local et la survie des patients atteints de tumeur solide. Elle est probablement le reflet d'une maladie évoluée et/ou d'un terrain fragilisé, mais peut aussi induire un manque d'oxygène disponible en intra tissulaire.

L'EPO exogène semble améliorer la qualité de vie des patients anémiques (et leurs fonctions cognitives) pour des concentrations d'hémoglobine inférieures à 10 g/dl. Les Standards, Options et Recommandations confirment qu'il n'y a pas à l'heure actuelle d'attitude standard et que l'EPO n'est pas une option thérapeutique dans les tumeurs traitées par radiothérapie seule [68, 69]. Toutefois, la relation entre l'expression de l'EPO et de son récepteur par les cellules tumorales, l'hypoxie, la vascularisation et l'angiogenèse tumorale doit être élucidée [45, 67, 107]. Ce n'est pas parce que l'anémie est corrigée que l'O₂ sera présent dans la tumeur, mais il est certain que tout patient anémique aura un retentissement fonctionnel et éventuellement une perte de chance thérapeutique (limite à l'effet oxygène en radiothérapie). Si, chez l'homme, les récepteurs membranaires à l'EPO s'avéraient fonctionnels, la recherche de la surexpression de ces récepteurs permettrait de sélectionner les patients anémiques susceptibles ou non de recevoir de l'EPO. On peut en effet considérer la probable existence d'un équilibre subtil entre l'effet correcteur de l'anémie par l'EPO (possibilité d'une meilleure oxygénation tissulaire) et son rôle activateur sur la croissance de certaines cellules cancéreuses (ou du tissu sain) (*Figure 26*). Aucune étude clinique n'ayant démontré de manière formelle l'intérêt de l'utilisation de l'EPO sur la survie, celle-ci doit probablement être évitée chez les patients non anémiques et rediscutée en situation curative (en association avec la radiothérapie) dans le cadre d'études cliniques utilisant de nouveaux marqueurs d'expression de la sensibilité cellulaire aux variations d'oxygénation de leur environnement (récepteurs à l'EPO, expression de HIF-1, synthèse VEGF...) [11, 45, 107].

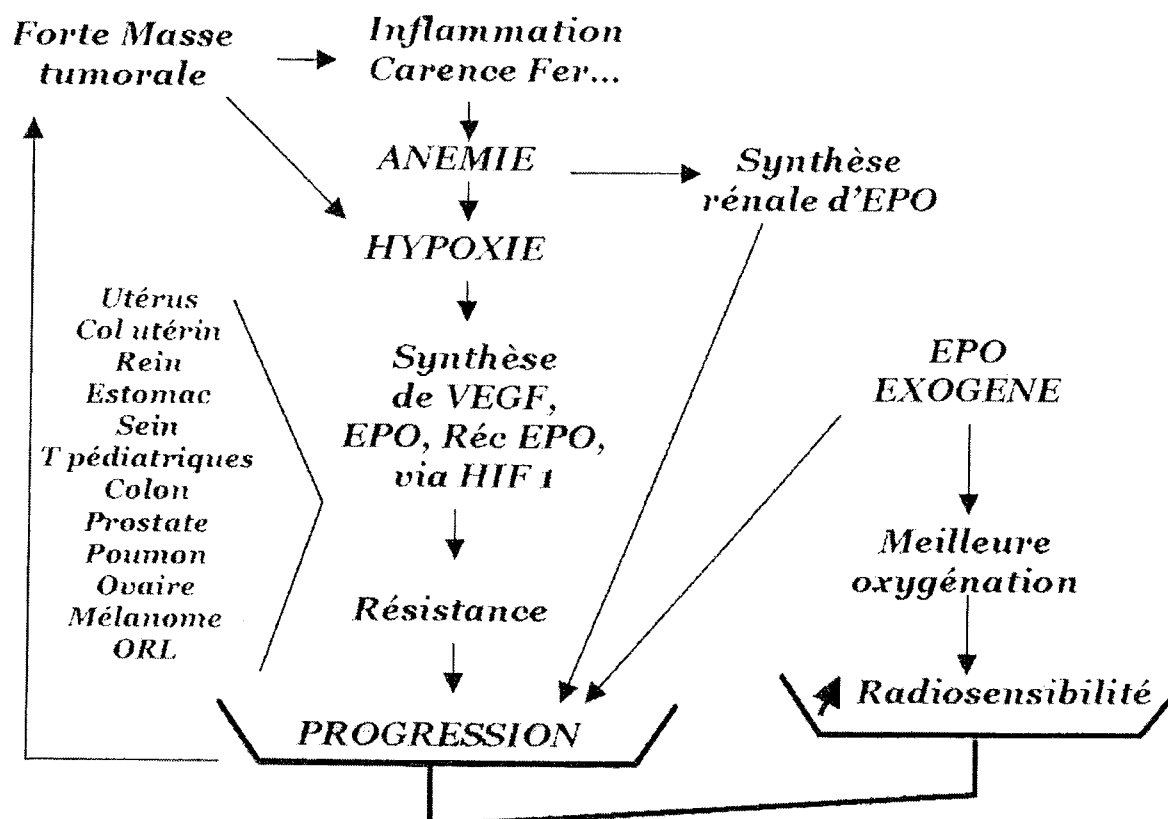


Figure 26 - Hypothèse de la promotion tumorale par l'EPO [45].

E. EPO et anémie de l'insuffisance cardiaque

Dans l'insuffisance cardiaque, une anémie a des conséquences beaucoup plus sévères que chez un sujet sain, qui peut compenser une baisse du taux d'hémoglobine par une augmentation du débit cardiaque et une augmentation de l'extraction veineuse de l'oxygène. Ces possibilités sont plus limitées chez l'insuffisant cardiaque du fait d'une altération de la réserve contractile et de la précharge et d'une extraction d'O₂ déjà augmentée au repos. Dans ces conditions, des baisses d'hémoglobine en dessous de 10 g/dl ont des conséquences plus marquées que chez un sujet sain, au repos comme à l'effort [35].

1. Données épidémiologiques

Il n'y a pas d'unanimité en ce qui concerne la façon dont est définie l'anémie dans les différentes études. Selon certaines, le seuil de 12 ou 13 g/dl est retenu chez l'homme (environ 1 g/dl de moins chez la femme) ; dans d'autres, la définition est fondée sur l'hématocrite. Dans ces conditions, il ne faut pas s'étonner de voir une hétérogénéité dans la prévalence

rapportée de l'anémie dans l'insuffisance cardiaque. Les chiffres varient de 4 à 55 % selon la définition retenue et la population étudiée. On peut retenir, de toutes les études qui ont été faites, que la fréquence de l'anémie augmente avec le seuil pour la définir, avec l'âge des patients et la classe fonctionnelle NYHA (New York Heart Association), et naturellement avec l'altération de la fonction rénale. Globalement, si on retient le seuil de 12 g/dl, la prévalence semble être aux alentours de 10 à 15 % chez des patients en classe I-II de la NYHA et peut atteindre 40 à 50 % chez des patients en classe III-IV de la NYHA ou âgés [35].

2. Mécanismes de l'anémie dans l'insuffisance cardiaque

Schématiquement, il existe trois mécanismes d'anémie dans l'insuffisance cardiaque [35]:

- l'anémie par carence de fer en rapport avec un traitement antiplaquettaire ou anticoagulant est probablement la plus fréquente. Elle peut être corrigée par supplémentation en fer ;
- l'anémie peut être en rapport également avec une hémodilution. C'est le cas en particulier des patients en insuffisance cardiaque évoluée, congestive. Il est difficile en pratique de savoir la part d'hémodilution dans une anémie quand la clinique n'est pas évocatrice ;
- dans les autres cas, on ne retrouve pas de cause à cette anémie. Plusieurs mécanismes ont été évoqués. Le mécanisme essentiel est une anomalie de la réponse à l'EPO. L'augmentation physiologique de la production d'EPO, en réponse à une hypoxie tissulaire locale, est insuffisante en regard du niveau de l'anémie. La sécrétion d'EPO peut être à l'inverse diminuée, dans l'insuffisance rénale sévère, par l'activation de cytokines pro-inflammatoires.

3. Traitement de l'anémie dans l'insuffisance cardiaque

Bien que les taux d'EPO soient légèrement augmentés, ils sont insuffisants pour corriger l'anémie et, de ce fait, une supplémentation par de l'EPO humaine recombinante est une voie à envisager pour corriger l'anémie. Les transfusions font en effet courir le double risque d'hypervolémie et de complications iatrogènes.

La première étude réalisée dans l'insuffisance cardiaque a été faite par Silverberg et al. chez 26 patients en classe III ou IV de la NYHA. Il s'agissait d'une étude ouverte où les patients étaient traités par de l'EPO sous-cutanée et du fer intraveineux, de façon à obtenir un taux d'hémoglobine à 12 g/dl sur une durée moyenne de 7 mois. Le traitement a augmenté

l'hémoglobine de 10,2 à 12,1 g/dl, a amélioré la classe fonctionnelle NYHA (réduction de 3,8 avant traitement à 2,2 après traitement), la fraction d'éjection ventriculaire gauche ou FEVG et a permis une diminution des besoins en diurétiques.

Les mêmes auteurs ont, l'année d'après, rapporté une étude ouverte, mais cette fois-ci randomisée, comparant l'EPO associée à du fer chez 32 patients en insuffisance cardiaque stade III ou IV. Les résultats ont montré, de la même façon, une augmentation significative du taux moyen d'hémoglobine de 10,3 g/dl avant traitement à 12,9 g/dl après traitement. La FEVG s'est accrue de 27,7 à 35,4 %. La classe NYHA s'est également améliorée en diminuant de 3,66 à 2,66, le nombre moyen et les durées de séjours hospitaliers ont également été réduits et les besoins en diurétiques *per os* et IV ont significativement diminué [3, 163, 164, 165].

De nouvelles investigations sont actuellement en cours notamment avec la darbépoétine- α . Il est possible que, à l'avenir, des injections mensuelles soient suffisantes [3].

Ces études sont nécessaires pour savoir si l'EPO peut être efficace et bien tolérée chez les insuffisants cardiaques anémiques. On ne connaît ni le taux d'hémoglobine à cibler, ni la vitesse à laquelle il faut le faire. Il faudrait également évaluer le risque de thrombose vasculaire ; ce risque a été démontré quand l'hémoglobine augmente trop rapidement. Les insuffisants cardiaques chroniques ont à la fois un état procoagulant et, à l'inverse, en cas de foie cardiaque ou d'hémodilution, un état d'hypocoagulation. Ces études sont donc indispensables et permettront de savoir si le traitement au long cours par EPO se révèle efficace sur les symptômes, la qualité de vie, voire le pronostic des patients [35, 161, 162].

4. Autres applications possibles du traitement par érythropoïétine dans l'insuffisance cardiaque

L'érythropoïétine semble avoir de nombreux effets pharmacologiques autres que son action sur les globules rouges particulièrement intéressants dans la pathologie cardiovasculaire.

Des récepteurs de l'EPO ont été détectés dans plusieurs tissus, notamment le cœur, l'endothélium vasculaire, la rétine et le cerveau. L'expression myocardique des récepteurs à l'EPO est nécessaire pour une morphogénèse cardiaque normale. L'EPO semble aussi avoir des effets neuroprotecteurs très importants. Cette action passerait par un effet anti-apoptotique de l'EPO au niveau cérébral. L'EPO limite aussi la taille de l'infarctus cérébral chez l'homme. L'apoptose est également un mécanisme important de perte myocytaire dans

l'infarctus du myocarde et dans l'ischémie myocardique. L'EPO a été utilisée dans différents modèles d'ischémie ou d'hypoxie myocardique. Expérimentalement, elle est capable de réduire l'apoptose induite par l'hypoxie. Dans un modèle de préconditionnement ischémique chez le rat, l'administration d'EPO a réduit l'apoptose myocytaire et amélioré la fonction ventriculaire gauche [3, 35, 191].

Il est possible que ces effets bénéfiques de l'EPO dans l'ischémie myocardiques ne soient pas simplement en rapport avec un effet sur la mort cellulaire, mais aussi un effet microvasculaire. L'EPO inhibe, en effet, l'apoptose dans l'endothélium vasculaire et agit ainsi comme un facteur angiogénique au niveau vasculaire. Elle semble être ainsi un agent protecteur remarquable avec des propriétés beaucoup plus larges que sa seule action sur l'érythropoïèse [3, 35, 161, 162].

L'anémie, quel qu'en soit le mécanisme, est fréquente dans l'insuffisance cardiaque sévère et semble conférer un risque vital indépendant. L'EPO recombinante semble, depuis peu de temps, pouvoir offrir la possibilité de corriger cette anémie et d'améliorer les symptômes, la fonction ventriculaire gauche et, peut-être, le pronostic des patients [163, 164, 165]. Surtout, elle apparaît dotée de qualités cytoprotectrices beaucoup plus larges qu'initialement envisagées et pourrait ainsi avoir un rôle significatif dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, notamment ischémique [3, 35].

F. Augmentation préopératoire de la stimulation érythropoïétique des patients ne souhaitant pas être transfusés

De nombreuses publications font état de la prescription d'EPO à des témoins de Jéhovah dans deux indications précises : corriger une éventuelle anémie préopératoire et en prévision accroître volontairement le nombre de globules rouges et de réticulocytes pour une intervention hémorragique (chirurgie orthopédique, chirurgie cardiaque sous circulation extracorporelle CEC, reprises chirurgicales).

En effet, une analyse de plus de 61 publications a essayé d'évaluer chez les témoins de Jéhovah la concentration d'hémoglobine la plus basse tolérable. Plus d'un tiers d'entre eux sont décédés de leur anémie avec une concentration en hémoglobine en dessous de 5 g/dl. Ce

taux de mortalité en chirurgie programmée est très élevé et inacceptable. Ces chiffres expliquent en partie pourquoi l'EPO est largement utilisée chez eux [89, 190].

Certaines équipes préconisent d'élever, en période préopératoire, la masse globulaire de leurs patients. La prescription d'EPO, 14 jours avant l'intervention, a permis de diminuer les besoins transfusionnels de 25 % en orthopédie, dès lors que les patients avaient une concentration préopératoire d'hémoglobine inférieure à 13 g/dl. La même approche est proposée en chirurgie cardiaque mais avec un traitement préopératoire plus court (de 5 jours) et à plus fortes doses (300 UI/kg/j), associé à une supplémentation en fer de 650 mg/j. Dans ces conditions, la diminution du saignement préopératoire et des besoins transfusionnels a été évaluée à 30 %. Les auteurs de ce travail pensent que ces bons résultats sont liés à l'hémoconcentration et à l'effet probable de l'EPO sur les plaquettes au cours de la CEC. Un autre mode de prescription de l'EPO a été proposé en chirurgie cardiaque sur des patients ayant, en période préopératoire, une concentration d'hémoglobine inférieure à 10 g/dl. La durée du traitement s'échelonnait de 14 à 70 jours et était guidée par l'élévation de la concentration en hémoglobine jusqu'à des valeurs dépassant 13 g/dl. Dans ces conditions, un seul patient a eu besoin de transfusion homologue [89, 190].

L'inefficacité du traitement peut être due à un manque de supplémentation en fer. L'apport doit être systématique d'au moins 200 mg/j, sous forme de sulfate de fer *per os* ou intraveineux [89].

G. Correction de l'anémie des myélodysplasies

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des affections clonales de la moelle hématopoïétique, caractérisées par des troubles de maturation avec avortement intramédullaire des précurseurs des trois lignées myéloïdes. Ces anomalies entraînent des cytopénies sanguines (anémie, neutropénie, thrombopénie), de profondeur variable, et peuvent conduire au niveau médullaire à un blocage de maturation avec excès de blastes.

Il n'existe pas actuellement de traitement curatif des SMD en dehors de l'allogreffe de moelle osseuse. Dans les SMD sans excès de blastes, ou avec excès modéré de blastes, la correction des cytopénies est la priorité. A côté du traitement symptomatique que constituent les transfusions, l'utilisation des facteurs de croissance hématopoïétiques représente une alternative logique. Leur place dans le traitement des cytopénies des SMD est en cours d'évaluation, avec de nombreux essais cliniques publiés [27, 185].

1. Rationnel de l'utilisation de l'EPO

L'anémie est très fréquemment présente, dès le diagnostic, chez les patients atteints de myélodysplasie, et concerne près de 90 % des patients en cours d'évolution de la maladie. L'anémie des SMD est due à une hématopoïèse inefficace, liée à une apoptose intramédullaire très augmentée dès les stades initiaux de la maladie. Cette apoptose atteint les trois lignées myéloïdes, à tous les stades de différenciation, mais elle est particulièrement marquée au niveau de la lignée érythrocytaire.

L'étude du comportement *in vitro* des progéniteurs en présence de cytokines recombinantes ou de milieux de culture conditionnés montre une abolition ou une forte diminution de la croissance des progéniteurs érythrocytaires chez 30 à 75 % des patients atteints de SMD.

In vitro, il a été montré que la croissance des CFU-E et des BFU-E pouvait être améliorée en utilisant des concentrations d'EPO 5 à 20 fois supérieures à celles utilisées pour les témoins. L'administration d'EPO à doses pharmacologiques pourrait donc corriger les anomalies de prolifération et de maturation des progéniteurs érythrocytaires, soit en stimulant les progéniteurs normaux résiduels, soit en induisant la prolifération et la maturation du clone myélodysplasique, soit en conjuguant les deux effets. Cependant, les patients atteints de myélodysplasies ont des concentrations d'EPO plasmatique très variables ; pour un même taux d'hémoglobine, certains patients ont un taux d'EPO très bas, d'autres un taux d'EPO très élevé [27, 185].

2. Traitement de l'anémie par l'érythropoïétine seule

De très nombreuses études utilisant l'EPO recombinante pour traiter l'anémie des syndromes myélodysplasiques ont été publiées. Une méta-analyse a été effectuée, portant sur 205 patients regroupés dans 17 articles publiés avant 1995. Ces articles ont été sélectionnés car ils comportaient un nombre suffisant de patients, des critères d'inclusion relativement homogènes (soit des besoins transfusionnels importants ou une anémie définie par un taux d'hémoglobine inférieur à 10,5 g/dl) et les critères de réponse suivants : augmentation de l'hémoglobine de plus de 1,5 g/dl chez les patients non transfusés, ou stabilité de l'hémoglobine, ou absence de transfusions chez les patients transfusion-dépendants. Les modalités de traitement étaient hétérogènes en termes de voie d'administration (voie sous-cutanée ou intraveineuse), de fréquence des injections (de 3 à 7 injections par semaine), de dose hebdomadaire ainsi que de concentration sérique d'EPO (de 12 à 10.900 UI/l) [27, 185].

Les résultats globaux du traitement étaient très décevants, avec une réponse érythrocytaire globale de 16 %, variable selon le type de SMD : 21 % dans les anémies réfractaires simples, 7,5 % dans les anémies sidéroblastiques, 22 % dans les anémies réfractaires avec excès de blastes. Aucune réponse n'était observée dans les anémies réfractaires avec excès de blastes en transformation et les leucémies myélomonocytaires chroniques, mais très peu représentées. Cependant, deux facteurs prédictifs de réponse significatifs ressortent de cette méta-analyse : la dépendance transfusionnelle, et le taux d'EPO sérique endogène. Seuls 10 % des patients transfusés répondent, contre 44 % des patients non transfusés. Si le taux d'EPO endogène est inférieur à 200 UI/l, 21 % des patients répondent, contre seulement 10 %, si ce taux est supérieur à 200 UI/l [27, 185].

Au total, le traitement de l'anémie des SMD par EPO seule est décevant, avec un taux de réponse moyen de 16 %, et les meilleurs résultats sont obtenus chez les patients non transfusés, ayant un taux bas d'EPO endogène [27, 185].

3. Traitement de l'anémie par l'association EPO/G-CSF

Les résultats cliniques médiocres avec l'EPO seule et l'existence d'arguments expérimentaux *in vitro* ont conduit les investigateurs à proposer des traitements associant plusieurs cytokines. En effet, l'utilisation de cytokines précoces (GM-CSF, G-CSF, SCF) augmente le nombre de précurseurs sensibles à l'EPO. D'autre part, un effet synergique de ces facteurs sur la croissance des progéniteurs normaux, mais aussi des progéniteurs provenant de patients atteints de SMD a été démontré *in vitro* par des techniques de cultures clonogéniques.

Les deux premiers essais cliniques associant le G-CSF et l'EPO ont rapporté des taux de réponses encourageantes de 42 % et 38 %. D'autres études ont été depuis publiées. Celles de Negrin et al., Hellström-Lindberg et al. et Reamacha et al. regroupent le nombre le plus important de patients [13, 27, 185].

Les schémas thérapeutiques de ces trois essais sont relativement comparables et visent à démontrer la synergie de ces deux facteurs de croissance.

1) Dans l'essai de Negrin, le G-CSF est administré une fois par jour par voie SC à la dose de 1 µg/kg et la dose est ajustée afin de maintenir « normal » le chiffre des polynucléaires neutrophiles. Après deux semaines de traitement, l'EPO est introduite à raison d'une injection SC de 100 UI/kg/jour (avec escalade dose toutes les quatre semaines jusqu'à

150 ou 300 UI/kg/jour). Après seize semaines, le G-CSF est arrêté et les patients sont traités par EPO seule.

Globalement, les résultats sont prometteurs, puisque 48 % des patients ont une réponse érythrocytaire. Les résultats sont particulièrement bons dans le groupe des anémies réfractaires simples (57 % de réponses) et dans le groupe des anémies sidéroblastiques (47 %). La synergie est donc clairement établie. Par ailleurs, à la 16^e semaine, à l'arrêt du G-CSF, 50 % des patients continuent de répondre à l'EPO, mais 50 % rechutent. Tous ces patients, sauf un, sont à nouveau répondeurs à la réintroduction du G-CSF, ce qui démontre, dans cette catégorie de patients, une réelle synergie des deux molécules [130].

2) L'étude d'Eva Helström est randomisée et compare deux bras de traitement : dans l'un, le G-CSF est administré pendant quatre semaines (de 30 à 150 µg/jour), puis l'EPO est introduite (de 5.000 à 10.000 UI/jour) ; dans l'autre bras, l'EPO est administrée seule pendant huit semaines, et le G-CSF est introduit à la 8^e semaine.

Globalement, la réponse érythrocytaire est de 38 %. Ici aussi, les résultats dans le groupe des anémies sidéroblastiques sont excellents, avec 46 % de répondeurs [87].

3) Dans l'étude du groupe espagnol, l'EPO est administrée seule à la dose de 300 UI/kg trois fois par semaine pendant huit semaines, et si le patient ne montre qu'une réponse partielle ou aucune réponse, le G-CSF est ajouté à la dose de 1 µg/kg trois fois par semaine. Les résultats sont bons, avec 50 % des patients qui présentent une réponse érythrocytaire ; 75 % dans les anémies réfractaires simples et 41 % dans les anémies sidéroblastiques. Là encore, la synergie EPO/G-CSF est démontrée pour certains patients car 50 % des patients qui ne répondent pas à l'EPO seule répondent lorsque le G-CSF est introduit [143].

Les résultats des traitements actuellement disponibles pour les syndromes myélodysplasiques sont globalement décevants. Seuls les traitements très lourds peuvent être curateurs, mais ils ne sont pas applicables aux sujets âgés, qui représentent la majorité des cas de SMD. Dans ce contexte, l'utilisation des facteurs de croissance pour corriger l'anémie des myélodysplasies est séduisante et semble représenter une alternative au support transfusionnel.

Les résultats de l'ensemble des essais de traitement de l'anémie permettent de dire que l'EPO recombinante et le G-CSF exercent une action synergique *in vivo*. Cette synergie semble particulièrement intéressante pour les anémies sidéroblastiques, avec des taux de réponse de l'ordre de 50 %. Le taux d'EPO endogène prétraitement est un bon facteur prédictif de réponse dans toutes les études. Cependant le seuil du taux d'EPO endogène justifiant la mise en route ou non d'un traitement reste à définir : 500 UI/l, 250 UI/l ? [27, 185].

Malgré ces résultats positifs, les facteurs de croissance n'ont pas actuellement d'AMM dans les syndromes myélodysplasiques. Il reste à évaluer les problèmes de coût/efficacité, car les posologies d'EPO utilisées sont élevées. Enfin contrairement aux essais réalisés dans les hémopathies non myéloïdes, aucune étude de la qualité de vie n'a jusqu'ici été publiée [27, 185].

H. EPO et perspectives transfusionnelles

La connaissance des risques de transmission de germes pathogènes lors de transfusions de sang ou de dérivés sanguins a eu pour effet de réduire le nombre de donneurs potentiels, conséquence d'une sélection médicale accrue. Ces risques ont stimulé, à partir des années 80, le développement de stratégies alternatives. L'EPO a désormais un rôle important dans les stratégies de transfusion autologue, notamment lors d'interventions chirurgicales programmées. Des « substituts du sang », comme des transporteurs d'oxygène artificiels à base d'hémoglobine ou des tentatives de production d'hémoglobine recombinante ont été proposés. Ces produits pourraient servir de relais, mais ne concurrencent en rien la transfusion sanguine. De plus, certains problèmes liés à leur utilisation subsistent comme l'auto-oxydation de l'hémoglobine en solution, ou l'effet vasoconstricteur des solutions d'hémoglobine. Il serait dès lors intéressant de trouver d'autres sources possibles de globules rouges [48, 49].

1. Contrôler *in vitro* la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques

Le récent développement des techniques de sélection des progéniteurs hématopoïétiques et la connaissance des facteurs de croissance impliqués spécifiquement dans certaines lignées cellulaires ont rendu envisageable la production *ex vivo* de populations cellulaires hématopoïétiques à des fins de greffe ou à des fins transfusionnelles (globules blancs, précurseurs mégacaryocytaires ou érythrocytaires). Ces cellules peuvent en effet être amplifiées à partir de la prolifération d'un tout petit nombre de cellules souches sanguines, médullaires ou placentaires [48, 49].

Depuis quelques années, un intérêt considérable est apparu pour l'expansion des cellules hématopoïétiques. Le champ d'application est potentiellement vaste [48, 49] :

- soit augmenter le nombre de cellules souches primitives dans un greffon insuffisant comme c'est le cas pour des greffes de sang placentaire chez l'adulte, ou diminuer la quantité de cellules souches à prélever comme cela est proposé comme effet purge dans les hémopathies et certains cancers : l'objectif est alors clairement d'amplifier le compartiment primitif ;
- soit augmenter le nombre de cellules matures afin de raccourcir la durée d'aplasie : l'objectif est d'induire massivement la différenciation des compartiments de progéniteurs ;
- soit produire des cellules de lignées spécifiques comme les précurseurs érythrocytaires : l'objectif est de faire proliférer au maximum le compartiment et d'imposer une différenciation exclusivement érythrocytaire aux progéniteurs ainsi produits. A cet égard, le sang placentaire présente certains avantages par rapport aux deux autres sources : il contient suffisamment de progéniteurs hématopoïétiques pour permettre une prise de greffe chez l'enfant et parfois chez l'adulte ; ces progéniteurs donnent naissance *in vitro* à des colonies de plus grande taille et ont une capacité d'expansion plus importante.

2. Produire des globules rouges *in vitro*

Une littérature abondante montre que la différenciation de cellules souches hématopoïétiques, notamment dans la lignée érythrocytaire, peut être stimulée très efficacement en culture par différentes combinaisons de cytokines. Plusieurs critères sont rappelés pour que la production de globules rouges puisse être considérée comme valable [50, 95] :

- la prolifération des cellules progénitrices doit être importante ;
- la différenciation vers la lignée érythrocytaire doit être spécifique ;
- la maturation doit être complète et implique l'énucléation des cellules.

En culture liquide, on avait pu obtenir une expansion significative, mais avec un blocage de la maturation finale. Une énucléation n'avait été obtenue qu'aux dépens d'une expansion réduite. Aucun essai n'avait réussi auparavant à décrire des conditions *ex vivo* qui permettent de jumeler une prolifération massive et une énucléation de la totalité des réticulocytes. Un pas vient sans doute d'être franchi par un groupe de chercheurs français. Le processus de cultures mis au point dans le travail actuel obtient une expansion de $1,95 \times 10^6$, ainsi qu'une conversion à 100 % des érythrocytes. Les globules rouges ont les caractères morphologiques et fonctionnels de cellules adultes natives (déformabilité, aptitude à fixer l'oxygène) [50, 95].

Les techniques de cultures employées ont cherché à reproduire, dans la mesure du possible, le microenvironnement qui, dans la moelle, permet la maturation érythrocytaire à partir de cellules progénitrices (*Figure 27*) [50, 95].

1) La première étape (8 jours) a été d'induire prolifération et différenciation érythrocytaire dans un milieu sans sérum, en présence de cytokines : le SCF, l'IL-3 et l'EPO.

2) Une deuxième étape (3 jours) a consisté à poursuivre la culture avec l'EPO seule, en ajoutant soit des cellules stromales murines, soit des cellules mésenchymateuses humaines.

3) Dans une troisième étape (10 jours), enfin, les cellules ont été incubées sur stroma en supprimant tous les facteurs exogènes.

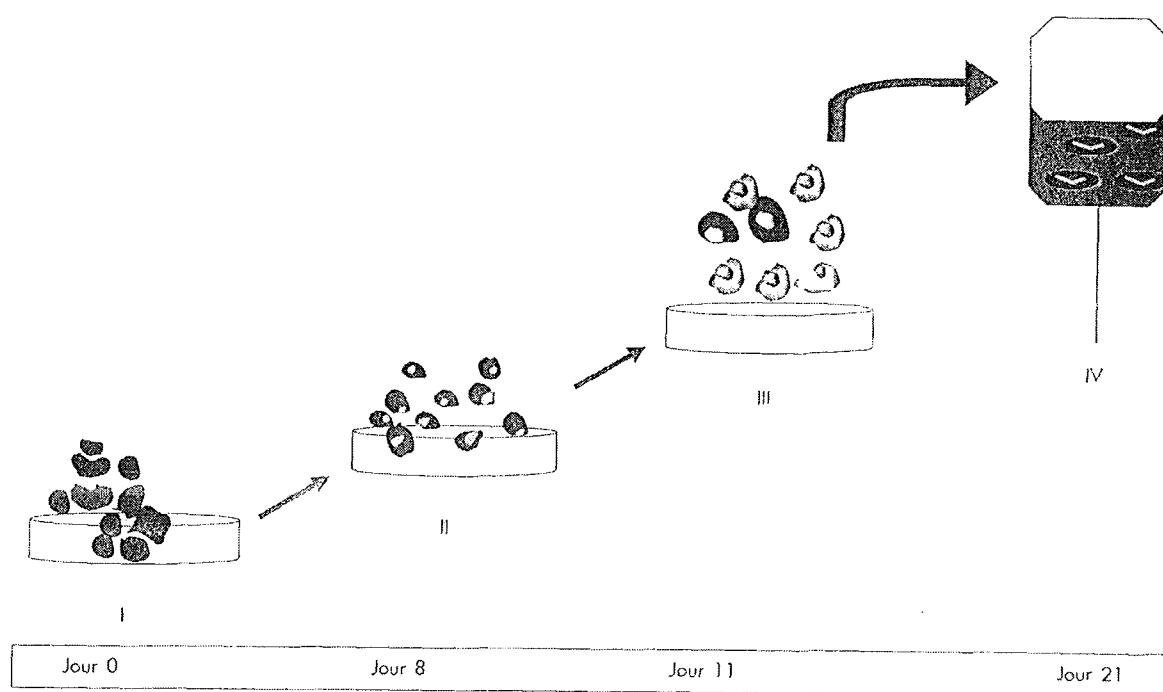


Figure 27 - Représentation schématique des étapes nécessaires à l'obtention ex vivo d'hématies humaines à maturité en culture [95].

Une amplification maximale a été observée vers J15, à partir de sang périphérique, mais encore plus importante à partir de sang de cordon. L'engagement vers la lignée érythrocytaire est net dès J8, suivi rapidement par une différenciation terminale. Les cellules progénitrices disparaissent à ce moment. À J15 la presque totalité des cellules étaient des réticulocytes. Dans les jours suivants, on a assisté à l'énucléation finale, en même temps qu'à la disparition de l'expression du récepteur de la transferrine [50, 95].

Les globules rouges avaient les mêmes caractéristiques que les cellules natives, leur morphologie biconcave, le taux de réticulocytes était environ de 18 %. La nature de l'hémoglobine synthétisée variait selon l'origine du prélèvement : majoritairement (94 %) de l'HbA à partir du sang périphérique, une dominante (64 %) d'HbF à partir de sang de cordon. Sur ces érythrocytes obtenues *ex vivo*, on a vérifié un taux normal de glucose-6-phosphate déshydrogénase et de pyruvate kinase, ce qui suggérait le maintien de propriétés réductrices. Leur valeur fonctionnelle a été évaluée par leur capacité à fixer un ligand après photolyse en flash, ainsi que par leur capacité à fixer et relarguer l'oxygène. Toutes ces valeurs étaient pratiquement les mêmes que celles de cellules témoins [50, 95].

La première étape d'amplification des cellules CD34+ avait déjà fait l'objet d'une publication par les mêmes auteurs. Ils avaient aussi montré que les précurseurs érythrocytaire, introduits chez la souris immunodéficiente NOD/SCID (*non-obese diabetic/severe combined immunodeficient*, modèle animal utilisé classiquement pour l'analyse de la reconstitution *in vivo* de CSH humaines), s'y différenciaient normalement. Le progrès du dernier travail est d'avoir tenu compte du rôle de facteurs régulateurs produits dans la moelle par les cellules stromales, la chronologie des différents milieux de culture s'avérant importante. Elle a cherché à reproduire les étapes connues de prolifération et différenciation des cellules hématopoïétiques. Les cytokines sont actives sur la prolifération, mais n'agissent pas sur la différenciation des progéniteurs, seuls les facteurs tardifs, EPO dans le cas présent, sont spécifiques [50, 95].

Enfin, l'interaction avec les protéines de la matrice extracellulaire et les macrophages permet l'énucléation finale. L'utilisation de cellules murines posait un problème, qui a été résolu par la substitution de cellules mésenchymateuses humaines. Un contact direct avec ces cellules est nécessaire, l'interposition d'un filtre très mince annulant l'effet recherché [50, 95].

3. Des applications multidisciplinaires

Il a ainsi été décrit une méthodologie de culture reproduisant *ex vivo* les conditions du microenvironnement hématopoïétique, dans un milieu défini, qui permet la prolifération des CSH, leur engagement vers la lignée érythrocytaire et la maturation terminale complète jusqu'au globule rouge. Cette approche est applicable à plusieurs modèles [50].

a) Transfusion sanguine

Cette technologie qui autorise la génération massive *ex vivo* de globules rouges à partir de CSH rend la production conceptuellement réalisable dans un but transfusionnel. La moelle osseuse a servi dans cette étude de référence. La possibilité de recueillir facilement des CD34+ dans le sang périphérique après mobilisation par du G-CSF ou dans le sang de cordon à la naissance ouvre des perspectives thérapeutiques considérables. Les quantités potentiellement productibles sont en effet compatibles avec les exigences cliniques (un concentré globulaire standard contient environ 2×10^{12} globules rouges). Si l'on considère d'une part qu'un sang de cordon contient de 2 à 5×10^6 CD34+, et que d'autre part les niveaux d'amplification sont de l'ordre de 2×10^6 fois, c'est bien l'équivalent de plusieurs concentrés de globules rouges qui peuvent être ainsi produits à partir d'un seul prélèvement. Au-delà de l'intérêt transfusionnel évident en termes d'approvisionnement et de sécurité infectieuse (plusieurs dons générés à partir d'un seul donneur et/ou transfusion autologue), c'est aussi en matière d'efficacité transfusionnelle que ce type de produit est prometteur. Il permettrait de transfuser une population homogène en âge, dont la durée de vie devrait être proche de 120 jours par comparaison aux 28 jours de demi-vie moyenne des globules rouges prélevés chez un donneur en raison de la présence conjointe de globules rouges d'âge variable. Cela diminuerait le nombre de transfusions et allègerait l'inévitable surcharge martiale, complication majeure chez les sujets polytransfusés [48, 49, 50].

b) Parasitologie

Ce modèle de différenciation érythrocytaire peut constituer un nouvel outil simple pour l'étude du cycle de reproduction de certains agents infectieux comme le plasmodium dans la malaria. Jusqu'à présent, la souris immunodéficiente constituait le seul modèle permettant l'étude du plasmodium dans le but de développer de nouvelles drogues ou de mettre au point des vaccins antipaludéens. La durée de vie limitée des globules rouges humains injectés à la souris NOD/SCID obligeait même à une lourde préparation du modèle receveur (splénectomie, irradiation, traitement médicamenteux...) D'autres équipes ont développé l'isolement de réticulocytes issus de la souris ou de patients présentant des pathologies hématologiques. Ce modèle *in vitro*, aisément accessible, contourne les lourdeurs du modèle *in vivo* [50].

c) Un nouveau vecteur médicamenteux

Par nature les globules rouges ont une biodistribution idéale et ne se divisent plus. De telles propriétés pourraient être exploitées pour utiliser ces cellules comme vecteur thérapeutique d'un nouveau type. En effet, préalablement à l'induction de différenciation érythrocytaire, les progéniteurs pourraient être génétiquement manipulés afin de produire des protéines cytoplasmiques ou membranaires dont l'action serait volontairement limitée dans le temps, dans un but thérapeutique [50].

d) Perspectives

Les cellules souches embryonnaires humaines (huES), au potentiel prolifératif illimité, pourraient devenir dans les prochaines années une source alternative pour l'ingénierie cellulaire. Déjà, des équipes relatent l'engagement des huES vers les cellules hématopoïétiques CD34+ à hauteur de 20 %. La différenciation in vitro des cellules ES vers la lignée érythrocytaire pourrait ainsi permettre à terme la production de masse de globules rouges [50].

Ce nouveau concept de « globules rouges de culture » produits en grand nombre à partir de cellules souches hématopoïétiques peut avoir des applications potentiellement considérables. L'utilisation transfusionnelle reste à l'heure actuelle purement spéculative : le rendement obtenu (4 unités de sang à transfuser à partir d'un prélèvement de sang de cordon) et le coût élevé de la préparation rendent cet usage prohibitif. La percée reste, cependant, remarquable. Le but évident, dans la décennie à venir, est une production automatisée et moins onéreuse de globules rouges prêts à l'emploi [50, 95].

I. Anémie en gynécologie

1. Traitement de l'anémie en chirurgie gynécologique

L'hystérectomie est l'une des interventions chirurgicales les plus fréquentes chez la femme avant la ménopause. Un tiers de ces femmes ont moins de 65 ans et plus de 90 % sont opérées pour une affection non maligne. Une anémie causée par des pertes de sang chroniques est fréquemment l'indication pour l'intervention. Chez 40 à 50 % des patientes subissant une hystérectomie, une anémie est diagnostiquée avant l'opération et, pour 68 à 75 %, la fatigue

causée par cette anémie constitue un important problème. Le but de l'hystérectomie est d'améliorer la qualité de vie des patientes par suppression de la cause d'anémie. Toutefois, l'opération en elle-même, par le biais de pertes de sang, peut aggraver l'anémie préexistante, réduire davantage la qualité de vie et rendre plus difficile la récupération postopératoire. On estime entre 200 et 1700 ml la quantité de sang perdu selon le type d'opération [92].

Les conséquences de la perte de sang lors de l'hystérectomie sont des symptômes persistants des semaines, voire des mois après l'intervention : épuisement, niveau d'énergie réduit, augmentation du besoin de repos, retard dans la reprise du travail. Selon une étude, l'épuisement apparaît plus fréquemment que les douleurs. 90 % des patientes se sont déclarées fatiguées après l'intervention. En revanche, moins de 75 % des patientes ont annoncé qu'elles éprouvaient des douleurs. D'après une enquête de l'American Society of Reproductive Medicine, 91 % estimaient que l'épuisement était une conséquence inévitable de l'intervention chirurgicale. Pour cette raison, la moitié des patientes interrogées n'a pas non plus demandé de l'aide à son médecin. Et lorsqu'elles en ont demandé, moins de la moitié d'entre elles a reçu un traitement ou des indications sur la manière de lutter contre sa fatigue. Des questionnaires standardisés, tels qu'on les connaît déjà en chirurgie orthopédique, devraient être validés pour la chirurgie gynécologique et leur utilisation devrait améliorer la communication entre médecin et patiente. L'optimisation de la qualité de vie postopératoire pourrait raccourcir le temps de rétablissement et contribuer à ce que la patiente puisse reprendre ses activités quotidiennes plus rapidement [12, 92].

Diverses mesures doivent être prises pour réduire ou éviter l'anémie périopératoire. De nombreuses études montrent que l'EPO peut améliorer la qualité de vie des patients cancéreux de manière significative. En chirurgie orthopédique, l'époétine- α a été utilisée avec succès pour stimuler l'érythropoïèse avant une grosse opération électorale, pour réduire les transfusions sanguines homologues et pour corriger une anémie postopératoire. Le succès du recours à l'EPO dans ces deux indications constitue la base de la possibilité de son utilisation en chirurgie gynécologique. Dans ce contexte, le but du traitement par l'EPO est la correction d'une anémie préopératoire et la prévention d'une anémie postopératoire. Des études ont déjà débuté pour examiner l'efficacité d'un dosage hebdomadaire unique d'EPO dans la prévention de l'anémie en chirurgie gynécologique [12, 92].

2. Traitement de l'anémie pendant la grossesse et le post-partum

L'utilisation de l'EPO humaine recombinante dans le traitement de l'anémie per et post-partum est toujours débattue.

Pendant la grossesse, c'est l'anémie ferriprive secondaire à une carence alimentaire qui prédomine. Celle-ci peut s'aggraver durant la phase du post-partum suite à d'importantes hémorragies. Les effets nocifs de cette anémie sont bien connus, tant pour la mère que pour le fœtus. L'importance du diagnostic de certitude paraît donc plus qu'évidente. Sur le plan thérapeutique, l'administration de fer et d'acide folique à titre préventif se révèle très efficace. Toutefois, en cas d'anémie ferriprive manifeste, les injections de fer par voie intraveineuse permettent une correction rapide de l'anémie. L'efficacité thérapeutique, surtout en cas d'anémie sévère sur hémorragie aiguë pendant l'accouchement, a pu être accrue, dans certaines études, par l'association au fer intraveineux de l'EPO qui permet dans la majorité des cas d'éviter la transfusion [13].

Des études préliminaires montrent également que l'EPO peut être administrée pendant la grossesse afin d'induire une correction rapide de l'anémie sévère, et cela sans risque pour le fœtus vu qu'elle ne traverse pas la barrière placentaire [13]. Mais à l'heure actuelle, son utilisation durant la grossesse ne doit être discutée que dans quelques cas individuels particulièrement complexes (association d'une anémie, de difficultés obstétricales et transfusionnelles particulières) [148, 149].

Néanmoins, compte tenu de son coût et des résultats contradictoires de certaines études, son utilisation large voire systématique ne peut être recommandée. Un dosage d'EPO naturelle circulante permettrait selon certains de distinguer les patientes pouvant tirer bénéfice de ce traitement des patientes non-répondeuses [148, 149].

J. Traitement de l'anémie des patients atteints d'une hépatite C chronique sous interféron/ribavirine

L'interféron- α recombinant associé à la ribavirine est le traitement le plus efficace de l'hépatite C. Actuellement, le traitement de référence associe l'interféron pégylé donné une fois par semaine et la ribavirine.

Il a été bien montré que l'interféron- α en monothérapie pouvait entraîner une anémie limitée avec en général une baisse du taux d'hémoglobine d'environ 1 g/dl. Le mécanisme sous-

jaçant serait une myélosuppression avec inhibition de la production d'EPO. La ribavirine, en revanche, peut entraîner une anémie beaucoup plus importante lorsqu'elle est délivrée par voie orale. Le mécanisme de cette anémie hémolytique est mal connu. La ribavirine induit une hypoplasie de la lignée érythrocytaire. Cette hypoplasie chez les singes rhésus est due à une inhibition des précurseurs érythrocytaires dans la moelle [114, 182].

Les différentes hypothèses qui ont été soulevées pour expliquer cette anémie hémolytique due à la ribavirine sont essentiellement liées à un stress oxydatif de la membrane érythrocytaire. Ainsi, cela entraîne l'altération de la membrane des globules rouges, une sénescence précoce et une phagocytose extravasculaire de ces derniers par le système réticulo-endothélial.

Bien que la dose optimale de ribavirine soit inconnue, les différents résultats des études multicentriques internationales semblent suggérer que des doses relativement élevées de ribavirine augmentaient l'efficacité du traitement sur les paramètres virologiques. Il a été aussi démontré que des doses importantes augmentaient les effets secondaires comme l'anémie, avec une diminution moyenne du taux d'hémoglobine de 2 à 3 g/dl allant parfois jusqu'à 4 g/dl ou plus [114, 119, 182].

Cette importante chute de l'hémoglobine a souvent des conséquences importantes sur la prise en charge des patients traités. L'anémie est souvent mal tolérée (fatigue, dyspnée, diminution de la qualité de vie) et peut provoquer une diminution d'adhérence au traitement avec des arrêts de traitements. Ces arrêts sont, soit spontanément décidés par le patient, soit la conséquence de l'importance de l'anémie qui oblige le thérapeute à diminuer les doses de ribavirine voire de l'interféron. Ces diminutions de doses ou ces arrêts de traitement sont susceptibles d'entraîner une diminution de l'efficacité thérapeutique. De plus, l'anémie peut avoir des conséquences importantes chez les sujets « à risque », en particulier on a décrit des accidents vasculaires, cardiaques, oculaires... [1, 114, 159].

Lunel-Fabiani et al. ont présenté une étude portant sur 20 patients avec une hépatite C qui ont développé une anémie sous traitement par l'interféron- α -2b plus ribavirine, traités par EPO humaine recombinante. L'âge médian était de 43 ans (25-72). Quatre patients avaient reçu un traitement antérieur. Dix patients ont reçu de l'interféron- α -2b, 6 MUI trois fois par semaine, cinq patients de l'interféron- α -2b, 3 UI trois fois par semaine, cinq patients de l'interféron- α -2b pégylé 80 à 120 μ g par semaine, associé à la ribavirine à la dose de 800 à 1200 mg/j chez 19 patients et 200 mg/j chez un patient présentant une insuffisance rénale. La durée du

traitement interféron/ribavirine était de six mois à un an. La médiane du taux d'hémoglobine sous traitement était de 9,8 g/dl (8,4-11,2). Sous EPO, l'hémoglobine a augmenté pour atteindre une médiane de 11,7 g/dl (9,6-12,8). La dose de ribavirine a dû être diminuée à 800 mg/j chez quatre patients, à 600 mg/j chez quatre patients et à 400 mg/j chez un patient. Treize patients ont eu une réponse initiale à l'interféron/ribavirine, six (tous de génotype 1) étaient non répondeurs. Actuellement, onze patients (55 %) ont une réponse prolongée, un est encore sous traitement et deux patients ont eu une rechute [114].

En conclusion, chez les patients atteints d'hépatite C chronique et traités par interféron/ribavirine, l'EPO paraît avoir un bénéfice certain sur l'anémie induite par la ribavirine. Un tel traitement permet le maintien de doses efficaces de ribavirine. Des études contrôlées avec des données sur la réponse virologique sont nécessaires pour recommander d'utiliser de façon systématique de l'EPO chez les patients qui présentent une chute importante de l'hémoglobine sous bithérapie [1, 114, 159].

K. Traitement des anémies hémolytiques immunes

Parmi les anémies hémolytiques immunes, l'incompatibilité Rhésus comme d'ailleurs l'incompatibilité ABO demeurent en tête de liste. Alors que le traitement périnatal continue à se centrer sur la photothérapie avec ou sans exsanguino-transfusion et la transfusion intra-utérine, l'anémie tardive peut être gérée par un traitement judicieux d'EPO, si l'on veut tenter d'éviter une transfusion. Le but du traitement est de traiter le nouveau-né à terme dès que l'hémoglobine descend en dessous de 10 g/dl par des doses d'EPO initiales d'au moins 200 UI/kg/jour par voie sous-cutanée. Une fois que la valeur d'hémoglobine atteint 12 g/dl, on peut réduire le nombre d'injections à trois par semaine, puis l'interrompre. L'apport en fer est essentiel, ainsi qu'un complément en acide folique durant le traitement par EPO [13].

L. Anémie et infection par le VIH

L'anémie suite à une infection par le VIH est multifactorielle. La composante inflammatoire joue certainement un rôle prépondérant. Toutefois, il ne faut pas oublier les autres mécanismes conduisant à une anémie en cas d'infection par le VIH :

- hématopoïèse inefficace (dysplasie liée au VIH),
- infiltrat de la moelle d'origine infectieuse ou tumorale,

- aplasie secondaire à une infection telle que le Parvovirus B19,
- carence vitaminique d'origine nutritive à une malabsorption,
- inhibition de la synthèse d'ADN d'origine médicamenteuse (antiviraux, antiparasitaires),
- hémolyse sur micro-angiopathie thrombotique

Il paraît donc évident que l'établissement de la cause exacte constitue la pierre angulaire du traitement de l'anémie en cas d'infection par le VIH. Le dosage de l'EPO doit faire partie du processus diagnostique. L'administration de l'EPO réside dans l'exclusion de causes traitables telles que les points 3, 4, 5 et 6 et la présence d'un déficit en sécrétion endogène de l'EPO chez un patient avec des réserves en fer normales ou augmentées [13].

Au vu de cette liste non exhaustive, l'utilisation de l'EPO en thérapeutique se développe considérablement. L'EPO permet d'envisager aussi bien la correction d'anémie dans des pathologies diverses que des perspectives prometteuses dans le domaine transfusionnel. Des extensions d'AMM vont probablement être apportées pour les spécialités commercialisées. Néanmoins, parallèlement à ces utilisations thérapeutiques, l'EPO a depuis longtemps été détourné de son usage premier au profit du dopage sportif.

III. Érythropoïétine et dopage sanguin

Le dopage se définit comme étant un acte visant artificiellement à l'amélioration des performances sportives. D'après le dispositif français de lutte contre le dopage (loi n° 99-223 du 23 mars 1999), il est interdit à toute personne de mettre en œuvre des moyens ou de prendre des substances naturelles ou synthétiques, en vue d'améliorer artificiellement ses capacités, au cours d'une compétition ou en vue d'y participer et qui portent préjudice à l'éthique sportive et à l'intégrité physique et psychique de l'athlète. Sont également interdits tous les moyens susceptibles de masquer l'utilisation illicite de produits non autorisés. Une liste déterminant l'ensemble des produits définis comme étant interdits est régulièrement mise à jour par le Ministère de la Jeunesse et des Sports, et celui de la Santé [29, 122, 127].

Le dopage dans le sport est une pratique connue de longue date, même si elle tend à être niée ou minimisée dans les milieux sportifs. Le développement de la pharmacologie a permis d'enrichir la panoplie des produits dopants. En effet, après les amphétamines et les anabolisants, ce sont maintenant les produits issus de la biotechnologie qui hantent les milieux

sportifs. C'est en particulier le cas de l'hormone de croissance, qui augmente la trophicité et la force musculaire, et de l'érythropoïétine, qui accroît la capacité de transport de l'oxygène. Les méfaits cardiaques des amphétamines ainsi que les répercussions, notamment gonadiques, de l'utilisation des anabolisants sont bien connus. Les effets secondaires de l'EPO, peut-être plus sournois, sont loin d'être négligeables et plusieurs décès parmi de jeunes cyclistes lui ont été imputés récemment. Le scandale du dopage à l'EPO, sciemment organisé tel qu'il a été étalé dans la presse lors du tour de France 98, donne à réfléchir sur les dérives possibles de remarquables progrès pharmacologiques et technologiques [155].

A. Transport de l'oxygène et performance sportive

L'un des principaux facteurs de la performance physique dans les sports d'endurance (courses de fond, ski de fond, cyclisme...) est la consommation maximale d'oxygène (VO_2 max). Ce paramètre est défini comme étant le débit maximal d'utilisation de l'oxygène par les tissus et se mesure au cours d'un exercice physique progressif et maximal. La valeur de la VO_2 max pour un sujet donné fixe une limite supérieure en termes de performance physique mais ne constitue en aucun cas un facteur de prédiction de celle-ci. Les facteurs physiologiques susceptibles de limiter cette VO_2 max sont : le système pulmonaire, le débit cardiaque maximal, la capacité de transport de l'oxygène dans le sang (en particulier le contenu artériel en oxygène) et certaines caractéristiques des muscles squelettiques telles que la densité des capillaires, la concentration en enzymes, la densité mitochondriale. Chez l'individu sain, dans des conditions nutritionnelles optimales garantissant le maintien d'un stock de glycogène musculaire suffisant, il semblerait que le facteur limitant principal de la VO_2 max soit la capacité du système cardiovasculaire (cœur, poumons et sang) de transporter l'oxygène aux muscles ; d'où l'idée qu'une augmentation « artificielle » du transport de l'oxygène devrait améliorer la performance dans les sports d'endurance [9, 10, 155].

B. Méthodes d'augmentation du transport d'oxygène

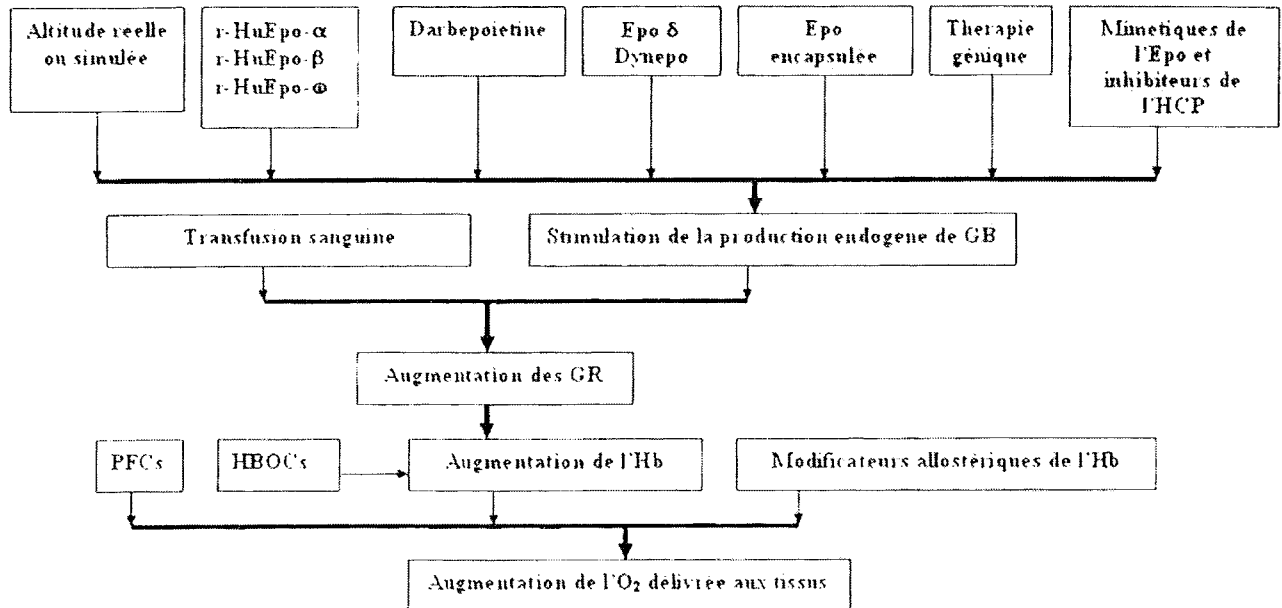


Figure 28 - Différentes méthodes permettant d'augmenter la délivrance d'oxygène aux muscles [9].

1. L'entraînement en altitude

La première idée fut d'accroître la concentration sanguine en hémoglobine en augmentant le nombre d'érythrocytes circulants. La méthode la plus ancienne et la plus naturelle consiste à s'entraîner en altitude. La pression partielle en oxygène diminuant en altitude, l'organisme réagit à cette hypoxie en sécrétant de l'EPO. L'évolution de la concentration en EPO est alors biphasique : augmentation initiale rapide puis décroissance progressive pour atteindre des valeurs proches de la normale. La concentration en hémoglobine augmente du fait d'une diminution du volume plasmatique ; ensuite l'élévation de cette concentration reflète une polyglobulie variée dont l'intensité dépend de l'altitude et de la durée du séjour (+ 1 g/l par semaine à 2500 m). L'hématocrite accru facilitera le transport en oxygène et permettra d'augmenter les performances sportives, surtout juste après le retour dans des conditions ambiantes normales en oxygène. Cette observation a amené de nombreux sportifs d'élite français à faire des stages en altitude, comme par exemple, au centre d'entraînement de Font-Romeu [9, 127, 155].

Il existe d'autres variantes non naturelles simulant la composition de l'air en altitude et permettant de reproduire un entraînement en altitude. La technique la plus connue est « dormir haut et s'entraîner bas ». Cette méthode repose sur le concept suivant : vivre en altitude peut augmenter, entre autres, la capacité sanguine de transport de l'oxygène, mais la diminution de la pression partielle en oxygène limite la fréquence, l'intensité et la durée de l'effort lors de l'entraînement. « Vivre haut » et « s'entraîner bas » permettrait donc à la fois de bénéficier des adaptations physiologiques liées à l'altitude et de maintenir des charges d'entraînement élevées. Différents dispositifs (chambres hypoxiques ou hypobares) permettent aujourd'hui de pratiquer cette méthode sans résider en altitude, toutefois l'effet sur l'érythropoïèse et en particulier sur l'augmentation de la concentration en hémoglobine est peu important tant que l'altitude simulée reste inférieure à 3000 mètres [9, 10].

2. L'érythropoïétine

Les premières suspicions de dopage à l'EPO apparaissent dès 1987. Depuis, de nombreux auteurs dénoncent cette nouvelle forme de dopage, en soulignant notamment les dangers qui l'accompagnent.

Les effets théoriques de l'administration d'EPO sur la performance rentrent dans le vaste débat sur les facteurs limitant la performance en endurance. La question de savoir si la consommation maximale d'O₂ est limitée par l'apport ou bien par l'utilisation de l'oxygène se pose pour les physiologistes et n'est toujours pas résolue [80].

Une augmentation d'EPO élevant l'hématocrite développe la capacité de transport en oxygène du sang. Certains milieux sportifs voient dans son utilisation un moyen d'améliorer leur niveau de performance sportive d'endurance par un meilleur apport d'oxygène au niveau des tissus musculaires. En utilisant l'EPO, les sportifs cherchent une élévation du nombre de globules rouges et de la concentration en hémoglobine. Ainsi, leur endurance et leur capacité d'adaptation aux stages d'endurance, en particulier en altitude, sont meilleures. Certains auteurs ont montré qu'une augmentation d'hémoglobine entre 1 et 2,5 g/dl s'accompagne d'une augmentation significative de la VO₂ max et de la performance pour les activités physiques dont l'apport en oxygène constitue un facteur limitant comme la course de fond ou le ski de fond [29].

Selon Ekblom et Berglund, il n'y a aucune différence entre le gain de performance obtenu par une augmentation provoquée brusquement par transfusion sanguine ou consécutive à une prise d'EPO. Mais l'utilisation de l'EPO a des effets hématologiques beaucoup plus

importants et est également plus facile à gérer sur le plan matériel : l'athlète peut se faire les injections lui-même, sans surveillance. Comme autre argument, on peut retenir une durabilité dans les effets, puisqu'ils perdurent jusqu'à plus de 3 mois [29].

Les avantages procurés par ce dopage pour le sportif occultent trop rapidement les dangers qu'une telle pratique suppose. En effet, l'utilisation abusive d'EPO conduit inévitablement à des complications. Chez le sportif, il semble bien que le problème majeur secondaire à une augmentation exagérée de l'hématocrite consiste en un accroissement dangereux de la viscosité sanguine. Cet effet peut encore être aggravé par la déshydratation suivant les efforts intenses et prolongés. Les effets délétères de l'hyperviscosité, en particulier le risque de thromboses artérielles et veineuses, pourraient aussi être accentués par le ralentissement exagéré de la fréquence cardiaque. La bradycardie physiologique, bien connue chez le sportif d'endurance de haut niveau, est aggravée la nuit lorsque le tonus sympathique est réduit au minimum, et davantage encore en cas d'hématocrite accru. Il est intéressant de noter que plusieurs décès répertoriés ces dernières années chez de jeunes cyclistes sont survenus en plein sommeil, et non lors d'un effort intense comme on aurait pu s'y attendre. Les causes exactes des décès ne sont cependant pas connues avec certitude et pourraient correspondre à des infarctus du myocarde, des thromboses cérébrales, voire des embolies pulmonaires [75, 138, 155].

3. Les produits du futur

a) Les mimétiques de l'EPO

Le coût des traitements classiques à l'EPO mais aussi leur possibilité d'induire des réactions immunologiques et la nécessité de conditions spéciales de conservation ont conduit à la recherche de nouvelles molécules, notamment peptidiques, capables de se fixer sur le récepteur cellulaire de l'EPO et de stimuler l'érythropoïèse [10].

b) Les micro-bioréacteurs

Il s'agit de micro capsules de céramique contenant des cellules génétiquement modifiées pour produire de l'EPO. Elles sont conçues de manière à laisser entrer les fluides nutritifs nécessaires à la survie des cellules et à laisser sortir des déchets et la protéine produite : elles

protègent également ces cellules de l'attaque des éléments du système immunitaire de l'hôte. Ces capsules sont insérées sous la peau et peuvent être retirées lorsque la valeur souhaitée de l'hématocrite est atteinte [10].

c) La thérapie génique

Depuis quelques années plusieurs équipes ont démontré la faisabilité du transfert du gène de l'EPO chez les rongeurs et les primates ainsi que la régulation de sa sécrétion. Le laboratoire Oxford Biomedica a mis au point un vecteur viral, le Repoxygen[®], permettant de délivrer le gène de l'EPO humaine aux cellules musculaires. Ce gène est sous le contrôle d'un ensemble de gènes portant le motif « Hypoxia Regulatory Element » qui permet une régulation de la production d'EPO *in situ* via les cellules musculaires. Ce produit est aujourd'hui au stade des essais précliniques [10].

Devant l'utilisation croissante de l'EPO lors de manifestations sportives et principalement dans le cyclisme, les instances dirigeantes ont demandé la mise en place de tests de dépistage fiables et pratiques pour une identification rapide des fraudeurs.

C. Détection de l'usage illicite de l'érythropoïétine

1. Dépistage direct

Le dépistage du dopage à l'aide de composés endogènes, tels que la transfusion autologue ou l'EPO, est complexe : il est nécessaire de faire la différence entre une production endogène et un apport exogène du produit incriminé.

Les premières méthodes permettant de doser la concentration plasmatique de l'EPO reposaient sur des techniques immunoenzymologiques, radioimmunologiques ou radioimmunométriques. Cependant, si elles sont utilisées en milieu clinique pour le diagnostic de certains types d'anémies et de polyglobulies, ces techniques de dosages ne peuvent être suffisantes. En effet, l'EPO endogène est sujette naturellement à de très fortes variations [29]. L'EPO recombinante est produite par génie génétique à partir de cellules de mammifères (d'ovaires de cobayes chinois pour les formes α et β , de reins de jeunes cobayes pour la forme ω). Ces molécules recombinantes présentent, par rapport à l'EPO endogène, des différences structurales au niveau des chaînes glycosylées ayant des conséquences sur leurs mobilités

électrophorétiques. C'est ainsi qu'en 1999, Françoise Lasne et Jacques de Ceaurriz, directeur du LNDD (Laboratoire National de Dépistage du Dopage), mettent au point un test urinaire infailible constituant l'avancée la plus remarquable dans la lutte anti-dopage de ces dix dernières années. Ce test permet la détection de l'utilisation illicite des différentes époétines (α , β et ω) mais également celle de la darbépoïétine. Utilisé pour la première fois aux Jeux Olympiques de Sydney, en 2000, il sera dans un premier temps doublé par un test sanguin indirect, mettant en évidence, non pas la présence d'EPO, mais ses effets : hématicrite élevée, taux de fer élevé (la prise de fer est généralement associée à la prise d'EPO)... Depuis 2003, le test mis au point à Châtenay-Malabry est utilisé par l'ensemble des laboratoires antidopage du monde entier et ne nécessite plus de dosage sanguin [9].

Néanmoins, ce dépistage « direct » rencontre deux problèmes. Il devient inefficace quelques jours après arrêt des injections à cause de la courte demi-vie de l'hormone. L'effet dopant, par contre, peut subsister durant une à trois semaines après la fin du traitement. De plus, l'époétine- δ , la quatrième des EPO synthétiques, est produite par une lignée de cellules humaines. Elle est très proche de l'EPO endogène, et ne peut donc être distinguée de cette dernière lors des tests urinaires [9].

2. Dépistage indirect

Anticipant sur les difficultés que rencontrerait le dépistage direct de l'EPO, à cause de sa courte demi-vie et de la mise au point de nouveaux produits structurellement plus proches du composé endogène, des auteurs avaient proposé, d'associer au dépistage direct, des méthodes « indirectes » de dépistage de « l'accélération illicite » de l'érythropoïèse. Le principe de cette approche consistait à rechercher, au niveau sanguin et urinaire, des composés endogènes, ou marqueurs biologiques, qui varieraient au-delà du domaine de leurs valeurs physiologiques normales suite à l'administration d'EPO mais également de toute substance susceptible d'augmenter l'érythropoïèse par les mêmes voies que l'EPO (peptides mimétiques par exemple).

a) Morphologie érythrocytaire

Conconi a mis en lumière un certain nombre de modifications de la morphologie érythrocytaire consécutives à une prise d'EPO. Il décrit une augmentation du volume globulaire moyen et une diminution de la concentration corpusculaire en hémoglobine après injection d'EPO chez des sujets sains. Selon cette étude, il serait possible de révéler une prise

exogène d'EPO par la mesure du rapport entre le volume globulaire et la teneur corpusculaire en hémoglobine. Ainsi, le pourcentage de cellules macrocytaires et hypochromes serait un moyen permettant la différenciation chez des sujets sains, entre ceux ayant suivi ou non un traitement par EPO. Cette technique, présentée lors d'un symposium international, reste à l'étude [29].

b) Fibrinolyse

En augmentant le nombre d'érythrocytes, un traitement à l'EPO entraîne une hyperviscosité du sang. Celle-ci est responsable de petites réactions locales de coagulation. Ce phénomène correspond à la conversion du fibrinogène en fibrine, catalysée par la thrombine. Pour éviter la thrombose, la plasmine joue un rôle important en permettant la fibrinolyse.

Des travaux étudiant les effets d'un traitement à l'EPO sur le système de coagulation ont été poursuivis chez l'homme et chez l'animal. Des administrations de 200 à 250 UI/kg d'EPO à des lapins ont permis d'induire au niveau de l'urine une augmentation du fragment D-dimère résultant de la dégradation de la fibrine. Or le dosage de la concentration du fragment D-dimère est un bon reflet de l'augmentation de l'activité de la fibrinolyse. Chez des patients hémodialysés insuffisants rénaux, l'élimination par l'urine des produits de dégradation qui résultent de la lyse de la fibrine (FbDP) et du fibrinogène (FgDP), lors d'études comparatives entre des patients traités à l'EPO et des patients non traités, montre une augmentation très significative des FbDP urinaires mais pas de FgDP, qui sont trop larges pour être filtrés par le glomérule. Ces résultats laissent entrevoir que des administrations d'EPO peuvent éventuellement être décelées dans l'urine en se fondant sur les produits de dégradation de la fibrine. De plus, si on sait que l'activité fibrinolytique augmente à l'exercice, cette réaction est considérée comme négligeable [29].

c) Récepteurs solubles à la transferrine

Synthétisée au niveau du foie, la transferrine est une protéine β_1 -globuline fixant deux atomes de fer. Elle délivre le fer aux cellules par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire spécifique à la transferrine (Tfr). Grâce à celui-ci, la transferrine pénètre dans la cellule et y délivre le fer. Chez un adulte normal, les cellules érythrocytaires de la moelle osseuse représentent environ 80 % des cellules possédant ce récepteur membranaire et cette proportion ne varie pas avec une augmentation de la stimulation de l'érythropoïèse. Leur densité membranaire passe d'un nombre peu élevé sur les progéniteurs érythrocytaires à un

maximum de l'ordre de 800.000 sur les normoblastes intermédiaires, puis leur nombre redescend à 100.000 sur les réticulocytes pour n'être plus que très peu à la surface du globule rouge mature. Au cours des différentes étapes de la maturation des globules rouges, la partie extracellulaire du récepteur est amputée par protéolyse et rejetée dans le plasma, où elle peut être dosée comme récepteur soluble à la transferrine (Tfrs).

Une étude réalisée par le Pr Audran et al. a permis de mettre en évidence l'intérêt du suivi du rapport concentration plasmatique du récepteur soluble de la transferrine sur ferritine (Tfrs/fe). L'augmentation de la production d'érythrocytes provoque une élévation de la concentration plasmatique des Tfrs et un abaissement de celle de la ferritine. Certes une élévation des Tfrs peut également traduire un trouble du métabolisme du fer, mais cela est facilement décelable et exclut toute confusion [9, 29].

d) Hématocrite

Depuis 1997, une procédure inédite de lutte contre le dopage à l'EPO a été mise en place. Ainsi, 20 coureurs cyclistes ont dû se soumettre à une prise de sang avant le début de la course Paris-Nice pour mesurer l'hématocrite. Dans le cas d'un taux dépassant le seuil fixé à 50 %, dans le cadre de la médecine du travail évaluant les risques iatrogènes et d'hyperviscosité, le coureur reçoit une contre-indication médicale à la pratique d'un sport de haut niveau. L'EPO provoquant une augmentation de l'hématocrite, une telle procédure se veut capable de diminuer les incidents, voire les accidents, chez les utilisateurs d'EPO. Cette décision d'un taux limite a été prise par la Commission Sécurité et Condition du Sport (CSCS) de l'Union Cycliste Internationale (UCI). Elle s'appuie sur des travaux internes de 1988 retrouvant dans la population de cyclistes de haut niveau un hématocrite moyen proche de 45 %. Elle est confortée par des travaux scandinaves sur les skieurs de fond. Il a été prévu que cette valeur puisse être remise à jour. Néanmoins, ce seuil limite est très contesté. Les normes généralement admises sur des appareils de type Coulter (utilisés lors des analyses anti-dopage) sont compris entre 37 et 47 % chez la femme adulte et entre 40 et 54 % chez l'homme adulte. De plus, d'autres facteurs peuvent agir sur l'hématocrite, comme par exemple un séjour en altitude ou une déshydratation. Il n'est donc pas possible de certifier que ce taux élevé d'hématocrite est lié à une utilisation illicite d'EPO ou à une adaptation endogène ; mais le souci de protection de la santé chez les sportifs, qui a poussé à prendre cette décision, ne peut être que louable. Les coureurs ne sont donc pas déclarés « dopés » mais inaptes. Cette inaptitude temporaire à la pratique du sport de haut niveau pour une durée

de 15 jours se fonde sur les risques cardiovasculaires liés à la forte viscosité due à l'hémoconcentration. Dès sa première utilisation, cette pratique a écarté trois coureurs cyclistes. Ainsi, si cette procédure ne permet pas de mettre en évidence un dopage à l'EPO, elle peut toutefois s'avérer dissuasive [29, 80, 127, 155].

Dans l'état actuel de nos connaissances, le dépistage de l'EPO doit être fait en priorité à partir du test urinaire. Un test indirect peut servir de méthode de criblage (screening) permettant de détecter des athlètes susceptibles d'avoir pris de l'EPO. Le dépistage indirect par dosage des Tfrs serait cependant la seule méthode permettant de démasquer les athlètes ayant arrêté la prise d'EPO mais bénéficiant encore de son effet ergogène. Pour cela, il devra être suffisamment performant pour permettre de faire la différence entre athlètes traités par EPO et athlètes revenant d'un stage en altitude ou ayant subi des entraînements en hypoxie. L'étude des paramètres hématologiques et biochimiques ne permettant pas cette discrimination avec les exigences requises (pas plus de 1/10.000 de faux positifs, détection de 90 % des positifs), d'autres méthodes doivent être envisagées. Une solution serait de faire appel aux techniques de la biologie moléculaire, la méthode SAGE (serial analysis of gene expression) par exemple, afin de rechercher tous les gènes dont l'expression pourrait être affectée par l'administration de doses supra physiologiques d'EPO et d'utiliser la quantification de ces gènes pour un dépistage indirect de l'EPO. Une autre solution, de prime abord plus simple, serait d'établir un profil hématologique individuel des athlètes à partir de paramètres tels que l'hématocrite ou l'hémoglobine, les réticulocytes, la ferritine, les Tfrs, et de définir un intervalle de variation physiologique pour chacun d'entre eux en fonction du sexe de l'athlète et du sport pratiqué. Ces paramètres seraient ensuite mesurés un certain nombre de fois au cours de l'année. Tout écart supérieur à l'intervalle de variation physiologique, préalablement déterminé sur la population de sportifs concernés, conduirait à la mise au repos de l'athlète jusqu'au retour à la normale. L'intérêt d'une telle approche repose évidemment sur la fréquence des contrôles qui devra être suffisante pour dissuader les athlètes de recourir à l'usage de l'EPO ou, dans quelques années peut-être, à la thérapie génique [9].

A l'image de l'évolution des méthodes permettant d'accroître l'apport d'oxygène aux muscles (transfusion sanguine, EPO, transporteurs d'oxygène, modificateurs allostériques de l'hémoglobine et bientôt peut-être la thérapie génique), le dopage est en constante évolution, suivant de près toute innovation thérapeutique pouvant être détournée de sa vocation initiale

afin d'augmenter la performance. La lutte contre ce fléau nécessite de ce fait une veille permanente [9, 155].

Quatrième partie :

**État des lieux des
connaissances des
pharmaciens
d'officine**

Quatrième partie : Etat des lieux des connaissances des pharmaciens d'officine

I. Présentation de l'enquête

Utilisées en thérapeutique humaine depuis le début des années 1990, les spécialités à base d'EPO ne sont sorties de la réserve hospitalière qu'en 2005 (le 27 mai pour Eporex[®] et Neorecormon[®], le 1^{er} juin pour Aranesp[®]. Nous n'aborderons pas dans cette étude Dynepo[®], la dernière spécialité commercialisée le 16 octobre 2007). Des entretiens menés auprès de pharmaciens d'officine ont révélé que certains d'entre eux ne se sentaient pas suffisamment formés pour assurer une bonne délivrance de ces spécialités.

Devant cette constatation, l'idée de cette enquête est née. Nous nous sommes demandé si ce problème était généralisé ou non. Les pharmaciens connaissent-ils ces médicaments issus de la biotechnologie ? Comment se forment-ils à la délivrance de ces produits ? Quels conseils donnent-ils alors à leurs patients ?

Nous allons présenter les objectifs liés à cette enquête ainsi que la méthodologie utilisée pour les atteindre.

A. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de cette enquête est de dresser un état des lieux des connaissances des pharmaciens d'officine concernant ce médicament qu'est l'érythropoïétine deux ans après sa mise à disposition dans le circuit officinal.

B. Méthodologie

Pour atteindre au mieux ces objectifs, nous avons construit un questionnaire envoyé à 120 officines de Lorraine par l'intermédiaire des trois grossistes-répartiteurs de la région, la CERP, l'OCP et ALLIANCE SANTE.

Nous allons étudier l'élaboration du questionnaire en expliquant l'objectif attendu pour chaque question posée et nous exposerons ensuite les cibles de cette enquête.

1. Élaboration du questionnaire

Le questionnaire envoyé aux officines est rapporté en annexe de la thèse.

Partie A : Le pharmacien et la formation continue

Question 1 : Type de pharmacie

Cette question a pour but de déterminer l'influence du milieu environnemental de l'officine (rural, banlieue, centre-ville) sur la facilité d'accès aux soins des patients mais également sur les possibilités du personnel de l'officine pour se former.

Question 2 : Distance de la pharmacie à la grande ville la plus proche

Cette question complète la précédente sur l'accès des pharmaciens à la formation continue. Les réunions UTIP ainsi que celle des laboratoires ont lieu le plus souvent dans des grandes villes. La réponse demandée est exprimée en kilomètres.

Question 3 : Date d'obtention de votre diplôme

La réponse apportée permet d'estimer la proportion des jeunes diplômés fraîchement sortis des bancs de la faculté qui ont donc pu aborder les traitements par EPO dans leur cursus universitaire, des pharmaciens plus âgés qui ont l'obligation de remettre en question leurs connaissances et de participer à des formations continues.

Question 4 : Participez-vous à des formations continues ?

Cette question permet de déterminer à quelle fréquence le pharmacien suit des formations continues et donc dans quelle mesure il fait évoluer ses connaissances.

Partie B : Le pharmacien et l'érythropoïétine

Question 5 : Connaissez-vous ces spécialités ?

Question 6 : En avez-vous déjà délivré ? Si oui à quelle fréquence ?

L'intérêt de ces deux questions est de connaître l'importance des prescriptions des trois spécialités d'EPO dans l'officine et de nous renseigner sur la fréquence à laquelle le pharmacien est confronté aux patients.

Question 7 : Connaissez-vous leurs indications ?

Les trois spécialités Eprex[®], Neorecormon[®] et Aranesp[®] n'ont pas les mêmes indications dans leur AMM. Toutefois pour ne pas surcharger le questionnaire, nous avons décidé de regrouper ces indications en quatre groupes que nous avons déjà abordés dans le chapitre 3 « EPO, indications médicales ayant reçu une AMM ». Nous avons donc demandé aux pharmaciens combien d'indications ils étaient capables de citer, toutes spécialités confondues.

Question 8 : Connaissez-vous les modalités de prescription ?

Question 9 : Savez-vous comment vous les procurer ?

Question 10 : Connaissez-vous le mode de conservation de ces produits ?

Avec les questions 8, 9 et 10, nous voulons aborder les problèmes pratiques que le pharmacien d'officine est amené à rencontrer dans la délivrance de l'EPO : approvisionnement, conservation, prescription.

Question 11 : Connaissez-vous les modalités d'administration ?

Question 12 : Pourriez-vous citer quelques-uns de leurs effets indésirables ?

Le but de ces deux questions est de savoir si le pharmacien est en mesure de répondre aux interrogations que les patients peuvent se poser au quotidien sur leur traitement.

Question 13 : Quels conseils donnez-vous aux patients à qui vous délivrez ces produits ?

C'est une question ouverte qui nous permettra de recenser l'ensemble des conseils que les pharmaciens prodiguent à leurs patients sous EPO.

Question 14 : En résumé vous sentez-vous formés à la délivrance de ces spécialités ?

Question 15 : Qu'attendriez-vous de la part des laboratoires afin d'améliorer la dispensation ?

Le ressenti des pharmaciens sur leur capacité à dispenser l'EPO va nous permettre d'apporter des éléments de réponses à la problématique que nous avons posée. Un produit issu des biotechnologies comme l'EPO est-il plus difficile à délivrer qu'un autre médicament ? La 2^{ème} partie de la question amène les pharmaciens à réfléchir sur les solutions dont ils auraient besoin pour améliorer l'acte pharmaceutique face aux patients sous EPO.

2. Cible du questionnaire

Le questionnaire s'adressait aux pharmaciens d'officine titulaires ou adjoints.

Le choix du nombre de questionnaire a été discuté avec M. Trockle. Nous avons conclu sur une distribution de 40 questionnaires par l'intermédiaire des trois grossistes-répartiteurs de la région (CERP, OCP, ALLIANCE SANTE) soit un total de 120 questionnaires.

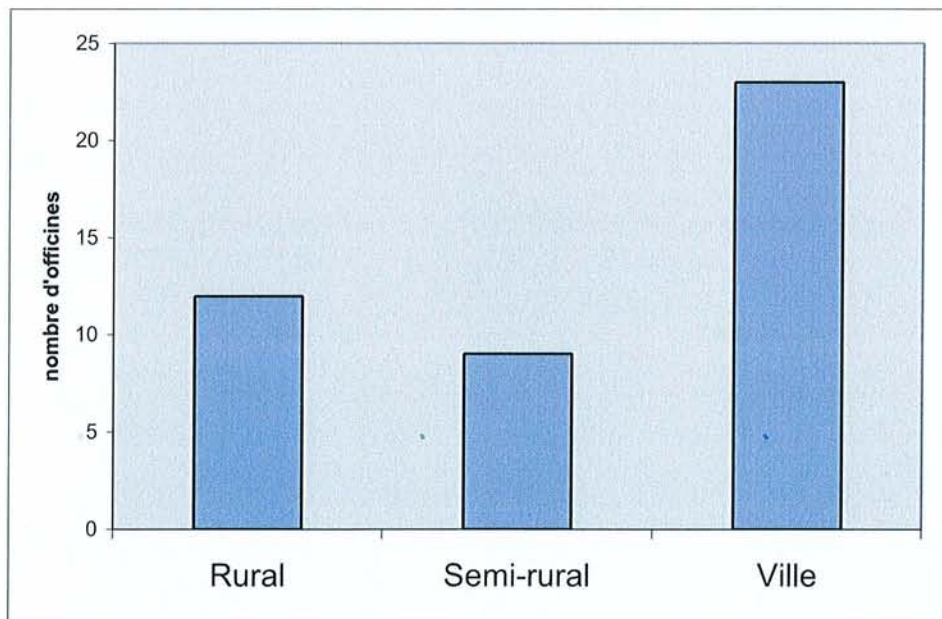
Le retour des enquêtes complétées s'est fait de la même façon par les grossistes-répartiteurs.

II. Résultats de l'enquête

Sur les 120 questionnaires envoyés fin janvier 2006, nous avons obtenu 44 réponses représentant ainsi 36,7 % de participation.

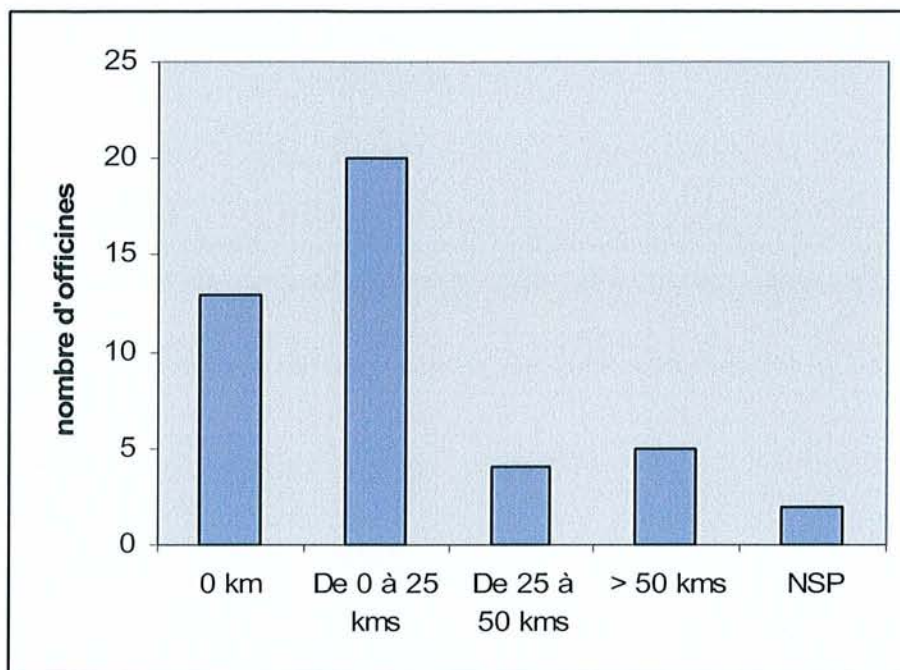
A. Le pharmacien et la formation continue

Question 1 : Type de pharmacie

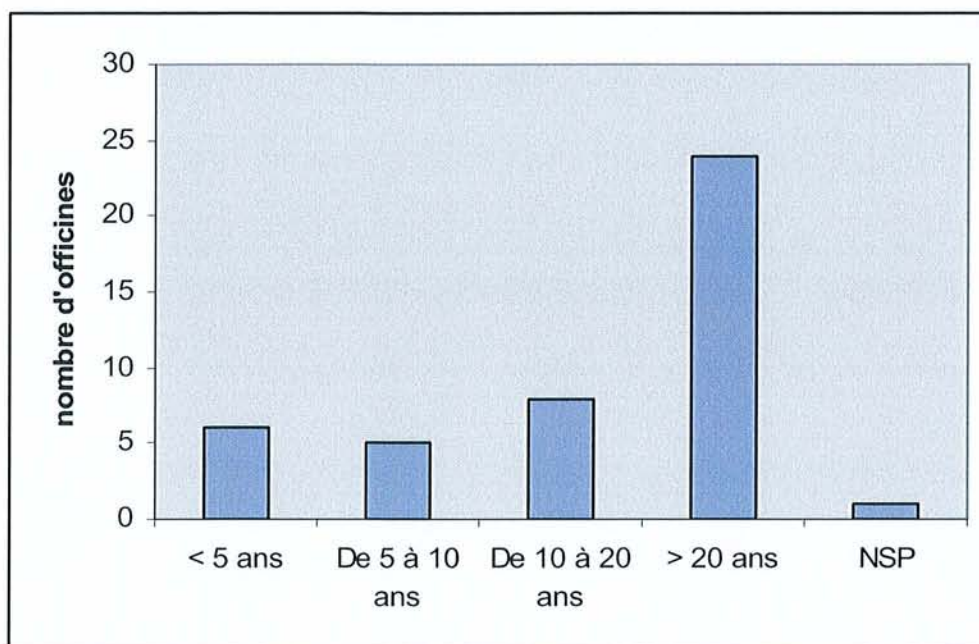


Les pharmacies d'officine ayant répondu à ce questionnaire sont majoritairement situées en ville ce qui, à première vue, semble un point positif en termes d'accès aux formations continues et de proximité aux hopitaux.

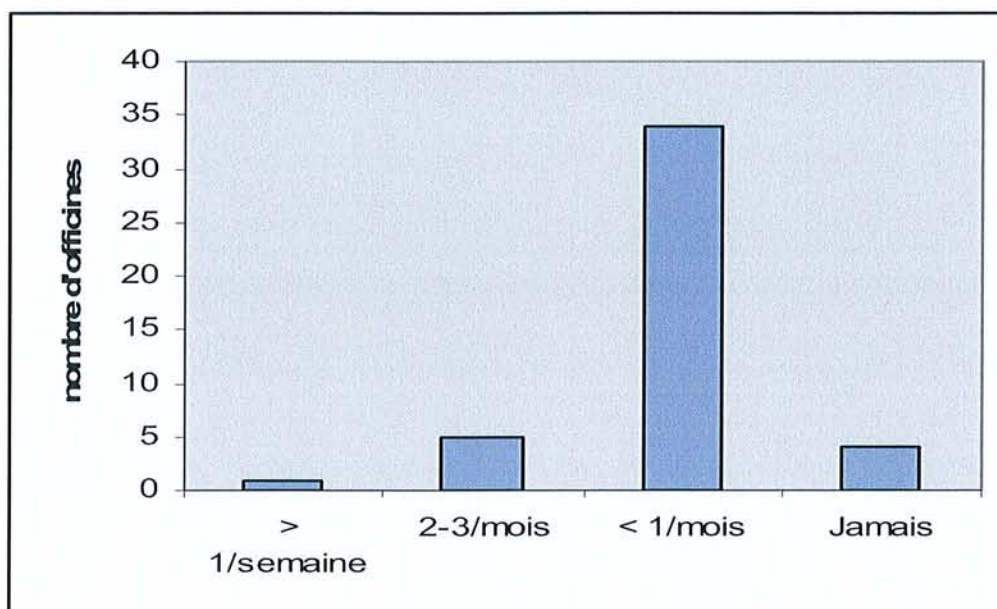
Question 2 : Distance de la pharmacie à la grande ville la plus proche



La distance de la pharmacie à la grande ville la plus proche est dans un peu moins de la moitié des cas de l'ordre de 0 à 25 kms. Environ 30 % des pharmaciens exercent dans une grande ville, à savoir sur le secteur : Nancy, Metz, Pont-à-Mousson, Toul ou Lunéville.

Question 3 : Date d'obtention de votre diplôme

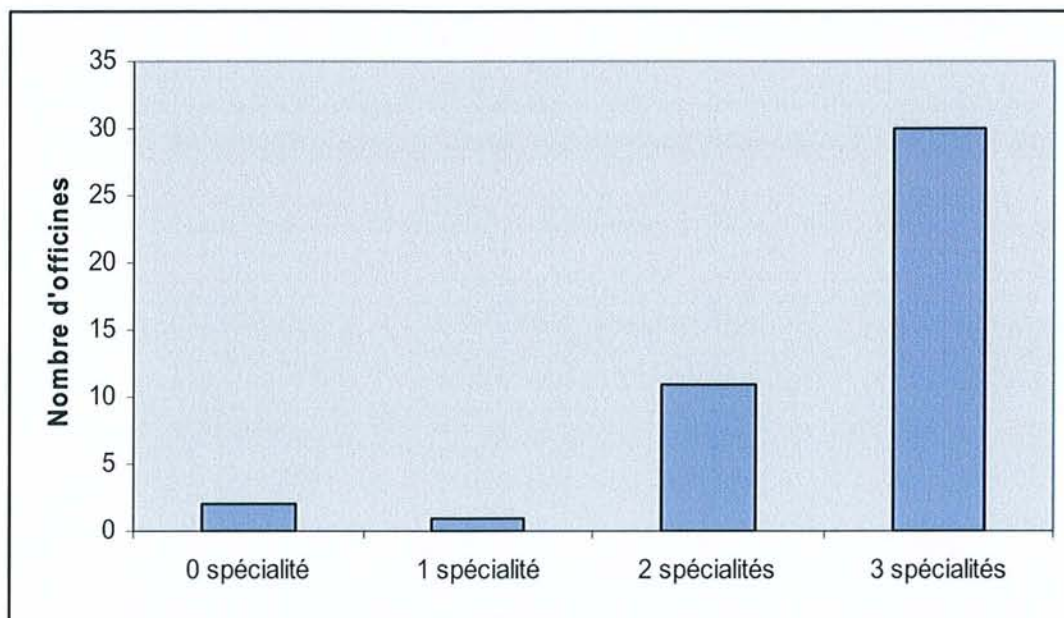
Un peu plus de la moitié des pharmaciens interrogés (54 %) sont diplômés depuis plus de 20 ans. Seuls 14 % ont moins de 5 ans d' « ancienneté », tandis que 40 % sont sortis de la faculté il y a entre 5 et 10 ans. Ces résultats reflètent bien la répartition des pharmaciens en Lorraine et principalement des pharmaciens titulaires [78]. La majorité des interrogés n'a donc pas pu aborder sur les bancs de la faculté l'utilisation thérapeutique des EPO, ce qui pourrait être un point négatif dans notre problématique.

Question 4 : Participez-vous à des formations continues ?

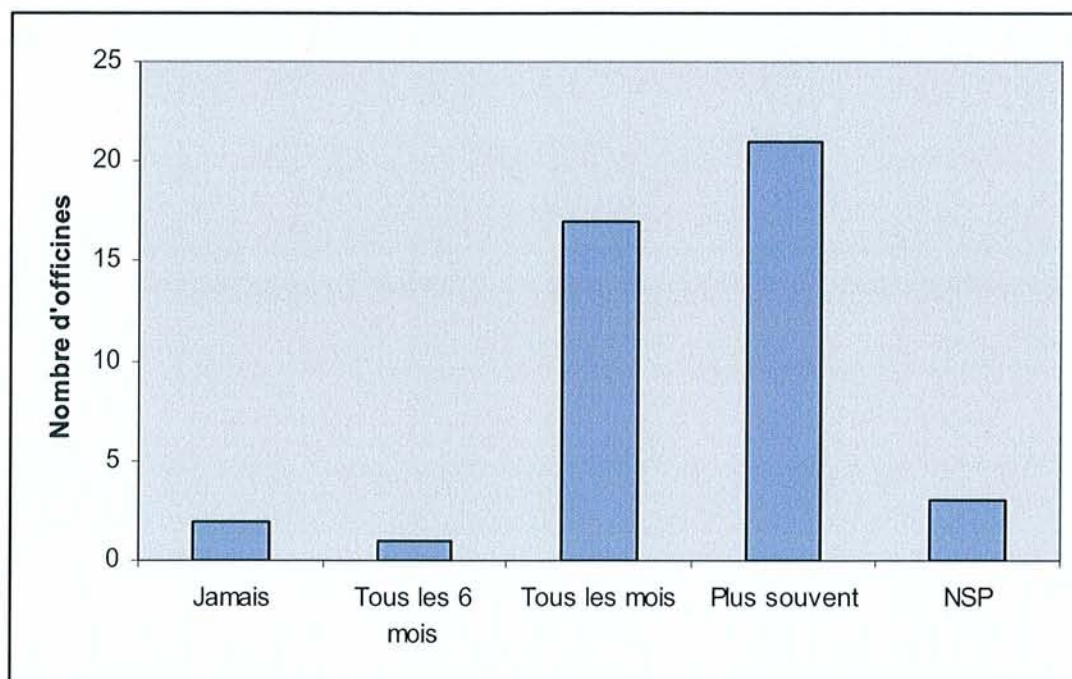
Sur la question des formations continues, plus de 3/4 des pharmaciens ont répondu y participer moins d'une fois par mois. Seul un pharmacien (ayant quitté la faculté il y a moins de 5 ans) se forme chaque semaine. Mais il a précisé sur le questionnaire qu'il incluait dans cette réponse la lecture des journaux professionnels tels que le Moniteurs des Pharmacies, le Quotidien des Pharmaciens ou Prescrire. A l'opposé, un pharmacien sur dix affirme ne jamais participer à ces formations continues. Il s'agit de pharmaciens ayant plus de 10 ans d'expérience et exerçant dans 75 % des cas en milieu rural. En effet, la localisation de la pharmacie conditionne l'accès à la formation continue car les pharmaciens qui assistent à 2 ou 3 formations par mois travaillent en ville ou à moins de 25 kms de la grande ville la plus proche.

B. Le pharmacien et l'érythropoïétine

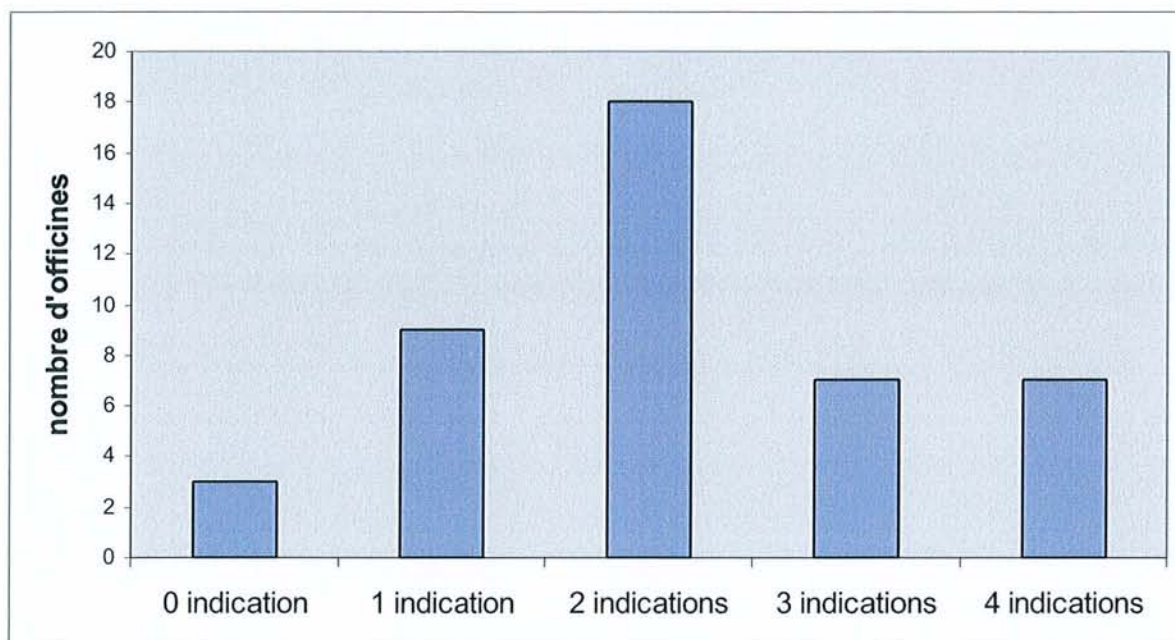
Question 5: Connaissez-vous ces spécialités ?



Seuls deux pharmaciens ne connaissent pas et n'ont jamais entendu parlé d'Epex[®], de Neorecormon[®] et d'Aranesp[®]. Plus de deux tiers des interrogés connaissent ces trois spécialités.

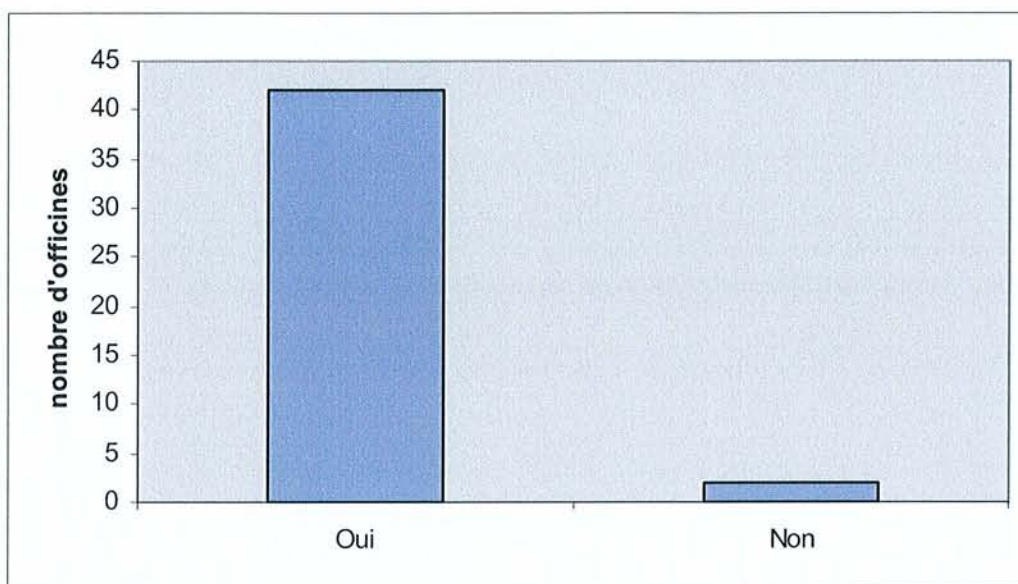
Question 6 : En avez-vous déjà délivré ? Si oui à quelle fréquence ?

Comme le montrent ces résultats, l'EPO est un médicament souvent délivré dans le réseau officinal. Plus de 38 % en « sortent » au moins une boîte tous les mois et 48 % plus souvent. Deux pharmaciens n'en délivrent jamais, ce sont les mêmes qui ne connaissent pas les spécialités.

Question 7 : Connaissez-vous leurs indications ?

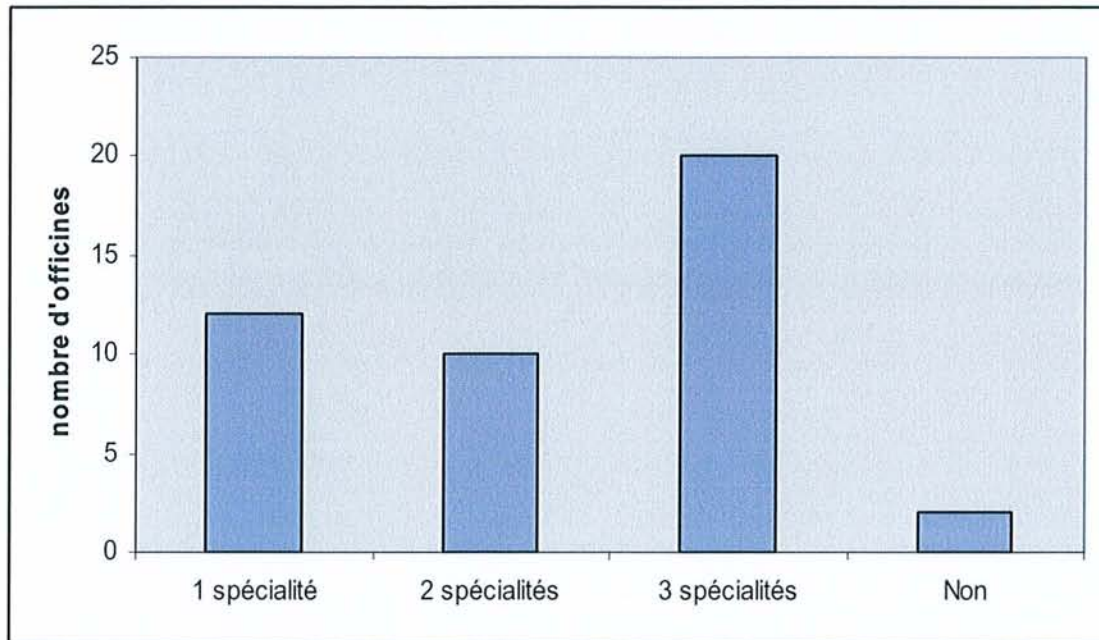
Les quatre groupes d'indications attendues comme présentés dans le chapitre 3 « EPO, indications médicales ayant reçu une AMM » sont les suivants : néphrologie, oncologie, chirurgie et néonatalogie. Il est vrai que cette classification simplifie le nombre d'indications existantes et peut faire l'amalgame entre les différentes EPO. Mais elle nous permet d'avoir une idée des connaissances des officinaux en termes d'utilisations thérapeutiques de l'EPO.

Seuls sept pharmaciens sur les 44 interrogés connaissent les quatre domaines d'utilisation de l'EPO. La majorité pourrait citer deux indications qui seraient à mon avis la néphrologie et l'oncologie, les deux premières indications à avoir reçu une AMM. Trois pharmaciens quant à eux sont incapables de dire à quoi sert l'EPO. Parmi eux on retrouve des pharmaciens qui n'ont jamais délivré ces produits ou au mieux tous les six mois.

Question 8 : Connaissez-vous les modalités de prescription ?

L'EPO est un médicament à prescription initiale hospitalière annuelle (PIH) de liste 1. Une ordonnance de médicament d'exception à 4 volets doit être établie à l'hôpital par tout médecin hospitalier ou par un médecin exerçant dans un service de dialyse à domicile. Le renouvellement de la PIH peut être effectué par tout médecin.

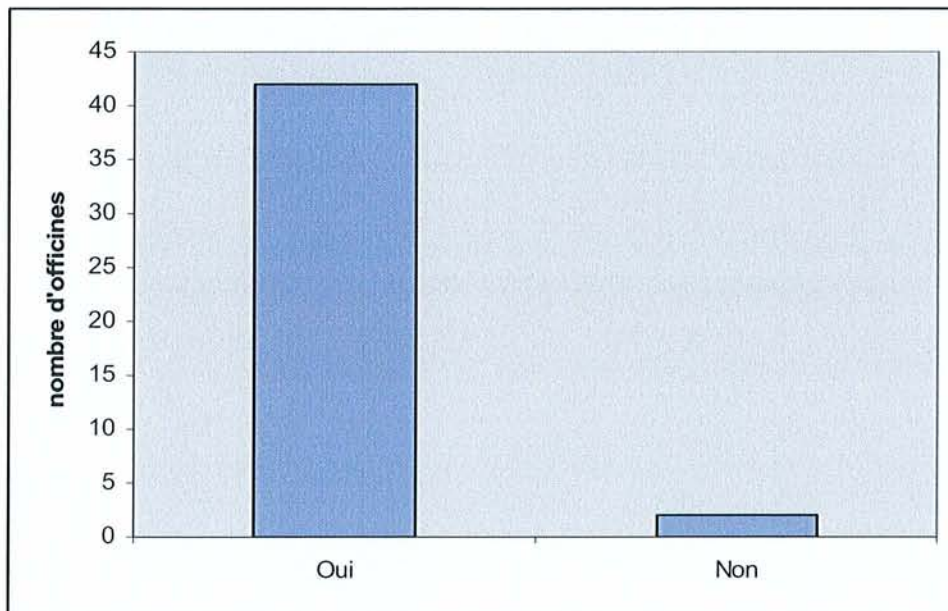
La quasi-totalité des pharmaciens interrogés (96 %) connaissent ces modalités de prescription. Les deux pharmaciens qui ont répondu non sont également ceux qui ne connaissent pas ces spécialités.

Question 9 : Savez-vous comment vous les procurer ?

Les laboratoires Roche qui commercialisent Neorecormon[®], ont créé un dispositif inédit. Ils ont signé un contrat particulier avec les grossistes-répartiteurs. Ces derniers référencent uniquement les présentations de Neorecormon[®] les plus prescrites (les seringues préremplies dosées à 10 000 UI, 20 000 UI et 30 000 UI) et distribuent une brochure informative à chaque livraison. La distribution des dix autres références, à faible rotation, est assurée directement par les laboratoires Roche (en 24 à 48h).

Les dix présentations d'Eporex[®] et les vingt présentations d'Aranesp[®] sont référencées par les grossistes-répartiteurs.

Un peu moins de la moitié des interrogés savent se procurer les trois EPO du marché mais cela s'explique facilement lorsque l'on regarde la proportion des pharmacies qui ne délivrent jamais ces produits. Ils n'ont pas besoin d'en commander et n'en connaissent donc pas les modalités.

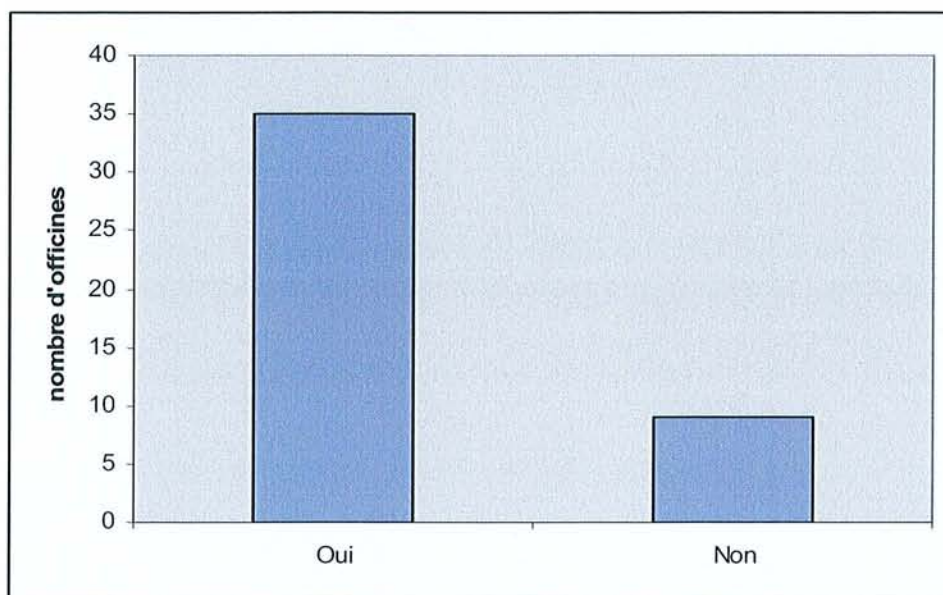
Question 10 : Connaissez-vous le mode de conservation de ces produits ?

Seuls les deux pharmaciens qui ne connaissent pas ces spécialités ne savent pas qu'elles se conservent au réfrigérateur entre +2° et +8°C et à l'abri de la lumière dans leur emballage externe. Néanmoins, il existe de légères différences en fonction des formes et des spécialités rencontrées.

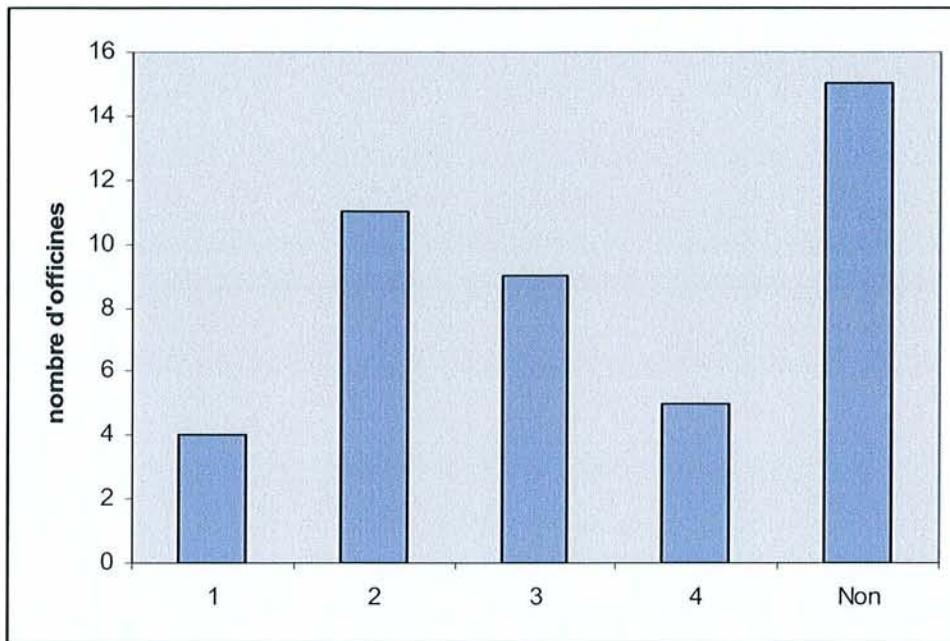
En effet, Eprex[®] peut être placé à température ambiante pendant une durée maximale d'une heure avant la réalisation de l'injection [99, 101].

La forme cartouche de Neorecormon[®] peut être placée à température ambiante (<25°C) durant une période unique de 5 jours. Après reconstitution, la solution est stable durant un mois au réfrigérateur. La forme seringue préremplie peut être gardée à température ambiante durant une période unique de 3 jours [102].

Aranesp[®] tolère une période de conservation de 7 jours à température ambiante sous réserve d'une utilisation dans cette période [96].

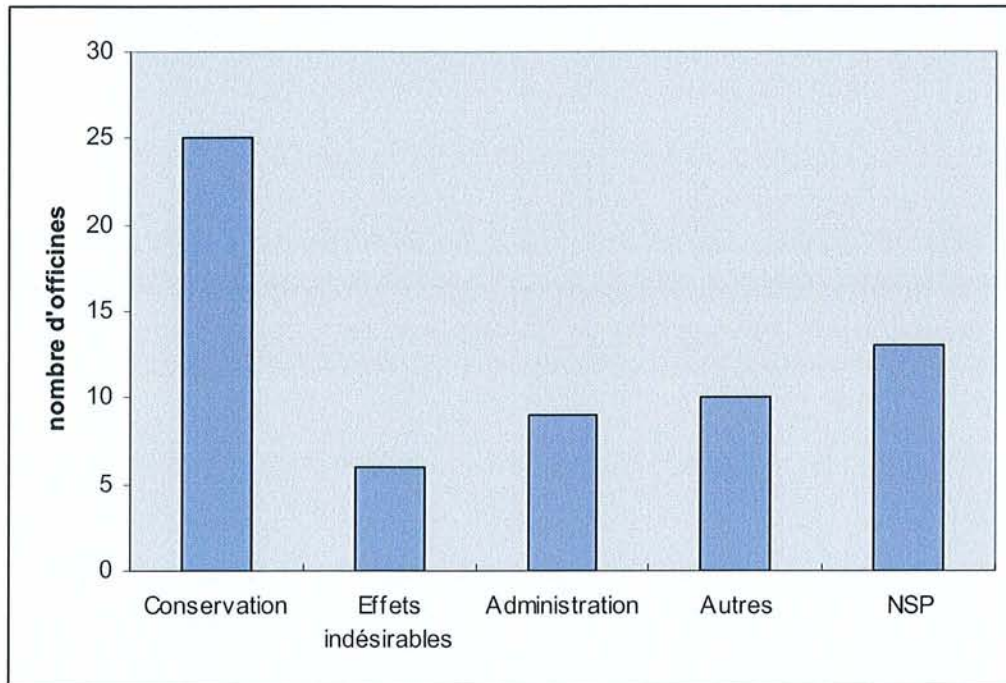
Question 11 : Connaissez-vous les modalités d'administration ?

Les médicaments sortis de la réserve hospitalière sont fréquemment des médicaments injectables que le patient peut lui-même s'administrer. Le pharmacien est donc habitué à ces modes opératoires comme le montrent les résultats ci-dessus. Plus de 3/4 des interrogés savent donc que la voie sous-cutanée est la voie préférée d'injection de l'EPO lorsque le patient n'est pas en dialyse ou lorsqu'il est en ambulatoire. Néanmoins, la voie intraveineuse continue d'être utilisée en particulier dans les protocoles de TAP et pour Eporex[®] chez les patients insuffisants rénaux chroniques chez qui la voie sous-cutanée est contre-indiquée.

Question 12 : Pourriez-vous citer quelques-uns de leurs effets indésirables ?

La majorité des personnes interrogées (66 %) savent qu'un traitement par EPO peut entraîner comme tout traitement des effets indésirables. On retrouve en particulier des douleurs au point d'injection, des céphalées pouvant être la conséquence d'une augmentation de la pression artérielle, des douleurs articulaires, une hyperkaliémie et plus gravement des thromboses et des crises convulsives.

Néanmoins, plus d'un tiers des pharmaciens ne connaissent pas ces effets indésirables. Ce sont principalement (67%) des pharmaciens qui sont diplômés depuis plus de 20 ans ou qui n'assistent jamais à des formations continues. Il devient indispensable que ces derniers réactualisent leurs connaissances. Connaître les effets indésirables d'un traitement permet d'apporter la réponse à une question posée par un patient ou d'orienter vers une consultation médicale lorsque le problème rencontré dépasse le seul cadre du conseil officinal.

Question 13 : Quels conseils donnez-vous aux patients à qui vous délivrez ces produits ?

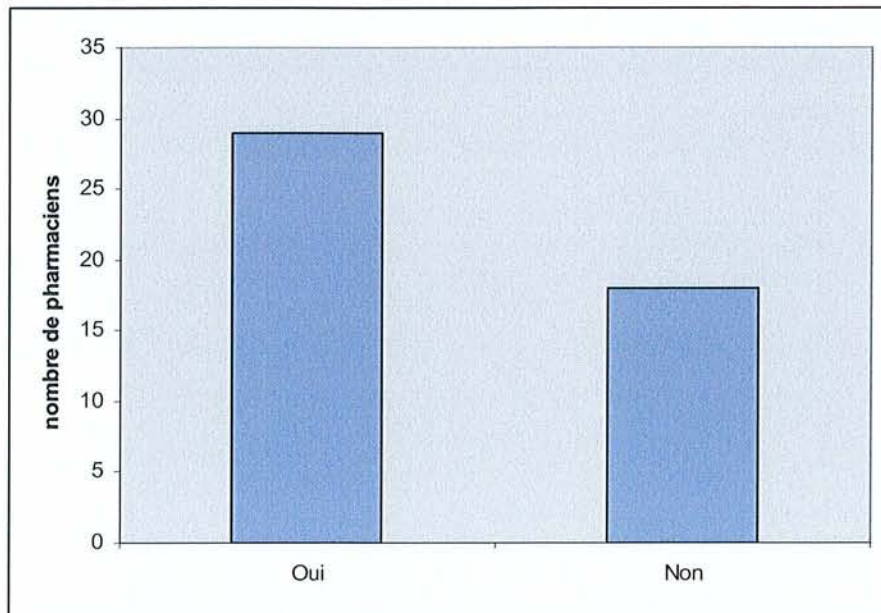
Le 1^{er} conseil officinal qui ressort de cette enquête concerne la conservation de ces spécialités (56 %). Comme nous l'avons vu précédemment, l'EPO est un produit de la chaîne du froid. Le pharmacien se doit de respecter ces conditions de conservation à l'officine mais également d'informer le patient sur ce point.

14 % des pharmaciens abordent également le problème des effets indésirables et 20 % parlent avec leur patient du mode d'administration. Le patient réalisant dans la plupart des cas lui-même les injections, il convient de préciser l'ensemble des conseils concernant l'auto-administration sous-cutanée du produit : grilles d'auto-injection (abdomen, bras, cuisse), respect des règles d'asepsie, utilisation de conteneurs à aiguilles. Avant de pratiquer l'injection, le patient doit laisser revenir à température ambiante la solution, il doit vérifier qu'elle ne comporte pas de particules en suspension et il ne doit pas agiter la seringue ou le flacon.

D'autres conseils sont apportés au patient chez 23 % des interrogés. Il concerne les examens de surveillance (statut martial, kaliémie, pression artérielle), le respect des traitements annexes (antihypertenseur, fer, éviter l'automédication) ou la remise de plaquettes d'informations données par les laboratoires.

Pour finir, il est à noter le nombre de pharmaciens qui ne se prononcent pas sur le point des conseils officinaux. Est-ce parce qu'ils n'en prodiguent pas au comptoir ? Dans ce cas, ce chiffre de 30 % de délivrances muettes est inquiétant.

Question 14 : En résumé vous sentez-vous formés à la délivrance de ces spécialités ?



A la problématique posée au départ : « Les pharmaciens d'officine se sentent-ils formés à la délivrance de l'EPO ? », 61 % des personnes interrogées répondent oui. Ce chiffre monte à 83 % pour les jeunes diplômés et à 71 % pour les « plus de 20 ans ». Parallèlement à cela, 41 % ne s'estiment pas suffisamment compétents et ne se sentent donc pas en confiance pour délivrer l'EPO dans les meilleures conditions. Ce chiffre atteint même 60 % chez les pharmaciens travaillant depuis 5 à 10 ans.

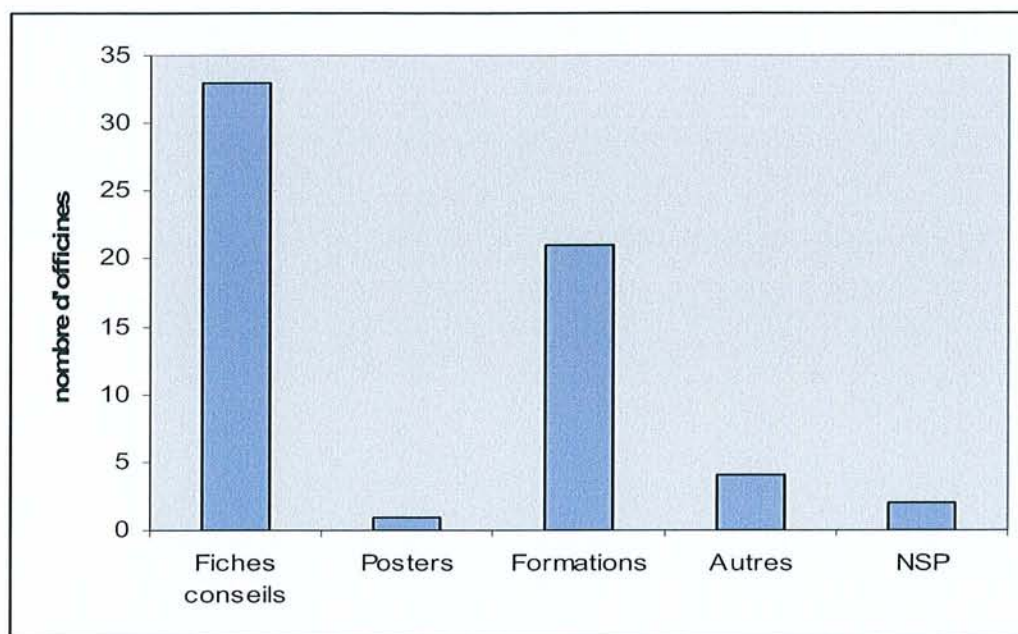
La majorité des réponses oui est retrouvée également dans les officines où l'EPO est fréquemment délivrée : 61 % et 70 % respectivement pour une sortie tous les mois et pour une délivrance plus fréquente. D'ailleurs, les pharmaciens qui n'en délivrent jamais ou qui en délivrent au mieux une fois par an ne se jugent pas préparés s'ils venaient à rencontrer une prescription.

Parmi les pharmaciens qui se trouvent qualifiés pour la délivrance, 21 % n'ont pas donné de conseils à la question précédente et réalisent donc des délivrances muettes.

On peut constater que la somme des différents pourcentages obtenus dépasse 100 car trois pharmaciens ont répondu oui et non à cette question. Ces trois pharmaciens (plus de 20 ans

d'expérience) soulignent bien le problème que pose la délivrance de produits sortis de la réserve hospitalière. Ces produits récents n'ont pas pu être abordés lors de la formation initiale des officinaux et nécessitent donc un renouvellement de leurs connaissances, qui apparaît mitigé au vu de ces résultats.

Question 15 : Qu'attendriez-vous de la part des laboratoires afin d'améliorer la dispensation ?



Afin d'améliorer la dispensation des spécialités à base d'EPO, les pharmaciens attendent de la part des laboratoires qu'ils leur mettent à disposition des fiches conseils (75 %) qu'ils pourraient distribuer à leurs patients au moment de la délivrance. Ces fiches pourraient contenir des informations sur la pathologie traitée, des conseils portant sur l'administration ou la conservation des produits ou des conseils hygiéno-diététiques pour le sujet anémique.

Un peu moins de la moitié des pharmaciens aimerait assister à des formations organisées par les laboratoires afin de mieux connaître le produit qu'ils délivrent et ainsi améliorer le conseil qu'ils peuvent apporter aux patients.

D'autres éléments ont également été cités comme la mise à disposition de posters que l'équipe officinale pourrait consulter à chaque délivrance, un site internet où le pharmacien et le patient pourraient trouver des informations concernant l'EPO ou la pathologie, des outils intégrés dans le logiciel professionnel ainsi que la mise à disposition de valisettes isothermes

(ce qui est déjà le cas par les laboratoires Roche pour Neorecormon[®] ou Janssen-Cilag pour Eprex[®]).

III. Discussion

Les résultats de cette enquête permettent d'apporter des éléments de réponses à la problématique posée au départ, « les pharmaciens d'officine se sentent-ils suffisamment formés à la délivrance de l'EPO ? ». 61 % des personnes interrogées répondent oui. Mais en analysant les réponses en fonction de la fréquence à laquelle les pharmaciens sont confrontés à ce médicament, de la localisation de l'officine ou de l'âge du pharmacien, les résultats varient énormément. Plus la fréquence de prescription de l'EPO est élevée et plus le pharmacien est en confiance pour délivrer ce produit. C'est le cas pour 70 % des officinaux qui en délivrent plusieurs boîtes par mois. En revanche, tous les pharmaciens qui n'y sont jamais ou pratiquement jamais confrontés ont répondu non à cette même question.

Par ailleurs, plus les pharmacies sont proches des villes donc des hôpitaux où l'EPO est prescrite ou des centres de formations continues et plus les pharmaciens s'estiment suffisamment qualifiés : 50 % des pharmaciens exerçant en zone rurale, 67 % en zone semi-rurale et 74 % en zone urbaine.

De plus, les « jeunes » diplômés ainsi que les pharmaciens de « plus de 20 ans » font partie du panel qui se sent le plus compétent pour délivrer l'EPO avec des réponses positives respectivement de l'ordre de 83 % et 71 %. Cela s'explique, pour les premiers, par le fait qu'ils ont abordé ces médicaments sur les bancs de la faculté mais pour les pharmaciens plus âgés, il y a une ambiguïté par rapport aux réponses apportées à la question 4 sur les formations continues. En effet, les pharmaciens qui exercent depuis plus de 10 ans font partie de ceux qui renouvellent le moins leurs connaissances. A la vue de cette constatation, nous avons repris les différentes réponses apportées à la question 4. Nous nous sommes rendu compte que l'intervalle de temps choisi n'était pas assez significatif et que la question était mal posée. Peut-être aurions-nous dû cibler sur la lecture de revues professionnelles ou sur la participation à des formations continues concernant l'EPO. C'est donc pour cela que nous n'utiliserons pas les réponses obtenues car elles n'apporteront rien de plus à ce travail.

Pour en revenir à l'analyse de ce questionnaire, un point important est à souligner. La question 14 dont nous venons de discuter précédemment permet de répondre en partie à la problématique posée mais d'un point de vue émotionnel : quel est le ressenti du pharmacien ?

Néanmoins, les réponses apportées aux autres questions permettent de déterminer concrètement les connaissances des pharmaciens. Ainsi on se rend compte que les spécialités à base d'EPO sont bien connues des officinaux. Même si seulement 61 % se disent suffisamment compétents pour délivrer, ils sont 96 % à connaître leurs modalités de prescription, leurs modes d'approvisionnement et de conservation et 80 % leurs modalités d'administration. D'ailleurs, les pharmaciens qui exercent depuis 5 à 10 ans ont répondu à 60 % ne pas se sentir en confiance pour délivrer l'EPO et pourtant, parmi eux, 2/3 ont répondu aux questions précédentes. Cela souligne bien toute l'ambiguïté qui se dégage de ce problème et nous essaierons d'y apporter quelques éléments de réponse.

Un autre point important est à soulever. Les réponses (ou plutôt les non-réponses) à la question 13 sont inquiétantes. 30 % des délivrances sont muettes. Aucun conseil n'a été donné aux patients, ne serait-ce que sur la conservation de ces produits. Parmi ces réponses, 40 % ont été faites par des pharmaciens qui se disent suffisamment formés. On peut également prendre le problème dans l'autre sens : 21 % des pharmaciens qui s'estiment compétents n'ont pas donné de conseils. Comment expliquer ces résultats ? Les patients sortant de l'hôpital ne demandent-ils aucun conseil à leurs pharmaciens parce qu'ils sont suffisamment informés sur leurs traitements ? Ce dernier manque-t-il d'outils pratiques pour communiquer avec le patient sur un produit aussi technique que l'EPO ? C'est en tout cas ce qu'il ressort de cette enquête où 75 % des interrogés attendent de la part des laboratoires des fiches conseils qu'ils pourraient remettre à leurs patients au moment de la délivrance.

D'autre part, près de la moitié des pharmaciens souhaiteraient que ces mêmes laboratoires s'investissent un peu plus en leur proposant des formations concernant leurs spécialités. Ces formations pourraient être organisées en partenariat avec les facultés ou les UTIP ou, comme c'est le cas pour d'autres médicaments, par la visite d'un délégué médical à la pharmacie. Il pourrait aborder rapidement la pathologie traitée et les points importants de la spécialité indispensables à un bon conseil officinal. D'ailleurs 13 des 29 pharmaciens se disant qualifiés à la délivrance de l'EPO désirent également plus de formations, ce qui renforce l'idée que pour eux l'EPO reste un médicament complexe dont ils ne maîtrisent pas encore tous les aspects.

Afin d'élargir le panel des pharmaciens interrogés et vérifier si les résultats de notre enquête sont cohérents avec ceux d'autres enquêtes déjà réalisées, nous avons appelé les trois laboratoires commercialisant les spécialités à base d'EPO. Seuls les laboratoires ROCHE

nous ont dit avoir réalisé une telle étude en 2006 en partenariat avec l'institut de sondage IPSOS. Par ailleurs, une recherche lancée sur Internet nous a révélé que la société KALIOPE avait réalisé en novembre 2005 une étude auprès de 200 pharmaciens hospitaliers et officinaux sur les rétrocessions à l'hôpital et les sorties de réserve hospitalière. Malheureusement les résultats n'ont pas été publiés et les directeurs de marketing n'ont pu nous fournir que les résumés de ces études.

Les pharmaciens officinaux ont des sentiments ambigus face aux nouvelles situations qui se présentent à eux. D'un côté, ils se sentent valorisés de pouvoir dispenser ces médicaments jusqu'alors réservés au milieu hospitalier. D'ailleurs les pharmaciens hospitaliers considèrent que les officinaux sont tout à fait aptes à délivrer ces médicaments et ils apprécient les services que peuvent offrir leurs confrères libéraux. Mais d'un autre côté, les pharmaciens d'officine s'évertuent à mettre de la distance entre la « technicité » de ces molécules et les retombées de leur dispensation en officine. Ils n'ont de cesse de mettre en avant la multiplicité des contraintes et des changements indispensables qui s'attachent à la dispensation de ces médicaments : la nécessité d'une formation préalable, le respect de la chaîne du froid, la mise à disposition d'un espace de confidentialité, le développement de relations avec les confrères hospitaliers [65]... Ce dernier point est d'ailleurs souligné dans l'étude réalisée par les laboratoires ROCHE. Les officinaux souhaiteraient un meilleur relais hôpital-ville des patients et notamment la mise en place d'appels téléphoniques lorsque ces derniers sont amenés à sortir de l'hôpital afin de pouvoir commander le produit adéquat.

Les laboratoires pharmaceutiques et les répartiteurs doivent donc être à l'écoute des pharmaciens pour :

- ✓ les informer sur les modifications de statut et les passages en ville de leurs produits,
- ✓ leur proposer des formations sur ces spécialités et les pathologies qui y sont liées,
- ✓ leur fournir des outils pour communiquer avec les patients et améliorer le suivi de leurs traitements (fiches conseils, valisette isotherme pour le transport...),
- ✓ les aider à optimiser les achats et la gestion des stocks de ces médicaments.

Conclusion

Conclusion

L'érythropoïétine est le principal facteur de croissance des globules rouges. Depuis sa découverte il y a un peu plus d'un siècle, des avancées considérables ont été faites aussi bien en termes de connaissances de cette hormone que de progrès industriels.

Ainsi l'essor des biotechnologies a permis la mise au point de techniques de recombinaison génétique permettant d'obtenir en quantité illimitée une glycoprotéine pure analogue de l'EPO endogène : l'érythropoïétine humaine recombinante. Cette production industrielle a ouvert la voie à l'utilisation thérapeutique dès 1989.

A l'origine, l'EPO s'est montrée efficace dans le traitement de l'insuffisance rénale chronique chez des patients sous dialyse péritonéale et hémodialyse. Le marché s'est ensuite étendu aux malades au stade de pré-dialyse puis chez les patients insuffisants rénaux non encore dialysés et enfin aux jeunes enfants.

D'autres pathologies bénéficient du traitement par EPO comme l'anémie lors de certains cancers traités par chimiothérapie contenant notamment des sels de platine particulièrement aplasians.

L'EPO a également trouvé sa place en néonatalogie : elle permet de prévenir le développement d'une anémie symptomatique chez le nouveau-né prématuré.

La mise sur le marché de l'EPO a modifié les stratégies transfusionnelles habituelles. Elle entre désormais dans les protocoles de transfusion autologue programmée (TAP) et chez les patients bénéficiant d'une chirurgie orthopédique majeure programmée qui n'ont pas accès à un programme de TAP.

D'autres indications se profilent, comme l'anémie de l'insuffisance cardiaque pour laquelle l'EPO semble pouvoir améliorer les symptômes et peut-être le pronostic des patients.

Elle peut être aussi employée pour corriger les anémies liées à une réponse médullaire inadéquate malgré des taux élevés d'EPO ; son association à d'autres facteurs de croissance hématopoïétique est prometteuse.

Il a aussi été décrit une méthodologie de culture *ex vivo* de globules rouges à partir de CSH stimulées par différentes combinaisons de cytokines. Ce concept de « globules rouges de culture » peut avoir des applications potentiellement considérables et notamment dans un but transfusionnel.

Cependant, les effets de l'EPO ne se limitent pas aux organes hématopoïétiques. Des récepteurs ont été découverts sur d'autres organes et en particulier le cerveau, le cœur et l'intestin. De nouvelles voies d'utilisation semblent ainsi apparaître.

L'EPO est donc une hormone qui a contribué à l'amélioration de la qualité de vie de bon nombre de patients et fait actuellement l'objet de nombreuses indications reconnues et en cours d'évaluation.

Parallèlement à l'extension du nombre d'indications de l'EPO, une autre utilisation non reconnue se développe. Il s'agit de l'introduction de l'EPO dans le monde du sport. Le tour de France 1998 et l'exclusion de l'équipe Festina ont révélé ce problème au grand public. L'EPO a été mise sur le marché en 1989 et durant près de 10 ans aucun test de dépistage efficace n'était capable de la déceler. Mais depuis quelques années, les instances sportives bénéficient de techniques fiables de dépistage :

- dépistage direct exploitant le fait que les charges électriques portées par les différentes formes d'EPO ne sont pas identiques,
- dépistage indirect mettant en évidence, non pas la présence d'EPO, mais ses effets : hémocrite élevée, récepteurs solubles à la transferrine et produits de dégradation de la fibrine augmentés.

Pourtant dès 1997, l'Union cycliste internationale a introduit des contrôles sanguins réguliers, beaucoup moins coûteux que les tests urinaires et appliqués à grande échelle : il est interdit aux coureurs cyclistes d'avoir un taux d'hémocrite supérieur à 50%. L'EPO provoquant une augmentation de l'hémocrite, cette procédure se veut capable de diminuer les incidents, voire les accidents, chez les utilisateurs d'EPO. Ainsi si elle ne permet pas de mettre en évidence un dopage à l'EPO, cette prévention se veut toutefois dissuasive.

Pendant 15 ans, l'EPO a été dispensée dans les hôpitaux. Les pharmaciens d'officine n'ont découvert ce médicament qu'en 2005, avec la sortie de réserve hospitalière. Une remise à niveau de leurs connaissances s'est donc imposée. Au vu des résultats de l'enquête, les

pharmaciens sont souvent confrontés à ces nouvelles spécialités et ils les connaissent assez bien : indications, modalités d'administration, de conservation, d'approvisionnement.

Malgré tout, une certaine ambiguïté apparaît dans les réponses apportées. En effet, même si la majorité des interrogés s'estiment compétents dans la délivrance de l'EPO, le pourcentage de « non » n'est pas anodin.

Devant la technicité toujours croissante des médicaments sortant de la réserve hospitalière et les pathologies lourdes pour lesquelles ils sont prescrits, le pharmacien d'officine est confronté à de nombreuses contraintes dans son exercice professionnel : respect de la chaîne du froid, mise à disposition d'un espace de confidentialité... Des actions simples pourraient être envisagées afin d'améliorer l'exercice officinal : un meilleur relais hôpital-ville ou une plus grande implication des laboratoires dans la formation des pharmaciens et la communication avec les patients.

Mais comme me le faisait remarquer un des pharmaciens interrogés : « l'EPO n'est-elle pas un médicament comme les autres ? Ne suffit-il pas de se former et de se tenir informé pour assurer une bonne délivrance ? »

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
 ADNc : ADN complémentaire
 ALAT : Alanine aminotransférase
 ARN : Acide ribonucléique
 ARNm : ARN messenger
 ARNT : Aryl hydrocarbore receptor nuclear transcativator
 ASAT : Aspartate aminotransférase
 ASE : Agent stimulant l'érythropoïèse
 ATP : Adénosine triphosphate
 BFU-E : Burst forming unit - erythroid
 BFU-Em : BFU-E mature
 BFU-Ep : BFU-E primitive
 BHE : Barrière hémato-encéphalique
 BHK : Baby hamster kidney
 BPA : Burst promoting activity
 CD : Clusters de différenciation
 CERA : Continuous Erythropoiesis receptor activator
 CFU-E : Colony forming unit - erythroid
 CFU-GEMM : Colony forming unit - granulocyte / érythrocyte / mégacaryocyte / macrophage
 CFU-MK: Colony forming unit mégacaryocyte
 CFU-S : Colony forming unit - spleen
 CHO : Chinese hamster ovary
 CLHP : Chromatographie liquide haute performance
 CRP : Protéine-C réactive
 CSH : Cellule souche hématopoïétique
 CSP : Cellule souche périphérique
 Da : Dalton
 DHFR : Dihydrofolate réductase
 DRESS : Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms
 EDTA : Acide éthylènediaminetétracétique ou acide édétinique

EGF : Epidermal growth factor
 EKLF : Erythroid Kupel like factor
 EPO : Erythropoïétine
 EPO-R : Récepteur à l'érythropoïétine
 FbDP : Produits de dégradation de la fibrine
 FEVG : Fraction d'éjection ventriculaire gauche
 FgDP : Produits de dégradation du fibrinogène
 GGT : Gamma glutamyl transférase
 GM-CSF : Granulocyte / Monocyte - colony stimulating factor
 Hb : Hémoglobine
 HCP : Hematopoietic cell phosphatase
 HIF-1 : Hypoxia-induced factor - 1
 HLA : Human leucocyte antigen
 HPP-CFC : High proliferative potentiel - colony forming cell
 HRE : Hypoxia responsive element
 IFN : Interféron
 IGF : Insuline like growth factor
 IL : Interleukine
 KIE : Kidney inducibility element
 KL : Kit ligand
 LIE : Liver inducibility element
 LLC : Leucémie lymphoïde chronique
 LTC-IC : Long term culture - initiating cell
 M-CSF : Macrophage - colony stimulating factor
 MAP-kinase : Mitogen actived protein - kinase
 MEC : Matrice extracellulaire
 MIF- α : Macrophage inflammatory protéine - α
 NESP : Novel erythropoiesis stimulating protein
 NRE : Negative regulatory element
 NYHA : New York Heart Association
 PAS : Per-ARNT-Sim
 PBS : Phosphate buffer saline
 PCR : Polymerase chain reaction
 PI3-kinase : Phosphatidylinositol 3 - kinase

PIH : Prescription initiale hospitalière
PPFC : Polyglobulie primitive familiale congénitale
PRCA : Pure red cell aplasia
PTFE : Polytétrafluoroéthylène
PTH : Parathormone
r-HuEPO : Erythropoïétine humaine recombinante
RIA : Radio immunoassay
SAH : Serum albumine humaine
SCF : Stem cell factor
SNC : Système nerveux central
STAT : Signal transducers and activators of transcription
TAP : Transfusion autologue programmée
Tfr : Récepteur membranaire à la transferrine
Tfrs : Récepteur soluble à la transferrine
TGF- β : Transforming growth factor - β
TNF- α : Tumor necrosis factor - α
TPO : Thrombopoïétine
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule – 1
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VHC : Virus de l'hépatite C
VHL : Von Hippel-Lindau

| |
|--------------------------|
| LISTE DES FIGURES |
|--------------------------|

| | |
|---|----|
| Figure 1 - Représentation schématique de l'hématopoïèse [128]..... | 4 |
| Figure 2 - Les cellules de la lignée érythrocytaire [111, 112]..... | 10 |
| Figure 3 - L'îlot érythroblastique [2]..... | 13 |
| Figure 4 - Évolution des marqueurs membranaires de la lignée érythrocytaire au cours de la différenciation [à partir de 24]. | 15 |
| Figure 5 - Niveau d'intervention des facteurs de régulation de l'érythropoïèse [128]. | 22 |
| Figure 6 - Place des facteurs inhibiteurs dans la régulation de l'érythropoïèse [128]..... | 26 |
| Figure 7 - Structure primaire de l'EPO [103]. | 29 |
| Figure 8 - Modèle de structure tridimensionnelle de l'EPO montrant les quatre hélices et les boucles de raccordement [104].. | 31 |
| Figure 9 - Le gène de l'érythropoïétine chez l'homme et la souris [193]. | 34 |
| Figure 10 - Régulation de la production d'EPO [99]..... | 35 |
| Figure 11 - Gène de l'érythropoïétine et du segment en 3' qui contient la séquence enhancer à laquelle le facteur de transcription HIF-1 se lie pour induire l'expression du gène [13]. | 36 |
| Figure 12 - Régulation cellulaire de l'expression de l'érythropoïétine [39]. | 38 |
| Figure 13 - Régulation de l'activité de la protéine HIF-1 α par la concentration intracellulaire en oxygène [137]. | 39 |
| Figure 14 - Régulation du gène de l'EPO [104]. | 41 |
| Figure 15 - Représentation schématique des différentes chaînes des récepteurs de cytokines [56]. | 43 |
| Figure 16 - Schéma explicatif des expériences de Rémy et al [118]. | 45 |
| Figure 17 - Représentation schématique des voies de signalisation induites par l'EPO [4]..... | 46 |
| Figure 18 - Représentation schématique des voies impliquées dans l'apoptose [44]..... | 50 |
| Figure 19 - Structure de la darbépoétine alfa ou NESP [167]..... | 64 |
| Figure 20 - Propriétés biologiques et biochimiques de la r-HuEPO et de ses analogues [58]. | 65 |

| | |
|---|-----|
| Figure 21 - Nomogramme établi par Van Wyck permettant de prédire les besoins en fer au cours d'un traitement par EPO [192]..... | 86 |
| Figure 22 - Principaux facteurs physiopathologiques impliqués dans l'anémie rénale [102].. | 92 |
| Figure 23 - Mécanismes physiopathologiques de l'anémie liée au cancer [169]. | 99 |
| Figure 24 - Calcul de la dose d'époétine- β (IV, SC) au cours d'un programme de TAP selon le sexe [102]. | 106 |
| Figure 25 - Mesures à prendre pour augmenter le volume globulaire des hématies et diminuer l'anémie des nouveau-nés prématurés [102]..... | 112 |
| Figure 26 - Hypothèse de la promotion tumorale par l'EPO [45]. | 125 |
| Figure 27 - Représentation schématique des étapes nécessaires à l'obtention ex vivo d'hématies humaines à maturité en culture [95]. | 135 |
| Figure 28 - Différentes méthodes permettant d'augmenter la délivrance d'oxygène aux muscles [9]. | 145 |
| Figure 29 - Régulation de la synthèse protéique de HIF-1 α indépendante de la pression en oxygène dans la cellule [34]..... | 187 |
| Figure 30 - Régulation détaillée de l'activité de HIF-1 dépendante de l'oxygène [34]. | 188 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 - Paramètres clés des différents agents stimulant l'érythropoïèse [174]. | 60 |
| Tableau 2 - Les causes d'une baisse d'efficacité de l'EPO [18]. | 80 |
| Tableau 3 - Doses d'entretien utilisées chez les enfants en hémodialyse [125]. | 93 |
| Tableau 4 - Facteurs régulant l'érythropoïèse (1/4) [128]. | 184 |
| Tableau 5 - Facteurs régulant l'érythropoïèse (2/4) [128]. | 185 |
| Tableau 6 - Facteurs régulant l'érythropoïèse (3/4) [128]. | 185 |
| Tableau 7 - Facteurs régulant l'érythropoïèse (4/4) [128]. | 186 |
| Tableau 8 - Risques liés à la transfusion allogénique [169]. | 186 |
| Tableau 9 - Avantages et inconvénients de la transfusion et de l'EPO [169]. | 187 |

Annexes

ANNEXES

Tableau 4 - Facteurs régulant l'érythropoïèse (1/4) [128].

| | EPO | GM-CSF | G-CSF | M-CSF | IL1 |
|--------------------|--|---|---|--|--|
| CHROMOSOME | 7q | 5q | 17q | 5q | 2q |
| LIEU DE PRODUCTION | Rein Foie | <ul style="list-style-type: none"> - T lymphocytes - Cellules endothéliales - Fibroblastes - Cellules épithéliales thymiques | <ul style="list-style-type: none"> - Monocytes-macrophages - Fibroblastes | <ul style="list-style-type: none"> - Monocytes-macrophages - Fibroblastes - Cellules endothéliales vasculaires - Cellules épithéliales - Ostéoblastes | Ubiquitaire |
| STIMULANT | Hypoxie | <ul style="list-style-type: none"> - IL1, TNF alpha - Endotoxines | IL1, TNF alpha | IL3, IL4, TNF alpha | <ul style="list-style-type: none"> - Endotoxines - TNF alpha - IL1 - GM-CSF - IL2 |
| PROPRIÉTÉS | <p>Stimule in vitro la différenciation des BFU-E, CFU-E et la synthèse de l'hémoglobine.</p> <p>Stimule la mégacariopoïèse</p> | <p>Stimule la prolifération des :</p> <p>CFU-GEMM CFU-GM BFU-E.</p> <p>Stimule les fonctions des polys neutro et des éosinophiles et des monocytes macrophages.</p> <p>Stimule le développement in vitro de cellules endothéliales vasculaires.</p> <p>Stimule les cellules de cancers épithéliaux</p> <p>Stimule la prolifération des cellules leucémiques myéloïdes</p> | <p>Stimule la production de polys neutrophiles et la phagocytose des polys neutrophiles.</p> <p>Mise en cycle des cellules souches en synergie avec IL3, IL1, IL6</p> | <p>Stimule la production des monocytes et des macrophages.</p> <p>Stimule les fonctions des monocytes et des macrophages</p> | <p>Induit l'expression du GM-CSF et du G-CSF, l'IL1 et l'IL6 dans les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules thymiques et les kératocytes.</p> <p>Induit :</p> <ul style="list-style-type: none"> - la prolifération de lymphocytes T activés ; - la production de prostaglandine E dans les monocytes, fibroblastes et les polys neutrophiles ; <p>Stimule en synergie avec IL3, IL6 et le G-CSF les cellules primitives.</p> |

Tableau 5 - Facteurs régulant l'érythropoïèse (2/4) [128].

| | IL2 | IL3 | IL4 | IL5 | IL6 |
|--------------------|--|---|---|--|---|
| CHROMOSOME | 4q | 5q | 5q | 5q | 7q |
| LIEU DE PRODUCTION | T lymphocytes | T lymphocytes Mastocytes | T lymphocytes | T lymphocytes | Macrophages Cellules endothéliales T lymphocytes |
| STIMULANT | IL1 Lectines Mitogènes Esters de phorbol | Mitogènes Esters de phorbol Activation du récepteur IgE | Esters de phorbol | Antigènes Mitogènes Esters de phorbol | IL1 Endotoxines Mitogènes |
| PROPRIÉTÉS | Stimule la prolifération et l'activation des lymphocytes T et B et des cellules NK. Induit l'expression de IL1 dans les monocytes et de l'IFN gamma (avec IL1) dans les lymphocytes T | Stimule la prolifération des : - CFU-GEMM, - CFU-masts, - BFU-E, - T lymphocytes avec IL2. Induit la différenciation des B lymphocytes. Induit l'expression du M-CSF dans les macrophages. Stimule la prolifération in vitro des cellules leucémiques myéloïdes. | Induit la prolifération de lymphocytes B et T et de fibroblastes. Induit la sécrétion d'Ig (passage vers IgG et IgE) Induit l'expression dans : - les monocytes de M-CSF et de G-CSF, - les lymphocytes T de récepteurs à l'IL2. Inhibe : - la prolifération des B par IL2, - l'induction des LAK, - la sécrétion de l'IL1. Stimule le développement in vitro en synergie avec Epo sur les BFU-E et CFU-E chez la souris avec GM-CSF, et G-CSF sur les CFU-GM. | Stimule la production et les fonctions des polys éosinophiles. Induit la sécrétion d'Ig en synergie (IL2 et IL4). Active les T cytotoxiques. | Stimule : - la production de plaquettes, - la maturation des plaquettes Induit la différenciation des lymphocytes B Stimule en synergie avec : - IL3, les CFU-GEMM et CFU-MK, - GM-CSF, les CFU-GM, - M-CSF, les CFU-GM, - IL4, les T lymphocytes, - IL2 et IL1, les T lymphocytes. Induit la synthèse des protéines de la phase aiguë de l'inflammation. |

Tableau 6 - Facteurs régulant l'érythropoïèse (3/4) [128].

| | IL7 | IL8 | IL9 | IL10 | IL11 |
|--------------------|--|---|---|--|--|
| CHROMOSOME | Inconnu | Inconnu | 5q | Inconnu | Inconnu |
| LIEU DE PRODUCTION | Stroma Rate Thymus | Monocytes Lymphocytes T | Lymphocytes T4 | Lymphocytes Lymphocytes B | Cellules stromales |
| STIMULANT | Inconnu | Liposaccharides Phyto-hémagglutinine Concavaline A | Mitogènes | | |
| PROPRIÉTÉS | Stimule la prolifération des cellules pré B et T | Méiateur chimiotactique des neutrophiles et des lymphocytes T. En présence de l'IL3 relargage de l'histamine par les basophiles. Stimule la prolifération des progéniteurs en synergie avec les facteurs de croissance. | Stimule la prolifération des BFU-E, la prolifération des mastocytes en synergie avec l'IL3. | Inhibe la sécrétion de cytokines (IL2, Interféron gamma) au cours des réactions d'hypersensibilité retardée. | En synergie avec les facteurs de croissance (IL3), stimule la production de mégacariocytes et des lignées plasmocytaires |

Tableau 7 - Facteurs régulant l'érythropoïèse (4/4) [128].

| | Stem Cell Factor ou C-kit Ligand | TNF alpha | TGF Bêta | LIF/HILDA |
|--------------------|---|--|--|--|
| CHROMOSOME | 21q | 6p | | 22q |
| LIEU DE PRODUCTION | Cellules stromales | Monocytes - Macrophages B lymphocytes Cellules NK | Cellules stromales | Cellules mononuclées du sang |
| STIMULANT | | Endotoxines IL3, IL1 GM-CSF Esters de phorbol | | |
| PROPRIÉTÉS | Action synergique sur les cellules souches et les progéniteurs avec les facteurs de croissance. | Induit l'expression du GM-CSF, du G-CSF IL1et IL6 dans les fibroblastes et les cellules endothéliales : - du GM-CSF dans les lympho- cytes T, - de l'IL8 dans les monocytes. Inhibe la prolifération des CFU- GEMM, BFU-E. Active la phagocytose des polynucléaires et leur passage à travers les parois vasculaires. Stimule en synergie le dévelop- pement in vitro des CD 34+. | Inhibe la mise en cycle des cellules primitives en culture à long terme. Inhibe la pousse in vitro des CFU-MK. | Induit la différenciation des cellules leucé- miques murines M1. Inhibe la différenciation de cellules embryon- naires totipotentes. Action pléiotrope sur les ostéoclastes, les hépa- tocytes. Stimule la mégacario- poïèse in vivo chez les souris. |

Tableau 8 - Risques liés à la transfusion allogénique [169].

| Risque | Risque/CCGR | Décès/million de CCGR | Risque/CCGR estimé en France |
|---|--|--|--|
| Hépatite A | 1/1 000 000 | 0 | |
| Hépatite B | 1/30 000-1/250 000 | 0-0,14 | 1/118 000-1/475 000 |
| Hépatite C | 1/30 000-1/150 000 | 0,5-0,17 | 1/223 000-1/700 000 |
| VIII | 1/200 000-1/200 000 | 0,5-5 | 1/570 000-1/1 720 000 |
| HTLV I et II | 1/250 000-1/2 000 000 | 0 | |
| Cytomégalo virus | 1 à 2% immuno-compétents 12,5% hémodialysés 20 à 32% allogreiftés 4,6 à 53% nouveau-nés | 0 ? ? ? | 0,14 % avec CCGR déleucocytés 1,44 % avec CMV |
| Prions | ? | ? | ? |
| Infection bactérienne | 1/200 000-1/1 000 000 | 0,1-0,25 | 1/200 000 |
| Hémolyse aiguë | 1/25 000-1/1 000 000 | 0,67-10 | |
| Hémolyse retardée | 1/1 000-1/11 000 | 0,4 | |
| OAP transfusionnel | 1/5 000 | 0,2 | |
| Reactions allergiques | Urticair 1/30-1/100 Anaphylaxie 1/20 000-1/170 000 | | |
| Frissons-Hyperthermie | 1-11 % | 0 | |
| Allo-immunisation | Standard 39 % (20-71 %) Déleucocyté 15 % (0-28 %) | | |
| Potentialisation tumorale par immunodépression | Augmentation ? | ? | ? |
| Risque infectieux par immunodépression | Augmentation ? | ? | ? |
| GVH transfusionnelle | ? 79 cas publiés 1990-1995 ; 1/659 au Japon en chirurgie cardiaque 1981-1986 ; 1/237 000 (USA 1989) | ? 90 % de décès dans les cas observés | |

Tableau 9 - Avantages et inconvénients de la transfusion et de l'EPO [169].

| Traitement | Avantages | Inconvénients |
|-----------------|---|---|
| Transfusion | <ul style="list-style-type: none"> - Effet immédiat dès la transfusion - Coût direct plus faible (en l'absence de complication) | <ul style="list-style-type: none"> - Risque transfusionnel - Coût psychologique (peur du patient) - Hospitalisation - « Aire sous la courbe » de l'hémoglobine moins importante - Coût en cas de complication - Déplétion immunitaire - Complications encore inconnues ? |
| Érythropoïétine | <ul style="list-style-type: none"> - Traitement ambulatoire - « Aire sous la courbe » de l'hémoglobine plus importante - Pas de complication | <ul style="list-style-type: none"> - Trois injections par semaine - Délai d'action - Existence de patients non répondeurs - Coût direct plus important |

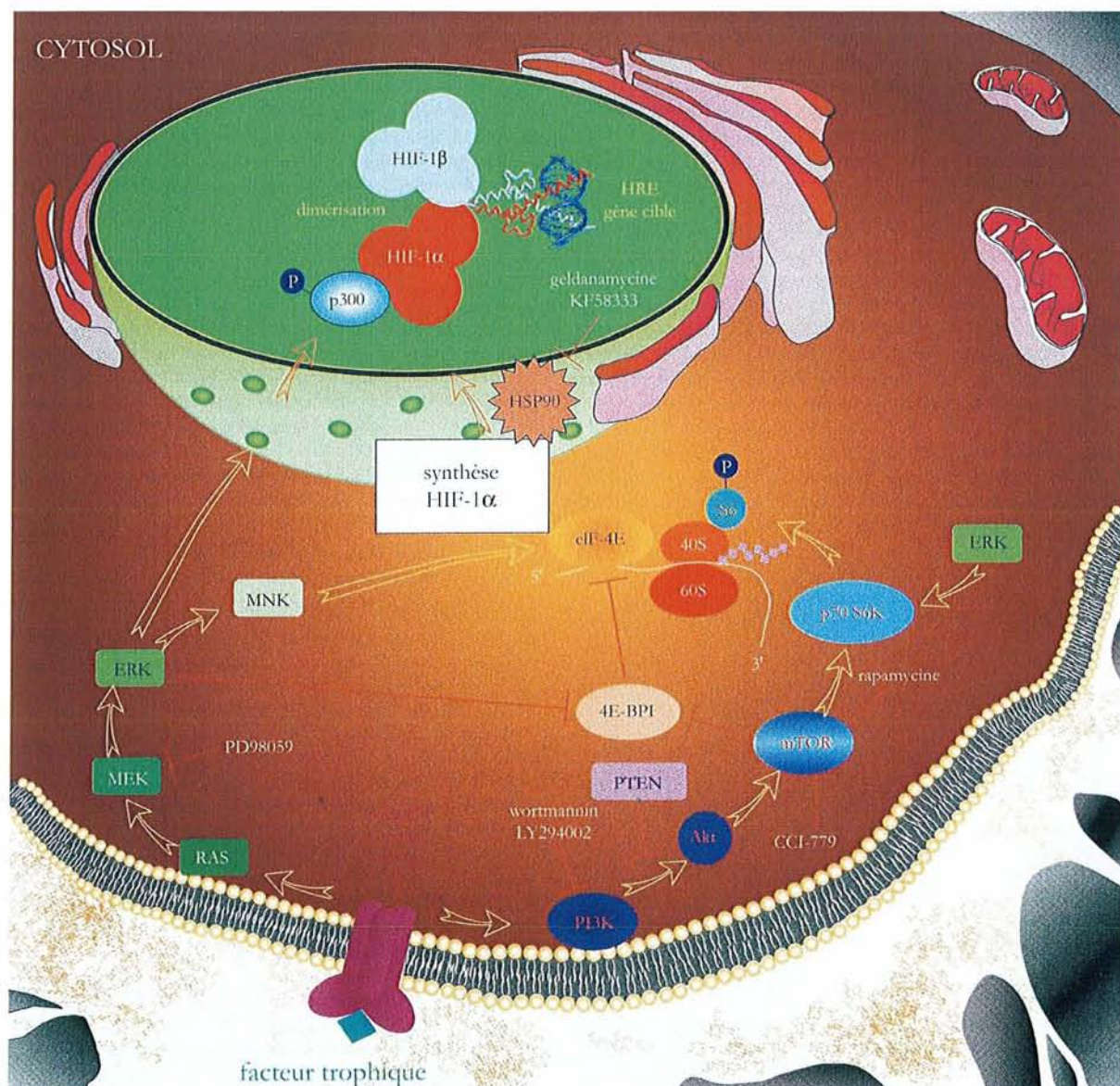


Figure 29 - Régulation de la synthèse protéique de HIF-1 α indépendante de la pression en oxygène dans la cellule [34].

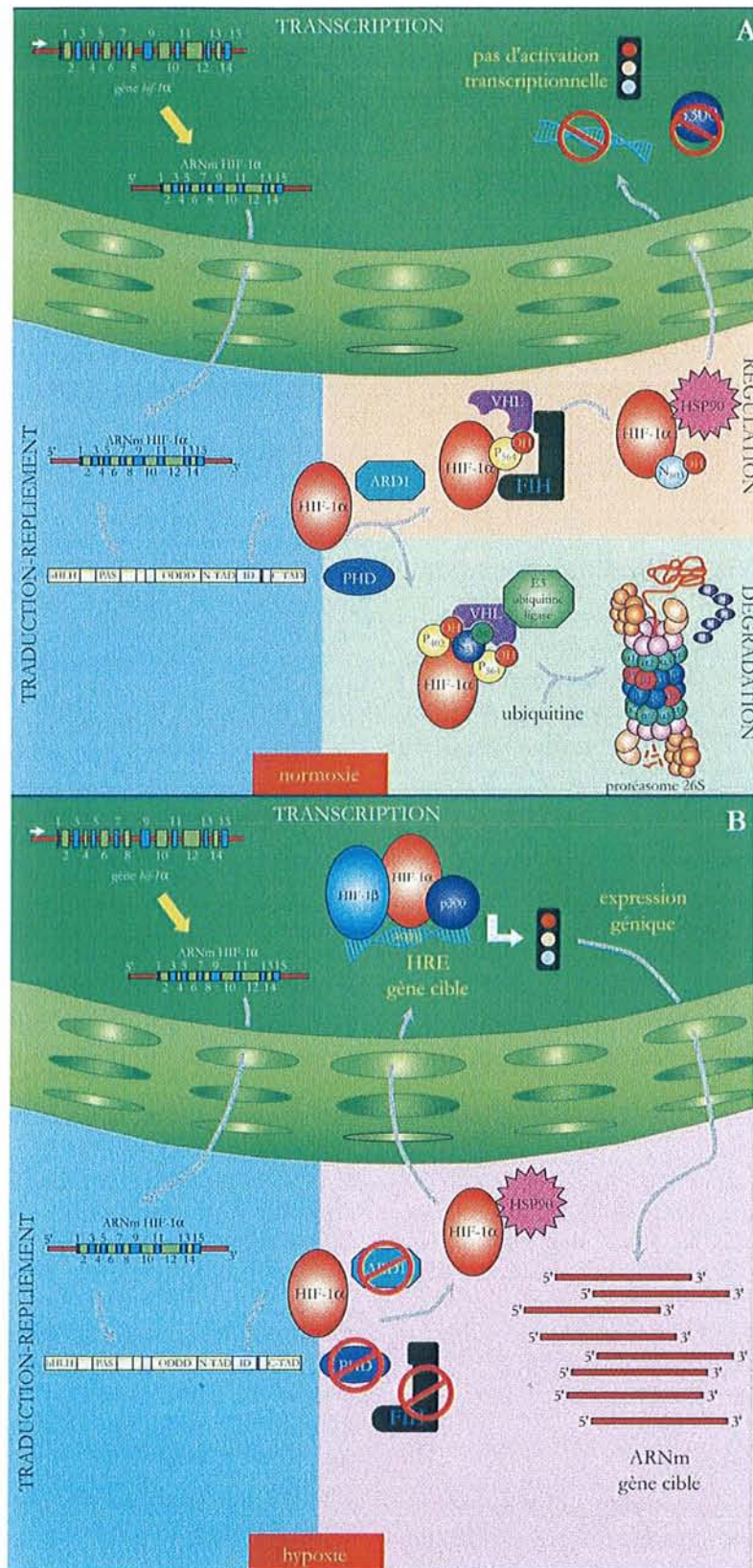


Figure 30 - Régulation détaillée de l'activité de HIF-1 dépendante de l'oxygène [34].

ANNEXE 1 : Questionnaire envoyé aux officines**L'érythropoïétine à l'officine**

Pharmacien diplômé en 2005, je prépare une thèse d'exercice sur le thème : « EPO : indications thérapeutiques et usages détournés. Le rôle du pharmacien d'officine dans la dispensation ». Dans ce cadre, j'aurais besoin de votre participation en répondant à ce questionnaire.

Toutes les réponses seront évidemment traitées de façon totalement anonyme.

Si vous acceptez de participer à cette enquête, pouvez-vous, s'il vous plait, retourner le questionnaire complété avant le 31/03/06 à :

**DAUBLIN Maxime
10 bd du recteur Senn
54000 NANCY**

MERCI D'AVANCE !

A - La formation continue et vous

1 - Type de pharmacie

- Rural
- Semi-rural
- Ville

2 - Distance de la pharmacie à la grande ville la plus proche :

- 0 km
- De 0 à 25 kms
- De 25 à 50 kms
- > 50 kms

3 - Date d'obtention de votre diplôme :

- < 5 ans
- De 5 à 10 ans
- De 10 à 20 ans
- > 20 ans

4 - Participez-vous à des formations continues :

- Oui, toutes les semaines
- Oui, plusieurs fois par mois
- Oui, moins souvent
- Non, jamais

B - L'érythropoïétine et vous

5 - Connaissez-vous les spécialités à base d'EPO?

- 1 spécialité
- 2 spécialités
- 3 spécialités
- Non

6 - En avez-vous déjà délivré ? Si oui, à quelle fréquence ?

- Jamais
- Tous les 6 mois
- Tous les mois
- Plus souvent

7 - Connaissez-vous leurs indications ?

- 1 indication
- 2 indications
- 3 indications
- 4 indications
- Non

8 - Connaissez-vous les modalités de prescription ?

- Oui
- Non

9 - Savez-vous comment vous les procurer ?

- Oui, les 3 spécialités
- Oui, 2 spécialités
- Oui, 1 spécialité
- Non

10 - Connaissez-vous le mode de conservation de ces produits ?

- Oui
- Non

11 - Connaissez-vous les modalités d'administration ?

- Oui
- Non

12 - Pourriez-vous citer quelques-uns de leurs effets indésirables ?

- Au moins 1
- Au moins 2
- Au moins 3
- Au moins 4
- Non

13 - Quels conseils donnez-vous aux patients à qui vous délivrez ces produits ?

14 - En résumé, vous sentez-vous formés à la délivrance de ces spécialités ?

- Oui
- Non

15 - Qu'attendriez-vous de la part des laboratoires afin d'améliorer la dispensation ?

- Des fiches conseil à donner aux patients
- Des posters
- Des formations avec les facultés ou les UTIP
- Autres :

ANNEXE 2 : Tableau récapitulatif des réponses, questionnaire par questionnaire

| Numéro | La formation continue et vous | | | |
|--------|-------------------------------|---|-----------------------------|----------------------|
| | Type de pharmacie | Distance de la grande ville la plus proche (km) | Date d'obtention du diplôme | Formations continues |
| 1 | Ville | 0 | < 5 ans | < 1/mois |
| 2 | Semi-rural | De 0 à 25 | > 20 ans | < 1/mois |
| 3 | Rural | De 0 à 25 | 10-20 ans | Jamais |
| 4 | Ville | > 50 | 5-10 ans | < 1/mois |
| 5 | Semi-rural | > 50 | > 20 ans | < 1/mois |
| 6 | Ville | 0 | 10-20 ans | 2-3/mois |
| 7 | Rural | De 0 à 25 | > 20 ans | < 1/mois |
| 8 | Ville | 0 | < 5 ans | < 1/mois |
| 9 | Rural | De 0 à 25 | > 20 ans | < 1/mois |
| 10 | Semi-rural | De 25 à 50 | > 20 ans | < 1/mois |
| 11 | Ville | 0 | > 20 ans | < 1/mois |
| 12 | Ville | 0 | < 5 ans | < 1/mois |
| 13 | Ville | > 50 | 10-20 ans | < 1/mois |
| 14 | Ville | 0 | > 20 ans | < 1/mois |
| 15 | Rural | - | > 20 ans | < 1/mois |
| 16 | Semi-rural | De 0 à 25 | 5-10 ans | < 1/mois |
| 17 | Ville | 0 | > 20 ans | 2-3/mois |
| 18 | Ville | 0 | 5-10 ans | < 1/mois |
| 19 | Rural | De 25 à 50 | < 5 ans | < 1/mois |
| 20 | Semi-rural | De 0 à 25 | > 20 ans | < 1/mois |
| 21 | Semi-rural | De 0 à 25 | 5-10 ans | < 1/mois |
| 22 | Semi-rural | De 0 à 25 | > 20 ans | < 1/mois |
| 23 | Ville | De 0 à 25 | > 20 ans | < 1/mois |
| 24 | Rural | De 0 à 25 | > 20 ans | < 1/mois |
| 25 | Rural | De 25 à 50 | 10-20 ans | Jamais |
| 26 | Ville | De 0 à 25 | 10-20 ans | < 1/mois |
| 27 | Semi-rural | De 0 à 25 | 10-20 ans | 2-3/mois |
| 28 | Rural | De 0 à 25 | > 20 ans | Jamais |
| 29 | Ville | 0 | > 20 ans | < 1/mois |
| 30 | Ville | De 0 à 25 | > 20 ans | < 1/mois |

| Numéro | La formation continue et vous | | | |
|--------|-------------------------------|---|-----------------------------|----------------------|
| | Type de pharmacie | Distance de la grande ville la plus proche (km) | Date d'obtention du diplôme | Formations continues |
| 31 | Ville | > 50 | > 20 ans | < 1/mois |
| 32 | Ville | 0 | 10-20 ans | < 1/mois |
| 33 | Ville | De 0 à 25 | > 20 ans | 2-3/mois |
| 34 | Ville | 0 | > 20 ans | < 1/mois |
| 35 | Ville | 0 | > 20 ans | < 1/mois |
| 36 | Rural | De 0 à 25 | > 20 ans | < 1/mois |
| 37 | Rural | De 25 à 50 | > 20 ans | < 1/mois |
| 38 | Rural | > 50 | < 5 ans | 1/semaine |
| 39 | Ville | 0 | 5-10 ans | < 1/mois |
| 40 | Ville | De 0 à 25 | > 20 ans | < 1/mois |
| 41 | Ville | De 0 à 25 | - | < 1/mois |
| 42 | Rural | De 0 à 25 | 10-20 ans | < 1/mois |
| 43 | Semi-rural | - | > 20 ans | Jamais |
| 44 | Ville | De 0 à 25 | < 5 ans | 2-3/mois |

| Numéro | L'érythropoïétine et vous | | | | | | | | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|---|------------------------|-----------------------------|
| | Spécialités (x/3) | Fréquence de délivrance | Indications (x/4) | Modalités de prescription | Approvisionnement (x/3) | Mode conservation | Modalités administration | Effets indésirables (x/4) | Conseils | Formés à la délivrance | Améliorations par les labos |
| 1 | 3 | 2/an | 0 | Oui | 3 | Oui | Non | 0 | Conservation | Non | - |
| 2 | 0 | Jamais | 0 | Non | 0 | Non | Non | 0 | - | Non | - |
| 3 | 2 | + Souvent | 2 | Oui | 1 | Oui | Non | 0 | - | Non | Fiches conseil |
| 4 | 0 | Jamais | 0 | Non | 0 | Non | Non | 0 | - | Non | Fiches conseil, formations |
| 5 | 2 | + Souvent | 3 | Oui | 2 | Oui | Oui | 2 | - | Oui | Fiches conseil |
| 6 | 2 | + Souvent | 3 | Oui | 2 | Oui | Non | 3 | Conservation, effets secondaires | Non | Fiches conseil, formations |
| 7 | 3 | 1/mois | 1 | Oui | 1 | Oui | Oui | 1 | Conservation, suivre recommandations de l'hôpital | Non | Formations |
| 8 | 3 | 1/mois | 2 | Oui | 1 | Oui | Oui | 2 | Changer site injection | Oui | Formations |
| 9 | 3 | 1/mois | 4 | Oui | 3 | Oui | Non | 0 | - | Non | Fiches conseil |
| 10 | 3 | + Souvent | 4 | Oui | 3 | Oui | Oui | 4 | Observance traitement antihypertenseur | Oui et Non | Fiches conseil |
| 11 | 3 | + Souvent | 3 | Oui | 1 | Oui | Oui | 3 | Utilisation du stylet, site injection | Oui | Fiches conseil |
| 12 | 3 | + Souvent | 3 | Oui | 3 | Oui | Oui | 4 | Surveillance hématologique, pas d'automédication | Oui | Fiches conseil, formations |
| 13 | 3 | + Souvent | 4 | Oui | 3 | Oui | Oui | 0 | - | Oui | Fiches conseil |
| 14 | 2 | 1/mois | 4 | Oui | 1 | Oui | Oui | 4 | Conservation | Oui | Fiches conseil |
| 15 | 1 | 2/an | 1 | Oui | 1 | Oui | Oui | 0 | - | Non | Fiches conseil |

| Numéro | L'érythropoïétine et vous | | | | | | | | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|--|------------------------|---|
| | Spécialités (x/3) | Fréquence de délivrance | Indications (x/4) | Modalités de prescription | Approvisionnement (x/3) | Mode conservation | Modalités administration | Effets indésirables (x/4) | Conseils | Formés à la délivrance | Améliorations par les labos |
| 16 | 3 | + Souvent | 2 | Oui | 3 | Oui | Oui | 2 | Conservation | Non | Formations |
| 17 | 2 | + Souvent | 2 | Oui | 1 | Oui | Oui | 3 | Conservation, ne pas agiter, effets secondaires | Oui et Non | Formations |
| 18 | 2 | 2/an | 2 | Oui | 2 | Oui | Oui | 2 | Conservation, changer site injection, effets secondaires | Oui | Fiches conseil |
| 19 | 3 | 1/mois | 1 | Oui | 1 | Oui | Oui | 2 | Conservation | Oui | Site Internet |
| 20 | 3 | + Souvent | 2 | Oui | 1 | Oui | Oui | 3 | Conservation, ne pas agiter | Oui | Fiches conseil, formations |
| 21 | 3 | + Souvent | 4 | Oui | 3 | Oui | Oui | 0 | Conservation | Oui | Fiches conseil, formations |
| 22 | 3 | + Souvent | 2 | Oui | 1 | Oui | Oui | 2 | Conservation | Oui et Non | Fiches conseil |
| 23 | 3 | + Souvent | 1 | Oui | 3 | Oui | Oui | 1 | - | Oui | Formations |
| 24 | 2 | + Souvent | 2 | Oui | 2 | Oui | Oui | 0 | Conservation, mode administration | Oui | Fiches conseil |
| 25 | 3 | 1/mois | 4 | Oui | 3 | Oui | Oui | 0 | Conservation | Non | Fiches conseil, formations |
| 26 | 3 | + Souvent | 1 | Oui | 3 | Oui | Oui | 0 | - | Non | Formations |
| 27 | 3 | + Souvent | 2 | Oui | 3 | Oui | Oui | 3 | Conservation | Oui | Fiches conseil, formations |
| 28 | 3 | 1/mois | 2 | Oui | 1 | Oui | Non | 1 | - | Oui | Fiches conseil |
| 29 | 3 | 1/mois | 2 | Oui | 2 | Oui | Oui | 0 | - | Oui | Fiches conseil |
| 30 | 2 | 1/mois | 1 | Oui | 2 | Oui | Oui | 2 | Conservation | Oui | Fiches conseil |
| 31 | 3 | 1/mois | 1 | Oui | 3 | Oui | Oui | 3 | Conservation, respecter la posologie | Oui | Fiches conseil, formations, valisettes isothermes |
| 32 | 3 | + Souvent | 4 | Oui | 3 | Oui | Oui | 2 | Conservation | Oui | Fiches conseil |

| Numéro | L'érythropoïétine et vous | | | | | | | | | | |
|--------|---------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|--|------------------------|-------------------------------------|
| | Spécialités (x/3) | Fréquence de délivrance | Indications (x/4) | Modalités de prescription | Approvisionnement (x/3) | Mode conservation | Modalités administration | Effets indésirables (x/4) | Conseils | Formés à la délivrance | Améliorations par les labos |
| 33 | 3 | + Souvent | 3 | Oui | 3 | Oui | Oui | 4 | - | Oui | Fiches conseil, formations |
| 34 | 3 | + Souvent | 2 | Oui | 3 | Oui | Oui | 3 | Surveillance hématologique | Oui | Fiches conseil, progiciel |
| 35 | 2 | 1/mois | 2 | Oui | 2 | Oui | Oui | 3 | Surveillance tension, potassium, fer | Non | Fiches conseil |
| 36 | 3 | + Souvent | 1 | Oui | 3 | Oui | Oui | 0 | Conservation | Oui | Fiches conseil |
| 37 | 3 | + Souvent | 1 | Oui | 3 | Oui | Oui | 1 | Conservation, effets secondaires | Non | Fiches conseil |
| 38 | 3 | + Souvent | 2 | Oui | 3 | Oui | Oui | 2 | Conservation, changer site injection, effets secondaires | Oui | Fiches conseil, formations |
| 39 | 3 | 1/mois | 2 | Oui | 1 | Oui | Non | 2 | Conservation | Non | Fiches conseil, formations |
| 40 | 3 | + Souvent | 2 | Oui | 2 | Oui | Non | 0 | Conservation, Surveillance hématologique, prise de fer | Oui | Formations, valisettes isothermes |
| 41 | 2 | 1/mois | 2 | Oui | 2 | Oui | Oui | 3 | Conservation | Oui | Formations |
| 42 | 3 | 2/an | 3 | Oui | 3 | Oui | Oui | 4 | Conservation, administration, plaquettes labo | Oui | Fiches conseil, formations |
| 43 | 2 | + Souvent | 2 | Oui | 2 | Oui | Oui | 0 | - | Non | Fiches conseil |
| 44 | 3 | + Souvent | 3 | Oui | 3 | Oui | Oui | 2 | Conservation, effets secondaires, administration | Oui | Fiches conseil, posters, formations |

ANNEXE 3 : Tableau récapitulatif de l'ensemble des résultats de l'enquête

| | | Nombre de réponses | % de réponses |
|-------------------|---|---------------------------|----------------------|
| Question 1 | Type de pharmacie | | |
| | Rural | 12 | 27,3 |
| | Semi-rural | 9 | 20,5 |
| | Ville | 23 | 52,3 |
| Question 2 | Distance de la grande ville la plus proche | | |
| | 0 km | 13 | 29,5 |
| | De 0 à 25 kms | 20 | 45,5 |
| | De 25 à 50 kms | 4 | 9,1 |
| | > 50 kms | 5 | 11,4 |
| | NSP | 2 | 4,5 |
| Question 3 | Date d'obtention du diplôme | | |
| | < 5 ans | 6 | 13,6 |
| | De 5 à 10 ans | 5 | 11,4 |
| | De 10 à 20 ans | 8 | 18,2 |
| | > 20 ans | 24 | 54,5 |
| | NSP | 1 | 2,3 |
| Question 4 | Formations continues | | |
| | > 1/semaine | 1 | 2,3 |
| | 2-3/mois | 5 | 11,4 |
| | < 1/mois | 34 | 77,3 |
| | Jamais | 4 | 9,1 |
| Question 5 | Spécialités | | |
| | 0 spécialité | 2 | 4,5 |
| | 1 spécialité | 1 | 2,3 |
| | 2 spécialités | 11 | 25 |
| | 3 spécialités | 30 | 68,2 |
| Question 6 | Fréquence de délivrance | | |
| | Jamais | 2 | 4,5 |
| | Tous les 6 mois | 1 | 2,3 |
| | Tous les mois | 17 | 38,6 |
| | Plus souvent | 21 | 47,7 |
| | NSP | 3 | 6,8 |
| Question 7 | Indications | | |
| | 0 indication | 3 | 6,8 |
| | 1 indication | 9 | 20,5 |
| | 2 indications | 18 | 40,9 |
| | 3 indications | 7 | 15,9 |
| | 4 indications | 7 | 15,9 |

| | | Nombre de réponses | % de réponses |
|-------------|------------------------------------|--------------------|---------------|
| Question 8 | Modalités de prescription | | |
| | Oui | 39 | 88,6 |
| | Non | 5 | 11,4 |
| Question 9 | Approvisionnement | | |
| | 1 spécialité | 12 | 27,3 |
| | 2 spécialités | 10 | 22,7 |
| | 3 spécialités | 20 | 45,5 |
| | Non | 2 | 4,5 |
| Question 10 | Mode de conservation | | |
| | Oui | 42 | 95,5 |
| | Non | 2 | 4,5 |
| Question 11 | Modalités d'administration | | |
| | Oui | 35 | 79,5 |
| | Non | 9 | 20,5 |
| Question 12 | Effets indésirables | | |
| | Au moins 1 | 4 | 9,1 |
| | Au moins 2 | 11 | 25 |
| | Au moins 3 | 9 | 20,5 |
| | Au moins 4 | 5 | 11,4 |
| | Non | 15 | 34,1 |
| Question 13 | Conseils aux patients | | |
| | Conservation | 25 | 56,8 |
| | Effets indésirables | 6 | 13,6 |
| | Administration | 9 | 20,5 |
| | Autres | 10 | 22,7 |
| | NSP | 13 | 29,5 |
| Question 14 | Formés à la délivrance | | |
| | Oui | 29 | 65,9 |
| | Non | 18 | 40,9 |
| Question 15 | Améliorations par les labos | | |
| | Fiches conseils | 33 | 75 |
| | Posters | 1 | 2,3 |
| | Formations | 21 | 47,7 |
| | Autres | 4 | 9,1 |
| | NSP | 2 | 4,5 |

Bibliographie

Bibliographie

- 1 - AFDHAL N.
Role of epoetin alfa in maintaining ribavirin dose.
Gastroenterol. Clin. North Am., 2004, 33, Suppl ; 1, S25-S35
- 2 - AIME-GENTY N.
Le sang, dictionnaire encyclopédique.
Paris : Vuibert, 1999.- 223p.
- 3 - AKRAM K., PEARLMAN B., PARKER M.
Congestive heart failure-related anemia and a role for erythropoietin.
Int. J. Cardiol., 2006, x, x, xxx-xxx
- 4 - Ambion Inc., Applied Biosystems
GeneAssistTM Pathway Atlas.
[En Ligne]. Page consultée le 26 octobre 2007
Adresse URL :
<http://www.ambion.com/tools/pathway/pathway.php?pathway=Erythropoietin%20Pathway>
- 5 - ARINSOY T., OZDEMIR O., ARIK N. et al.
Recombinant human erythropoietin treatment may induce antithrombin-III depletion.
Nephron, 1992, 62, 4, 480-481
- 6 - ARNAUD F., SIMEONI U.
La transfusion de produits sanguins labiles en période néonatale.
Transfus. Clin. Biol., 2005, 12, 4, 336-341
- 7 - AROCK M.
L'Interleukine-3 : une cytokine aux multiples facettes.
Ann. Pharm. Fr., 1996, 54, 4, 162-176
- 8 - AUCLERC G., MERIC J.-B., POMMEYROL A.
Les anémies des cancéreux avant traitement.
Bull. Cancer, 2003, 90, numéro spécial, S128-S132
- 9 - AUDRAN M., CONNES P., VARLET-MARIE E.
Transport sanguin de l'oxygène et dopage.
Bull. Acad. Natle Méd., 2003, 187, 9, 1669-1683
- 10 - AUDRAN M., VARLET-MARIE E.
Évolution actuelle du dopage favorisant le transport de l'oxygène.
Bull. Acad. Natle Méd., 2004, 188, 6, 945-953

- 11 - AZRIA D., ZOUHAIR A., SERRE A.
Anémie et cancers des voies aérodigestives supérieures.
Bull. Cancer, 2005, 92, 5, 445-451
- 12 - BACHMANN G.
Epoetin alfa use in gynecology. Past, present and future.
J. Reprod. Med., 2001, 46, Suppl. 5, 539-544
- 13 - BERIS Ph.
L'érythropoïétine : physiologie et usage clinique à l'exclusion de l'anémie rénale.
Méd. Hyg., 2000, 58, 2302, 1159-1165
- 14 - BOFFA G.-A.
L'érythropoïétine humaine et ses cibles cellulaires.
Rev. Fr. Transfus. Hémodiol., 1991, 34, 1, 49-62
- 15 - BOURBEAU K., NOEL M.
La darbépoétine alfa (Aranesp^{MD}).
Québec Pharmacie, 2003, 50, 6, 477-485
- 16 - BOVEN K., STRYKER S., KNIGHT J.
The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stoppers syringues.
Kidney Int, 2005, 67, 6, 2346-2353
- 17 - BOVEN K., KNIGHT J., BADER F.
Epoetin-associated pure red cell aplasia in patients with chronic kidney disease : solving the mystery.
Nephrol. Dial. Transplant., 2005, 20 (Suppl. 3), 33-40
- 18 - BRANGER B.
La résistance à l'érythropoïétine.
Néphrologie, 2002, 23, 1, 3-5
- 19 - BRINES M. et al.
Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury.
Proc. Natl. Acad. Sci., 2000, 97, 19, 10526-10531
- 20 - BRON D. et coll.
Les cellules souches hématopoïétiques : sources, indications et perspectives.
Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg., 2002, 157, 1-2, 135-145
- 21 - CALHOUN D.
Enteral administration of hematopoietic growth factors in the neonatal intensive care unit.
Acta. Paediatr. Suppl., 2002, 9, 438, 43-53

- 22 - CAMPANA W. et al.
Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin.
Int. J. Mol. Med., 1998, 1, 1, 235-241
- 23 - CARDE P.
Inhibiteurs de l'érythropoïèse : de la physiologie à la thérapeutique.
Bull. Acad. Natle. Méd., 1994, 178, 5, 793-806
- 24 - CASADEVALL N., VAINCHENKER W.
L'érythropoïèse et sa régulation.
Rev. Prat., 1993, 43, 11, 1335-1340
- 25 - CASADEVALL N.
Physiologie de l'érythropoïétine et utilisation thérapeutique.
Ann. Pharm. Fr., 1996, 54, 4, 151-156
- 26 - CASADEVALL N.
L'érythropoïétine : indications actuelles.
Transfus. Clin. Biol., 2000, 7, 3, 255-256
- 27 - CASADEVALL N.
Place de l'érythropoïétine dans la correction de l'anémie des myélodysplasies.
Hématologie, 2001, n° spécial, 7, 12-16
- 28 - CASADEVALL N.
What is antibody-mediated pure red cell aplasia (PCRA) ?
Nephrol. Dial. Transplant., 2005, 20 [Suppl 4]., 3-8
- 29 - CAYLA J.-L., DUVALLET A.
Érythropoïétine : dépistage d'apport exogène.
Presse Méd., 1999, 28, 18, 992-996
- 30 - CHARBORD P.
Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et microenvironnement stromal.
Thérapie, 2001, 56, 4, 383-384
- 31 - CHEUNG W., MINTON N., GUNAWARDENA K.
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa once weekly and three times weekly.
Eur. J. Clin. Pharmacol., 2001, 57, 411-418
- 32 - CHIN K. et al.
Production et processing of erythropoietin receptor transcripts in brain.
Mol. Brain Res., 2000, 81, 1-2, 29-42
- 33 - CHNG W., TAN L., LIU T.
Cyclosporine treatment for patients with CRF who developed pure red blood cell aplasia following EPO therapy.
Am. J. Kidney. Dis., 2003, 41, 3, 692-695

- 34 - CLOTTES E.
Le facteur induit par l'hypoxie HIF-1 : régulation, implication dans la carcinogenèse et cible thérapeutique anti-cancer.
Bull. Cancer, 2005, 92, 2, 119-127
- 35 - COHEN SOLAL A., BEAUVAIS F.
Anémie, insuffisance cardiaque et érythropoïétine.
Arch. Mal. Cœur Vaiss., 2005, 98, 10, 997-1001
- 36 - CORAZZA F.
La régulation de l'érythropoïèse : acquisitions récentes et incertitudes actuelles.
Rev. Méd. Brux., 1990, 11, 4, 109-117
- 37 - COULOMBEL L., PONDARRE C., BENNACEUR A.
Cellules souches hématopoïétiques.
Bull. Acad. Natle. Med., 2000, 184, 6, 1201-1212
- 38 - CUMMINGS M., SHARKEY I., SHARP J.
Subcutaneous erythropoietin alpha (Eprex) is more painful than erythropoietin beta (Recormon).
Nephrol. Dial. Transplant., 1998, 13, 3, 817
- 39 - DALLE B., ROUYER-FESSARD P., HENRI A., BEUZARD Y.
Gène de l'érythropoïétine: régulation et intérêt thérapeutique.
Hématol. Cell. Therap., 1997, 39, 2, 109-113
- 40 - D'ANDREA A., LODISH H., WONG G.
Expression cloning of the murine erythropoietin receptor.
Cell., 1989, 57, 2, 277-285
- 41 - DE LA MOTTE ROUGE T., SCHNEIDER M.
Anémie et lymphome.
Bull. Cancer, 2005, 92, 5, 429-431
- 42 - DEICHER R., HORL W.
Differentiating factors between erythropoiesis-stimulating agents.
Drugs, 2004, 64, 5, 499-509
- 43 - DELANTY N., VAUGHAN C., FRUCHT S., STUBGEN P.
Erythropoietin-associated hypertensive posterior leukoencephalopathy.
Neurology, 1997, 49, 3, 686-689
- 44 - DEMEDTS I. et al.
Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema.
Respir. Res., 2006, 7, 53
- 45 - DENIS F., LARTIGAU E.
Anémie et radiothérapie
Cancer Radiothér., 2004, 8, Supl 1, S14-S23

- 46 - DONATO H., FERRO H.
Human recombinant erythropoietin therapy.
Medicina, 2006, 66, 1, 51-69
- 47 - DOSQUET P.
Anémie et insuffisance rénale chronique.
In : Hématologie / ed. par Albert NAJMAN.
Paris : Ellipses, 1994.- 456p.
- 48 - DOUAY L.
Du contrôle de l'hématopoïèse à la thérapie cellulaire : les perspectives transfusionnelles.
Ann. Biol. Clin., 2003, 61, 3, 259-267
- 49 - DOUAY L.
Perspectives transfusionnelles du contrôle *ex vivo* de l'hématopoïèse.
Transfus. Clin. Biol., 2003, 10, 3, 151-155
- 50 - DOUAY L., GIARRATANA M.-C.
Génération *in vitro* de globules rouges humains et fonctionnels : un modèle d'étude aux perspectives multidisciplinaires.
Bull. Acad. Natle Med., 2005, 189, 5, 903-915
- 51 - DRUEKE T.
Niveau d'hémoglobine : quel est l'objectif du traitement ?
1^{er} symposium Eprex[®].
Paris : Cilag, 1990.- 4p.
- 52 - DRUEKE T.
Les non-réponses à l'érythropoïétine (r-HuEPO).
2^{ème} symposium Eprex[®].
Paris : Cilag, 1991, 7p.
- 53 - DRUEKE T.
Hyporesponsiveness to recombinant human erythropoietin.
Nephrol. Dial. Transplant., 2001, 26 (Suppl 7), 25-28
- 54 - DUFFIELD J., MANN S., HORN L.
Low-dose cyclosporin therapy for recombinant erythropoietin-induced pure red-cell aplasia.
Nephrol. Dial. Transplant., 2004, 19, 2, 479-481
- 55 - DUMORTIER J., BOUCHER A., SCOAZEC J.-Y., VIAL T.
Cytolyse hépatique après administration d'Aranesp[®] (darbépoétine alfa).
Gastroenterol. Clin. Biol., 2004, 28, 5, 506-507
- 56 - DUSANTER-FOURT I., MAYEUX P., GISSELBRECHT S.
Transduction du signal par les récepteurs de cytokines.
Méd. Sci., 1994, 10, 8-9, 825-835

- 57 - EDMUNDS M., WALLS J.
Seizures in haemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin.
Nephrol. Dial. Transplant., 1989, 4, 12, 1065-1069
- 58 - EGRIE J.
The cloning and production of recombinant human erythropoietin.
Pharmacotherapy, 1990, 10 (2 Pt 2), 3S-8S
- 59 - EGRIE J., BROWNE J.
Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP).
Néphrol. Dial. Transplant., 2001, 16 [Suppl 3]., 3-13
- 60 - EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION (EHA) (8 ; 2003 ; Lyon)
La prise en charge des anémies au cours des cancers.
Presse Méd., 2003, 32, 29, 1367-1384
- 61 - EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA)
Aranesp – Résumé des caractéristiques du produit.
[En ligne]. Page consultée le 29 octobre 2007
Adresse URL : <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/aranesp/H-332-PI-fr.pdf>
- 62 - EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA)
Dynepo – Résumé des caractéristiques du produit.
[En ligne]. Page consultée le 29 octobre 2007
Adresse URL : <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/dynepo/H-372-PI-fr.pdf>
- 63 - EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA)
Mircera – Résumé des caractéristiques du produit.
[En ligne]. Page consultée le 29 octobre 2007
Adresse URL : <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/mircera/H-739-fr1.pdf>
- 64 - EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA)
Neorecormon – Résumé des caractéristiques du produit.
[En ligne]. Page consultée le 29 octobre 2007
Adresse URL : <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Neorecormon/H-116-PI-fr.pdf>
- 65 - EUROSTAF
La rétrocession à l'hôpital et les sorties de réserve hospitalière.
[En ligne]. Page consultée le 21 janvier 2008
Adresse URL : http://www.eurostaf.fr/cms/impression_page.htm?page_id=3&gab_id=9&URL_BI_ZY=medicaments_innovant/impression&

- 66 - FAULDS D., SORKIN E.-M.
Epoetin (recombinant human erythropoietin). A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in anaemia and the stimulation of erythropoiesis.
Drugs, 1989, 38, 6, 863-899
- 67 - FAYETTE J.
Érythropoïétine et anémie : quand la qualité de vie et la survie s'opposent.
Bull. Cancer, 2003, 90, 12, 1033-1034
- 68 - FEDERATION NATIONALE DES CENTRES DE LUTTE CONTRE LE CANCER
Recommandations pour la pratique clinique : standards, options et recommandations 2003 pour l'utilisation de l'érythropoïétine recombinante (époétine alfa et bêta, darbépoétine alfa, EPO) dans la prise en charge de l'anémie en cancérologie, mise à jour (rapport abrégé).
Paris : 2003.- 28p.
- 69 - FEDERATION NATIONALE DES CENTRES DE LUTTE CONTRE LE CANCER
Recommandations pour la pratique clinique : standards, options et recommandations 2003 pour l'utilisation de l'érythropoïétine recombinante (époétine alfa et bêta, darbépoétine alfa, EPO) dans la prise en charge de l'anémie en cancérologie pour les patients traités par radiothérapie, mise à jour.
Paris : 2003.- 12p.
- 70 - FONDATION SPORT SANTE
« Le dopage et le sport : ça nous intéresse ! »
Paris : 2000.- 81p.
- 71 - FORET M.
Érythropoïétine recombinante humaine, hypertension artérielle : quels rapports ?
1^{er} symposium Eprex[®].
Paris : Cilag, 1990.- 4p.
- 72 - FOUILLARD L.
Apport des facteurs de croissance de l'hématopoïèse et plus particulièrement dans le contexte des greffes de cellules souches hématopoïétiques.
Ann. Pharm. Fr., 1996, 54, 4, 157-161
- 73 - GARCIA M., LIMA V., CALHOUN D.
Enteral administration of a sterile, isotonic, non-caloric solution containing recombinant growth factors to neonates recovering from necrotizing enterocolitis (NEC) : a phase I/II dose-evaluation trial.
Pediatr. Res., 2002, 51, 146A
- 74 - Erythropoietin in clinical applications: an international perspective / ed. par Marc B. GARNICK.
New-York : Markel Dekker, 1990.- 334p.

-
- 75 - GAUTHIER J.
Le dopage sanguin et ses conséquences cardiovasculaires.
Presse Méd., 2002, 31, 40, 1904-1908
- 76 - GERSHON S. et coll.
Pure red-cell aplasia and recombinant erythropoietin.
N. Engl. J. Med., 2002, 346, 20, 1584-1585
- 77 - GOTO M., AKAI K., MURAKAMI A.
Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells : host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein.
Biotechnology, 1988, 6, 67-71
- 78 - GOURDIN S.
Enquête sur les besoins en pharmaciens et en préparateurs dans les officines de Lorraine en 2004.
Th. : Pharm. : Nancy 1 : 2005 ; 61
- 79 - GRETZ N., LASSERRE J., DRESCHER P.
A persistent flu-like syndrome in patients treated with erythropoietin.
Nephrol., 1990, 10, Suppl. 2, 148-152
- 80 - GUEZENNEC Ch.-Y.
Le dopage : efficacité, conséquences, prévention.
Ann. Endocrinol., 2001, 62, 1, 33-41
- 81 - GUILLOSSON J.-J.
Facteurs de croissance hématopoïétique. Actualités et perspectives thérapeutiques.
Ann. Pharm. Fr., 1996, 54, 4, 145-150
- 82 - GUYOT D., MARGUERITTE G.
Utilisation de l'érythropoïétine recombinante humaine chez l'enfant atteint de cancer.
Arch. Pédiatr., 2005, 12, 9, 1376-1382
- 83 - GUYOTAT D.
Cellules souches hématopoïétiques.
Transfus. Clin. Biol., 2003, 10, 206-208
- 84 - HANSEL S.
De l'érythropoïétine recombinante à Eprex.
1er symposium Eprex®.
Paris : Cilag, 1990.- 3p.
- 85 - HARDWICK N., KING C.
Generalized eczematous reaction to erythropoietin.
Contact Dermatitis, 1993, 28, 2, 123

- 86 - HARVEY E. et al.
Pseudoporphyria cutanea tarda : two cases reports on children receiving peritoneal dialysis and erythropoietin therapy.
J. Pédiatr., 1992, 121 (5Pt1), 749-752
- 87 - HELLSTROM-LINDBERGE et al.
Treatment of anemia in myelodysplastic syndromes with granulocyte colony-stimulating factor plus erythropoietin : results from a randomized phase II study and long-term follow-up of 71 patients.
Blood, 1998, 92, 1, 68-75
- 88 - HERMINE O., ZERMATI Y.
Régulation de l'érythropoïèse.
Hématologie, 2001, n° spécial 7, 7-11
- 89 - JANVIER G., ROTH C., BENILLAN N.
Transfusions en chirurgie : peuvent-elles encore être réduites par l'érythropoïétine humaine recombinante ?
Ann. Fr. Anesth. Réanim., 1996, 15, 8, 1219-1229
- 90 - JELKMANN W.
Erythropoietin : structure, control of production, and function.
Physiol. Rev., 1992, 72, 2, 449-480
- 91 - JUUL S., LEDBETTER D., JOYCE A.
Why is erythropoietin in mothers' milk ? Is it enterally absorbed ? Studies of erythropoietin receptors on enterocytes of human and rat neonates.
Pediatr. Res., 1999, 46, 3, 263-268
- 92 - KIRCHNER V.
Traitement de l'anémie en gynécologie : utilisation de l'époétine en oncogynécologie et en chirurgie gynécologique.
Rev. Med. Suisse, 2005, 1, 15, 1041-1047
- 93 - KLEINER M., SERUR D., KNOWLES M.
Erythropoietin and abnormal hair growth in hemodialysis patients.
Am. J. Kidney Dis., 1991, 18, 5, 619
- 94 - KOCH C.
Blood, blood components, plasma and plasma products.
In : Meyler's side effects of drugs.- 14^e ed. / ed. par M.N.G. DUKES et J.K. ARONSON.
Amsterdam : Elsevier, 2000.- p.1128
- 95 - LABIE D., TAMOUZA R.
Maturation ex vivo des globules rouges : de la culture à la poche de transfusion.
Hématologie, 2005, 2, 11, 153-155

-
- 96 - Laboratoires AMGEN
Aranesp[®] (darbépoétine alfa).
Discussion scientifique, EPAR, 2001, 27p.
- 97 - Laboratoires CILAG
Eprex[®].
Dossier scientifique, 1991,
- 98 - Laboratoires JANSSEN-CILAG
Eprex[®] : Correction de l'anémie des patients cancéreux adultes traités par sel de platine.
Brochure scientifique,- 120p.
- 99 - Laboratoires JANSSEN-CILAG
Eprex[®] : Érythropoïétine humaine recombinante.
Dossier scientifique, 1992,- 67p.
- 100 - Laboratoires JANSSEN-CILAG
Eprex[®] : Prélèvement autologue différé.
Brochure scientifique,- 92p.
- 101 - Laboratoires JANSSEN-CILAG
Eprex[®].
Résumé Caractéristique Produit, 2005.- 15p.
- 102 - Laboratoires ROCHE
Neorecormon[®] : époétine beta.
Dossier scientifique, 1998.- 167p.
- 103 - LACOMBE C., MAYEUX P., CASEVALL N.
Overview of erythropoietin.
Nephrologie, 1991, 12, 5, 221-226
- 104 - LACOMBE C., MAYEUX P.
L'érythropoïétine.
Méd. Sci., 1995, 11, 7, 947-955
- 105 - LAFAYETTE J.
Érythropoïétine et anémie : quand la qualité de vie et la survie s'opposent.
Bull. Cancer, 2004, 90, 12, 1033
- 106 - LANG J.
Bilan d'un an d'utilisation : les effets latéraux.
1^{er} symposium Eprex[®].
Paris : Cilag, 1990.- 4p.

- 107 - LARTIGAU E., DENIS F.
Commentaires sur l'article de M. Henke : « erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy : randomised, double blind, placebo controlled trial » ou comment une cytokine reste une cytokine.
Cancer Radiothér., 2004, 8, 3, 131-133
- 108 - « Le dopage et le sport : ça nous intéresse ! » / ed. par Fondation Sport Santé.
Paris, 2003.- 81p.
- 109 - LEDBETTER D., JUUL S.
Necrotizing enterocolitis and hematopoietic cytokines.
Cin. Perinatol., 2000, 27, 3, 697-716
- 110 - L.E.N. Medical en collaboration avec Roche
E-Mail Direct Néphrologie – ASN 2003
[En Ligne]. page consultée le 10 avril 2006
Adresse URL : <http://www.len-medical.fr/nephro/asn03/thera20a.htm>
- 111 - LEPORIER M.
Hématologie.
Paris : InterMed, 1999.- 414p.
- 112 - LEVY J.-P., VARET B., CLAUVEL J.-P., LEFRERE F., BEZEAUD A.,
GUILLIN M.-C.
Hématologie et transfusion.
Paris : Masson, 2001.- 388p.- (Abrégés connaissances et pratique)
- 113 - LIVNAH O. et coll.
Crystallographic evidence for performed dimers of erythropoietin receptor before
ligand activation.
Science, 1999, 283, 5404, 987-990
- 114 - LUNEL-FABIANI F., FOUCHARD-HUBERT I., GERGELY A.-E.
Traitement de l'anémie des patients atteints d'une hépatite C chronique sous
interféron/ribavirine par l'érythropoïétine.
Patho. Biol., 2003, 51, 8-9, 520-524
- 115 - MACDOUGALL I.
Pure red cell aplasia with anti-erythropoietin antibodies occurs more commonly
with one formulation of epoetin alfa than another.
Curr. Med. Res. Op., 2004, 20, 1, 83-86
- 116 - MARTI H. et al.
Neuroprotection and angiogenesis : dual role of erythropoietin in brain ischemia.
News Physiol. Sci., 2000, 15, 225-229
- 117 - MASAAD-MASSADE L.
Hypoxie, HIF-1 α et récepteur aux œstrogènes.
Bull. Cancer, 2004, 91, 9, 677-683

- 118 - MAYEUX P.
En l'absence d'hormone, le récepteur de l'érythropoïétine est déjà un dimère.
Méd. Sci., 1999, 15, 8-9, 1049-1050
- 119 - McHUTCHISON J., MANNS M., LONGO D.
Definition and management of anemia in patients infected with hepatitis C virus.
Liver Int., 2006, 26, 4, 389-398
- 120 - MERIC J.-B., MORERE J.-F.
Anémie chez les patients atteints de cancer pulmonaire.
Bull. Cancer, 2005, 92, 5, 439-444
- 121 - MESSER J., ESCANDE B.
Une nouvelle jeunesse pour les facteurs de croissance hématopoïétiques ?
Arch. Pédiatr., 2003, 10, 10, 857-860
- 122 - Ministère de la jeunesse, des sports et de la vie associative
Santesport, lutte contre le dopage et protection de la santé des sportifs.
[En ligne]. (page consultée le 23 octobre 2006)
Adresse URL <http://www.santesport.gouv.fr/>
- 123 - Ministère de la santé et de la solidarité
Fiche d'information thérapeutique, Époétine bêta, Neorecormon[®].
J. Off. Répub. Fr., 2005, 41/239
- 124 - Ministère de la santé et de la solidarité
Fiche d'information thérapeutique, Darbépoétine alfa, Aranesp[®].
J. Off. Répub. Fr., 2006, 12/120
- 125 - Ministère de la santé et de la solidarité
Fiche d'information thérapeutique, Époétine alfa, Eprex[®].
J. Off. Répub. Fr., 2006, 14/119
- 126 - MOURAD G., CHONG G., CRISTOL J.-P.
Hyperimmunisation anti-HLA post-transfusionnelle.
Néphrologie, 1993, 14, 2, 91-94
- 127 - NAEIJE R., PAGNAMENTA A.
Point de vue sur le dopage.
Rev. Med. Brux., 1999, 20, 3, 153-158
- 128 - NAJMAN A., GUIGON M., LEMOINE F.
Hématopoïèse.
In : Hématologie / ed. par Albert NAJMAN.
Paris : Ellipses, 1994.- 456p.

- 129 - NAJMAN A.
Les polyglobulies.
In : Hématologie / ed. par Albert NAJMAN.
Paris : Ellipses, 1994.- 456p
- 130 - NEGRIN R., STEIN R., DOHERTY K.
Maintenance treatment of the anemia of myelodysplastic syndromes with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin : evidence for in vivo synergy.
Blood, 1996, 87, 10, 4076-4081
- 131 - NORGDARD N., WALL G.
Possible drug rash with eosinophilia and systemic symptoms syndrome after exposure to epoetin alfa.
Am. J. Health Syst. Pharm., 2005, 62, 23, 2524-2526
- 132 - NOVAK B., FORCE R, MUMFORD B., SOLBRIG R.
Erythropoietin-induced hypertensive urgency in a patient with chronic renal insufficiency : case report and review of the literature.
Pharmacotherapy, 2003, 23, 2, 265-269
- 133 - O'SHAUGHNESSY J.
Effects of epoetin alfa on cognitive function, mood, asthenia, and quality of life in women with breast cancer undergoing adjuvant chemotherapy.
Clin. Breast Cancer, 2002, 3, Supl., S116-S120
- 134 - PAGEL H., WEISS C., JELKMANN W.
Pathology and pharmacology of erythropoietin.
Berlin : Springer-Verlag, 1992.- 328p.
- 135 - PANCHAPAKEASAN U., AUSTIN S., SHAFRANSKY A.
Recovery of pure red-cella aplasia secondary to antierythropoietin antibodies after cessation of recombinant human erythropoietin.
Intern. Med. J., 2003, 33, 9-10, 468-471
- 136 - PARK C., SHIN Y., SHIN M. et al.
Pyoderma gangrenosum and spinal epidural abscess after subcutaneous administration of recombinant human erythropoietin.
Nephrol. Dial. Transplant., 1997, 12, 7, 1506-1508
- 137 - PILLET S., LE GUADER N.
Interaction des virus avec la voie cellulaire de réponse à l'hypoxie.
Méd. Sci., 2005, 21, 5, 517-522
- 138 - PIRNAY F.
Le dopage et le sport.
Rev. Med. Liège, 2001, 56, 4, 265-268

- 139 - PR Newswire Europe Ltd.
Succès de quatre études cliniques pivots de phase III consacrées à CERA.
[En Ligne]. (page consultée le 10 avril 2006)
Adresse URL : <http://www.prnewswire.co.uk/cgi/news/release?id=160613>
- 140 - POISSON D.
Eprex : historique et développement.
Nouv. Rev. Fr. Hématol., 1995, 37, suppl.1, S1-S3
- 141 - RAZZOUK B., HORD J., HOCKENBERRY M.
Double-blind, placebo-controlled study of quality of life, hematologic end points, and safety of weekly epoetin alfa in children with cancer receiving myelosuppressive chemotherapy.
J. Clin. Oncol., 2006, 24, 22, 3583-3589
- 142 - REDDY V., TURNEY J.
Epoetin-alpha-associated total alopecia.
Nephrol. Dial. Transplant., 2001, 16, 7, 1525
- 143 - REAMACHA A. et al.
Erythropoietin plus granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of myelodysplastic syndromes. Identification of a subgroup of responders.
Haematologica, 1999, 84, 12, 1858-1064
- 144 - REMY I. et coll.
Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change.
Science, 1999, 283, 5404, 990-993
- 145 - REZAI KALANTARI H.
Surveillance et effets secondaires des transfusions.
Rev. Med. Liege, 2002, 57, 6, 385-388
- 146 - RIGOURD V., KIEFER F., DOMMARGUES M.-A., AYACHI A.
Érythropoïétine chez le nouveau-né : efficacité comparée des voies d'administration sous-cutanée et intraveineuse.
Arch. Pédiatr., 2004, 11, 4, 319-326
- 147 - ROGER S., BAKER L., RAINE A.
Autonomic dysfunction and the development of hypertension in patients treated with recombinant human erythropoietin (r-HuEPO).
Clin. Nephrol., 1993, 39, 2, 103-110.
- 148 - ROSENCHER N., WOIMANT G., OZIER Y., CONSEILLER C.
Stratégie préopératoire d'épargne sanguine homologue et érythropoïétine en péri-chirurgie.
Transfus. Clin. Biol., 1999, 6, 6, 70-370
- 149 - ROSENCHER N., OZIER Y.
Érythropoïétine en péri-opératoire.
Transfus. Clin. Biol., 2003, 10, 3, 159-164

- 150 - ROUX A.
Pharmacocinétique de l'érythropoïétine.
2^{ème} symposium Eprex[®].
Paris ; Cilag, 1991.- 12p.
- 151 - ROYER B., AROCK M.
Utilisations thérapeutiques des facteurs de croissance.
1. Érythropoïétine et thrombopoïétine.
Ann. Biol. Clin., 1998, 56, 2, 143-152
- 152 - RUEDIN P., STOERMAN C., PECHERE-BERTSCHI A.
Comparaison de l'efficacité et de la tolérance de l'érythropoïétine humaine recombinante entre l'administration intraveineuse et sous-cutanée en hémodialyse chronique.
Nephrol., 1992, 13, 2, 87-92
- 153 - SAINTY D., SEBAHOUN G.
Anémies inflammatoires.
In : Hématologie clinique et biologique / ed. par Gérard SEBAHOUN.
Rueil-Malmaison : Arnette, 2005.- 578p.
- 154 - SAIZOU C., MORIETTE G., SAUCHEZ L.
Erythropoïétine et anémie du prématuré.
Arch. Pédiatr., 2004, 11, 12, 1516-1520
- 155 - SCHEEN A.-J.
Le dopage à l'érythropoïétine ou l'utilisation détournée des progrès thérapeutiques.
Rev. Med. Liège, 1998, 53, 8, 499-502
- 156 - SCHENCKERY J., LEFORT L.
Le dopage médicamenteux du sportif.
Monit. Pharm. Lab., 1999, 19, 2327, cahier II, 16p.
- 157 - SCHENCKERY J., PUNGIER V.
Les anémies.
Monit. Pharm. Lab., 2002, 77, 2459, cahier II, 15p.
- 158 - SEBAHOUN G.
Érythropoïèse.
In : Hématologie clinique et biologique / ed. par Gérard SEBAHOUN.
Rueil-Malmaison : Arnette, 2005.- 578p.
- 159 - SHERMAN M., CHEN L., COOPER M.
Clinical recommendations for the use of recombinant human erythropoietin in patients with hepatitis C virus being treated with ribavirin.
Can. J. Gastroenterol., 2006, 20, 7, 479-485

- 160 - SHINOHARA K., MITANI N., MIYAZAKI M.
Pure red-cell aplasia caused by the antibody to recombinant erythropoietin, epoetin-beta, in a Japanese patient with chronic renal failure.
Am. J. Hematol., 2005, 78, 4, 15-20
- 161 - SCHWARTZENBERG S., KEREN G., GEORGE J.
Erythropoietin as a protective agent in myocardial ischemia.
Harefuah, 2006, 145, 5, 380-396
- 162 - SCHWARTZENBERG S., BEN-SHOSHAN J., KEREN G., GEORGE J.
The role of erythropoietin in myocardial protection : potential mechanisms and applications.
Expert Rev. Cardiovasc. Ther., 2006, 4, 1, 41-50
- 163 - SILVERBERG D. et al.
Anemia during the predialysis period : a key to cardiac damage in renal failure.
Nephron, 1998, 80, 1, 1-5
- 164 - SILVERBERG D., WEXLER D., BLUM M.
The use of subcutaneous erythropoietin and intravenous iron for the treatment of the anemia of severe, resistant congestive heart failure improves cardiac and renal function and functional cardiac class, and markedly reduces hospitalisations.
J. Am. Coll. Cardiol., 2000, 35, 7, 1737-1744
- 165 - SILVERBERG D., WEXLER D., SHEPS D.
Effect of correction of mild anemia in severe, resistant congestive heart failure using subcutaneous erythropoietin and intravenous iron : a randomized controlled study.
J. Am. Coll. Cardiol., 2001, 37, 7, 1775-1780
- 166 - SINGBARTL G.
Adverse events of erythropoietin in long-term and in acute/short-term treatment.
Clin Investig., 1994, 72, S36-S43
- 167 - SINGLAS E.
Pharmacologie clinique de la darbépoétine alfa, une nouvelle protéine stimulant l'érythropoïèse (NESP).
La lettre du Pharmacologue, 2003, 17, 1, 1-7
- 168 - SINNASSAMY P., ANDRE J.-L., TREIZE G., LEROY B.
Effet du traitement par l'érythropoïétine humaine recombinante sur l'anémie de l'enfant en insuffisance rénale.
Arch. Fr. Pédiatr., 1993, 50, 3, 201-208
- 169 - SPAETH D.
Principes généraux du traitement de l'anémie des patients cancéreux.
Bull. Cancer, 2002, 89, 11, 935-947

- 170 - SPANO J.-P., NAMER M.
Anémie et cancer.
Bull. Cancer, 2005, 92, 5, 428
- 171 - STEINBERG H. et al.
Erythropoietin and visual hallucinations.
N. Engl. J. Med., 1991, 325, 4, 285
- 172 - STEINBERG H. et al.
Erythropoietin and visual hallucinations in patients on dialysis.
Psychosomatics, 1996, 37, 6, 556-563
- 173 - STIVELMAN J.
Benefits of anemia treatment on cognitive function.
Nephrol. Dial. Transpl., 2000, 15, Suppl. 3, 29-35
- 174 - STORRING P.-L., TIPLADY R.-J., GAINES DAS R.-E.
Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties.
Br. J. Haematol., 1998, 100, 1, 79-89
- 175 - STRACZEK H., LESESVE J.-F., LATGER-CANNARD V., BORDIGONI P.
Polyglobulie primitive de l'enfant : un diagnostic rare.
Ann. Biol. Clin., 2005, 63, 1, 83-87
- 176 - STRAVITZ R., CHUNG H., STERLING R.
Antibody-mediated pure red cell aplasia due to epoetin alfa during antiviral therapy of chronic hepatitis C.
Am. J. Gastroenterol., 2005, 100, 6, 1415-1419
- 177 - SULLIVAN S., CALHOUN D., MAHESHWARI A.
Tolerance of simulated amniotic fluid in premature neonates.
Ann. Pharmacother., 2002, 36, 10, 1518-1524
- 178 - TAYLOR J., McLAREN M., HENDERSON I, STEWART W., BELCH J.
Prothrombotic effect of erythropoietin in dialysis patients.
Nephrol. Dial. Transplant., 1992, 7, 3, 235-239
- 179 - TEMPLE R., EADINGTON D., SWAINSON C., WINNEY R.
Seizure related to erythropoietin treatment in patients undergoing dialysis.
Br. Med. J., 1990, 300, 6716, 46
- 180 - TERUEL J.-L., et al.
Pain after three preparations of recombinant human erythropoietin.
Nefrologia, 1992, 12 (Suppl. 1), 43-46

- 181 - CONGRESS OF THE EUROPEAN SOCIETY OF HEMATOLOGY (9 ; 2004 ; Geneva)
TESCH H. et al.
Evaluation of once-weekly epoetin alfa in anemic patients with hematologic cancers receiving chemotherapy : preliminary results of the epolym trail.
- 182 - THEVENOT T., DI MARTINO V., LUNEL-FABIANI F.
Complementary treatments of chronic viral hepatitis C.
Gastroenterol. Clin. Biol., 2006, 30, 2, 197-214
- 183 - TON THAT H., IBOS R., DUPRE-GOUDABLE C., DURAND D.
Thromboses de l'abord vasculaire des patients hémodialysés traités par l'érythropoïétine recombinante (r-HuEPO).
1^{er} symposium Eprex®.
Paris : Cilag, 1990.- 6p.
- 184 - TRIMOREAU F., PRALORAN V.
Hématopoïèse et sa régulation.
In : Hématologie clinique et biologique / ed. par Gérard SEBAHOUN.
Rueil-Malmaison : Arnette, 2005.- 578p.
- 185 - UGO V., CASADEVALL N.
Place des facteurs de croissance dans le traitement des syndromes myéodysplasiques.
Patho. Biol., 2002, 50, 4, 268-274
- 186 - URENA P.
Traitement de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique par un activateur longue durée de l'érythropoïèse.
Presse Med., 2002, 31, 11, 505-514
- 187 - VAINCHENKER W.
Régulation de l'érythropoïèse.
Nouv. Rev. Fr. Hématol., 1993, 35, 3, 309-312
- 188 - VAINCHENKER W. et coll.
Hématopoïèse et sa régulation. Comparaison entre l'érythropoïèse et la mégacaryocytopoïèse.
Bull. Acad. Natle. Méd., 1994, 178, 5, 753-779
- 189 - VAINCHENKER W.
Les cellules souches hématopoïétiques.
Thérapie, 2001, 56, 4, 379-381
- 190 - VAISLIC C., BICAL O., DELEUZE P. et al.
Cardiac surgery without transfusion in 2005.
Arch. Mal. Cœur Vaiss., 2005, 98, 1, 7-12

- 191 - VAN DER MEER P., LIPSIC E.
Erythropoietin repair of the failing heart.
J.Am. Coll. Cardiol., 2006, 48, 1, 185-186
- 192 - VAN WYCK D.
Iron status in patients receiving erythropoietin for dialysis-associated anemia.
Kidney Int., 1989, 35, 2, 712-716
- 193 - VARET B., CASADEVALL N., LACOMBE C.
L'érythropoïétine.
Méd. Sci., 1988, 6, 4, 366-372
- 194 - VAUBOURDOLLE M.
Hématologie.
Rueil-Malmaison : Groupe Liaisons Santé, 2000.-3, 301p.- (Le Moniteur Internat)
- 195 - VERHELST D., ROSSERT J., CASADEVALL N.
Treatment of erythropoietin-induced pure red-cell aplasia : a retrospective study.
Lancet, 2004, 363, 9423, 1768-1771
- 196 - VIGNOT S., SPANO J.-P.
Anémie et cancers colorectaux.
Bull. Cancer, 2005, 92, 5, 432-438
- 197 - VIRON B., KOLTA A., KILADJIAN J.-J.
Anticorps anti-érythropoïétine humaine recombinante : une cause exceptionnelle de résistance à l'érythropoïétine.
Néphrologie, 2002, 23, 1, 19-22
- 198 - VIRON B., JAAR B., VERDY E., MIGNON F.
Erythropoietin-induced protein S deficiency and vena cava thrombosis.
Nephrol. Dial. Transplant., 1992, 7, 9, 979
- 199 - WAUTERS J.-P.
Erythropoïétine : indications médicales et non médicales.
Med. Hyg., 1999, 57, 2244, 406-408
- 200 - WONG K., LI P., LUI S., NICHOLLS M., LAI K.
The adverse effects of recombinant human erythropoietin therapy.
Adverse Drug React. Acute Poisoning Rev., 1990, 9, 4, 183-206
- 201 - YILMAZ D., CETINQUL N., KANTAR M.
A single institutional experience : is epoetin alpha effective in anemic children with cancer ?
Pediatr. Hematol. Oncol., 2004, 21, 1, 1-8
- 202 - ZOUBEK A., KRONBERGER M.
Early epoetin alfa treatment in children with solid tumors.
Med. Pediatr. Oncol., 2002, 39, 4, 459-462

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 1^{er} avril 2008

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par **Maxime DAUBLIN**

Sujet :

**Erythropoïétine : de la physiologie aux
utilisations médicales et non médicales.
Rôle du pharmacien d'officine dans la
délivrance.**

Jury :

Président : Mme B. FAIVRE Maître de Conférences

Juges : Mme B. FAIVRE Maître de Conférences
 M. G. TROCKLE Maître de Conférences
 M. C. DIDIER Pharmacien

Vu,

Nancy, le 20 Février 2008

Le Président du Jury,

Les Codirecteurs de Thèse.



Mme B. FAIVRE
Maître de Conférence



Mme B. FAIVRE
Maître de Conférences



M. G. TROCKLE
Maître de Conférences

Vu et approuvé,

Nancy, le 21.02.2008

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

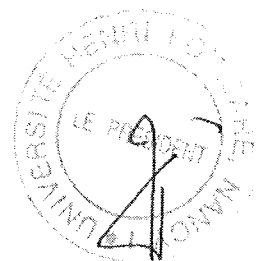



Chantal FINANCE

Vu,

Nancy, le 25.02.08

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,



Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement : 2378

TITRE

**ERYTHROPOIETINE : DE LA PHYSIOLOGIE AUX UTILISATIONS MEDICALES
ET NON MEDICALES
ROLE DU PHARMACIEN D'OFFICINE DANS LA DELIVRANCE**

**Thèse soutenue le 1^{er} avril 2008
Par Maxime DAUBLIN**

RESUME :

EPO et dopage sont indissociables dans l'esprit collectif, principalement depuis le tour de France cycliste 1998 et les révélations de l'affaire FESTINA. Mais l'érythropoïétine est avant tout une hormone naturellement produite par le rein, qui a été découverte il y a un peu plus d'un siècle. C'est le facteur de croissance principal des globules rouges.

Utilisée au départ dans le traitement de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique, l'EPO a vu le nombre de ses indications augmenter au cours de ces deux décennies : anémie des cancers, des tumeurs solides mais également programme de transfusions autologues et chirurgie orthopédique majeure programmée.

Parallèlement, une autre utilisation non reconnue se développe. Il s'agit de l'introduction de l'EPO dans le monde du sport comme agent dopant. Mais depuis quelques années, les instances sportives bénéficient de techniques fiables de dépistage.

Les spécialités à base d'EPO sont sorties de la réserve hospitalière en 2005. Nous avons réalisé une enquête auprès de pharmaciens d'officine. Ce travail va permettre de dresser un bilan des connaissances des officinaux deux ans après le passage en ville des EPO. Même si la majorité des interrogés s'estiment compétents dans la délivrance de l'EPO, une certaine ambiguïté apparaît dans les réponses.

MOTS CLES : EPO – Anémie – Dopage – Sortie Réserve Hospitalière – Enquête – Officine

| Directeurs de thèse | Intitulé du laboratoire | Nature |
|---------------------|-------------------------|---|
| Mme Béatrice FAIVRE | Hématologie | Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> |
| M. Gabriel TROCKLE | Pharmacodynamie | Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> |
| | | Thème 3 / 6 |

Thèmes

1 - Sciences fondamentales
3 - Médicament
5 - Biologie

2 - Hygiène/Environnement
4 - Alimentation – Nutrition
6 - Pratique professionnelle