

Les nouvelles perspectives thérapeutiques de l'érythropoïétine

Aurélie Yonnet

▶ **To cite this version:**

Aurélie Yonnet. Les nouvelles perspectives thérapeutiques de l'érythropoïétine. Sciences pharmaceutiques. 2005. dumas-01214128

HAL Id: dumas-01214128
https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01214128

Submitted on 9 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier
GRENOBLE
PHARMACIE

SICD1
Bibliothèques
de l'UJF et de Grenoble INP

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 n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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 au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.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/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

B.U.M GRENOBLE
D 115 087152 5

1er exemplaire

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2005

n° 7035

LES NOUVELLES PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES DE L'ERYTHROPOIETINE

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLOME D'ETAT

Aurélie YONNET
Née le 18 décembre 1981 à Echirolles (38)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE, LE 10 NOVEMBRE 2005

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury :

Monsieur le professeur Chistophe Ribuot

Membres :

Madame le docteur Marie Joyeux-Faure

Madame le docteur Anne Janvier

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE GRENOBLE MÉDECINE - PHARMACIE

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2005 n°

LES NOUVELLES PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES DE L'ERYTHROPOIETINE

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLOME D'ETAT

Aurélie YONNET
Née le 18 décembre 1981 à Echirolles (38)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE, LE 10 NOVEMBRE 2005

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

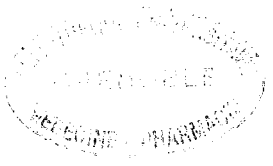
Président du jury :

Monsieur le professeur Chistophe Ribuot

Membres :

Madame le docteur Marie Joyeux-Faure

Madame le docteur Anne Janvier



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : M. le Professeur **P. DEMENGE**
Vice-Doyenne : Mme **A. VILLET**

PROFESSEURS DE PHARMACIE

BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	(Emérite)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-Technique
DANEL	Vincent	Toxicologie
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Bio-Inorganique
DEMENGE	Pierre	Physiologie / Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie / Biotechnologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique
RIBUOT	Christophe	Physiologie / Pharmacologie
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacie Galénique

PROFESSEUR ASSOCIE (PAST)

CHAMPON	Bernard	Pharmacie Clinique

Mise à jour du 11/06/2004

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie
ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique
BARTOLI	Marie-Hélène	Pharmacie Clinique et Biotechn.
BOUMENDJEL	Ahcène	Pharmacognosie
BRUGERE	Jean-François	Parasitologie
BURMEISTER	Wilhelm	Virologie
CARON	Cécile	Biologie Moléculaire
CHARLON	Claude	Chimie Pharmacie
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie et génie de la formulation
DELETRAZ	Martine	Droit Pharmaceutique Economie
DESIRE	Jérôme	Chimie Bioorganique
DIJOUX-FRANCA	Marie-Geneviève	Pharmacognosie
DURMORT-MEUNIER	Claire	Virologie Moléculaire Structurale
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique
FAURE	Patrice	Biochimie C
FAURE-JOYEUX	Marie	Physiologie-Pharmacologie
FOUCAUD-GAMEN	Jacqueline	Immunologie
GEZE	Annabelle	Pharmarcotechnie Galénique
GERMI	Raphaële	Bactériologie et virologie clinique
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie – Pharmacologie
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique
GUIRAUD	Pascale	Biologie Cellulaire et Génétique
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie
KRIVOBOK	Serge	Botanique – Cryptogamie
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique
PINEL	Claudine	Parasitologie
RAVEL	Anne	Chimie Analytique
RICHARD	Jean-Michel	Chimie Toxico.Ecotox.
RIONDEL	Jacqueline	Physiologie - Pharmacologie
SEVE	Michel	Ens. Physique / Rech. Biochimie
TAILLANDIER	Georges	Chimie Organique
VILLEMAIN	Danielle	Mathématiques
VILLET	Annick	Chimie Analytique

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

ROUTABOUL	Christel	Chimie Générale

DEDICACES

A mes parents,

A Mathilde et Sylvain,

A Manue, Cécile, Guillaume, Rapha, Marion, Charlotte, Nils, Hugues, Florence et les autres…

… Merci pour tout !

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Christophe Ribuot,

J'ai pu apprécier la qualité de vos cours et je vous remercie d'avoir accepté la présidence de cette thèse.

A Madame le Docteur Marie Joyeux-Faure,

Sans qui cette thèse n'aurait pas eu lieu, je vous remercie pour m'avoir guidé tout au long de son élaboration.

Je vous remercie également de votre disponibilité et vos encouragements, j'ai beaucoup apprécié de travailler avec vous.

A Madame le Docteur Anne Janvier,

Par qui j'ai appris beaucoup sur la pharmacie d'officine.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE..... 9

PARTIE 1 : Mécanisme d'action de l'érythropoïétine sur l'érythropoïèse..... 11

1. Historique..... 12
2. Aspect biochimique et site de production..... 12
3. Rappels sur l'érythropoïèse..... 14
4. Rôle de l'EPO dans l'érythropoïèse 17
5. Le récepteur à l'EPO 17
6. Régulation de la production d'EPO : le rôle de l'hypoxie..... 20
7. Utilisation thérapeutique actuelle..... 23
   - 7.1. Mode d'utilisation..... 25
   - 7.2. Indications thérapeutiques..... 25
     - 7.2.1. Traitement de l'anémie chez le sujet insuffisant rénal, dialysé ou non..... 26
     - 7.2.2. Traitement de l'anémie chez le prématuré..... 26
     - 7.2.3. Traitement de l'anémie chez les patients présentant une tumeur solide, un lymphome malin ou un myélome multiple..... 26
     - 7.2.4. Traitement de l'anémie chez le patient infecté par le VIH, en particulier s'il est traité par zidovudine..... 27
     - 7.2.5. Augmentation du volume d'hématies en période péri opératoire..... 27
   - 7.3. Posologies..... 29

7.4. Les effets indésirables..... 31

7.4.1. Les effets indésirables d'apparition précoce..... 31

7.4.2. Les effets indésirables d'apparition tardive..... 31

7.4.2.1.L'hypertension artérielle..... 31

7.4.2.2.L'érythroblastopénie..... 32

7.4.2.3.La thrombose..... 32

8. Angiogénèse..... 34

9. Conclusion..... 36

PARTIE 2 : La neuroprotection induite par l'érythropoïétine..... 37

1. Libération de l'EPO et expression de l'EPOR dans le système nerveux central et régulation de leur gène..... 38

2. Rôle de l'EPO dans le développement cérébral..... 40

3. Rôle de l'EPO dans la protection neuronale..... 41

3.1. Protection contre l'ischémie..... 41

3.2. Protection contre la neurotoxicité induite par le glutamate..... 46

3.3. Rôle anti-inflammatoire..... 47

4. Mécanismes d'action de l'EPO..... 48

5. Impact clinique..... 50

5.1. Le passage de la barrière hémato-encéphalique..... 50

5.2. Essai clinique chez l'homme..... 52

5.3. L'asialoérythropoïétine..... 56

6. Conclusion..... 60

PARTIE 3 : La cardioprotection induite par l'érythropoïétine..... 61

1. Le préconditionnement..... 62
2. Etudes de l'effet de l'EPO sur les cellules cardiaques..... 64
3. Etudes in vitro de l'effet de l'EPO sur cœur isolé..... 65
4. Etudes in vivo de l'effet de l'EPO..... 67
5. Voies de signalisation et médiateurs de la cardioprotection..... 72
   - 5.1. Les voies de signalisation..... 73
   - 5.2. Médiateurs de la cardioprotection 74
     - 5.2.1. Les canaux potassiques 74
     - 5.2.2. Les NO synthases..... 75
6. Bénéfices thérapeutiques potentiels..... 77
   - 6.1. Anémie et maladies cardio-vasculaires..... 77
   - 6.2. Cardioprotection contre l'ischémie..... 78

CONCLUSION GENERALE..... 80

ABREVIATIONS..... 85

BIBLIOGRAPHIE..... 86

SERMENT DE GALIEN..... 93

INTRODUCTION GENERALE

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone produite par le rein, régulant l'hématopoïèse. On sait depuis une quinzaine d'année produire par génie génétique l'EPO recombinante humaine (EPOr-Hu). Elle est actuellement utilisée dans le traitement de l'anémie chronique associée à certaines pathologie (insuffisance rénale chronique, cancer, ...) et a apporté une avancée considérable dans ce domaine.

Récemment, les études sur cette molécule ont montré que l'activité de l'EPO n'était pas limitée à une action exclusive sur l'hématopoïèse. L'utilisation de l'EPOr-Hu dans divers modèles expérimentaux sur cellules ou animaux a permis de découvrir que cette molécule est capable d'induire une protection cellulaire lors d'un stress. En effet, il a été observé que l'EPO jouait un rôle protecteur sur les cellules neuronales du système nerveux central en cas d'ischémie : l'injection d'EPO avant, au moment ou juste après une ischémie cérébrale permet de réduire la taille de la lésion et d'améliorer la récupération neuropsychologique.

On sait maintenant que l'EPO joue également un rôle protecteur au niveau cardiaque lors de l'exposition à différents stress comme l'ischémie.

Ces nombreuses études expérimentales permettent aujourd'hui d'envisager une application clinique potentielle de l'effet cytoprotecteur de l'EPO. Ainsi, ces observations suscitent de grands espoirs concernant la prise en charge des patients suite à un accident vasculaire cérébral (AVC) ou à un infarctus du myocarde (IDM), ou en prévention de situations ischémiques associées à certaines chirurgies.

Je m'attacherai donc à développer tout d'abord l'activité hématopoïétique de l'EPO ainsi que ses applications thérapeutiques actuelles mais également les effets indésirables induits par le traitement.

Dans une deuxième partie, j'exposerai quelles sont les connaissances actuelles concernant l'action neuroprotectrice et quelles pourraient être ses applications thérapeutiques. En effet, une étude clinique pilote menée chez des patients présentant un AVC met en évidence l'effet protecteur de l'EPO et apporte de grands espoirs dans la prise en charge de l'AVC.

Dans une troisième partie, je détaillerai la cardioprotection induite par l'EPO dans divers modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo*. Différents mécanismes médiant cet effet cardioprotecteur seront exposés ainsi que les enjeux thérapeutiques.

PARTIE 1

Mécanisme d'action de l'érythropoïétine sur l'érythropoïèse

L'activité de l'EPO sur la production des globules rouges a été très largement caractérisée depuis la découverte de cette molécule endogène. On est maintenant capable de produire cette molécule par génie génétique et même de la modifier pour obtenir une demi-vie plus longue.

L'action hématopoïétique est la seule propriété utilisée actuellement en thérapeutique. L'utilisation de l'EPO exogène depuis 1988 a permis une grande avancée dans le traitement de l'anémie.

1. Historique

Il y a maintenant plus d'un siècle que Carnot et Deflandre ont émis l'hypothèse qu'un facteur humoral, qu'ils avaient appelé « hémopoïétine », régulait la production de globules rouges. Il a fallu attendre 1977 pour que Miyake et ses collaborateurs purifient et isolent l'érythropoïétine humaine de l'urine d'un patient en anémie aplasique. En 1985, l'équipe de Jacobs réussit le clonage du gène de l'EPO et identifie sa séquence nucléotidique (Ng *et al*, 2003). L'EPOr-Hu est ensuite utilisée en thérapeutique à partir de 1988.

2. Aspect biochimique et site de production

L'EPO est une glycoprotéine hautement glycosylée de 30,4 kD, codée par le bras long du chromosome 7, composée de 165 acides aminés. Le polypeptide synthétisé à partir

de l'ARNm est formé de 193 acides aminés. Il subit ensuite des modifications post-traductionnelles : glycosylation, formation de 2 ponts disulfures et clivage de la chaîne.

La structure de la protéine mature possède 2 ponts disulfures, 3 sites de N-glycosylation (sur les acides aminés 24, 38 et 83) et un site de O-glycosylation (acide aminé 126).
Les ponts disulfures sont situés entre les acides aminés 6 et 161 et entre les acides aminés 29 et 33. Le premier pont est plus important sur le plan fonctionnel car il permet de maintenir la molécule dans une conformation correcte qui lui permettra d'être reconnue par les récepteurs (Lappin, 2003).

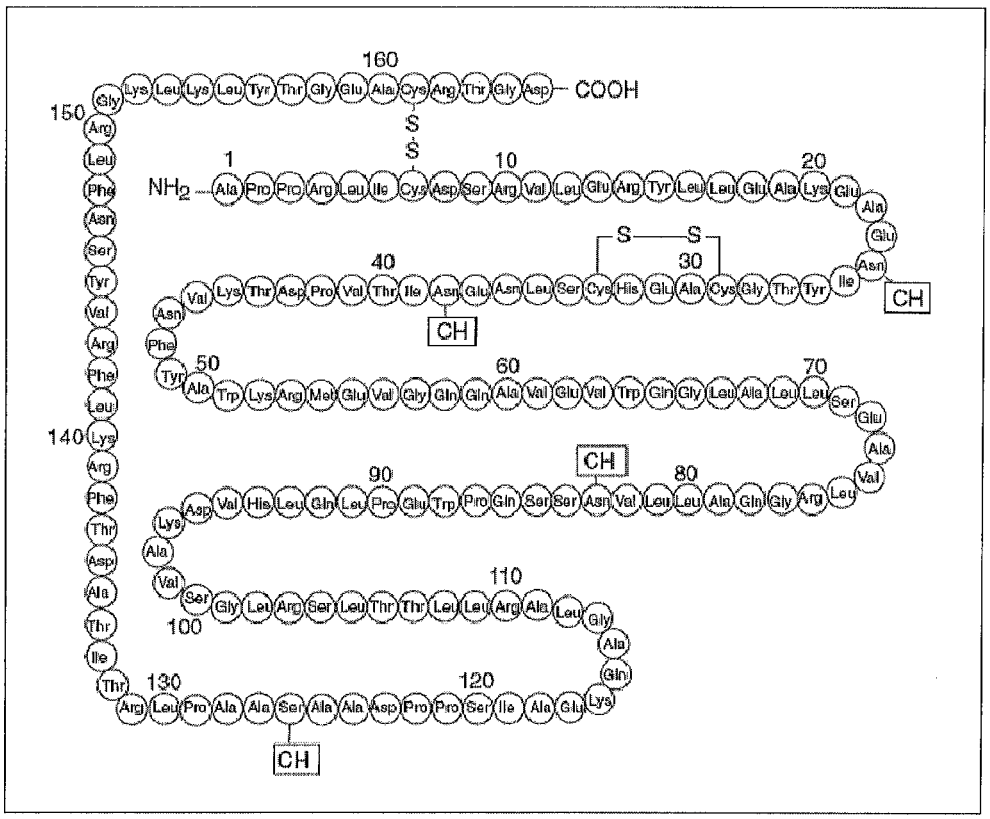


Figure de 1 : Structure primaire de l'érythropoïétine (Lappin, 2003)

Plusieurs chaînes glycosylées sont terminées par un acide sialique, ce qui ralentit l'élimination de l'EPO par le foie. En effet, l'EPO perd son activité biologique hématopoïétique par désialysation, ce qui révèle des sites reconnus par des récepteurs hépatocytaires jouant un rôle dans son élimination.

L'EPO est produite par les cellules péritubulaires rénales chez l'adulte et par les hépatocytes chez le fœtus. Seule une faible quantité d'EPO est synthétisée par le foie à l'âge adulte (Fisher, 2003).

3. rappels sur l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est l'ensemble des mécanismes qui concourent à la formation des érythrocytes.

Physiologiquement, cette formation est continue et estimée à 200 milliards d'hématies par jour. Elle permet d'assurer le maintien d'un stock hémoglobinique constant, en produisant à chaque instant un nombre de réticulocytes équivalent au nombre d'hématies phagocytées lors de l'hémolyse physiologique.

L'érythropoïèse a lieu dans la moelle osseuse, à partir des cellules souches myéloïdes totipotentes qui sont capables de donner naissance à n'importe quelles cellules myéloïdes et d'assurer le maintien d'un pool constant d'hématies.

A partir de ces cellules, se forment peu à peu les progéniteurs BFU-E puis CFU-E qui donnent naissance au cours de la maturation au proérythroblaste, puis à l'érythroblaste basophile, l'érythroblaste acidophile puis le réticulocyte libéré dans la circulation sanguine.

La dernière phase de maturation du réticulocyte en hématie aura lieu dans le compartiment sanguin.

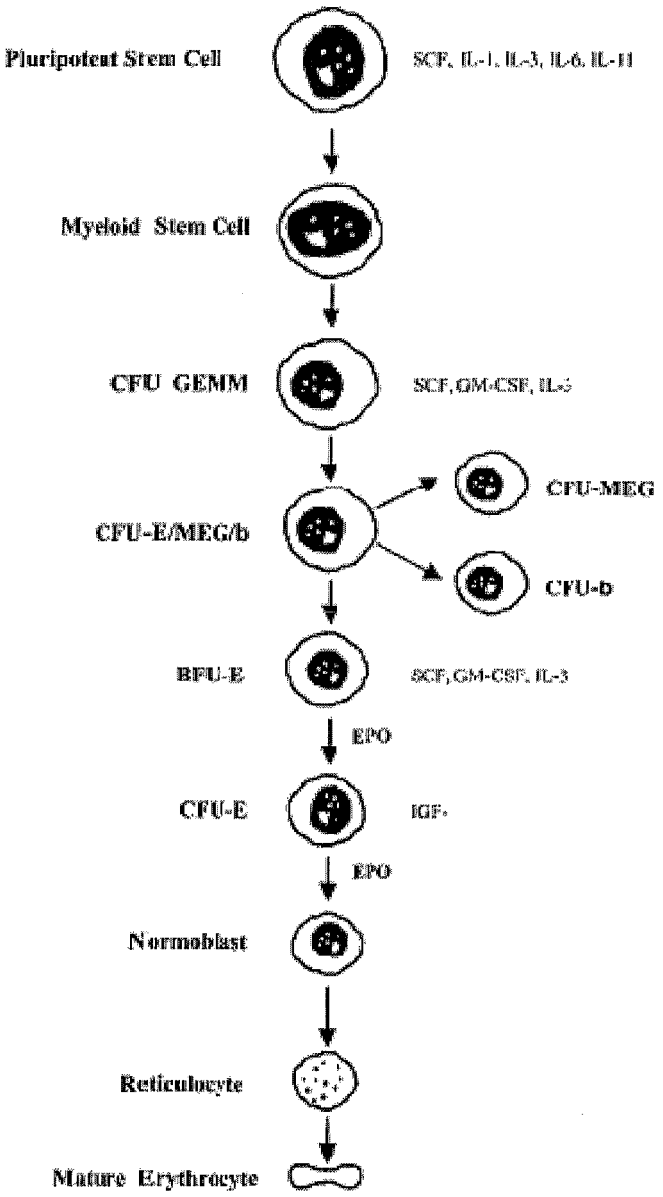


Figure 2 : L'érythropoïèse (Fisher, 2003)

4. Rôle de l'EPO dans l'érythropoïèse :

L'EPO est un facteur de croissance majeur de l'érythropoïèse.

Le déroulement de l'érythropoïèse, de la cellule pluripotente à l'érythrocyte mature est régulé par des facteurs de croissance qui sont des cytokines (SCF, IL-1, IL-3, IL-4, IL-9, IL-11, GM-CSF, IGF-1 et EPO).

L'EPO agit principalement sur les progéniteurs BFU-E et CFU-E de la lignée érythrocytaire de manière synergique avec d'autres interleukines (SCF, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-9, et IGF-1), et favorise leur prolifération et leur maturation en proérythroblastes (Fisher, 2003).

L'EPO a une action particulière anti-apoptotique, c'est-à-dire qu'elle réduit le taux de mort cellulaire parmi les progéniteurs de la lignée érythrocytaire. Alors que les autres cytokines, elles, stimulent préférentiellement la maturation des cellules.

5. Le récepteur à l'EPO

La régulation de l'érythropoïèse par l'EPO est permise par les récepteurs à l'EPO (EPOR), situés à la surface membranaire des progéniteurs de la lignée érythrocytaire.

C'est le progéniteur CFU-E qui possède le plus de récepteurs à sa surface, d'où sa forte sensibilité à l'EPO. Le nombre de récepteurs décroît au fur et à mesure de la différentiation cellulaire. Ainsi, le réticulocyte et l'érythrocyte mature ne portent plus d'EPOR (Lappin, 2003).

L'EPOR est formé par deux protéines trans-membranaires identiques. La fixation de l'EPO sur le site spécifique extracellulaire entraîne une dimérisation du récepteur.

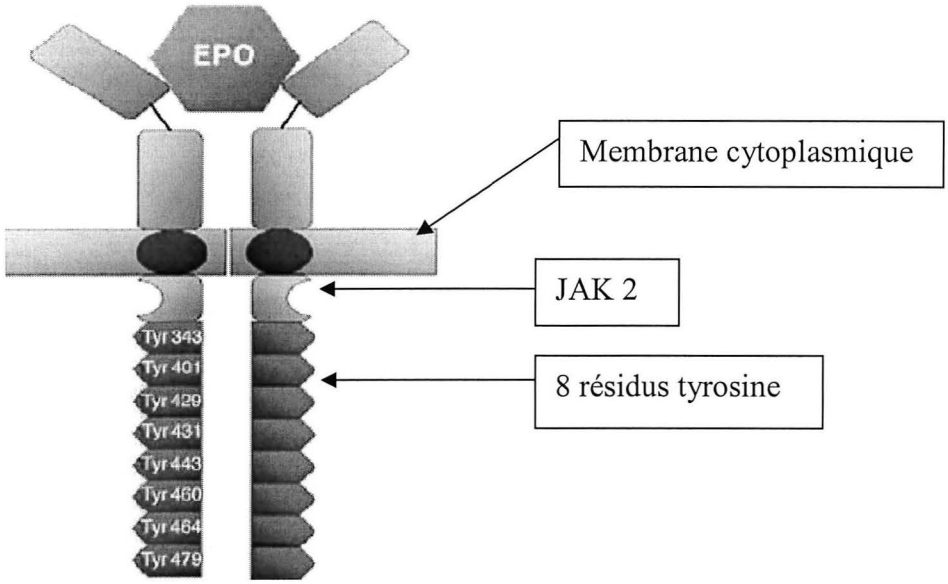


Figure 3 : Le récepteur à l'érythropoïétine (EPOR). (Lappin, 2003)

Le changement de conformation active les deux protéines kinases Janus tyrosine kinase 2 (JAK 2), fixées sur le récepteur de manière constitutive, qui se dimérisent à leur tour et passent ainsi sous forme active.

Ces kinases phosphorylent huit résidus tyrosine du domaine cytoplasmique du récepteur. Cela provoque l'activation par phosphorylation de protéines de signalisation intracellulaires qui possèdent un domaine SH2 (Src homology 2), comme :

- La **PI-3 kinase** (phosphatidylinositol 3-kinase) qui active l'Akt kinase (sérine/thréonine kinase). Cette voie a un effet anti-apoptotique

- Les **MAP kinases** (mitogen actived protein kinases) qui favorisent la division cellulaire.
- Les **STAT 5A et 5B** (signal transducers and activators of transcription), ayant un effet anti-apoptotique, en particulier par l'activation du facteur inhibiteur de l'apoptose Bcl-x (Lacombe & Mayeux, 1999).
- La **phospholipase C-γ1** (PLC-γ1) qui hydrolyse le phosphatidyl inositol 4-5 diphosphate (PIP2) de la membrane cellulaire et génère l'inositol triphosphate (IP3) qui induit la libération d'ions calcium dans le cytosol (à partir des stocks intracellulaires et par augmentation de l'entrée de calcium dans la cellule).

Les protéines de signalisation activées vont transmettre le message jusqu'au noyau où elles activent la transcription.

Deux tyrosine-phosphatases jouent également un rôle dans la transmission du signal :

- La **SHP-2** : elle s'associe au deuxième résidu tyrosine du récepteur et joue un rôle de stimulation de la prolifération cellulaire.
- La **SHP-1** : elle s'associe au troisième résidu tyrosine et permet la déphosphorylation de JAK 2. Elle inhibe la transmission du signal et favorise le passage du récepteur dans une forme inactivée (Lacombe & Mayeux, 1999).

La régulation de la signalisation est donc permise par la déphosphorylation des JAK 2.

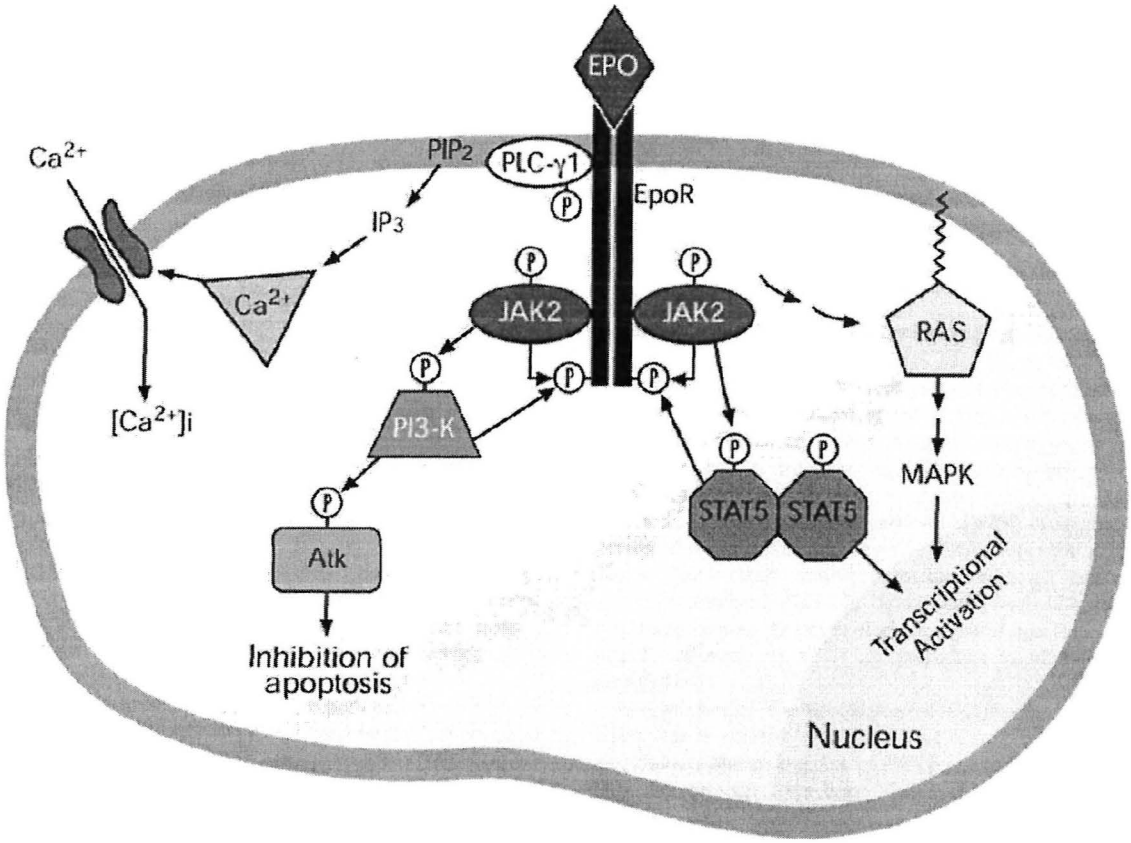


Figure 4 : Transmission du signal induit par la fixation de l'érythropoïétine sur son récepteur (Smith *et al*, 2003).

6. Régulation de la production d'EPO : Le rôle de l'hypoxie

La production d'érythropoïétine est fortement augmentée en cas d'hypoxie.

Ce phénomène est permis grâce à la présence, sur le gène de l'EPO, d'un site d'activation en 3' sur lequel se fixera un complexe activateur de la transcription.

La régulation oxygéno-dépendante de l'expression du gène passe par un facteur de transcription induit par l'hypoxie, HIF-1α (hypoxia inductible factor 1α).

Lorsque HIF-1α est activé, il s'associe à HIF-1β, appelé également ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) pour former l'hétérodimère HIF-1.

La quantité d'ARNT cytoplasmique est indépendante de la teneur en oxygène de la cellule. Par contre, la sous-unité HIF-1α n'est détectable que dans la cellule hypoxique.

L'hétérodimère HIF-1 forme alors un complexe avec les cofacteurs transcriptionnels P300, CBP et HNF-4 qui se fixe sur le site d'activation en 3' du gène de l'EPO et active sa transcription (Ebert & Bunn, 1999).

Un modèle plausible de réaction cellulaire à l'hypoxie est représenté sur le schéma suivant.

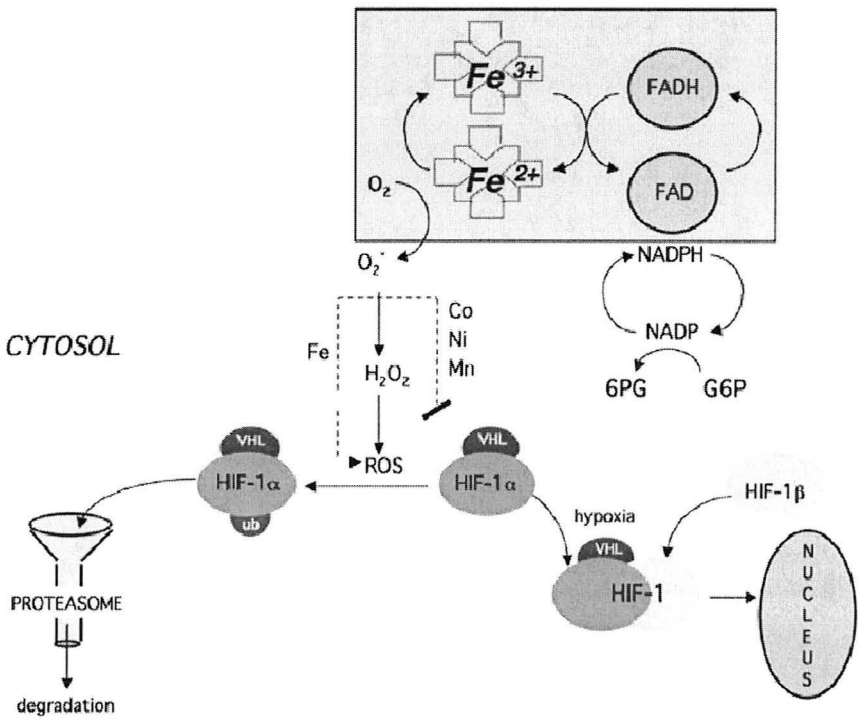


Figure 5 : Mécanisme de réponse à l'hypoxie par la cellule (Ebert & Bunn, 1999).

Dans la cellule oxygénée, les protéines à fonction héminiques comme la NADPH oxydase, génèrent des ions superoxyde par transfert d'électrons qui sont convertis en espèces réactives de l'oxygène (ERO).
Le facteur HIF-1α est à son tour oxydé par ces espèces puis reconnu par le protéasome qui le dégrade.

Dans la cellule hypoxique, HIF-1α n'est pas oxydé et peut s'associer au facteur ARNT pour former le dimère HIF-1 qui est alors transloqué vers le noyau pour activer l'expression des gènes inductibles par l'hypoxie, comme celui de l'EPO (Ebert & Bunn, 1999). Le stimulus hypoxique entraîne l'apparition d'ARNm spécifiques de l'EPO en 1 heure.

7. Utilisation thérapeutique actuelle

L'EPO humaine recombinante, produite par génie génétique, est commercialisée depuis 1988. Elle a révolutionné le traitement de l'anémie due à l'insuffisance rénale chronique qui nécessitait auparavant des transfusions sanguines fréquentes.

Plusieurs spécialités sont actuellement commercialisées:

- **L'EPREX®** (epoiétine α)
- **LE NEORECORMON®** (epoiétine β)

  Ces molécules sont très proches de l'EPO physiologique. Ce sont seulement des variations du degré de glycosylation des chaînes latérales qui permettent des différences pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.
- **L'ARANESP®** (darbepoïetine) : cette molécule possède 5 chaines N-glucidiques alors que l'EPO humaine n'en contient que 3.

  Cette molécule a une demi-vie beaucoup plus longue, ce qui permet de réduire le nombre d'injections par semaine.

Aucune de ces molécules n'est strictement identique à l'EPO physiologique.
Elles sont identifiables dans un prélèvement urinaire par une méthode de détection basée sur la différence de charge entre l'EPO endogène et l'EPOr-Hu, ce qui permet de mettre en évidence une utilisation détournée du produit (Pascual *et al*, 2005).

L'EPOr-Hu est utilisée par voie intraveineuse (IV) ou sous-cutanée (SC). Concernant l'EPO α ou β, la voie SC permet d'obtenir des concentrations sanguines maximales plus basses et une demi-vie plus longue par rapport à la voie IV. En effet, la libération

sanguine d'EPOr-Hu est plus progressive lors de l'injection SC. La biodisponibilité est de l'ordre de 48% par cette voie. La meilleure efficacité de la voie SC pourrait s'expliquer par une occupation plus longue du site du récepteur et donc une stimulation prolongée des cellules progénitrices. La voie SC permet donc, à doses égales, une meilleure efficacité que la voie IV et une réduction de l'incidence de certains effets indésirables comme l'hypertension artérielle.

Pour ce qui est de la darbepoïétine, la voie IV peut être utilisée sans perte d'efficacité par rapport à la voie SC : des doses identiques sont nécessaires pour les 2 voies d'administration (AFSSAPS, 2005).

	EPREX®	**NEORECORMON®**	**ARANESP®**
Dénomination commune internationale	epoiétine alfa	epoiétine béta	darbépoiétine
Laboratoire	Janssen-Cilag®	Roche®	Amgen®
Date d'obtention de l'AMM	1988	1997	2001
Demi-vie par voie intraveineuse	4 h	4 à 12 h	21 h
Demi-vie par voie sous-cutanée	24 h	13 à 28 h	49 h

7.1. Mode d'utilisation

Ces spécialités n'étaient disponibles que dans les pharmacies hospitalières jusqu'à présent mais au cours de l'année 2005, elles sont sorties de la réserve hospitalière et peuvent être délivrées en officine. Elles sont soumises à une prescription restreinte, sur une ordonnance d'exception à 4 volets, car ce sont des spécialités très coûteuses. La prescription initiale est hospitalière, d'une durée de un an maximum. La prescription initiale par un médecin exerçant dans un service de dialyse à domicile est également autorisée. Le renouvellement n'est pas restreint.

Toutes ces spécialités sont à conserver entre 2 et 8°C à l'abri de la lumière.

Une supplémentation en fer est fortement recommandée pendant le traitement pour prévenir une carence martiale et permettre une bonne efficacité du traitement.

Toutes études *in vitro* et *in vivo* mentionnées ensuite ont utilisé l'EPO recombinante humaine, que je nommerai « EPO » dès à présent par souci de clarté. Pour mentionner l'EPO physiologique, je préciserai « EPO endogène ».

7.2. Indications thérapeutiques

L'EPO a été tout d'abord utilisée chez les patients anémiques à cause d'une insuffisance rénale chronique ou après l'administration de sels de platine. Une extension d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1995 a été obtenue dans le contexte de chirurgies orthopédiques, cardiaques et vasculaires.

7.2.1. *Traitement de l'anémie chez le sujet insuffisant rénal, dialysé ou non.*

Ces patients ont une production d'EPO endogène insuffisante. Le traitement par EPO ou darbépoïétine corrige l'anémie, évite la transfusion sanguine et améliore la qualité de vie (augmentation des performances physiques et des fonctions cognitives). De plus, la restauration d'une hémodynamie correcte réduit le risque de complications comme l'hypertrophie ventriculaire gauche et la mortalité associée (Ng *et al*, 2003).

7.2.2. *Traitement de l'anémie chez le prématuré*

Le nouveau né prématuré (né avant 34 semaines de gestation, avec un poids de naissance compris entre 750 et 1500 g, reçoit fréquemment de multiples transfusions sanguines pour compenser le faible taux d'EPO produite. Dans ce cas, l'utilisation de d'EPO permettrait de réduire le nombre de transfusions nécessaires. Des études ont montré que seuls les enfants ayant reçu plus de 600 UI/kg/semaine d'EPO nécessitent des transfusions moins fréquentes (Ng *et al*, 2003).

7.2.3. *Traitement de l'anémie chez les patients présentant une tumeur solide, un lymphome malin ou un myélome multiple.*

La perte de sang, l'hémolyse, l'infiltration de la moelle osseuse ou les effets indésirables myélotoxiques de la chimiothérapie et de la radiothérapie sont différents facteurs qui peuvent conduire à l'anémie (Lacombe & Mayeux, 1999).

L'injection d'EPO permet une augmentation importante du taux d'hémoglobine sanguine et réduit le nombre de transfusions nécessaires.

On observe également une amélioration significative de la qualité de vie du patient (capacité fonctionnelle, bien-être,...) même lorsque l'anémie traitée est modérée

(Hb ≥105 g/l). Néanmoins, certaines études ont montré qu'il existait un risque d'accélération de la croissance tumorale si la tumeur est porteuse de l'EPOR. Il faut donc être prudent quant au traitement de l'anémie chez le sujet cancéreux, même si cette hypothèse est encore controversée (Rev Prescrire, juin 2005).

7.2.4. *Traitement de l'anémie chez le patient infecté par le VIH, en particulier s'il est traité par zidovudine.*

L'anémie est un effet indésirable fréquent du traitement par zidovudine. Elle peut être très sévère, jusqu'à l'aplasie, et est réversible à l'arrêt du traitement.

Le traitement par EPO permet de réduire l'anémie, d'améliorer l'état de santé du patient et de réduire le risque de transfusion.

7.2.5. *Augmentation du volume d'hématies en période péri opératoire.*

L'intérêt de l'EPO dans le contexte péri opératoire est d'augmenter la masse globulaire des patients qui subissent une chirurgie programmée potentiellement hémorragique ou nécessitant une grande quantité de sang, en particulier la chirurgie orthopédique.

Le traitement par l'EPO plusieurs semaines avant la chirurgie permet de corriger une anémie préexistante et d'accroître le volume des pertes sanguines ne nécessitant pas de recours à la transfusion homologue.

Il permet également d'augmenter le volume de dons de sang autologue avant la chirurgie. Néanmoins, cette pratique ne réduit pas le risque de transfusion sanguine autologue différée au cours de la chirurgie. De plus, la transfusion autologue différée comporte des risques d'erreurs d'attribution du sang et de contamination bactérienne. Le traitement par l'EPO préopératoire sans prélèvement autologue sera donc préféré (Debaene, 2001).

Dans le cadre de la chirurgie à cœur ouvert chez l'enfant, l'étude de Shimpo *et al* (1997) chez 48 sujets, a montré que l'injection de 150 ou 300 UI/kg d'EPO pendant 6 à 7 jours avant la chirurgie et le jour suivant permet de réduire le risque de recours à la transfusion sanguine autologue, sans constater d'effets indésirables majeurs.

L'ARANESP® (darbépoïétine) ne possède d'AMM que dans le traitement de l'anémie en cas d'insuffisance rénale chronique, de pathologie maligne myéloïde et de traitement anticancéreux.

En cas d'anémie, il faut attendre 10 à 14 jours après l'injection de EPO pour observer une augmentation significative du taux d'hémoglobine sanguine. Cette augmentation doit être très progressive pour réduire le risque d'effets indésirables (hypertension artérielle, thrombose) et ne doit pas excéder une augmentation de l'hémoglobine sanguine de plus de 1 à 2 g/dL par mois. Le taux d'hémoglobine désiré est de 10 à 12 g/dL.

L'administration d'EPO ne peut donc constituer un traitement d'urgence de l'anémie. La transfusion sanguine reste le traitement de référence pour la prise en charge des patients souffrant d'une anémie symptomatique, qui permet une correction immédiate du taux sanguin d'hémoglobine.

Chez certains patients, le traitement reste inefficace. Plusieurs causes sont à envisager comme une carence (en fer, vitamine B12 ou folates), une hémorragie interne ou externe, une atteinte maligne de la moelle osseuse ou la production d'anticorps anti-EPO.

L'inefficacité d'un traitement pourrait être définie par un taux d'hémoglobine sanguine inférieur à 100 g/L après 4 semaines de traitement à doses standards.

Les bénéfices attendus lors du traitement de l'anémie par l'EPO sont multiples :

- Réduction du risque d'hypertrophie ventriculaire qui conduirait à une insuffisance cardiaque.
- Amélioration de la qualité de vie (capacité physique, humeur...)
- Réduction du nombre de transfusions sanguines avec les risques qu'elles comportent.

7.3. Posologies

Les posologies usuelles en fonction de la pathologie et de la voie d'administration sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Suite à la survenue de cas d'érythroblastopénie, observés dans la majorité des cas lors de traitements par EPREX® par voie SC chez des patients insuffisants rénaux chroniques, cette voie d'administration est maintenant contre-indiquée pour cette spécialité chez ce type de patients (AFSSAPS, 19 juillet 2002).

Pathologie	EPREX®	NEORECORMON®	ARANESP®
Anémie chez le patient insuffisant rénal chronique	- **voie SC :** contre-indiquée - **voie IV** : 50 UI/kg 3 fois par semaine	- **voie SC :** 20 UI/kg 3 fois par semaine - **voie IV :** 40 UI/kg 3 fois par semaine	- **voie SC ou IV :** 0,45 μg/kg 1 fois par semaine
Anémie chez les patients cancéreux	- **voie SC** : 150 à 300 UI/kg 3 fois par semaine	- **voie SC** : 150 à 300 UI/kg 3 fois par semaine	- **voie SC** : 2,25 μg/kg 1 fois par semaine
Don de sang autologue	- **voie IV** : 600 UI/kg 2 fois par semaine (pendant 3 semaines maximum)	- **voie SC** : 600 UI/kg 2 fois par semaine - **voie IV** : 800 UI/kg 2 fois par semaine (pendant 4 semaines maximum)	Pas d'AMM
Réduction du besoin transfusionnel (chirurgie programmée)	- **voie SC :** 600 UI/kg 1 fois par semaine avant l'intervention	Pas de données	Pas d'AMM

7.4. Les effets indésirables

Le traitement par l'EPO se poursuit généralement sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois. On distingue les effets indésirables d'apparition précoce après l'injection et les effets indésirables d'apparition tardive.

7.4.1. Les effets indésirables d'apparition précoce

L'effet indésirable le plus courant est un syndrome pseudo-grippal ou des céphalées peu de temps après l'injection, il est en général peu important et régresse en 24 h.
L'apparition de rashs cutanés survient rarement.

7.4.2. Les effets indésirables d'apparition tardive

7.4.2.1. L'hypertension artérielle

Une augmentation dose-dépendante de la pression artérielle ou l'aggravation d'une hypertension artérielle préexistante est un effet indésirable fréquent, en particulier chez les patients traités par voie intraveineuse. La tension artérielle doit être suivie étroitement et il peut être nécessaire d'instaurer ou d'augmenter un traitement anti-hypertenseur préexistant. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le démasquage d'une hypervolémie suite à la correction de l'anémie. D'autres hypothèses sont également avancées :

- L'EPO possède un effet vasoconstricteur par augmentation du calcium intra-cytoplasmique et libération de médiateurs vasoconstricteurs.

- Elle favorise également la synthèse de l'endothéline-1 (ET-1).
- Enfin, le phénomène d'angiogénèse augmente la prolifération des cellules endothéliales (AFSSAPS, 2005).

7.4.2.2. L'érythroblastopénie

Des cas d'érythroblastopénie avec ou sans aplasie de la lignée rouge (PRCA) ont été rapportés chez des patients en insuffisance rénale chronique par développement d'anticorps anti-EPO. C'est un effet indésirable très rare. Il se caractérise par l'apparition soudaine d'une anémie normocytaire et normochrome sans déficit en fer, acide folique et vitamine B12. Une biopsie de la moelle osseuse montre un déficit en érythroblastes et la présence d'anticorps anti-EPO. L'érythroblastopénie peut survenir de 3 semaines à 9 mois après le début du traitement par l'EPO. Celui-ci doit alors être interrompu immédiatement et un traitement immunosuppresseur est fortement recommandé (AFSSAPS, 2005).

7.4.2.3. La thrombose

Lors du traitement par l'EPO, il existe un risque de thrombose en particulier chez les patients présentant une pathologie vasculaire sévère coronarienne, carotidienne, des artères périphériques ou cérébrales. Plusieurs phénomènes en sont responsables, en particulier une augmentation de la réactivité plaquettaire et le phénomène d'angiogénèse (cf paragraphe 8).

De plus, le phénomène inflammatoire qui est présent dans de nombreuses maladies chroniques comme l'insuffisance rénale chronique ou la pathologie cancéreuse favorise

également la survenue de thrombose. En effet, le phénomène inflammatoire accroît la production de thrombine (Tobu *et al*, 2004).

Il faut donc être particulièrement prudent chez les patients présentant plusieurs facteurs de risque.

Les patients ayant des complications au niveau de leur fistule artérioveineuse doivent recevoir une prophylaxie antithrombotique par administration d'acide acétylsalicylique par exemple.

On peut également observer au cours du traitement une élévation modérée mais dose dépendante du nombre de plaquettes. Si ce nombre dépasse la normale supérieure, le traitement doit être arrêté.

8. Le phénomène d'angiogénèse

L'angiogénèse est un processus qui permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants. De nombreuses études ont montré que, en dehors de son action sur l'érythropoïèse, l'EPO jouait un rôle dans l'angiogénèse en activant les cellules endothéliales. Dans ce cas également, l'EPO agirait comme un facteur de croissance (Marti, 2004).

En réalité, ceci n'est pas très étonnant car la plupart des cytokines qui régulent l'hématopoïèse, comme l'EPO, jouent également un rôle sur l'endothélium vasculaire en favorisant la migration et la prolifération des cellules endothéliales.

Les récepteurs à l'érythropoïétine ne sont donc pas seulement exprimés à la surface des cellules hématopoïétiques mais aussi sur d'autres types de cellules comme les cellules endothéliales (Marti, 2004).

Cette hypothèse a été confirmée par la découverte d'un progéniteur commun aux cellules endothéliales et hématopoïétiques, l'hémangioblaste, ce qui laisse suggérer que ces deux types de cellules présentent des antigènes communs, comme l'EPOR (Bikfalvi & Han, 1994).

Il semble que l'EPO agisse en synergie avec un autre facteur de croissance, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) de manière à potentialiser leur activité vasculaire (Jaquet *et al*, 2002). L'EPO, par sa liaison au récepteur situé sur la membrane de la cellule endothéliale utilise les mêmes voies de signalisation que dans l'érythroblaste pour transmettre le message vers le noyau (JAK, ...).

Elle stimule ainsi la prolifération et la différentiation des cellules endothéliales. De plus, elle induit la libération d'ET-1 par activation de sa synthèse et augmente le taux de calcium libre dans le cytoplasme.

Plusieurs études montrent que l'EPO stimule également l'activité des NO synthases (NOS) d'où une augmentation de la libération de NO par les cellules endothéliales (Banerjee *et al*, 2000). Ce phénomène a été démontré *in vitro* sur culture de cellules endothéliales humaines en incubation avec de l'EPO pendant 6 jours (Banerjee *et al*, 2000), mais également *in vivo* chez des patients dialysés suivant un traitement par EPO. Tous les sujets traités présentaient une augmentation du taux de NO plasmatique contrairement aux patients non traités (Kanagy *et al*, 2003).

9. Conclusion

L'EPO, que l'on sait cloner depuis 1985, a été beaucoup étudiée pour comprendre par quels mécanismes agissait cette molécule. On connaît maintenant les principales voies de signalisation dans l'érythrocyte et son mode d'action.

L'EPO est un traitement très efficace pour traiter l'anémie. Elle a permis de réduire considérablement les besoins en transfusion sanguine. De plus, la correction de l'anémie permet de réduire le risque de complications cardiaques par exemple.

Peu à peu, nous avons découvert que l'EPO n'agissait pas uniquement sur les hématies mais aussi sur d'autres cellules comme les cellules endothéliales, ce qui permet d'expliquer certains effets indésirables comme l'hypertension artérielle ou la thrombose. L'action anti-apoptotique exercée sur les précurseurs des hématies est très intéressante et pourrait s'appliquer à d'autres cellules qui expriment l'EPOR. Des études ont alors était menées pour déterminer quelles cellules exprimaient l'EPOR, en particulier dans le cerveau et le cœur, et si les voies de signalisation intracellulaires étaient les mêmes. Le rôle de l'EPO dans ces cellules a aussi été exploré de même que son application en situation de stress.

PARTIE 2

La neuroprotection induite par l'érythropoïétine

L'EPO est connue depuis longtemps comme un facteur de croissance hématopoïétique. Depuis une dizaine d'années, on a découvert d'autres fonctions à cette molécule, en particulier au niveau du système nerveux central.

Ainsi il semble que l'EPO joue un rôle important dans le développement embryonnaire, la protection et la réparation des lésions cérébrales. De nombreuses études ont mis en évidence la présence de cellules cérébrales capables de produire de l'EPO ou d'exprimer l'EPOR.

L'effet neuroprotecteur induit par l'EPO se traduit par l'amélioration de la survie neuronale lors de différentes situations de stress comme l'ischémie cérébrale ou l'exposition au glutamate. Les mécanismes impliqués dans cet effet cytoprotecteur commencent à être explorés et il semble que l'EPO ait un effet anti-apoptotique, antioxydant, anti-inflammatoire et faciliterait la maturation de cellules souches et le phénomène d'angiogénèse.

1. Libération de l'EPO et expression de l'EPOR dans le système nerveux central et régulation de leur gène

On a tout d'abord recherché la présence d'EPO et de son récepteur dans le cerveau animal. L'ARNm de l'EPO et de l'EPOR a été détecté dans les biopsies des différentes aires du cerveau de singe : le cortex temporal, l'hippocampe et l'amygdale cérébelleuse (Marti *et al*, 1996).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que dans le cerveau humain, plusieurs types de cellules sont capables de produire de l'EPO. Ce sont les astrocytes et les neurones. Par contre, les microgliocytes et les oligodendrocytes n'en produisent pas.
Des analyses immunochimiques ont révélé la présence de l'EPOR sur les neurones, les astrocytes, les cellules endothéliales et les microgliocytes (Marti, 2004).

L'EPO et son récepteur sont fortement exprimés durant la vie fœtale puis leur expression chute à la naissance. En fait, la distribution de l'EPO et EPOR dans le système nerveux central change au cours de l'âge gestationnel (Genc *et al*, 2003).

La production d'EPO dans le tissu cérébral, comme dans les autres tissus producteurs, est régulée par le facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF-1) qui est activé par différents stress comme l'hypoxie.

Ainsi, comme au niveau du rein ou du foie, la production cérébrale d'EPO dépend d'un système sensible à l'oxygène. De plus, le facteur HIF-1 stimule la production de l'EPOR. En revanche, le délai et la durée de la production d'EPO sont différents selon les organes soumis à une hypoxie.
Une étude chez la souris a montré qu'une hypoxie rénale provoque un pic d'expression de l'ARNm de l'EPO 2 h après l'hypoxie, qui chute rapidement, atteignant 30% du taux maximal au bout de 8 h. Par contre, une stimulation hypoxique cérébrale provoque un pic d'expression de l'ARNm de l'EPO au bout de 4 h et ce taux reste élevé pendant 24 h (Chikuma & Masuda, 2000) .

Il existe des situations, autres que l'hypoxie, influençant l'expression de l'EPO et de son récepteur dans le système nerveux. Ainsi l'hypoglycémie ou la production d'espèces réactives de l'oxygène par la mitochondrie sont également capables d'activer le facteur HIF-1. L'insuline et les facteurs de croissance insuline-like pourraient avoir un effet identique sur les astrocytes.

2. Rôle de l'EPO dans le développement cérébral

On a montré que l'EPO et l'EPOR étaient largement présents dans le système nerveux central du fœtus (Juul *et al*, 1999).

Ils sont détectables dès la 5ème semaine de gestation et leur localisation varie au cours du développement.

L'étude du développement cérébral d'une souris présentant un déficit en EPOR révèle une augmentation du taux d'apoptose accompagnée d'une hypoplasie de la région du 4ème ventricule (Yu *et al*, 2001).

Cela suggère que l'EPO et l'EPOR joue un rôle important dans le développement cérébral.

L'EPO est produite en quantité importante durant la vie fœtale puis sa production est réduite à partir de la naissance.

Dans le cerveau adulte, l'EPO et l'EPOR sont exprimés en faible quantité, uniquement dans les neurones et dans les astrocytes (Juul *et al*, 1999).

3. Rôle de l'EPO dans la protection neuronale

Les expériences suivantes consistent à évaluer la fonction neuroprotectrice de l'EPO administrée par voie systémique chez des modèles animaux présentant une ischémie cérébrale, une exposition à la neurotoxicité induite par le glutamate, ou une encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

3.1. Protection contre l'ischémie

De nombreuses études ont exploré le rôle neuroprotecteur de l'EPO contre l'ischémie cérébrale. Nous avons choisi de ne mentionner que quelques unes d'entre elles afin d'illustrer cet effet. Les deux études que nous avons choisi de présenter ici explorent, dans le cadre d'une ischémie cérébrale provoquée chez la gerbille ou le rat, l'effet de l'injection d'EPO soit par voie intracérébrale (Sakanaka *et al*, 1998) soit par voie intrapéritonéale (IP) (Brines *et al*, 2000).

L'étude de Sakanaka *et al* (1998) a permis de mettre en évidence *in vivo* l'effet protecteur neuronal de l'EPO contre les dégâts d'une ischémie cérébrale.
Elle utilise des gerbilles sur lesquelles on a provoqué une ischémie cérébrale par clampage des artères carotidiennes.
L'EPO est injectée directement dans le ventricule latéral gauche de l'animal.

Dans la première expérience, les gerbilles subissent une ischémie de 3 min, excepté le groupe contrôle (sham-operation).

On leur injecte ensuite de l'EPO aux doses de 0,5, 2,5, 5 ou 25 UI/jour pendant 7 jours, de façon continue.

On mesure enfin la capacité d'apprentissage des gerbilles en mesurant le temps qui s'écoule avant qu'elles ne retournent sur une grille (qui envoyait des décharges électriques sur les pattes, 24 h auparavant) dont le générateur a été coupé. Un délai long montre une capacité d'apprentissage plus importante (figure 6, diagramme A)

On calcule également la densité des neurones CA1 de l'hippocampe sur une coupe histologique (figure 6, diagramme B).

Les résultats montrent une amélioration significative des capacités d'apprentissage suite à l'injection d'EPO aux doses de 2,5, 5 ou 25 U/jour par rapport au groupe qui n'a pas reçu de traitement.

De même, la densité neuronale après l'ischémie est améliorée chez les groupes traités par l'EPO.

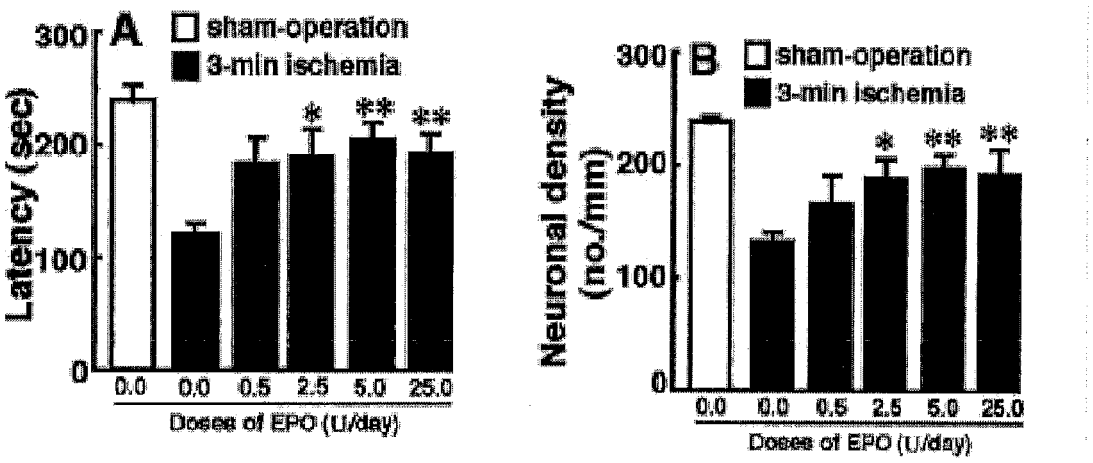


Figure 6 : Effets de l'injection d'EPO intraventriculaire sur la capacité d'apprentissage et la densité neuronale de l'hippocampe des gerbilles après une ischémie cérébrale de 3 min. (Sakanaka *et al*, 1998).

La deuxième expérience suit le même protocole que la première, mais on injecte à la place de l'EPO un récepteur soluble de l'EPO (sEPOR).

Dans cette expérience, on provoque une ischémie durant 2,5 min (3 min dans la première) car cette durée ne provoque pas de diminution de la densité neuronale. On peut ainsi observer si sEPOR (capable de se lier à l'EPO circulante) provoque des lésions neuronales suite à l'ischémie de 2.5 min.

Le groupe contrôle reçoit le sEPOR dénaturé par la chaleur (sdEPOR). On n'observe alors aucune modification des deux paramètres étudiés.

sEPOR injecté à la dose de 5 ou 10 μg/jour pendant 7 jours n'induit pas d'effet néfaste. Par contre, les doses de 25 ou 50 μg/jour réduisent significativement la capacité d'apprentissage et la densité neuronale (figure 7).

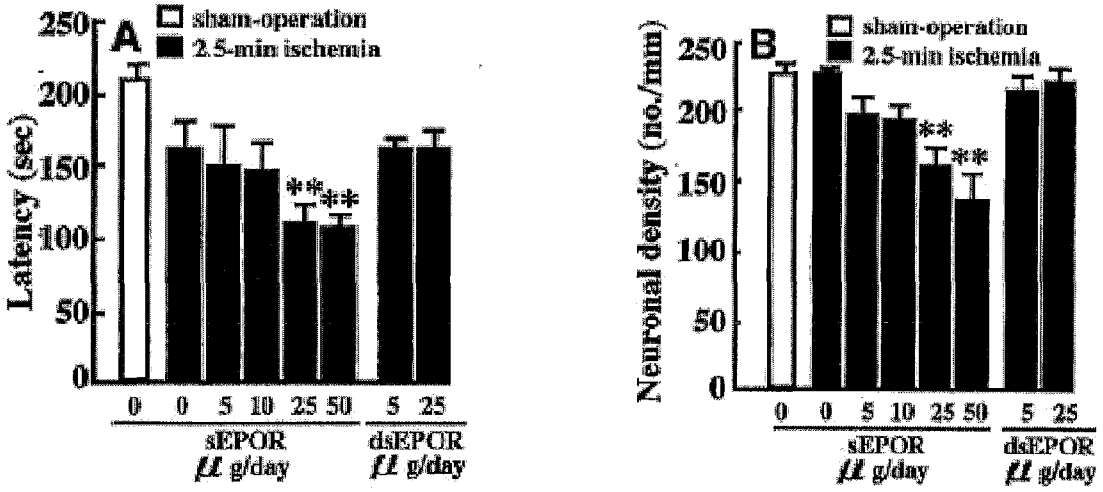


Figure 7 : Effets de l'injection intraventriculaire de sEPOR et sdEPOR sur la capacité d'apprentissage et la densité neuronale de l'hippocampe des gerbilles après une ischémie cérébrale de 2,5 min. (Sakanaka *et al*, 1998).

L'étude de Sakanaka *et al* démontre donc que l'injection cérébroventriculaire d'EPO (2,5 à 25 U/jour pendant 7 jours) prévient, de façon dose-dépendante, des difficultés d'apprentissage induites par une ischémie cérébrale et réduit la mort neuronale (au niveau de l'hippocampe).

L'injection de sEPOR montre que l'EPO endogène produite au niveau cérébral joue un rôle important dans la neuroprotection car sa complexation et donc son inactivation ne prévient pas le développement des lésions ischémiques.

Cette étude permet donc de conclure que l'EPO neuronale joue un rôle essentiel dans la survie des cellules neuronales exposées à une ischémie.

Dans l'étude de Brines *et al* (2000), on provoque une ischémie cérébrale chez le rat par occlusion de l'artère carotide droite.

L'EPO est administrée (5000 UI/kg) par voie IP 24 h avant, simultanément ou 3, 6 ou 9 h après l'ischémie.

On observe que l'administration d'EPO avant, pendant ou 3 à 6 h après l'ischémie réduit significativement la taille de la nécrose (figure 8). Le fait que l'EPO joue un rôle bénéfique lorsqu'elle est injectée avant l'ischémie montre son rôle en tant que préconditionnement pharmacologique à l'ischémie.

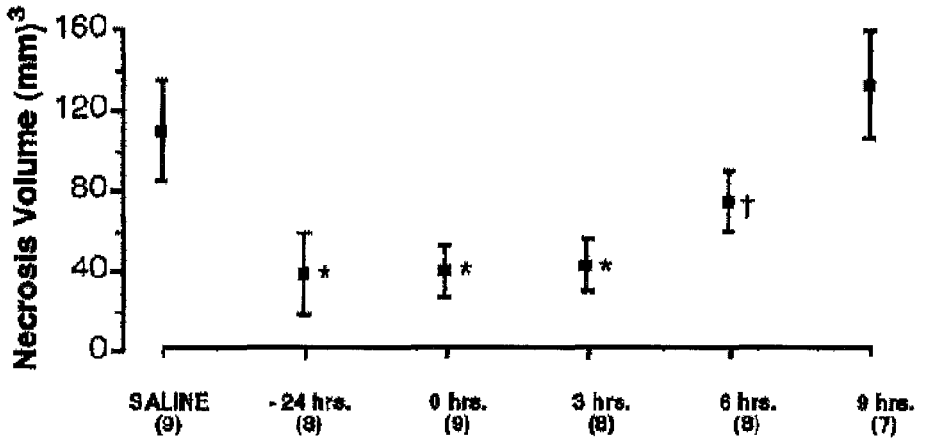


Figure 8 : Volume de la nécrose cérébrale en fonction du délai d'injection de l'EPO avant ou après l'ischémie (heure 0) (Brines *et al* 2000).

3.2. Protection contre la neurotoxicité induite par le glutamate

L'équipe de Brines a également mis en évidence expérimentalement le rôle protecteur de l'EPO contre la toxicité du glutamate chez la souris.

La toxicité du glutamate est mesurée par le délai et l'intensité des crises d'épilepsie provoquées par l'administration par voie IP d'un analogue du glutamate (l'acide kaïnique) à la dose de 20 mg/kg.

Les souris ayant reçu 5000 UI/kg d'EPO 24 h avant l'injection d'acide kaïnique présentent une réduction de la sévérité des crises et une réduction de la mortalité de 45% par rapport au groupe qui n'a pas reçu d'EPO (sham) (figure 9A).

La figure 9B montre que l'injection d'EPO protège contre la toxicité du glutamate pendant 3 jours.

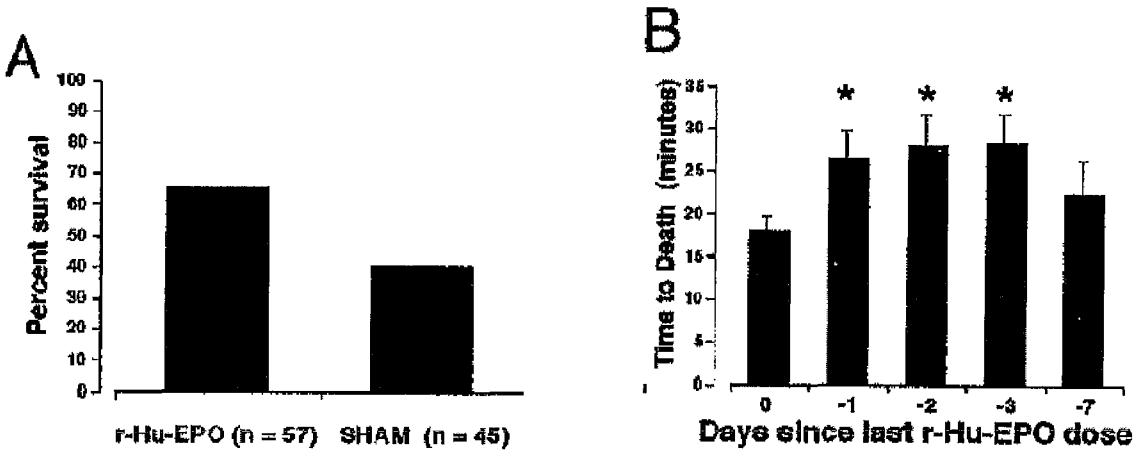


Figure 9 : Administration d'EPO avant ou après l'injection d'acide kaïnique.
A : taux de survie des souris ayant reçu l'EPO 24 h avant l'injection.
B : délai avant la mort des souris, en fonction du moment de l'administration d'EPO (Brines *et al*, 2000).

3.3. Rôle anti-inflammatoire

L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale est un modèle pathologique qui active le système inflammatoire.

L'administration à des rats par voie systémique d'EPO, 5000 UI/kg 3 jours après le déclenchement de la maladie, induit une réduction de la sévérité des symptômes (ataxie, paralysie, incontinence urinaire) par rapport au groupe contrôle qui n'a pas reçu d'EPO (Brines *et al*, 2000).

L'ensemble des expériences de l'équipe de Brines met en évidence l'effet neuroprotecteur de l'EPO par voie systémique en situation d'ischémie, d'exposition au glutamate ou en cas d'EAE.

On peut donc espérer qu'une application clinique soit possible. Cependant, la quantité d'EPO administrée (5000 UI/kg) dans ces expériences est beaucoup plus importante que celle utilisée habituellement en clinique (500 UI/kg environ).

4. Mécanismes d'action de l'EPO

Les mécanismes d'action de l'EPO dans la neuroprotection ne sont pas encore entièrement élucidés. Il semble que l'EPO ait plusieurs effets :

- Inhibition de l'apoptose
- Recrutement de cellules souches
- Activation des canaux calciques
- Activation des systèmes antioxydants
- Réduction de la libération du glutamate
- Effet anti-inflammatoire
- Activation de l'angiogénèse

Comme dans la cellule érythrocytaire, la fixation de l'EPO à son récepteur provoque une série de signaux en cascade conduisant à l'activation de gènes anti-apoptotiques et à l'inhibition de gènes pro-apoptotiques.

Une voie de signalisation par l'intermédiaire du facteur nucléaire κB (NF-κB) a été mise en évidence au niveau neuronal, mais pas dans la cellule érythrocytaire. NF-κB serait activé suite à la phosphorylation de son inhibiteur (IκB) par la protéine JAK 2. Il migrerait alors vers le noyau pour activer la transcription de gènes neuroprotecteurs (Digicaylioglu & Lipton, 2001).

L'EPO agit aussi directement sur les cellules souches neuronales pour activer leur maturation (Shingo *et al*, 2001).

L'EPO stimule la fonction et la viabilité neuronale par l'activation des canaux calciques. Cela provoque une augmentation de la libération de dopamine, une activation des MAP-kinases et de la tyrosine-hydroxylase ainsi qu'une augmentation de la synthèse du NO (Koshimura *et al*, 1999).

L'action vasodilatatrice du NO jouerait un rôle bénéfique dans l'oxygénation des tissus. L'EPO activerait la libération de NO par les cellules endothéliales cérébrales par l'intermédiaire de l'ET-1 dont la libération est elle-même stimulée par l'EPO.
En revanche, l'hypoxie ou l'ischémie serait responsable d'une surproduction de NO qui (en se combinant à l'anion superoxyde) pourrait générer l'anion peroxynitrite ($ONOO^-$) qui est vasoconstricteur. Dans ce cas, l'administration d'EPO pourrait réduire la surproduction de NO et donc prévenir les lésions ischémiques (Kumral *et al*, 2004).

L'activation des canaux calciques induit également une réduction de la libération de glutamate, médiateur neurotoxique (Kawakami *et al*, 2001).

L'effet neuroprotecteur de l'EPO passerait également par une action anti-oxydante. On observe une réduction de la formation de radicaux libres (par réduction de la surproduction de NO) et, comme le VEGF, l'EPO pourrait augmenter l'activité des enzymes antioxydantes (superoxide dismutase, glutathion peroxidase, catalase) dans les neurones.
L'EPO possède aussi un effet anti-inflammatoire en réduisant la production des cytokines pro-inflammatoires libérées pendant une l'ischémie cérébrale (Agnello *et al*, 2002).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'équipe de Brines (2000) a également mis en évidence cette propriété en utilisant un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale.

Le phénomène d'angiogénèse induit par l'EPO, par stimulation de la prolifération et de la différenciation des cellules endothéliales, joue un rôle important dans la neuroprotection.

Lors d'une ischémie ou d'une hypoxie cérébrale, ce phénomène permet d'améliorer le flux sanguin et l'oxygénation des tissus autour de la zone ischémiée en favorisant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins, pendant plusieurs jours après l'ischémie.

Au niveau cérébral comme dans les autres organes, l'EPO agit de manière synergique avec un autre facteur angiogénique, le VEGF, également induit en cas d'hypoxie par le facteur HIF-1.

Des études plus poussées dans ce domaine seraient nécessaires pour élucider totalement les mécanismes impliqués dans l'effet neuroprotecteur activé par l'EPO (Sakanaka *et al*, 1999).

5. Impact clinique

5.1. Le passage de la barrière hémato-encéphalique

On peut se demander comment une injection systémique d'EPO pourrait avoir une action au niveau du système nerveux central puisque la barrière hémato-encéphalique

(BHE) est imperméable aux grosses molécules comme l'EPO. Cependant, de récentes études ont clairement mis en évidence que les molécules de poids moléculaire important pouvaient traverser la barrière à l'aide de récepteurs spécifiques présents sur la surface luminale des cellules endothéliales des capillaires cérébraux.
La liaison au récepteur provoque une endocytose suivie d'une translocation de la molécule à travers la BHE.

L'étude de Brines *et al* (2000) a permis de mettre en évidence le passage de l'EPO à travers la BHE, chez la souris.

Son équipe a tout d'abord montré par un marquage immunochimique sur des coupes de tissus de rat, de souris et d'humains que l'EPOR était abondamment exprimé au niveau des capillaires cérébraux. On le retrouve également au niveau du cortex frontal et de l'hippocampe sur les neurones de taille moyenne à importante.

Elle a ensuite montré que l'EPO passe effectivement la BHE, en injectant à des rats 5000 UI/kg d'EPO marquée (par biotinylation) par voie IP.

L'EPO biotinylée (epoiétine α) est retrouvée autour des capillaires cérébraux 5 et 17 h après l'injection. Par contre, une administration simultanée d'EPO non marqué en quantité deux fois plus importante ne permet plus d'observer de cet effet. Le passage de la BHE est donc un phénomène saturable.

5.2. Essai clinique chez l'homme

Un essai clinique pilote sur la neuroprotection a été mené récemment par l'équipe d'Ehrenreich (Ehrenreich *et al*, 2002).

Il consistait à étudier l'innocuité et l'efficacité de l'administration d'EPO dans le traitement de l'accident vasculaire cérébral (AVC).

L'innocuité est évaluée chez 13 patients volontaires sains qui reçoivent 1 injection par jour pendant 3 jours d'EPO par voie IV (33 000 UI/j soit 100 000 UI au total).

Cette dose élevée est bien tolérée. On n'observe pas d'augmentation de la tension artérielle et les paramètres biologiques hématologiques (hématocrite, hémoglobine, nombre d'hématies) restent stables pendant les 30 jours d'étude.

La concentration en EPO dans le liquide céphalo-rachidien est 60 fois plus importante chez les patients traités que chez les patients non traités : il y a donc un passage à travers la BHE.

L'efficacité du traitement est évaluée chez 40 patients qui présentent un AVC. C'est une étude en double aveugle.

Le groupe traité (n=21) reçoit 33000 UI d'EPO par voie IV, dans les 8 h après l'AVC. Les 2 injections suivantes (même dose) ont lieu 24 et 48 h après la première. Le groupe contrôle (n=19) reçoit un placebo.

Les lésions cérébrales post-ischémiques sont évaluées en dosant la concentration plasmatique de la protéine S100β qui est un marqueur glial des lésions cérébrales.

Le groupe traité présente un pic sérique à j7 significativement plus faible que le groupe traité par placebo (figure 10).

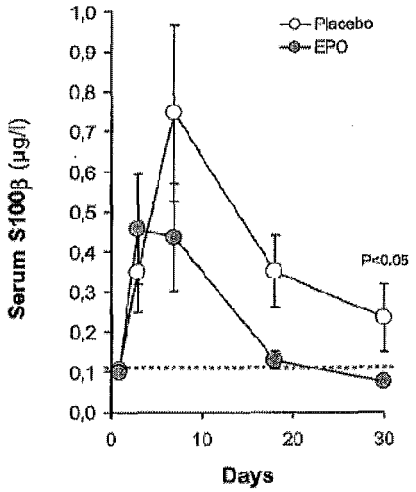


Figure 10 : Concentration sanguine de la protéine S100β au cours du temps (j0 correspond au jour de l'attaque) (Ehrenreich *et al*, 2002).

On mesure également la taille des lésions par IRM à j1, j3 et j18 (j0 correspondant au jour de l'attaque). A j18, par la technique DWI, on observe une réduction de la taille de la lésion par rapport au groupe contrôle (figure 11).

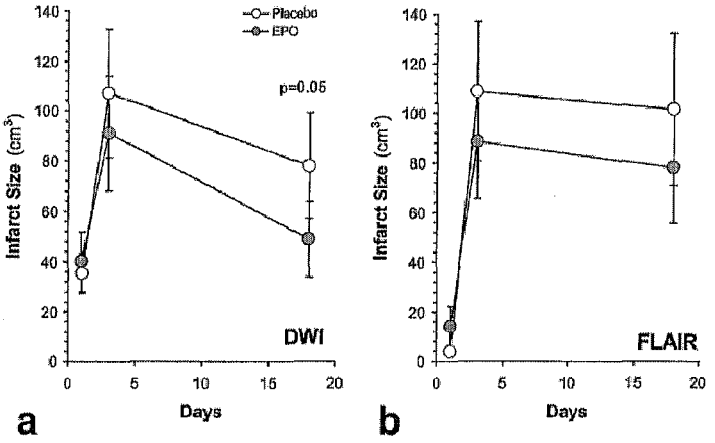


Figure 11 : Evolution de la taille des lésions cérébrales ischémiques de j0 à j18 des patients traités par l'EPO et des patients recevant le placebo mesurée par 2 méthodes d'IRM :

a = DWI (Diffusion Weighted imaging)

b = FLAIR (FLuid Attenuated Inversion Recovery)

(Ehrenreich *et al*, 2002).

Le score neurologique est évalué par les scores NIH et SSS entre j0 et j30.

On observe une amélioration significative du score neurologique chez les patients traités par rapport au groupe placebo dès le 18ème jour (figure 12).

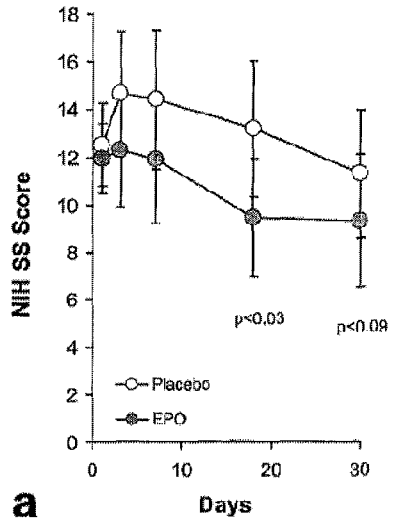


Figure 12 : Evolution du score neurologique pendant les 30 jours après l'ischémie cérébrale (Ehrenreich *et al*, 2002).

Cette étude clinique confirme donc l'effet neuroprotecteur de l'EPO vis à vis des lésions ischémiques provoquées par un AVC. Une étude clinique à plus grande échelle permettrait d'évaluer plus précisément la dose d'EPO nécessaire.

L'administration d'EPO dans le traitement de l'ischémie cérébrale suscite de grands espoirs car le seul traitement pour l'instant possible sont les thrombolytiques qui ne doivent être administrés que dans les 6 h suivant l'attaque (à condition qu'elle ne soit pas hémorragique) et qui comportent beaucoup de contre-indications à cause du risque hémorragique.

5.3. Asialoérythropoëtine

Il est possible d'effectuer une désialysation de l'EPO, c'est-à-dire un clivage des acides sialiques des chaînes glycosylées qui ralentissent son épuration sanguine par le foie. L'EPO est modifiée par incubation avec des enzymes de désialysation. On obtient l'asialoEPO.

La modification de la molécule d'EPO pour réduire sa demi-vie pourrait donc permettre d'obtenir un effet exclusivement neurologique. En effet, on a observé que l'administration d'une seule dose d'EPO permettait d'obtenir un effet neuroprotecteur (Brines *et al*, 2000). Ceci serait valable même lors d'une exposition très brève : L'étude *in vitro* de Morishita *et al* (1997) met en évidence, sur des cellules neuronales en culture, qu'une exposition de 5 min à l'EPO induit une action neuroprotectrice.

En revanche, l'augmentation de l'hématocrite nécessite la présence continue d'EPO, à l'aide injections multiples, responsable de nombreux effets indésirables cardiovasculaires aux doses pharmacologiques (Wiessner *et al*, 2001).

L'équipe de Erbayraktar (Erbayraktar *et al*, 2003) a étudié l'activité de cette molécule à demi-vie plus courte, chez le rat et la souris.

Cette étude utilise de l'EPO et l'asialoEPO marquées par un procédé radiologique.

Voici, chez le rat, les demi-vies plasmatiques en heures obtenues avec les 2 types de molécules en fonction de la voie d'administration :

	Voie intraveineuse	**Voie intrapéritonéale**	**Voie sous-cutanée**
EPO	5,6 h	7,0 h	5,4 h
asialoEPO	0,023 h	0,5 h	2,5 h

Pour les voies IV et IP, l'asialoEPO possède une demi-vie nettement inférieure à celle de l'EPO. De plus, l'affinité pour l'EPOR est identique.

L'effet de l'asialoEPO sur l'hémoglobinémie a été évalué.

Pour ce faire, l'asialoEPO et l'EPO sont injectées 2 fois par semaine à la dose de 100 µg/kg pendant 5 semaines par voie IP. On observe que le groupe traité par l'asialoEPO ne présente pas d'augmentation de la concentration sanguine d'hémoglobine, contrairement au groupe traité par l'EPO. L'AsialoEPO n'a donc pas d'effets hématologiques (Figure 13).

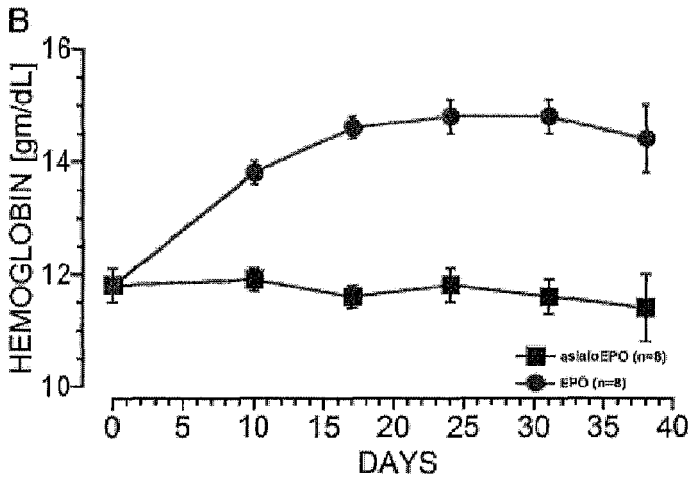


Figure 13 : Hémoglobinémie chez des souris traitées par l'EPO ou l'asialoEPO (100 µg/kg), 2 fois par semaine pendant 5 semaines (Ebayraktar *et al*, 2003).

Enfin, l'effet neuroprotecteur de l'asialoEPO a été déterminé. Pour cela l'asialoEPO et l'EPO sont administrés chez des rats (44 µg/kg par voie IV) après une ischémie cérébrale de 90 min. La taille de la zone ischémiée est mesurée 24 h plus tard.

On observe une réduction de la taille de l'infarctus de 50% chez les rats traités par l'EPO ou par l'asialoEPO par rapport au groupe contrôle (figure 14).

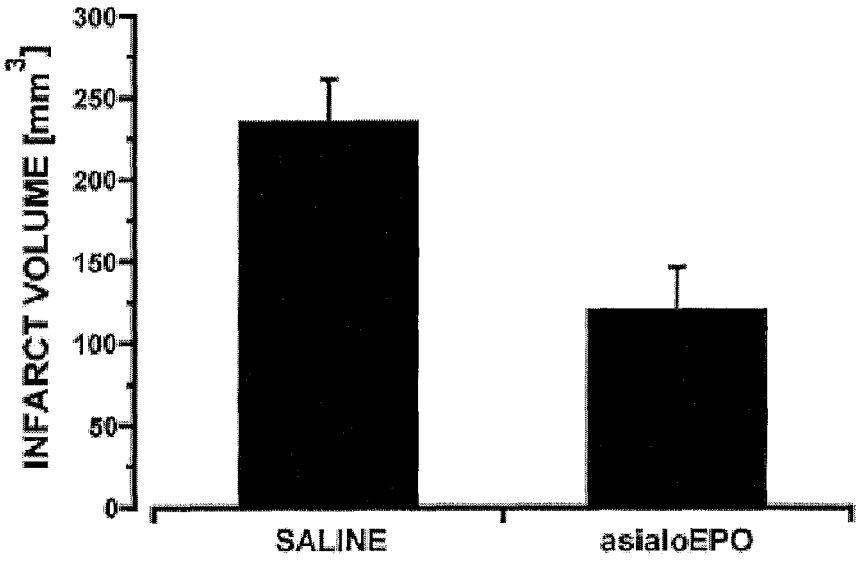


Figure 14 : Taille de l'infarctus en mm^3 mesurée 24 h après une ischémie cérébrale de 90 min, chez le groupe ayant reçu l'asialoEPO par voie IV et le groupe ayant reçu le véhicule (saline) (Ebayraktar *et al*, 2003).

L'AsialoEPO présente donc une activité neuroprotectrice comparable à celle de l'EPO sans activité hématologique.

L'asialoEPO, possède donc une demi-vie très courte par voie IV (1,4 min) mais conserve cependant une bonne affinité pour l'EPOR et une activité neuroprotectrice. Cette molécule est donc capable de passer la BHE, comme l'EPO.

De plus, elle ne provoque pas d'augmentation de la concentration de l'hématocrite, ce qui est une propriété intéressante, quand on connaît les effets indésirables hématologiques liés aux traitements de longue durée par l'EPO (hypertension, thrombose, hyperactivité plaquettaire).

6. Conclusion

L'effet neuroprotecteur de l'EPO est aujourd'hui largement caractérisé et l'on sait maintenant que l'administration de cette molécule prévient de façon spectaculaire les lésions cérébrales aussi bien avant qu'après une ischémie. Les mécanismes impliqués dans cet effet ne sont pas encore tous élucidés et de nombreuses études expérimentales sont encore nécessaires pour comprendre ce phénomène.

L'EPO semble être une molécule prometteuse dans la prise en charge des AVC mais les études qui ont été menées chez l'animal utilisent des doses d'EPO environ dix fois plus importantes que celles actuellement utilisées en thérapeutique. Il serait donc intéressant d'étudier chez l'homme, à plus grande échelle que l'étude de Ehrenreich, l'effet de telles doses en thérapeutique. Il semble difficile de pouvoir comparer l'efficacité de l'EPO versus les thrombolytiques chez l'homme pour des raisons éthiques. Cette étude pourrait cependant être menée chez l'animal.

Enfin, l'asialoEPO représente aujourd'hui une molécule prometteuse quant à la thérapeutique de situations ischémiques cérébrales. Une étude clinique comparative serait intéressante pour évaluer son réel bénéfice par rapport à l'EPO en thérapeutique.

PARTIE 3

La cardioprotection induite par l'érythropoïétine

De la même manière qu'une ischémie cérébrale, une ischémie myocardique induit des lésions cellulaires irréversibles. La lésion ischémique est caractérisée par une région centrale (où la mort cellulaire par nécrose est prédominante et rapide) et une région périphérique (la zone à risque) où les cellules subissent une mort par apoptose plus lente (Bogoyevitch, 2004).

Des études récentes ont montré que l'EPOR était exprimé au niveau du cœur (Wright *et al*, 2004). Ce qui a permis de penser que l'EPO pouvait donc avoir un effet bénéfique sur cet organe.

Différentes études expérimentales reportées ici illustrent le rôle cardioprotecteur de l'EPO contre les lésions ischémiques cardiaques, qui se traduit par l'amélioration de la récupération fonctionnelle, la réduction de la taille de la lésion et l'augmentation de la vascularisation.

1. Le préconditionnement

Lorsque le myocarde subit une petite ischémie non létale avant une ischémie de plus grande importance, les dégâts tissulaires sont moins graves que lors d'une ischémie sévère seule. Ce phénomène de protection endogène déclenché par l'ischémie brève est appelé préconditionnement ischémique (Murry *et al*, 1986). Le cœur s'adapte au premier stress en modifiant les phénotypes cellulaires pour pouvoir mieux résister à un stress ultérieur plus intense.

Ce phénomène a été tout d'abord étudié au niveau cardiaque, mais il se produit également au niveau d'autres organes comme le SNC, le foie, les muscles squelettiques, les reins, les poumons, ... (Nandagopal *et al*, 2001).

Il existe 2 phases dans le phénomène de préconditionnement (Yellon & Downey, 2003) :

- La 1ère phase est brève et survient peu de temps après le stress préconditionnant (de quelques minutes à 2 h). Elle est due à une régulation du flux des cations.
- La 2ème phase est retardée (de 12 à plus de 72h après le stress préconditionnant) et nécessite la synthèse de protéines.

Par exemple, lorsque des souris subissent une alternance d'hypoxie (6 min) et de réoxygénation (6min) pendant 1 h, 24 h avant une ischémie/reperfusion (I/R), on observe une réduction de la taille de l'infarctus. En effet, l'hypoxie active la production du facteur de transcription HIF-1, qui va à son tour réguler l'expression de différents gènes dont celui de l'EPO. Une augmentation de la libération d'EPO joue alors un rôle cardioprotecteur (Cai *et al*, 2003).

Le cœur peut être préconditionné de façon mécanique (par une ischémie ou une hyperthermie) ou pharmacologiquement. Il a été montré très récemment que l'EPO pouvait être considéré comme un préconditionnement pharmacologique (Cai & Semenza, 2004).

Ainsi, des modèles de cellules en culture, de cœurs isolés ou d'animaux *in vivo* ont été utilisés pour rechercher l'effet cardioprotecteur de l'EPO vis-à-vis des lésions ischémiques.

2. Etudes de l'effet de l'EPO sur les cellules cardiaques

Expression cardiaque de l'EPOR :

L'étude de Wright *et al* (2004) confirme la présence de l'EPOR sur les myocytes cardiaques du rat. Les fibroblastes cardiaques expriment également l'EPOR (Parsa *et al*, 2004). L'EPO endogène ou exogène peut donc agir directement sur le myocarde pour le protéger.

Une ischémie n'est pas réalisable sur des cellules cardiaques isolées. Cependant, cette situation est partiellement mimée en exposant ces cellules à un stress métabolique oxydatif ou à une hypoxie. On a donc pu étudier l'effet de l'exposition à l'EPO des myoblastes et des myocytes dans ces conditions.

Etudes sur myoblates cardiaques :

Dans l'étude de Parsa *et al* (2003), des myoblastes de cœur d'embryons de rats mis en culture sont traités par l'EPO (0,4 ou 10 UI/ml) pendant 24 h. Ces cellules sont ensuite soumises à un traitement pendant 22 h par H_2O_2 (qui est connu pour provoquer l'apoptose cellulaire par un stress oxydatif).

On observe alors que les cellules traitées auparavant par l'EPO présentent un taux de survie supérieur à celles non traitées.

L'EPO joue donc un rôle important dans la prévention de l'apoptose induite par un stress oxydatif.

Etudes sur myocytes cardiaques :

Une culture de myocytes reçoit de l'EPO (10 μg/ml) 30 min avant une hypoxie de 28 h (Calvillo *et al*, 2003). Les cellules contrôles ne reçoivent pas d'EPO. Les résultats montrent que après 28 h d'hypoxie, 60% des myocytes non traités sont morts, dont 85% par apoptose et 15% par nécrose. Dans le groupe traité par l'EPO, on observe une réduction de moitié du nombre de cellules apoptotiques mais autant de cellules nécrotiques. Ces observations montrent que l'EPO protège les myocytes de l'apoptose mais pas de la nécrose induites par l'hypoxie.

Pour ces 2 types de cellules cardiaques exposées à un stress oxydatif ou hypoxique, on observe que l'EPO joue un rôle cytoprotecteur car l'exposition préalable à l'EPO permet de réduire le nombre de cellules en apoptose.

3. Etudes in vitro de l'effet de l'EPO sur cœur isolé

Une première étude a permis de déterminer le rôle de l'EPO exogène dans la protection contre l'ischémie (Cai *et al*, 2003). Pour cela, les rats reçoivent 5000 UI/kg d'EPO en par voie IP. Les cœurs sont isolés et subissent 24 h plus tard une I/R.

On observe une réduction du nombre de cellules en apoptose par rapport au groupe contrôle qui n'a pas reçu d'EPO. On mesure également la pression développée par le

ventricule gauche (PDVG) lors de le reperfusion. Chez les rats traités, la PDVG augmente de 54% et de 18% dans le groupe témoin (figure 15).

L'injection d'EPO agit donc comme un préconditionnement et protège le cœur en améliorant sa capacité de récupération et en réduisant la taille de la lésion.

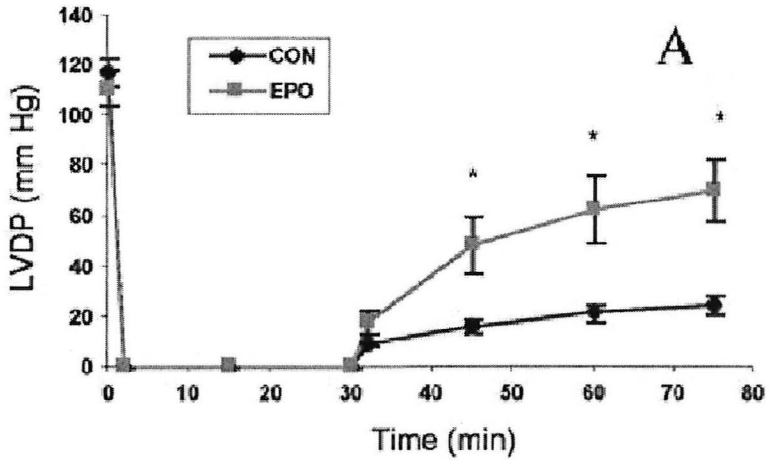


Figure 15 : Mesure de la PDVG suite à une I/R (reperfusion à t=30 min) chez des rats ayant reçu 5000 UI/kg d'EPO 24 h auparavant, versus le groupe contrôle (Cai *et al*, 2003).

Dans une étude ultérieure, la même équipe a montré que suite à l'administration d'EPO 15 min avant une I/R sur le cœur isolé de rat, on observe une meilleure récupération de la PDVG (65%) par rapport au groupe contrôle (16%) (Cai & Semenza, 2004).

Des résultats similaires ont été observés sur cœur isolé de lapin, en administrant l'EPO 15 min avant une I/R (Shi *et al*, 2004).

L'amélioration de la récupération de la PDVG a également été observée par l'équipe de Wright *et al* (2004), lors de l'injection d'EPO immédiatement avant une I/R sur cœur isolé de rat.

Enfin, l'administration d'EPO sur un cœur de rat lors de la reperfusion permet de réduire significativement la taille de l'infarctus (23% de la zone à risque, contre 54% chez le groupe contrôle) (Bullard *et al*, 2005).

L'ensemble de ces résultats montre donc que l'administration d'EPO, *in vivo* ou directement sur cœur isolé, préalablement à une I/R ou lors de la reperfusion permet d'améliorer la récupération fonctionnelle et de réduire la taille de la lésion du cœur isolé.

4. Etudes in vivo de l'effet de l'EPO

L'équipe de Parsa *et al* (2004) a étudié le rôle protecteur de l'EPO contre les lésions provoquées par une I/R *in vivo* chez le lapin.

Chaque animal subit une ischémie de 30 min (par ligature d'une artère coronaire) suivie de 45 min de reperfusion.

On injecte une dose d'EPO de 1000 ou 5000 UI/kg par voie IV, 12 h avant l'ischémie, au moment de l'ischémie ou au moment de la reperfusion selon les groupes. Le groupe contrôle reçoit seulement le véhicule.

L'effet protecteur de l'EPO est évalué par la mesure de la taille de l'infarctus. La fonction cardiaque est aussi évaluée par la mesure de la PDVG lors de la reperfusion. Ce paramètre est réduit par l'ischémie et amélioré par un préconditionnement.

L'amélioration de la PDVG est variable, suivant les groupes :

	Dose d'EPO	**Amélioration de la PDVG par rapport au groupe contrôle**
Groupe 1	Contrôle (pas d'EPO)	
Groupe 2	1000 UI/kg 12 h avant l'ischémie	+++
Groupe 3	1000 UI /kg au moment de l'ischémie	+
Groupe 4	1000 UI/kg au moment de la reperfusion	+
Groupe 5	5000 UI/kg au moment de l'ischémie	+++
Groupe 6	5000 UI/kg au moment de la reperfusion	Pas d'amélioration

Dans les groupes 2 et 5, on observe une amélioration significative de la PDVG. Le prétraitement avec une faible dose d'EPO ou l'injection d'une forte dose d'EPO au moment de l'ischémie jouent donc un rôle bénéfique dans la préservation de la fonction cardiaque.

Concernant la taille de l'infarctus, on observe une réduction significative dans les 5 groupes (figure 16).

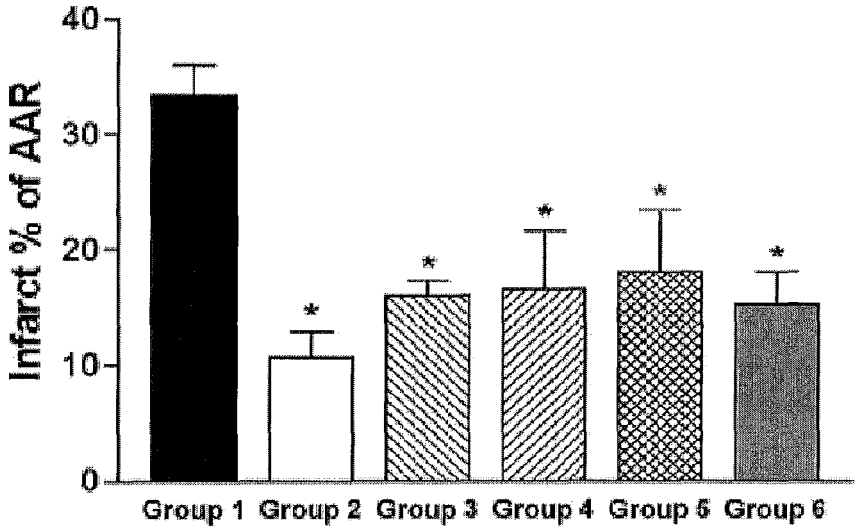


Figure 16 : Mesure de la taille de l'infarctus (en % de la zone à risque (AAR)) 3 jours après l'I/R (Parsa *et al*, 2004).

Dans l'étude de Tramontano *et al* (2003), les rats reçoivent 5000 UI/kg d'EPO juste avant la ligature permanente de l'artère coronaire antérieure gauche pendant 60 min. Les animaux sont ensuite sacrifiés. On observe alors une réduction significative du nombre de cellules en apoptose par rapport au groupe non traité (groupe MI) (figure 17).

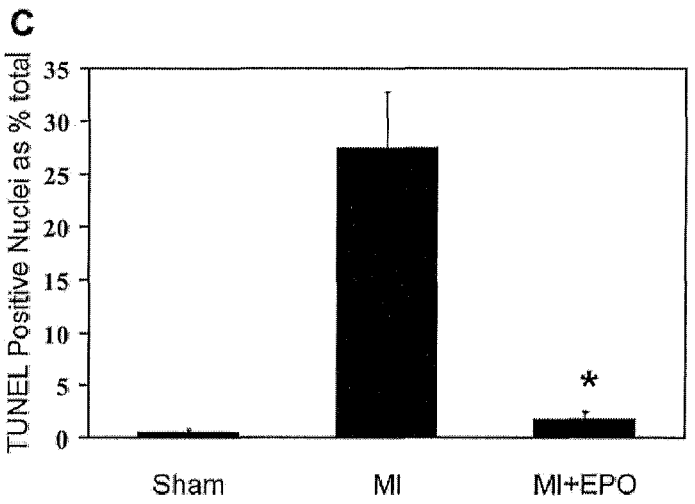


Figure 17 : Proportion de cellules en apoptose suite à une ischémie de 60 min. le groupe MI+EPO a reçu une dose de 5000 UI/kg d'EPO et le groupe MI n'en n'a pas reçu. Le groupe témoin (sham) n'a pas reçu d'EPO et n'a pas subit de ligature (Tramontano *et al* 2003).

Des résultats similaires ont été observés chez le rat ayant subi une I/R. L'EPO est injectée 2 h avant, au moment de l'ischémie ou au moment de la reperfusion. Dans tous les cas, on remarque une réduction de la taille de l'infarctus, une réduction du nombre de cellules en apoptose et une amélioration de la capacité de récupération de la fonction cardiaque (Lipsic *et al*, 2004).

Il a aussi été observé que l'administration d'EPO (5000 UI/kg) au moment de la reperfusion, après une ischémie de 40 min chez le rat, induit une réduction significative de la taille de l'infarctus, (33% de la zone à risque dans le groupe traité contre 54% dans le groupe contrôle) (Bullard *et al*, 2005).

Dans une toute autre étude, un groupe de rats reçoit une dose unique de 3000 UI/kg d'EPO immédiatement après la ligature permanente de l'artère coronaire descendante gauche. Le groupe témoin reçoit le véhicule (Moon *et al*, 2003).
La taille de la lésion évaluée après 8 semaines est réduite de 15 à 25% par rapport au groupe témoin. Le bénéfice de l'injection d'EPO est donc encore visible 2 mois après l'ischémie.

Dans ces modèles expérimentaux *in vivo*, l'EPO est injecté avant ou au moment de l'ischémie, ou alors au moment de la reperfusion. Dans tous les cas, on observe alors que l'EPO confère une cardioprotection que l'on peut évaluer de différentes manières.
La récupération de la fonction cardiaque (mesurée par la PDVG) au moment de la reperfusion est améliorée, en particulier si l'injection d'EPO a eu lieu 12 h avant l'I/R. On observe également une réduction du nombre de cellules en apoptose et donc une réduction du volume de la zone à risque, ce qui suggère que l'EPO permet une meilleure protection des tissus autour de la lésion. Enfin, la diminution de la nécrose (taille de l'infarctus) est encore visible 2 mois après l'I/R. Le bénéfice de l'EPO est donc maintenu pendant toute cette période.

Ainsi, l'administration d'EPO avant l'ischémie, au moment de celle-ci ou pendant la reperfusion confère dans tous les cas une protection efficace sur cœur isolé ou *in vivo*.
Des études complémentaires seraient nécessaires pour déterminer la dose optimale ainsi que la période la plus appropriée pour obtenir la meilleure efficacité.

5. Voies de signalisation et médiateurs de la cardioprotection

Chez les cellules hématopoïétiques et endothéliales, l'EPO est connue pour stimuler 3 voies de signalisation suite à la liaison à son récepteur (cf partie 1) et à l'activation des JAK 2 :

- La voie de la PI-3 kinase qui active ensuite l'Akt kinase
- La voie des MAP kinases
- La voie des STAT

Il semble que ces mêmes voies soient activées au niveau cardiaque.

Chez les myoblastes en culture, le traitement par l'EPO induit une activation de STAT 3, Akt et MAP kinases au bout de respectivement 10, 15 et 60 min (Parsa *et al*, 2003).

Le traitement par l'EPO de fibroblastes cardiaques en culture induit l'activation des voies JAK 2 / STAT 3, MAP kinases et Akt (Parsa *et al*, 2004).

5.1. Les voies de signalisation

- *Voie de la PI-3kinase / Akt*

Cette voie de signalisation est une voie importante au niveau cardiaque dans la modulation de l'apoptose.

L'injection d'EPO dans un cœur isolé de rat augmente l'activité de l'Akt. Par contre, l'administration d'un inhibiteur de PI-3k inhibe l'effet antiapoptotique de l'EPO lors d'une ischémie cardiaque (Tramontano *et al*, 2003).

- *Voie des MAP kinases*

L'équipe de Shi *et al* (2004) a observé que l'injection d'un inhibiteur de P38 MAP kinase et de P42/44 MAP kinase 15 min avant l'injection d'EPO abolit l'effet protecteur cardiaque de l'EPO contre les lésions ischémiques (inhibition de l'amélioration de la récupération fonctionnelle suite à une I/R).

- *Voie des STAT*

Les expériences de Parsa *et al* (2004) montrent que lors d'une injection d'EPO dans un cœur isolé de lapin, on observe une activation de JAK 2 ainsi que de STAT 3 et de STAT 5 qui sont des médiateurs antiapoptotiques stimulés par JAK 2. Cependant, l'identité précise des médiateurs de la famille des STAT impliquées dans ces réactions est encore mal connue (Baker, 2005).

- *Voie de la protéine kinase C (PKC)*

L'injection d'un inhibiteur de ce médiateur, la chélérythrine, en même temps que l'injection d'EPO 15 min avant une I/R sur cœur isolé de lapin abolie l'effet

cardioprotecteur de l'EPO (pas de meilleure récupération de la fonction cardiaque) (Shi *et al*, 2004). La PKC pourrait donc jouer un rôle important dans l'effet cardioprotecteur de l'EPO.

Les voies de signalisation intracellulaires activées suite à la liaison de l'EPO à son récepteur sont de mieux en mieux connues mais il reste cependant des zones d'ombre.

5.2. Médiateurs de la cardioprotection

Très récemment, plusieurs médiateurs de la cardioprotection induits par l'EPO ont été identifiés. Il s'agit des canaux potassiques situés au niveau de la membrane mitochondriale et du sarcolemme et des NO synthases.

5.2.1. Les canaux potassiques

Activés par l'ATP (K_{ATP}) ou par le calcium (K_{Ca}), les canaux potassiques sont fortement exprimés au niveau du myocarde et jouent un rôle important dans la cardioprotection (Baker, 2005).

En administrant un bloqueur des canaux potassiques K_{ATP} ou K_{Ca} avant l'injection d'EPO suivie immédiatement d'une I/R dans un cœur isolé, on observe l'abolition de l'effet cardioprotecteur de l'EPO (Shi *et al*, 2004).

L'ouverture des canaux du sarcolemme provoque un flux de potassium du cytosol vers l'extérieur de la cellule, permettant de réduire le flux de calcium entrant dans la cellule pendant l'ischémie et induisant une hyperpolarisation de la cellule.

L'activation des canaux mitochondriaux provoque un flux de potassium du cytosol vers la mitochondrie améliorant l'apport énergétique (Shi *et al*, 2004).

L'ouverture des canaux K_{ATP} pourrait survenir suite à l'activation des MAP kinases, elles-mêmes stimulées par la PKC (Baines *et al*, 1999).

L'étude de Shi *et al* (2004) met en évidence l'implication des canaux K_{Ca} dans la cardioprotection puisque que l'administration de paxilline, un bloqueur des canaux K_{Ca}, 15 min avant l'injection d'EPO puis l'I/R inhibe l'effet cardioprotecteur de l'EPO. Cette implication est controversée car une autre étude administrant la paxilline et l'EPO 1h avant l'I/R n'a pas montré de réduction de la cardioprotection induite par l'EPO (Joyeux-Faure *et al*, 2005).

5.2.2. Les NO synthases (NOS)

L'EPO est connue pour stimuler la libération de NO au niveau des cellules endothéliales. Il semble que ce phénomène se produise également au niveau des myocytes. Une étude *in vivo* chez le rat a montré que l'administration d'inhibiteurs des NOS abolit l'amélioration de la récupération fonctionnelle cardiaque induite par l'EPO suite à une I/R (Joyeux-Faure *et al*, 2005).

Le NO pourrait activer la guanylate-cyclase permettant la formation de GMPc. le GMPc activerait les canaux potassiques par l'intermédiaire de la protéine kinase G (Han *et al*, 2002).

Cependant, le rôle des NOS dans la cardioprotection induite par l'EPO reste à confirmer car l'étude de Shi *et al* (2004) semble montrer qu'elles ne sont pas impliquées dans cet effet.

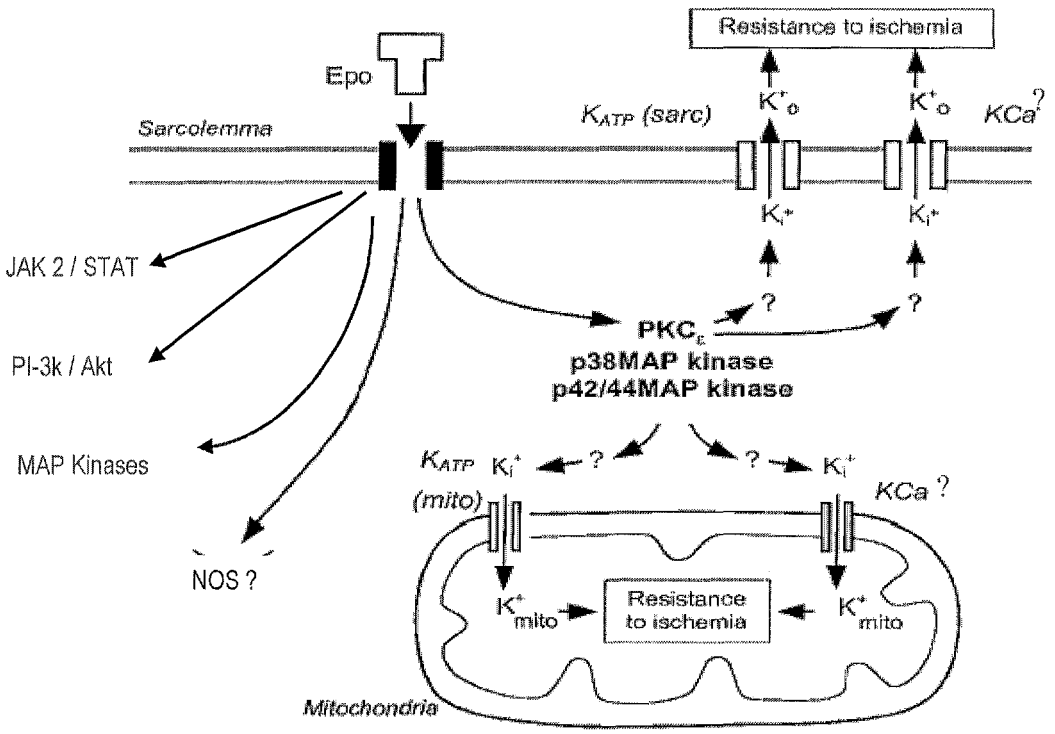


Figure 18 : Représentation schématique des voies de signalisation intracellulaires conduisant à l'activation des canaux potassiques (d'après Shi *et al*, 2004).

Tous ces phénomènes intracellulaires permettent une meilleure résistance cellulaire au stress hypoxique et donc une réduction du risque de nécrose et d'apoptose.

Outre ces effets, l'EPO pourrait également conférer un effet cardioprotecteur par d'autres mécanismes:

- Le phénomène d'angiogénèse induit par l'EPO permet de stimuler les cellules endothéliales de manière à améliorer le flux sanguin autour de la zone ischémiée. Ce phénomène, comme au niveau cérébral, joue certainement un rôle dans la réduction de la taille de la lésion cardiaque (Bogoyevitch, 2004)
- L'EPO pourrait aussi atténuer le phénomène inflammatoire en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires. Ceci a été décrit au niveau cérébral (Agnello *et al*, 2002) et reste à être confirmé au niveau cardiaque.

6. Bénéfices thérapeutiques potentiels

6.1. Anémie et maladies cardio-vasculaires

L'EPO est fréquemment utilisée chez les sujets souffrant d'insuffisance rénale chronique pour traiter l'anémie. L'anémie est un facteur de risque cardiovasculaire important car elle provoque une dilatation du ventricule gauche et une augmentation du volume du cœur. Le traitement permet donc de prévenir ces complications. Par contre, chez les insuffisants rénaux ayant déjà développé une insuffisance cardiaque gauche, l'effet est limité (*Van der Meer* et al, 2003).

L'insuffisance cardiaque chronique est également un facteur favorisant l'anémie par l'augmentation du taux de TNF-alfa qui a une action inhibitrice sur l'érythropoïèse. Lorsque l'anémie est installée, elle constitue à son tour un facteur de risque d'aggravation de l'insuffisance cardiaque que l'on évalue par l'examen fonctionnel des patients (classement de I à IV selon la New York Heart Association), la fraction d'éjection du ventricule gauche, les besoins en furosémide et la durée de

l'hospitalisation. Tous ces paramètres sont significativement améliorés lors du traitement de l'anémie par l'EPO (étude de Silverberg *et al*, 2001)

Il existe donc une interaction complexe entre anémie, insuffisance cardiaque chronique et insuffisance rénale chronique.

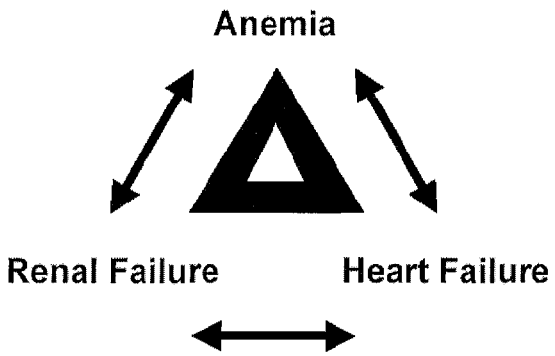


Figure 19 : Inter-relation entre l'anémie, l'insuffisance rénale chronique et l'insuffisance cardiaque chronique (Silverberg *et al*, 2001).

6.2. Cardioprotection contre l'ischémie

L'EPO pourrait constituer une nouvelle alternative thérapeutique dans plusieurs cas :

- En prévention contre l'ischémie chirurgicale, par le phénomène de préconditionnement pharmacologique. La chirurgie constitue un stress important pour les cellules cardiaques. L'EPO permettrait dans le cas de chirurgies cardiaques (pathologies cardiaques acquises de l'adulte ou malformations congénitales de l'enfant) une meilleure adaptation cellulaire aux stress exercés et une meilleure récupération suite à l'opération (Baker, 2005).

- Pour préserver le cœur lors d'une transplantation. Dans ce cas, l'EPO pourrait être administré avant transplantation ou directement dans le liquide de préservation du greffon.
- En traitement, lors de la prise en charge en urgence d'un IDM pour réduire les séquelles et la taille de l'infarctus. L'EPO serait alors administrée au moment de la reperfusion, pendant la thrombolyse, la mise en place d'un pontage ou d'une angioplastie (Baker, 2005). De nouvelles études sont nécessaires pour déterminer son efficacité chez l'homme versus ou en complément des traitements habituels (thrombolytiques, angioplastie) lors de la survenue d'un IDM ainsi que le délai autorisé pour l'injection permettant une bonne efficacité.

Ainsi, l'application de l'effet cardioprotecteur de l'EPO apporte de réels espoirs dans la prise en charge de situations ischémiques cardiaques comme l'IDM ou en cas de chirurgie cardiaque. L'EPO permettrait alors une meilleure adaptation cardiaque à ces situations hypoxiques.

CONCLUSION GENERALE

L'utilisation de l'EPO dans le domaine hématologique est désormais bien connue et joue un rôle essentiel dans le traitement de l'anémie chronique.

On sait maintenant que l'administration d'EPO ne limite pas son action au niveau du compartiment hématologique et vasculaire, mais agit également au niveau du SNC (par passage BHE à l'aide de transporteurs spécifiques) et au niveau cardiaque car ces organes expriment tous les deux l'EPOR.

La figure 20 illustre les différents sites d'action connus actuellement de l'EPO exogène ou endogène ainsi que ses effets protecteurs et délétères.

Seul l'effet hématologique est actuellement utilisé en thérapeutique. Les études expérimentales ont permis de mettre en évidence son mode d'action (réduction de l'apoptose, activation de l'angiogénèse, réduction de l'inflammation) et d'expliquer une partie des effets indésirables.

Prescrite auparavant uniquement pour corriger une anémie préexistante, le domaine d'application de l'EPO tend à s'élargir aux situations péri-opératoires, dans le but de réduire le risque de recours à la transfusion sanguine lors d'une chirurgie hémorragique.

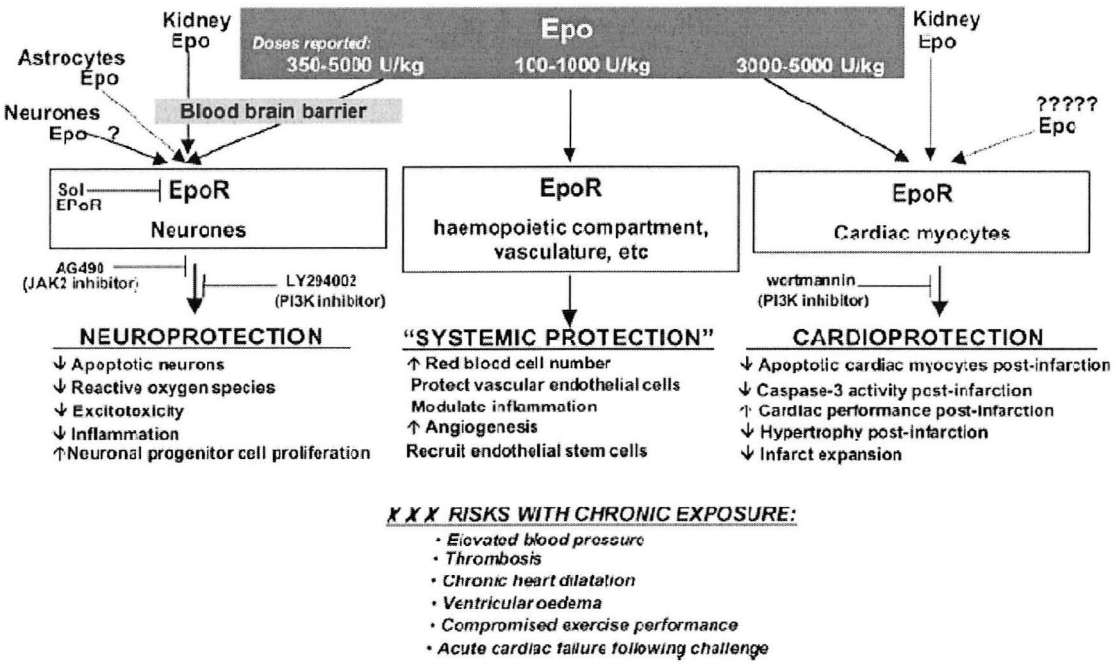


Figure 20 : Sites d'action connus actuellement de l'EPO exogène (Bogoyevitch *et al*, 2004)

Depuis quelques années seulement, on connaît les effets neuroprotecteurs et cardioprotecteurs de cette molécule.

L'effet neuroprotecteur pourrait trouver son application dans la prise en charge d'urgence de l'AVC. De plus, l'asialoEPO, dénuée d'effets hématologiques sans perte de l'effet neuroprotecteur, constitue une molécule d'avenir.

L'effet cardioprotecteur de l'EPO pourrait jouer un rôle prépondérant dans la prise en charge des pathologies ischémiques cardiaques, d'une part comme agent préconditionnant avant une chirurgie cardiaque et d'autre part en traitement de l'IDM pour réduire les séquelles de la lésion myocardique.

L'EPO est donc une molécule prometteuse dans le domaine des maladies cardiovasculaires, qui représentent au jour d'aujourd'hui la première cause de mortalité en France. Elle pourrait donc bientôt constituer une nouvelle stratégie thérapeutique.

Des études complémentaires, chez l'homme maintenant, sont nécessaires pour évaluer les bénéfices que pourrait apporter cette molécule et les doses d'EPO à utiliser. En effet, la plupart des études expérimentales utilisent 1000 ou 5000 UI/kg d'EPO (chez des rongeurs) mais les doses utilisées actuellement en thérapeutique sont de l'ordre de 500 UI/kg.

On ne connaît pas actuellement la dose minimale qui confère une cardioprotection efficace, mais d'aussi fortes doses chez l'homme pourraient favoriser l'apparition d'effets indésirables et de complications (thrombose, ...).

Ainsi, il semble important de déterminer la dose optimale d'EPO permettant une cardioprotection sans augmenter l'érythropoïèse, responsable de nombreux effets indésirables.

L'asialoEPO pourrait dans ce cas être une alternative intéressante car elle ne stimule pas l'érythropoïèse.

Toutes ces nouvelles perspectives thérapeutiques pourraient donner une seconde vie à cette molécule thérapeutique trop connue du grand public pour son usage détourné.

THESE SOUTENUE PAR : Aurélie Yonnet

TITRE :

LES NOUVELLES PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES DE L'ERYTHROPOIETINE

CONCLUSION

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone produite par le rein, régulant l'hématopoïèse. On sait depuis une quinzaine d'année produire par génie génétique l'EPO recombinante humaine (EPOr-Hu). Elle est actuellement utilisée dans le traitement de l'anémie chronique associée à certaines pathologies (insuffisance rénale chronique, cancer, ...) et a apporté une avancée considérable dans ce domaine.

Les études ont permis de mettre en évidence son mode d'action (réduction de l'apoptose, angiogénèse, réduction de l'inflammation) et d'expliquer une partie des effets indésirables.

Depuis quelques années seulement, on sait que l'activité de l'EPO ne se limite pas à une action exclusive sur l'érythropoïèse. En effet, elle joue un rôle protecteur sur les cellules neuronales du système nerveux central et les cellules cardiaques lors d'une ischémie.

De nombreuses études chez l'animal ont montré que l'injection d'EPO avant ou au moment d'une ischémie cérébrale ou cardiaque permet de prévenir les lésions ischémiques en réduisant la taille de la lésion et en augmentant les capacités de récupération.

Une étude clinique pilote a aussi montré que l'EPO prévient les lésions cérébrales dues à un accident vasculaire cérébral (AVC).

L'EPO est donc une molécule prometteuse dans le domaine des maladies cardiovasculaires, qui représentent la première cause de mortalité en France, autant dans la prévention de l'ischémie cérébrale ou cardiaque, par son action de préconditionnement, que dans le traitement de l'infarctus du myocarde ou de l'AVC. L'EPO pourrait donc bientôt devenir une nouvelle stratégie thérapeutique.

Des études complémentaires chez l'homme sont aujourd'hui nécessaires pour déterminer la dose optimale d'EPO permettant une protection cardiaque ou neuronale contre les lésions ischémiques sans augmenter l'érythropoïèse, responsable de nombreux effets indésirables.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 11/10/05

LE DOYEN

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
U.F.R. DE PHARMACIE
GRENOBLE 1

Pr P. DEMENGE

LE PRESIDENT DE THESE

Pr C. RIBUOT

ABREVIATIONS

AVC : accident vasculaire cérébral

BHE : barrière hémato-encéphalique

EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EPO : érythropoïétine

EPOR : récepteur de l'érythropoïétine

EPOr-Hu : érythropoïétine recombinante humaine

ET-1 : endothéline 1

IDM : infarctus du myocarde

I/R : ischémie/reperfusion

IP : intrapéritonéale

IV : intraveineuse

sEPOR : récepteur soluble de l'érythropoïétine

SC : sous-cutanée

SCN : système nerveux central

BIBLIOGRAPHIE

Publications et ouvrages :

Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, Ghezzi P. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Res. 2002, 952:128-34.

"Aranesp" dans dictionnaire Vidal. Issy-les-Molineaux 2005:125-126

Baines CP, Cohen MV, Downey JM. Signal transduction in ischemic preconditioning: the role of kinases and mitochondrial K(ATP) channels. J Cardiovasc Electrophysiol. 1999, 10:741-54.

Baker JE. Erythropoietin mimics ischemic preconditioning. Vascul Pharmacol. 2005, 42:233-41.

Banerjee D, Rodriguez M, Nag M, Adamson JW. Exposure of endothelial cells to recombinant human erythropoietin induces nitric oxide synthase activity. Kidney Int. 2000, 57:1895-904.

Bikfalvi A, Han ZC. Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa. Leukemia. 1994, 8:523-9.

Bogoyevitch MA. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. Cardiovasc Res. 2004, 63:208-16.

Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97:10526-31.

Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. Basic Res Cardiol. 2005, 100:1-7.

Cai Z, Semenza GL. Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. Circulation. 2004, 109:2050-3.

Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. Circulation. 2003, 108:79-85.

Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003, 100:4802-6.

Cheung WK, Goon BL, Guilfoyle MC, Wacholtz MC. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin after single and multiple subcutaneous doses to healthy subjects. Clin Pharmacol Ther. 1998, 64:412-23.

Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M, Sasaki R. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000 ; 279:E1242-8.

Debaene B. Place de l'érythropoiétine en période périopératoire. Conférences d'actualisation 2001. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS. p121-132.

Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. Nature. 2001, 412:641-7.

Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. Blood. 1999, 94:1864-77.

Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Ruther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Siren AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. Mol Med. 2002, 8:495-505.

"Eprex" dans dictionnaire Vidal. Issy-les-Molineaux 2005:696-698

Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003, 100:9102.

Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. Exp Biol Med (Maywood). 2003, 228:1-14.

Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. Brain Res. 2004, 1000:19-31.

Joyeux-Faure M, Béguin P, Godin-Ribuot D, Ribuot C. Rapid pharmacological preconditioning by erythropoietin mediated by inducible NOS and mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the rat heart. Arch Mal Cœur Vaisseaux, 2005, 98 :387.

Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. J Biol Chem. 2001, 276:39469-75.

Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J, Kato Y. Effects of erythropoietin on neuronal activity. J Neurochem. 1999, 72:2565-72.

Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Genc K, Yilmaz O, Gokmen N, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. Biol Neonate. 2005; 87:15-8.

Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. Microvasc Res. 2002, 64:326-33.

Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Ribuot C. Erythropoietin and myocardial protection: what's new? Fund Clin Pharmacol 2005, 19:439-46.

Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. Pediatr Dev Pathol. 1999, 2:148-58.

Kanagy NL, Perrine MF, Cheung DK, Walker BR. Erythropoietin administration in vivo increases vascular nitric oxide synthase expression. J Cardiovasc Pharmacol. 2003, 42:527-33.

Lacombe C, Mayeux P. Erythropoietin (Epo) receptor and Epo mimetics. Adv Nephrol Necker Hosp. 1999, 29:177-89.

Lappin TR, Maxwell AP, Johnston PG. EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions. Stem Cells. 2002, 20:485-92.

Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors. Oncologist. 2003; 8:15-8.

Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJ, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. J Cardiovasc Pharmacol. 2004, 44:473-9.

Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. Eur J Neurosci. 1996, 8:666-76.

Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. J Exp Biol. 2004, 207:3233-42.

Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003, 100:11612-7.

Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. Neuroscience. 1997, 76:105-16.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation. 1986, 74:1124-36.

Nandagopal K, Dawson TM, Dawson VL. Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance. J Pharmacol Exp Ther. 2001, 297:474-8.

"Neorecormon" dans dictionnaire Vidal. Issy-les-Molineaux 2005:1361-1363.

Ng T, Marx G, Littlewood T, Macdougall I. Recombinant erythropoietin in clinical practice. Postgrad Med J. 2003, 79:367-376.

Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. J Clin Invest. 2003, 112:999-1007.

Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto A, Stamler JS, Koch WJ. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. J Biol Chem. 2004, 279:20655-62.

Pascual JA, Belalcazar V, de Bolos C, Gutierrez R, Llop E, Segura J. Recombinant erythropoietin and analogues: a challenge for doping control. Vascul Pharmacol. 2005, 42:233-41.

Prescrire. Darbepoiétine alfa : pas de progrès démontré pour l'anémie due aux cytotoxiques. 2005, 262:412-418.

Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95:4635-40.

Shi Y, Rafiee P, Su J, Pritchard KA Jr, Tweddell JS, Baker JE. Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels. Basic Res Cardiol. 2004, 99:173-82.

Shimpo H, Mizumoto T, Onoda K, Yuasa H, Yada I. Erythropoietin in pediatric cardiac surgery: clinical efficacy and effective dose. Chest. 1997, 111:1565-70.

Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. J Neurosci. 2001, 21:9733-43.

Smith KJ, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC. The cardiovascular effects of erythropoietin. Cardiovasc Res. 2003, 59:538-48.

Tobu M, Iqbal O, Fareed D, Chatha M, Hoppensteadt D, Bansal V, Fareed J. Erythropoietin-induced thrombosis as a result of increased inflammation and thrombin activatable fibrinolytic inhibitor. Clin Appl Thromb Hemost. 2004, 10:225-32.

Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaia MV, El-Sherif N. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2003, 308:990-4.

Vogel V, Kramer HJ, Backer A, Meyer-Lehnert H, Jelkmann W, Fandrey J. Effects of erythropoietin on endothelin-1 synthesis and the cellular calcium messenger system in vascular endothelial cells. Am J Hypertens. 1997, 10:289-96.

Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. J Cereb Blood Flow Metab. 2001, 21:857-64.

Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. FASEB J. 2004, 18:1031-3.

Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. Physiol Rev. 2003, 83:1113-51.

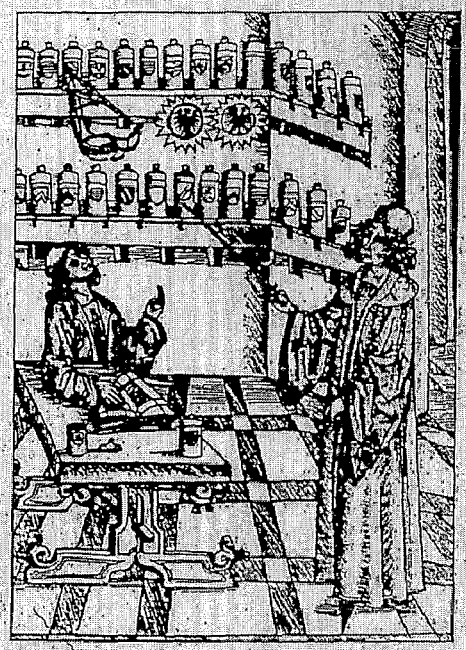
Yu X, Lin CS, Costantini F, Noguchi CT. The human erythropoietin receptor gene rescues erythropoiesis and developmental defects in the erythropoietin receptor null mouse. Blood. 2001, 98:475-7.

Textes officiels :

AFSSAPS. Traitement de l'anémie au cours de l'insuffisance rénale chronique de l'adulte. Mai 2005.

AFSSAPS. Information urgente sur EPREX® et notification de cas d'érythroblastopénie. Communiqué de presse. 19 juillet 2002.

Faculté de Pharmacie de Grenoble



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.

THESE SOUTENUE PAR : Aurélie Yonnet le 10 novembre 2005

TITRE : **LES NOUVELLES PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES DE L'ERYTHROPOIETINE**

RESUME :

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone produite par le rein, régulant l'hématopoïèse. On sait depuis une quinzaine d'année produire par génie génétique l'EPO recombinante humaine (EPOr-Hu). Elle est actuellement utilisée dans le traitement de l'anémie chronique associée à certaines pathologies (insuffisance rénale chronique, cancer, ...) et a apporté une avancée considérable dans ce domaine.

Les études ont permis de mettre en évidence son mode d'action (réduction de l'apoptose, angiogénèse, réduction de l'inflammation) et d'expliquer une partie des effets indésirables.
Depuis quelques années seulement, on sait que l'activité de l'EPO ne se limite pas à une action exclusive sur l'érythropoïèse. En effet, elle joue un rôle protecteur sur les cellules neuronales du système nerveux central et les cellules cardiaques lors d'une ischémie.

De nombreuses études chez l'animal ont montré que l'injection d'EPO avant ou au moment d'une ischémie cérébrale ou cardiaque permet de prévenir les lésions ischémiques en réduisant la taille de la lésion et en augmentant les capacités de récupération.
Une étude clinique pilote a aussi montré que l'EPO prévient les lésions cérébrales dues à un accident vasculaire cérébral (AVC).

L'EPO est donc une molécule prometteuse dans le domaine des maladies cardiovasculaires, qui représente la première cause de mortalité en France, autant dans la prévention de l'ischémie cérébrale ou cardiaque par son action de préconditionnement que dans le traitement de l'infarctus du myocarde ou de l'AVC.

L'EPO pourrait donc bientôt devenir une nouvelle stratégie thérapeutique.
Des études complémentaires sont aujourd'hui nécessaires chez l'homme pour déterminer la dose optimale d'EPO permettant une protection cardiaque ou neuronale contre les lésions ischémiques sans augmenter l'érythropoïèse, responsable de nombreux effets indésirables.

MOTS CLES : **érythropoïétine, neuroprotection, cardioprotection, angiogénèse, ischémie/reperfusion.**

COMPOSITION DU JURY :

Président du jury : Monsieur le professeur Chistophe Ribuot

Membres : Madame le docteur Marie Joyeux-Faure
Madame le docteur Anne Janvier

THESE SOUTENUE PAR : Aurélie Yonnet le 10 novembre 2005

TITRE : **LES NOUVELLES PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES DE L'ERYTHROPOIETINE**

RESUME :

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone produite par le rein, régulant l'hématopoïèse. On sait depuis une quinzaine d'année produire par génie génétique l'EPO recombinante humaine (EPOr-Hu). Elle est actuellement utilisée dans le traitement de l'anémie chronique associée à certaines pathologies (insuffisance rénale chronique, cancer, ...) et a apporté une avancée considérable dans ce domaine.

Les études ont permis de mettre en évidence son mode d'action (réduction de l'apoptose, angiogénèse, réduction de l'inflammation) et d'expliquer une partie des effets indésirables.
Depuis quelques années seulement, on sait que l'activité de l'EPO ne se limite pas à une action exclusive sur l'érythropoïèse. En effet, elle joue un rôle protecteur sur les cellules neuronales du système nerveux central et les cellules cardiaques lors d'une ischémie.

De nombreuses études chez l'animal ont montré que l'injection d'EPO avant ou au moment d'une ischémie cérébrale ou cardiaque permet de prévenir les lésions ischémiques en réduisant la taille de la lésion et en augmentant les capacités de récupération.
Une étude clinique pilote a aussi montré que l'EPO prévient les lésions cérébrales dues à un accident vasculaire cérébral (AVC).

L'EPO est donc une molécule prometteuse dans le domaine des maladies cardiovasculaires, qui représente la première cause de mortalité en France, autant dans la prévention de l'ischémie cérébrale ou cardiaque par son action de préconditionnement que dans le traitement de l'infarctus du myocarde ou de l'AVC.

L'EPO pourrait donc bientôt devenir une nouvelle stratégie thérapeutique.
Des études complémentaires sont aujourd'hui nécessaires chez l'homme pour déterminer la dose optimale d'EPO permettant une protection cardiaque ou neuronale contre les lésions ischémiques sans augmenter l'érythropoïèse, responsable de nombreux effets indésirables.

MOTS CLES : **érythropoïétine, neuroprotection, cardioprotection, angiogénèse, ischémie/reperfusion.**

COMPOSITION DU JURY :

Président du jury : Monsieur le professeur Chistophe Ribuot

Membres : Madame le docteur Marie Joyeux-Faure
Madame le docteur Anne Janvier