



HAL
open science

Mise au point d'un test sérologique de détection des anticorps anti-darbépoétine chez le chat

Auriane Mignon

► **To cite this version:**

Auriane Mignon. Mise au point d'un test sérologique de détection des anticorps anti-darbépoétine chez le chat. Médecine vétérinaire et santé animale. 2024. dumas-04808679

HAL Id: dumas-04808679

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04808679v1>

Submitted on 3 Dec 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année 2024

**MISE AU POINT D'UN TEST SÉROLOGIQUE DE
 DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-DARBÉPOÉTINE CHEZ
 LE CHAT**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 25 juillet 2024

par

Auriane, Jacqueline MIGNON

sous la direction de

Matthias KOHLHAUER

JURY

Présidente du jury :	Mme Christelle MAUREY-GUÉNEC	Professeur à l'EnvA
Directeur de thèse :	M. Matthias KOHLHAUER	Professeur à l'EnvA
Examinatrice :	Mme Delphine LE ROUX	Maître de Conférences à l'EnvA, HDR

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire

version mai 2024



Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
Mme	Benckroun	Ghita	Maître de conférences HDR	DEPEC
M	Biaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
Mme	Chastant	Sylvie	Professeur	DPASP
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guénéec	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Milemann	Yves	Professeur	DPASP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Professeur	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Béguin	Jérémy	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Aline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guélin-Poier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagré	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Radière	Guéric	Maître de conférences associé	DSBP
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC

Remerciements

À la Présidente du Jury de cette thèse, Madame Christelle MAUREY, Professeur titulaire de l'HDR à l'EnvA,

Merci d'avoir activement participé à l'élaboration du projet de mettre en évidence des anticorps anti-darbépoétine chez le chat. Merci de m'avoir aidée à réaliser un recrutement de chats d'intérêt et d'avoir recueilli leurs échantillons sanguins absolument cruciaux pour la réalisation de mes expériences. Merci également d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Au Directeur de cette thèse, M. Matthias KOHLHAUER, Professeur à l'EnvA titulaire de l'HDR à l'EnvA,

Merci d'avoir activement participé à l'élaboration du projet de mettre en évidence des anticorps anti-darbépoétine chez le chat. Merci d'avoir accepté de devenir mon directeur de thèse, de m'avoir accompagnée dans la rédaction de ce manuscrit et d'avoir commandé le kit nécessaire à la réalisation de ces expériences.

À Mme LE ROUX, Maître de conférences titulaire de l'HDR à l'EnvA,

Merci d'avoir activement participé à l'élaboration du projet de mettre en évidence des anticorps anti-darbépoétine chez le chat. Merci de m'avoir aidée à réaliser un recrutement de chats témoins, à élaborer les protocoles expérimentaux et de m'avoir tant aidée à réaliser les expériences. Merci d'avoir accepté d'être mon assesseur de thèse.

À ma famille : ma mère, mon père, ma sœur Félicie et mon frère Victor,

Merci de m'avoir accompagnée toutes ces années, d'avoir cru en mes capacités. Merci d'être là et de me soutenir au quotidien.

À mon fiancé, Victor,

Merci d'être à mes côtés, de me soutenir, me réconforter comme tu le fais si bien. Merci de m'avoir aidée et de m'aider encore chaque jour. La vie est belle avec toi. Ne change rien. Je t'aime.

Table des matières

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations.....	7
Introduction	11
Première partie : bibliographie	13
1. L'érythropoïèse	14
A. <i>La fonction de l'érythropoïèse, les acteurs en jeu</i>	14
a. Définition de l'érythropoïèse.....	14
b. Déroulé de l'érythropoïèse	14
c. L'érythropoïétine	17
d. Régulation de l'érythropoïèse non due à l'érythropoïétine	23
B. <i>L'anémie engendrée par défaut d'EPO</i>	25
a. Définition de l'anémie.....	25
b. L'anémie lors de MRC, une anémie éligible au traitement à la darbépoétine chez le chat	28
2. Traitement des anémies par les érythropoïétines de synthèse	37
A. <i>Recours aux ESAs</i>	37
a. Définition et principe d'un ESA.....	37
b. Propriétés pharmacologiques et structurales	37
c. Historique.....	38
B. <i>La darbépoétine, un ESA d'importance en médecine humaine et vétérinaire</i>	40
a. Différences pharmacologiques et structurales vis-à-vis des autres ESAs.....	40
b. Pharmacocinétique	41
c. Pharmacodynamique	42
C. <i>Mise en place d'un traitement</i>	42
a. Indication.....	42
b. La complémentation ferrique.....	43
c. Posologie et fréquence d'administration	44
d. Efficacité du traitement.....	46
e. Effets indésirables rapportés.....	48
D. <i>Présence d'anticorps anti-ESA : une cause d'échec au traitement</i>	53
a. Concept d'érythroblastopénie (PRCA)	53
b. Comparaison de L'EPO endogène féline à l'EPO humaine	55
c. Application au traitement par les ESAs	57
d. Tests de détections des anticorps anti-darbépoétine	60
Deuxième partie : étude expérimentale	63
1. Introduction	63
A. <i>Choix du test ELISA</i>	63
B. <i>Description du test ELISA indirect</i>	64
2. Matériels et méthodes	65
A. <i>Echantillonnage</i>	65
a. Sérums de chats témoins.....	65
b. Sérums d'intérêt.....	65
c. Validation de notre test ELISA "à façon" via l'utilisation du kit humain	67
B. <i>Mise au point des protocoles de l'expérience du kit et de celle de l'ELISA « à façon »</i>	68
a. Présentation du kit Kribiolosa™ Darbepoetin ELISA (ARANESP).....	68
b. Présentation de notre « coating » pour l'ELISA « à façon » et du matériel associé	70
c. Plans de plaques.....	72
d. Protocoles expérimentaux relatifs aux expériences du kit et de l'ELISA « à façon »	74
3. Résultats	79

A. <i>Expérience du kit</i>	79
B. <i>Mise au point de l'ELISA "à façon" et test des sérums de chats témoins</i>	81
a. Première expérience.....	81
a. Deuxième expérience : Test de l'ELISA « à façon » sur les standards.....	82
b. Deuxième expérience : Test des sérums de chats témoins exposés à la darbépoétine.....	84
c. Deuxième expérience : test des sérums de chats exposés à la darbépoétine.....	85
4. Discussion.....	92
5. Conclusion.....	96
Conclusion	97
Liste des références bibliographiques	99
Annexe 1	109
Annexe 2	111

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la membrane de l'érythrocyte et des protéines structurales associées (d'après Bernard F. Feldman et al., 2006).....	15
Figure 2 : Érythrocytes de chat après coloration de Romanowsky (d'après Weiss and Jane Wardrop, 2010).....	15
Figure 3 : Coupe histologique du micro-environnement de la moelle osseuse hématopoïétique à fort grossissement (modifiée d'après Weiss and Jane Wardrop, 2010)	17
Figure 4 : Illustration de la fixation de l'EPO à ses récepteurs homodimérique (EPO-R) et hétérodimérique (TPR) et de la transmission du signal associé (d'après Tsiftoglou, 2021).....	19
Figure 5 : Schéma des effets pléiotropes de l'EPO (modifié d'après Hu et al., 2012; Suresh et al., 2019; Tsiftoglou, 2021).....	23
Figure 6 : Principales causes de l'anémie, schéma modifié (d'après Chaparro and Suchdev, 2019)	26
Figure 7 : Graphique de la prévalence de la MRC et du stade IRIS associé dans l'espèce féline en fonction de l'âge (Marino et al., 2014).....	28
Figure 8 : Anamnèse et signes cliniques évocateurs de MRC (d'après Polzin, 2013).....	31
Figure 9 : Schématisation de la mise en place de fibrose interstitielle tubulaire rénale (d'après Venkatachalam et al., 2015).....	34
Figure 10 : Structure de l'époétine α et de la darbépoétine fixées au récepteur homodimérique EPO-R (modifiée d'après (Elliott et al., 2003).....	38
Figure 11 : Nombre de cas d'érythroblastopénie médiée par les anticorps anti-ESAs confirmés chez l'Homme, en fonction des années et des ESAs utilisés (modifié d'après Macdougall, 2005)	58
Figure 12 : Schématisation de la technique de l'ELISA indirect (Lin, 2015)	64
Figure 13 : Plan de plaque pour l'expérience relative au kit.....	72
Figure 14 : Plan de plaque pour la réalisation de l'expérience 1 de l'ELISA « à façon »	73
Figure 15 : Plan de plaque pour la réalisation de l'expérience 2 de l'ELISA « à façon »	74
Figure 16 : Schéma récapitulatif du déroulé de la méthode de mise au point de notre expérience de détection d'anticorps anti-darbépoétine chez le chat en quatre étapes successives.....	77
Figure 17 : Photographie de présentation des résultats de l'expérience du kit.....	79
Figure 18 : Photographie de présentation des résultats de la mise au point de l'ELISA.....	81
Figure 19 : Graphique comparant les densités optiques en fonction de la concentration en anticorps des sérums standards humains des expériences 1 et 2	83

Figure 20 : Graphique des relevés d'hématocrite au cours du temps et en fonction des injections de darbépoétine chez W (A09-5970).....	86
Figure 21 : Graphique des relevés d'hématocrite au cours du temps et en fonction des injections de darbépoétine chez X (A23-2XX6).....	87
Figure 22 : Graphique des relevés d'hématocrite au cours du temps et en fonction des injections de darbépoétine chez Y (A23-1XX5).....	88
Figure 23 : Figure 22 : Graphique représentant les mesures de DO pour chaque échantillon témoin et d'intérêt testé.....	90
Figure 24 : Tableau des relevés d'hématocrite, des injections de darbépoétine et des prélèvements sanguins au cours du temps chez W (A09-5970).....	109
Figure 25 : Tableau des relevés d'hématocrite, des injections de darbépoétine et des prélèvements sanguins au cours du temps chez X (A23-2XX6).....	109
Figure 26 : Tableau des relevés d'hématocrite, des injections de darbépoétine et des prélèvements sanguins au cours du temps chez Y (A23-1XX5).....	110

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différents facteurs de l'érythropoïèse (Suresh et al., 2019; Tsiftoglou, 2021).....	24
Tableau 2 : Classification des anémies en fonction de la valeur de l'hématocrite (d'après Bellier S. et Cordonnier N., 2010).....	26
Tableau 3 : Principales étiologies de maladie rénale chronique chez le chat (d'après Polzin, 2013 ; Brown et al., 2016)	30
Tableau 4 : Classification IRIS des stades et sous-stades de la MRC chez le chat (d'après International Renal Interest Society, 2023).....	32
Tableau 5 : Tableau récapitulation des causes d'anémie par diminution de l'érythropoïèse intervenant lors de MRC (Batchelor et al., 2020)	35
Tableau 6 : Tableau des principaux effets indésirables recensés lors de traitement à la darbépoétine en médecine humaine (Berns, 2010; Chung et al., 2023; Novak and Szczech, 2008).....	50
Tableau 7 : Effets indésirables suspectés de la darbépoétine chez les carnivores domestiques (d'après Chalhoub et al., 2012a; E. H. Fiocchi et al., 2017)	52
Tableau 8 : Comparaison interspécifique de séquences protéiques d'EPO endogènes puis comparaison à celle de la darbépoétine (d'après ("NCBI Blast erythropoietin Canis lupus familiaris," n.d.; "NCBI Blast erythropoietin Felis catus," n.d.; "NCBI Blast erythropoietin Homo sapiens sapiens," n.d.).....	56
Tableau 9 : Description des composants du kit KRIBIOLISA™ Darbepoetin ELISA (ARANESP) fabriqué par KRISHGEN Biosystems.....	69
Tableau 10 : Matériel utilisé essentiel à la mise au point de l'ELISA « à façon » de recherche d'anticorps anti-darbépoétine	70
Tableau 11 : Mesure de densité optique de la plaque du kit humain à la longueur d'onde de 450 nm	80
Tableau 12 : Tableau de mesure des densités optiques de la plaque ELISA à la longueur d'onde de 450 nm	81
Tableau 13 : Tableau comparatif des mesures de densités optiques des plaques ELISA « à façon » et kit des séries d'expériences 1 et 2 à la longueur d'onde de 450 nm	83
Tableau 14 : Tableau de résultats des valeurs de densité optique des échantillons de chats témoins	84
Tableau 15 : Tableau de résultats des valeurs de densité optique retranchées à celles obtenues au PBS des échantillons de chats témoins.....	85
Tableau 16 : Tableau de résultats des valeurs de densité optique des échantillons de chats d'intérêt	89

Tableau 17 : Tableau statuant sur la positivité des échantillons testés111

Liste des abréviations

ACVIM = Collège Américain de Médecine Interne Vétérinaire

ATP = Adénosine Triphosphate

BLAST = Basic Local Alignment Search Tools = Outils de Recherche d'Alignement Local de Base

BSA = Albumine Sérique Bovine

CHO = Chinese Hamster Ovary = Ovaire d'Hamster Chinois

CHUV-AC = Centre Hospitalier Universitaire des Animaux de Compagnie de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

CMH = Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA = Cellule Présentatrice d'Antigènes

CRP = Protéine C Réactive

CSH ou HSC = Cellule Souche Hématopoïétique ou Hematopoietic Stem Cell

Darbé = Darbépoétine

DFG = Débit de Filtration Glomérulaire

DO = Densité Optique

EPO = Erythropoïétine

EPO-R = Erythropoietin receptor = Récepteur de l'Erythropoïétine

ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay = Technique d'Immunoabsorption par Enzyme Liée

ESA = Erythropoiesis Stimulating Agent = Agent Stimulant l'Erythropoïèse

Fc = Fraction constante (des anticorps)

GM-SCF= Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor

GR = Globule Rouge

HAS = Haute Autorité de Santé

HIF= Hypoxia Inducible Factor = Facteur Inductible par Hypoxie

HIF-PHP = Hypoxia Inducible Factor – Propyl-4-hydroxylase

HRP = Horseradish Peroxidase

HSC = Hematopoietic Stem Cell = Cellule Souche Hématopoïétique

Ht = Hémathocrite

IFN = Interféron

IGF= Insuline-like Growth Factor

IgG = Immunoglobulines G

IL= Interleukine

IRA = Insuffisance Rénale Aigue

IRC = Insuffisance Rénale Chronique

IRIS = Interational Renal Interest Society

MRC = Maladie Rénale Chronique

MGG = coloration de May-Grünwald Giemsa

NT-proBNP = pro Brain Natriurétique Peptide = fragment du Peptide Natriurétique

PAS = Pression Artérielle Systémique

PBS = Phosphate Buffer Saline = Tampon Phosphate Salin

PCV = Packed cell volume = Hématocrite

PHD = Prolyl Hydroxylase

Pi3K = Phosphoinositide 3-Kinase

PRCA = Pure Red Cell Aplasia = Erythroblastopénie

ROS = Reactive Oxygene Species = Espèces Réactives de l'Oxygène

r-cEPO = recombinant canine Erythropoietin = Erythropoïétine recombinante canine

r-fEPO = recombinant feline Erythropoietin = Erythropoïétine recombinante féline

r-HuEPO = recombinant Human Erythropoietin = Erythropoïétine recombinante Humaine

RIP = Radio-Immuno-précipitation

RPCU = Rapport Protéine sur Créatinine Urinaire

SAA = Amyloïde A Sérique

SC = Sous-Cutané(e)

SCF = Stem Cell Factor = Facteur de croissance des cellules souches

SDMA = Diméthylarginine Symétrique

SPR = Surface Plasmon Resonance = Résonance Plasmonique de Surface

STAT = Signal Transducers and Activators of Transcription = Transducteurs de Signaux et Activateurs de Transcription

T3 = Triiodothyronine

TAL = Transcription Activator-Like effector = Activateur de Transcription

TCP = Tubule contourné proximal

TNF = Tumor Necrosis Factor = Facteur de Nécrose Tumorale

TPO = Thrombopoïétine

TPR = Récepteur de Protection Tissulaire de l'EPO

T1-inj = Echantillon sanguin prélevé après que le chat a reçu la première injection de darbépoétine

T2-inj = Echantillon sanguin prélevé après que le chat a reçu la deuxième injection de darbépoétine

T3-inj = Echantillon sanguin prélevé après que le chat a reçu la troisième injection de darbépoétine

UMR BIPAR = Unité Mixte de Recherche en Biologie et Immunologie Parasitaires

W = dénomination d'un des chats d'intérêt

X = dénomination d'un des chats d'intérêt

Y = dénomination d'un des chats d'intérêt

Introduction

La darbépoétine est une érythropoïétine humaine de synthèse qui n'est pas identique à l'érythropoïétine féline. Une différence de séquence protéique pourrait être à l'origine d'un rejet par développement d'une réponse immunitaire de la part de certains sujets traités par ce médicament. Cette réponse inadaptée pourrait expliquer les nombreux échecs thérapeutiques créés par l'administration de darbépoétine humaine à des chats anémiés.

Ce traitement est préconisé pour lutter contre l'anémie des chats insuffisants rénaux. Les chats réfractaires au traitement sont ceux atteints d'une anémie persistante malgré la mise en place d'un traitement à la darbépoétine. L'objectif de cette thèse est donc de déterminer si les chats non-répondeurs au traitement présentent des anticorps antidarbépoétine qui pourraient expliquer cette absence de réponse. La présence d'anticorps anti-darbépoétine chez le chat n'a jamais été caractérisée par le passé mais elle est en effet soupçonnée chez certains chats réfractaires à un traitement à la darbépoétine.

Afin de répondre à cet objectif, nous avons mis au point d'un test ELISA dans le but d'identifier la présence des anticorps anti-darbépoétine chez des chats ayant reçu un traitement à la darbépoétine. Il est donc au cœur de la réalisation de cette thèse.

La caractérisation d'anticorps anti-darbépoétine chez des chats traités à la darbépoétine pourrait ensuite motiver la recherche de nouveaux traitements plus adaptés pour lutter contre l'anémie du chat insuffisant rénal, ou la création d'un nouveau médicament vétérinaire se rapprochant au plus près de l'érythropoïétine féline par l'industrie pharmaceutique.

Première partie : bibliographie

Pour comprendre l'intérêt de cette thèse sur la mise en évidence d'une réponse immunitaire féline faisant suite au traitement à la darbépoétine humaine, il est nécessaire d'identifier le lien entre l'anémie et le recours au traitement à la darbépoétine. Cette mise en évidence pourrait également permettre d'adapter le traitement des patients concernés.

Cette thèse s'intéresse tout particulièrement aux chats en situation de maladie rénale chronique (MRC), traités à la darbépoétine et répondant mal à ce traitement. Le rein est responsable de la synthèse de l'érythropoïétine (EPO) au sein de l'organisme. L'EPO est un facteur de croissance des érythrocytes. Ainsi, en situation de maladie rénale chronique (MRC), cette synthèse fonctionne beaucoup moins bien et laisse place à l'anémie chez les sujets concernés (Marino et al., 2014). La darbépoétine est un traitement provenant de la médecine humaine, administré aux chats anémiés atteints de MRC (Chalhoub et al., 2012). Seulement, en clinique, ce traitement semble moins efficace chez le chat qu'en médecine humaine. Une production d'anticorps anti-darbépoétine est soupçonnée comme pouvant être la cause de ces échecs thérapeutiques chez le chat.

Dans une première partie, ce lien entre anémie et maladie rénale chronique sera détaillé via la description de la fonction de l'érythropoïèse.

Dans une deuxième partie, le traitement des anémies par les érythropoïétines de synthèse sera énoncé, en accordant une importance toute particulière à l'une d'entre-elles, la darbépoétine. Puis, les causes d'échecs à ce traitement ainsi que les tests à privilégier pour envisager la détection d'anticorps anti-darbépoétine seront également rapportés.

1. L'érythropoïèse

A. La fonction de l'érythropoïèse, les acteurs en jeu

a. Définition de l'érythropoïèse

L'érythropoïèse est la formation puis la différenciation des érythrocytes (ou globules rouges (GR)) au sein de la moelle osseuse. Ces érythrocytes sont ensuite chargés du transport du dioxygène (O₂) au sein de l'organisme et de la distribution aux tissus, permettant ainsi leur viabilité (Weiss and Wardrop, 2010).

Chez l'adulte, l'érythropoïèse a lieu au sein de la moelle osseuse hématopoïétique uniquement, et plus précisément dans les os plats et à l'extrémité des os longs. Une activité hématopoïétique extra-médullaire reste cependant possible chez l'adulte, mais pas en situation physiologique chez les carnivores. Elle survient en réponse à un processus pathologique, notamment en cas d'anémie (Reyes-Gomez, 2020).

b. Déroulé de l'érythropoïèse

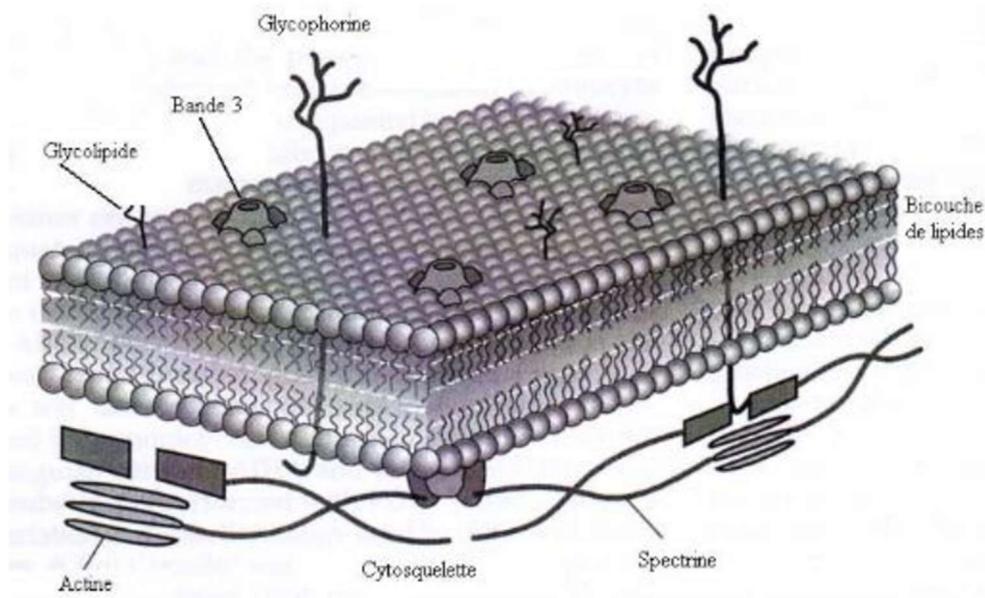
- *L'érythrocyte*

L'érythrocyte est aussi appelé hématie ou globule rouge. Sa durée de vie est de l'ordre de 120 jours chez l'homme, 100-115 jours chez le chien et 73 jours chez le chat. Il est à noter que le nombre d'érythrocytes double depuis la naissance jusqu'à l'entrée dans l'âge adulte (Weiss and Wardrop, 2010).

Il mesure environ 5,5 à 6 µm de diamètre chez le chat et est de forme biconcave. Il correspond à la maturation du réticulocyte. Il est néanmoins plus petit car plus condensé que celui-ci. Structuellement, l'érythrocyte est constitué d'une membrane érythrocytaire, qui est une sorte de membrane bicouche phospholipidique naturelle possédant une biocompatibilité intrinsèque et renfermant l'hémoglobine. On retrouve également des molécules de cholestérol non estérifié, intercalées entre les parties hydrophobes de ces phospholipides ainsi que des glycoprotéines associées à des glycolipides. Certaines de ces glycoprotéines portent des déterminants antigéniques de l'érythrocyte ou des résidus d'acides sialiques chargés négativement. En fin de vie, les érythrocytes perdent progressivement ces résidus chargés négativement, ce qui faciliterait leur phagocytose par les macrophages (Feldman et al., 2000; Harvey, 2012).

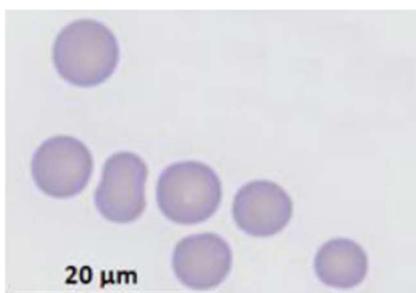
L'érythrocyte est constitué d'hémoglobine à hauteur de 92% du poids sec. Il contient également des enzymes essentielles à la protection de l'hémoglobine et de la membrane contre les phénomènes d'oxydation. Il est également constitué d'eau (à hauteur de 60%) et de divers électrolytes, à savoir le potassium, le sodium, le chlore et également de glucose (Harvey, 2012; He et al., 2021).

Figure 1 : Schéma de la membrane de l'érythrocyte et des protéines structurales associées (d'après Bernard F. Feldman et al., 2006)



Sur un frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG), les érythrocytes ressemblent à un disque biconcave lorsqu'ils sont observés de profil et à des cellules rondes comportant une pâleur centrale lorsqu'ils sont observés de face (photographie). Cependant, cette pâleur centrale est très peu visible chez le chat comparativement au chien (Cowell et al., 2006).

Figure 2 : Érythrocytes de chat après coloration de Romanowsky (d'après Weiss and Jane Wardrop, 2010)



Au sein de l'organisme, le rôle principal de l'érythrocyte est celui du transport du dioxygène depuis les capillaires alvéolaires du poumon jusque dans les tissus qui en ont besoin via le compartiment sanguin. Ainsi, la quantité d'O₂ transportée dans le sang dépend à la fois de la quantité d'hémoglobine stockée dans les hématies, mais également de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et de la pression partielle en oxygène (pO₂).

L'érythrocyte étant une cellule anucléée chez les mammifères, elle est incapable de réaliser la synthèse protéique et n'est pas dotée de mitochondries. Ainsi, la synthèse d'ATP via le cycle de Krebs ou par bêta-oxydation des lipides est rendue impossible, de même que la synthèse de l'hème. En outre, les fonctions de l'érythrocyte ont néanmoins besoin d'ATP pour être réalisées. Il est donc important pour l'érythrocyte de pouvoir recourir à la glycolyse pour former l'ATP. Le passage du glucose dans l'érythrocyte n'est d'ailleurs pas dépendant de l'insuline comme c'est le cas pour bon nombre de cellules, il s'effectue par diffusion passive (Weiss and Wardrop, 2010).

Le deuxième rôle de l'érythrocyte au sein de l'organisme est la régulation du pH sanguin via le transport de CO₂ grâce à l'anhydrase carbonique, une enzyme présente à la surface des érythrocytes transformant les bicarbonates en dioxyde de carbone ou l'inverse, selon les besoins de l'organisme et la valeur du pH sanguin à l'instant T (Teng et al., 2009).

- *Moelle osseuse, structure et environnement*

La moelle osseuse est un organe dynamique capable de se remodeler en fonction de signaux nutritionnels ou hormonaux pour répondre aux besoins de l'organisme en termes de production d'érythrocytes, de cellules lymphoïdes et de plaquettes. Elle est constituée d'ostéoblastes et ostéoclastes intervenant dans le remodelage du tissu osseux via l'émission de cytokines.

Les cellules hématopoïétiques pourraient également jouer un rôle dans ce remodelage, via la production de cytokines.

Le micro-environnement des cellules souches hématopoïétiques (HSC) est nécessaire à leur survie et un vrai support fonctionnel. Cet environnement est constitué de cellules stromales disposées au sein de niches innervées et vascularisées (Weiss and Wardrop, 2010).

Les cellules stromales sont des cellules de soutien qui communiquent avec les précurseurs hématopoïétiques par contact direct, de cellule à cellule. Ces cellules sont probablement des dérivés hématopoïétiques de la moelle osseuse (Weiss and Wardrop, 2010).

Les cellules hématopoïétiques ne sont pas toutes situées au même endroit au niveau de la moelle osseuse. Elles possèdent deux niches de localisation, à savoir la niche ostéoblastique et la niche périvasculaire. La niche ostéoblastique engendre la quiescence des HSC tandis que la niche périvasculaire favorise la redirection des HSC dans la circulation (Weiss and Wardrop, 2010).

La niche ostéoblastique est située sur la bordure externe de la moelle osseuse et est constituée de cellules mésenchymateuses, de fibroblastes, d'ostéoblastes, de macrophages et d'adipocytes tandis que la niche périvasculaire est adjacente à la moelle osseuse et est constituée de cellules endothéliales et mésenchymateuses (Zhao et al., 2021). Les érythrocytes (tout comme les mégacaryocytes) se situent près des sinus veineux, alors que les lymphocytes, granulocytes et macrophages se concentrent près des artérioles et des endothéliums (Naito et al., 1992).

Figure 3 : Coupe histologique du micro-environnement de la moelle osseuse hématopoïétique à fort grossissement (modifiée d'après Weiss and Jane Wardrop, 2010)



L'érythropoïèse a lieu au niveau des îlots érythroblastiques (figure 5). Il s'agit de structures formées par un macrophage central entouré de cellules de précurseurs des érythrocytes disposées de manière concentrique. Ces précurseurs sont de plus en plus matures du centre vers la périphérie (Harvey, 2012).

c. L'érythropoïétine

L'érythropoïétine (EPO) est un des acteurs principaux de l'érythropoïèse car il est le facteur de croissance principal de la lignée érythroïde (Rieu, 2009). L'EPO donne un signal de survie et de prolifération aux précurseurs érythroïdes.

- **Sa structure**

L'érythropoïétine est une protéine de 30 kDa très glycosylée. Il s'agit d'un polypeptide composé initialement de 193 acides aminés. Celui-ci est ensuite clivé post-traduction, correspondant à la forme mature de l'EPO (Tsiftoglou, 2021). L'EPO mature est constituée à 60% d'une chaîne polypeptidique de 166 acides aminés contenant deux ponts disulfure.

Les 40% restants contiennent des carbohydrates. Sa structure tridimensionnelle comporte quatre hélices (Tsiftoglou, 2021).

Sa structure a pu être mise en évidence par spectroscopie par résonance magnétique et cristallographie aux rayons X. Il s'agit d'une molécule allongée constituée de quatre hélices typiques d'un facteur de croissance hématopoïétique. Les carbones hydratés sont présents à un pôle de la molécule distend du site de liaison au récepteur à l'EPO-R. Les carbones hydratés ont une structure moléculaire étendue flexible et couvrent donc probablement une grande partie de la molécule (Egrie and Browne, 2002).

- *Ses récepteurs*
 - Structure et localisation

Le récepteur principal de l'érythropoïétine EPO-R est un homodimère transmembranaire de type JAK-STAT Kinase. Il est constitué de deux sous-unités et exprimé à la surface de certains progéniteurs érythroïdes mais pas à celle des réticulocytes ni des érythrocytes (Rieu, 2009; Tsiftoglou, 2021).

Un autre récepteur à l'EPO est également présent à la surface d'autres cellules, non hématopoïétiques, de l'organisme : foie, rein, cerveau, rétine, cœur et vaisseaux (Rieu, 2009; Tsiftoglou, 2021). Ce récepteur est cette fois-ci un complexe hétérodimérique.

Ce complexe constitué d'une chaîne d'EPO-R et d'une chaîne β du récepteur ubiquitaire du facteur CD131. Ce récepteur hétérodimérique est dénommé récepteur de protection tissulaire de l'EPO (TPR) (Tsiftoglou, 2021).

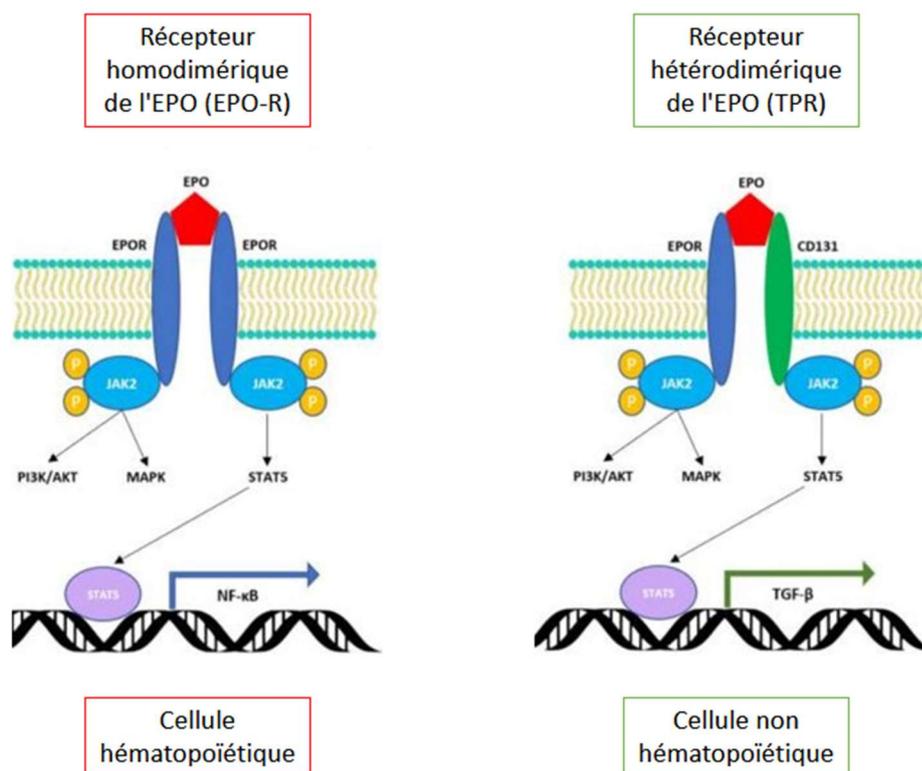
- Transmission du signal

En se liant à son récepteur homodimérique EPO-R, l'EPO déclenche la dimérisation de celui-ci, ce qui provoque une cascade de phosphorylations aboutissant des cascades biochimiques mettant en jeu notamment les facteurs PI3K, MARK, STAT5 puis à la transcription de certains gènes inhibiteurs de l'apoptose (Rieu, 2009). Ce signal a pour conséquence de stimuler l'érythropoïèse en activant les principaux facteurs de transcription érythroïdes (GATA-1 et TAL-1). Les progéniteurs érythroïdes comportent environ 1000 récepteurs homodimériques à l'EPO sur leur surface (Tsiftoglou, 2021).

Contrairement à ce qui a été décrit précédemment pour l'EPO-R, l'interaction de l'EPO avec le TPR ne déclenche pas l'érythropoïèse. En effet, ces dernières confèrent néanmoins à la cellule une capacité de protection contre l'apoptose, la dégénérescence et la cytotoxicité. Ainsi, l'interaction de l'EPO avec son récepteur hétérodimérique déclenche des cascades biochimiques similaires à celles intervenant pour la transmission du signal via l'EPO-R (Tsiftoglou, 2021).

Les deux types de récepteurs EPO-R et TPR sont illustrés comparativement ci-dessous via un schéma (modifié d'après Tsiftoglou, 2021).

Figure 4 : Illustration de la fixation de l'EPO à ses récepteurs homodimérique (EPO-R) et hétérodimérique (TPR) et de la transmission du signal associé (d'après Tsiftoglou, 2021)



La liaison de l'EPO avec le TPR agit sur divers types de cellules, mais à des concentrations relativement plus élevées que celles intervenant dans la stimulation de l'érythropoïèse (Tsiftoglou, 2021).

- *Métabolisme de l'EPO*

□ Synthèse

L'EPO endogène est produite par le rein essentiellement, à hauteur de 90% par des cellules fibroblastiques spécialisées situées au voisinage des tubules rénaux nommées péricytes (Rieu, 2009; Shih et al., 2018). Ces cellules interstitielles péri-tubulaires sont présentes au niveau du cortex interne et de la médulla externe du rein (Chalhoub et al., 2012). Cependant, d'autres tissus peuvent également remplir cette fonction comme le foie, la rate, le poumon ou encore le tissu cérébral. Les taux sanguins normaux d'EPO sont de 10 à 30 UI/L et sa demi-vie est de 4 à 11h en fonction des espèces (Rieu, 2009).

□ Métabolisme

L'élimination de l'EPO repose principalement sur son métabolisme médullaire mais aussi, plus secondairement, hépatique ou rénal (Rieu, 2009).

La majeure partie de l'EPO est dégradée au sein de la moelle osseuse. L'EPO, alors encore attachée à son récepteur, est partiellement dégradée avec celui-ci par la voie du protéasome, une voie classique de dégradation des protéines. Cependant, une partie de l'EPO est recyclée à ce stade et regagne la circulation. Le reste des résidus est ensuite internalisé dans une vésicule d'endocytose, dégradé par les lysosomes. (Rieu, 2009).

Dans une moindre mesure, l'EPO peut également être déglycosylée par des glycosidases puis partiellement dégradée par des protéinases dans la circulation sanguine. A ce stade, une première partie de l'EPO est captée et dégradée par les hépatocytes, et une seconde partie passe par la filtration glomérulaire, est réabsorbée et dégradée par les cellules du tube rénal proximal. Lors d'insuffisance rénale, ce mécanisme finit par ne plus fonctionner, réduisant le catabolisme rénal de l'EPO (Rieu, 2009).

De façon assez paradoxale, la faible affinité pour l'EPO-R de certains agents stimulant l'érythropoïèse (*Erythropoiesis Stimulating Agents*, ESA) leur confère une durée d'action plus longue car la constante d'affinité de l'EPO à l'EPO-R est plus faible et la molécule est donc moins catabolisée par voie médullaire (Rieu, 2009).

□ Régulation du métabolisme

La production d'EPO est inversement liée à la disponibilité de l'oxygène au sein de l'organisme (Eckardt and Kurtz, 2005).

Dans le rein, c'est le débit de filtration glomérulaire (DFG) qui détermine la consommation de dioxygène. C'est l'inverse de ce qui est observé dans les autres organes où le débit sanguin est ajusté aux besoins tissulaires en oxygène. Dans le rein, les cellules fibroblastiques productrices d'EPO sont sensibles à la pression partielle en dioxygène (pO_2) dans les capillaires péri-tubulaires. Sachant que la consommation de dioxygène du tubule contourné proximal (TCP) est constante, lorsque la pression partielle résiduelle de dioxygène diminue pour cause d'anémie ou d'hypoxie, les cellules fibroblastiques le détectent et la synthèse d'EPO augmente (Tsiftoglou, 2021).

A l'inverse, lors d'insuffisance rénale, la consommation de dioxygène par les cellules du TCP diminue car le DFG diminue également. Il en résulte une augmentation de la pO_2 dans les capillaires péri-tubulaires et donc une baisse de la production d'EPO. (Rieu, 2009).

Le facteur induit par l'hypoxie (*Hypoxia Inducible Factor*, HIF) lié à sa sous unité α , HIF1- α , se lie alors à la sous-unité β cytoplasmique formant un complexe HIF1- $\alpha\beta$ capable de franchir la membrane nucléaire des cellules fibroblastiques spécialisées dans la synthèse de l'EPO (Semenza, 2012; Tsiftoglou, 2021). Une fois dans le noyau, ce complexe agit comme facteur de transcription de gènes impliqués dans la synthèse de l'EPO en se liant à un élément de réponse à l'hypoxie dans le promoteur du gène de l'EPO (Tsiftoglou, 2021).

A l'inverse, lors d'une augmentation de la biodisponibilité en dioxygène, les sous-unité α du facteur HIF1 sont hydroxylées par les PHD, adressant directement ce facteur dans la voie de dégradation du protéasome et proscrivant ainsi la synthèse de l'EPO par les cellules interstitielles péri-tubulaires (CIP) du rein ((Eckardt and Kurtz, 2005; Tsiftoglou, 2021). Au niveau moléculaire, les enzymes prolyl hydroxylases (PHD) régulent étroitement la disponibilité de la sous-unité HIF- α en fonction de la disponibilité du dioxygène et du fer en entraînant ou non sa dégradation. Ainsi, un état d'hypoxie inhibe l'action des enzymes PHD qui n'entament pas la dégradation du facteur HIF1- α (Zheng et al., 2020). HIF est en réalité composé de deux sous-unités, appelées α et β . Il existe deux types de sous-unités α , nommées HIF-1 α et HIF-2 α , ainsi qu'une seule sous-unité β , appelée HIF-1 β . En situation d'hypoxie, une sous-unité α de HIF s'associe avec HIF-1 β (Zheng et al., 2020).

Une piste de recherche visant à favoriser la synthèse d'EPO est d'ailleurs de bloquer la dégradation de la protéine HIF1- α par le protéasome pour favoriser la synthèse d'EPO, notamment par des inhibiteurs de prolyl hydroxylase (IPH).

Ce schéma physiologique est cependant à nuancer car selon certains auteurs, la réalité serait beaucoup plus complexe que cela, et le degré et la durée de l'hypoxie entraîneraient des effets biologiques différents et souvent opposés (Del Vecchio and Minutolo, 2021). Ce système de régulation par le facteur HIF régule l'expression de gènes impliqués dans l'érythropoïèse mais également dans le métabolisme du fer, l'angiogenèse, le métabolisme des lipides et du glucose, la glycolyse, la fonction mitochondriale, l'inflammation et l'immunité, la croissance et la survie cellulaire, la vasodilatation et la migration cellulaire (Del Vecchio and Minutolo, 2021; Semenza, 2012).

La régulation de la production de l'EPO est également réalisée via les taux circulants d'EPO en eux-mêmes. En effet, une augmentation du produit final de l'EPO entraîne une inhibition de transcription des gènes de l'EPO via le blocage des interactions de HIF1- α avec les protéines co-activatrices (Tsiftoglou, 2021).

De même, la régulation de la production de l'EPO-R, soit indirectement de l'effet de l'EPO, est fonction des concentrations en progéniteurs érythroïdes. Ainsi, au fur et à mesure que la différenciation érythroïde s'achève, la transcription du gène EPO-R est régulée à la baisse (Tsiftoglou, 2021).

- *Effet de l'EPO*
- Action érythropoïétique

Le facteur principal de la régulation de l'érythropoïèse est l'érythropoïétine (Chalhoub et al., 2012).

Très majoritairement synthétisée par le rein, l'EPO est ensuite véhiculée par le sang jusqu'aux cellules cibles et se lie à son récepteur l'EPO-R. À la suite de leur stimulation, ces récepteurs activent des voies permettant la prolifération, la différenciation ainsi que la survie cellulaire (Harvey, 2012; Sebahoun, 2005).

Lorsque de l'EPO est relarguée en quantités importantes dans l'organisme, le temps de transit des précurseurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse est réduit et favorise alors la libération précoce et en quantité plus importante de réticulocytes dans la circulation sanguine (Harvey, 2012).

Par ailleurs, l'EPO agit également au niveau du métabolisme du fer. En effet, elle induit la biosynthèse de l'hème dans les mitochondries et active le transport du fer médié par la transferrine au niveau des progéniteurs érythroïdes (Tsiftoglou, 2021).

□ Action non érythropoïétique

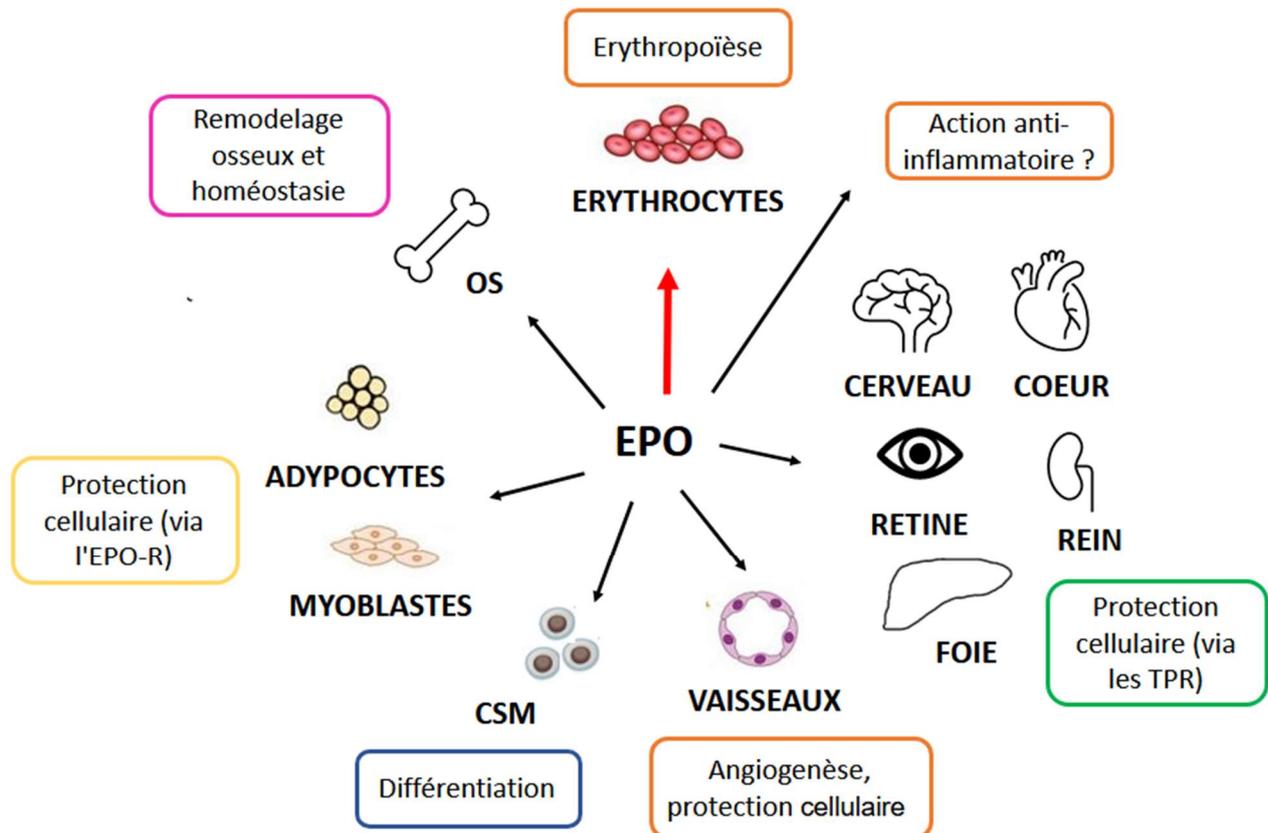
Comme décrit précédemment, l'érythropoïétine joue également rôle de protection cellulaire contre l'apoptose, la dégénérescence et la cytotoxicité sur des cellules non hématopoïétiques via son récepteur TPR. Les organes équipés de ces récepteurs sont pour rappel le foie, le rein, le cerveau, la rétine, le cœur et les vaisseaux (Tsiftoglou, 2021).

Elle intervient également dans le remodelage osseux. En effet, l'EPO-R est exprimé à la surface des ostéoblastes et des ostéoclastes et des expériences *in vivo* et *in vitro* ont démontré que l'EPO était impliquée dans le remodelage osseux et régulation de l'homéostasie osseuse (Tsiftoglou, 2021).

Des études récentes tendent à montrer que l'EPO induirait une différenciation angiogénique des cellules endothéliales ainsi que des cellules souches mésenchymateuses (Suresh et al., 2019).

D'autres auteurs suggèrent également que l'EPO aurait des propriétés anti-inflammatoires. En effet, des expériences ont été menées sur des rats chez qui des lésions rénales d'ischémie ont été induites. Les rats chez lesquels de l'EPO a été administrée, avaient une fonction et une structure rénales significativement préservée par rapport aux rats n'ayant pas reçu l'EPO. La présence de neutrophiles dans les cellules tubulo-interstitielles rénales, la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, ainsi que l'activation et la translocation nucléaire de NF-κB étaient réduites par rapport aux rats n'ayant pas reçu l'EPO (Hu et al., 2012).

Figure 5 : Schéma des effets pléiotropes de l'EPO (modifié d'après Hu et al., 2012; Suresh et al., 2019; Tsiftoglou, 2021)



Sur le schéma ci-dessus, l'action érythropoïétique est représentée de manière distincte des autres par une flèche rouge car il s'agit du rôle principal de l'EPO et de celui ayant l'intérêt le plus important au sein de cette thèse. Les autres actions de l'EPO sont représentées par des flèches noires.

d. Régulation de l'érythropoïèse non due à l'érythropoïétine

Comme vu précédemment, bien que le facteur principal de la régulation de l'érythropoïèse soit l'érythropoïétine, il existe d'autres acteurs de cette régulation, bien que minoritaires.

□ Autres facteurs de stimulation de l'érythropoïèse

Les différents facteurs autres que l'érythropoïétine participant à stimuler l'érythropoïèse sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Différents facteurs de l'érythropoïèse (Suresh et al., 2019; Tsiftoglou, 2021)

FACTEUR	ACTION SUR L'ERYTHROPOÏESE
TROMBOPOÏÉTINE (TPO)	Stimule principalement la thrombopoïèse et la prolifération et la survie des progéniteurs érythrocytaires, en synergie avec l'EPO
INTERLEUKINE 3 (IL-3)	Stimule la prolifération et le renouvellement cellulaire des HSC, la prolifération et des progéniteurs érythrocytaires et potentialise l'action de l'EPO
INTERLEUKINE 9 (IL-9)	Stimule la prolifération des progéniteurs érythrocytaires
INTERLEUKINE 11 (IL-11)	Stimule la prolifération et la maturation progéniteurs érythrocytaires
ANDROGENE	Stimulent la prolifération des progéniteurs érythrocytaires
GLUCOCORTICOÏDES	Stimulent la prolifération des progéniteurs érythrocytaires Inhibent la différenciation des progéniteurs érythrocytaires
HORMONE DE CROISSANCE	Stimule la croissance des progéniteurs érythrocytaires
INSULINE ET INSULINE-LIKE-GROWTH-FACTOR 1 (IGF1)	Stimulent la croissance et la différenciation des cellules érythroïdes. L'IGF-1 inhibe l'apoptose des progéniteurs érythrocytaires, et il stimule la maturation des précurseurs érythrocytaires
HORMONE TYROÏDIENNE T3	La triiodothyronine (T3) stimule la différenciation et la maturation des précurseurs érythrocytaires et la synthèse d'EPO par le rein
STEM CELL FACTOR (SCF)	Stimule la survie des HSC, la différenciation cellulaire lors des stades précoces de l'érythropoïèse, en synergie avec l'IL-3 et le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony stimulating factor) et potentialise l'action de l'EPO

□ Facteurs d'inhibition de l'érythropoïèse

Il s'agit principalement des facteurs TNF- α , TGF- β , de l'interleukine 1 (IL-1) et de certains interférons (IFN- α ; IFN- β ; IFN- γ). Ces derniers sont capables de favoriser l'apoptose de certains précurseurs érythrocytaires, d'inhiber la prolifération et la différenciation des précurseurs mais également la synthèse d'EPO pour certains d'entre eux, à savoir les IFN- α et IFN- γ ainsi que l'IL-1 (McCown and Specht, 2011; Weiss and Wardrop, 2010).

B. L'anémie engendrée par défaut d'EPO

a. Définition de l'anémie

Biologiquement, l'anémie correspond au fait d'avoir une concentration sanguine en hémoglobine ou en érythrocytes inférieure à la norme physiologique pour l'espèce, ne permettant pas à l'individu de couvrir les besoins de ses tissus et organes en oxygène (Chaparro and Suchdev, 2019).

- *Diagnostic de l'anémie*

Une situation d'anémie peut être caractérisée de différentes manières comme la concentration sanguine en hémoglobine, via l'hématocrite (Ht), la concentration en GR ou en réticulocytes. En recherche, la méthode la plus utilisée pour caractériser l'anémie est celle de la comparaison du taux d'hémoglobine sanguine à la norme de l'espèce (Chaparro and Suchdev, 2019). Chez le chien, une hémoglobinémie inférieure à 12 g/dL traduit une anémie tandis qu'elle est atteinte lors d'une hémoglobinémie inférieure à 8 g/dL chez le chat (Weiss and Wardrop, 2010).

Cependant, en médecine vétérinaire, on mesure classiquement le degré de l'anémie via la valeur de l'hématocrite, préférentiellement à la mesure de l'hémoglobinémie. L'hématocrite correspond au pourcentage de volume sanguin occupé par les érythrocytes (Bellier S. et Cordonnier N., 2010).

Les valeurs de l'hématocrite correspondant à divers degrés de l'anémie chez le chat et le chien sont précisées dans le tableau ci-dessous (d'après Bellier S. et Cordonnier N., 2010).

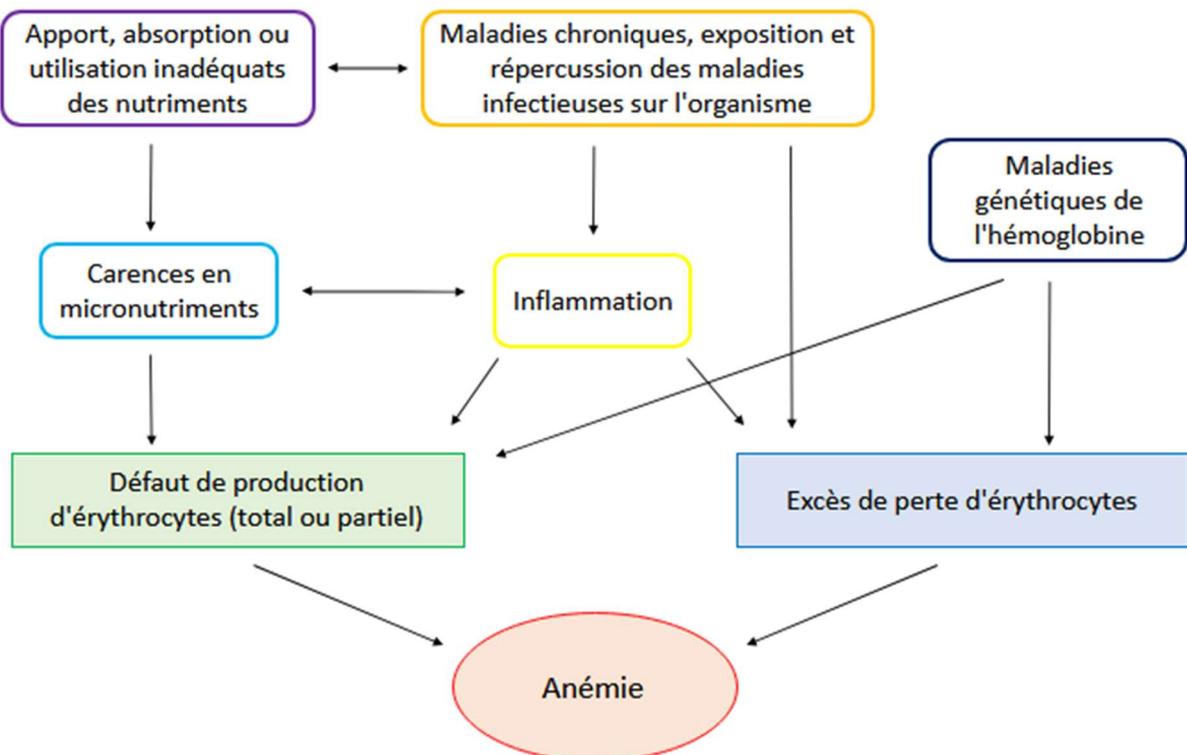
Tableau 2 : Classification des anémies en fonction de la valeur de l'hématocrite (d'après Bellier S. et Cordonnier N., 2010)

Degré de l'anémie	Valeur de l'hématocrite (en %)	
	Chat	Chien
Légère	20-26	30-37
Modérée	14-19	20-29
Grave	10-13	13-19
Très grave	<10	<13

- *Causes de l'anémie*

Chez les carnivores domestiques comme chez l'homme, l'anémie comporte plusieurs causes, pouvant éventuellement s'additionner, ce qui fait du diagnostic étiologique de l'anémie un réel défi pour le praticien dans certains cas.

Figure 6 : Principales causes de l'anémie, schéma modifié (d'après Chaparro and Suchdev, 2019)



Comme le montre la figure ci-dessus, les principales causes d'anémie sont un défaut d'apport de nutriments nécessaires à la croissance des érythrocytes et l'augmentation du catabolisme des érythrocytes via des phénomènes inflammatoires, infectieux, l'existence de maladie chronique. Des causes génétiques peuvent également être impliquées dans le développement d'une anémie par défaut de production ou excès de catabolisme d'érythrocytes (Chaparro and Suchdev, 2019).

Une des causes principales d'anémie en médecine humaine est la carence en fer (environ 50% des causes). Le fer est un constituant essentiel de l'hémoglobine et des érythrocytes matures. Une carence en fer peut provoquer une anémie réfractaire au traitement aux agents stimulant l'érythropoïèse (ESAs) (cf. infra). D'autres carences peuvent cependant intervenir comme la carence en vitamines A, B9 (folates), B12 (cobalamines) ou rarement en vitamines B6 (riboflavine). De même, les cancers peuvent être à l'origine d'anémie réfractaire à un traitement par les ESAs (Chaparro and Suchdev, 2019).

L'anémie est présente dans 35 à 60% des cas chez les chats atteints de Maladie Rénale Chronique (MRC) (Chalhoub et al., 2012). Cette situation nous intéresse tout particulièrement ici car nous étudions la réaction des chats à un médicament classiquement utilisé pour lutter contre l'anémie ayant pour origine une MRC. Il s'agit donc de la situation qui sera développée par la suite au sein de cette thèse.

- *Carence en fer, effets indésirables et régulations*

Les mobilisations du fer dans l'organisme sont régulées par son absorption intestinale, le recyclage des érythrocytes et le stockage hépatique. L'absorption intestinale varie en fonction du taux de fer ingéré, avec une résistance des entérocytes après une forte dose de fer, tandis que l'hypoxie et l'érythropoïèse augmentent cette absorption et l'inflammation provoque sa rétention. L'excrétion du fer, en revanche, n'est pas régulée (Camaschella and Girelli, 2020; McCown and Specht, 2011).

La carence en fer touche plus d'un milliard de personnes et peut être absolue ou relative. La carence absolue résulte d'un apport insuffisant, d'une absorption réduite ou de pertes excessives de fer, souvent diagnostiquée par un faible taux de ferritine. La carence relative est due à une inflammation qui augmente la synthèse d'hepcidine, entraînant la séquestration du fer et des taux de ferritine élevés, rendant le diagnostic et le traitement plus complexes (Camaschella and Girelli, 2020; McCown and Specht, 2011)

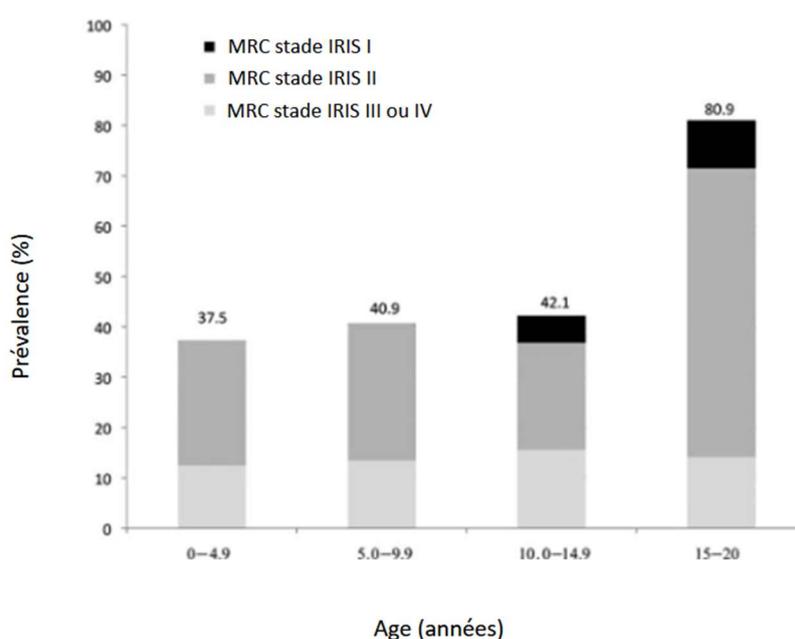
b. L'anémie lors de MRC, une anémie éligible au traitement à la darbépoétine chez le chat

Classiquement, la darbépoétine est majoritairement utilisée lors d'anémie liée à une maladie rénale chronique féline.

- *La maladie rénale chronique*
 - Historique

La maladie rénale chronique (MRC) est la maladie métabolique touchant le plus fréquemment les chats âgés de plus de 12 ans (Lund et al., 1999). Les chats gériatriques en seraient affectés à hauteur de 35% (Bartges, 2012; Batchelor et al., 2020) à 81% (Marino et al., 2014) selon les références. L'espèce féline est très souvent affectée par cette maladie, ce qui est moins le cas pour l'espèce canine. Il s'agit d'une affection fréquente qui constitue une cause majeure de mortalité chez les chats gériatriques principalement. La maladie commence à se manifester cliniquement chez l'individu lorsque, au minimum, les deux tiers voire les trois quarts de la fonction rénale sont perdus. Il s'agit d'une perte définitive, irréversible (Brown et al., 2016). L'origine de cette maladie est le plus souvent inconnue, probablement multifactorielle. Les lésions histopathologiques le plus souvent retrouvées sont une inflammation interstitielle, une atrophie tubulaire, de la fibrose avec une glomérulosclérose secondaire (Brown et al., 2016).

Figure 7 : Graphique de la prévalence de la MRC et du stade IRIS associé dans l'espèce féline en fonction de l'âge (Marino et al., 2014)



□ Physiopathologie

Comme énoncé précédemment, la plupart du temps, on ne connaît pas réellement l'origine de la maladie rénale chronique. Plusieurs facteurs peuvent initier la maladie rénale chronique comme la coexistence d'une autre maladie chronique, l'âge, l'ischémie, ou encore des facteurs environnementaux. De plus, bien souvent, cette origine est multifactorielle (Brown et al., 2016).

Lors de la phase d'initiation de la maladie, les mécanismes primaires dépendent de la ou des affection(s) en cause (Brown et al., 2016) mais dans tous les cas, les lésions associées à la MRC aboutiront à la mise en place d'un déroulé d'étape successives aboutissant au dernier stade à la fibrose rénale terminale. Ainsi, l'analyse histopathologique tardive des lésions rénales sera peu informative sur la cause, contrairement à une analyse plus précoce (Fontaine et al., 2019).

Il ne faut pas confondre maladie rénale chronique (MRC) et insuffisance rénale chronique (IRC). En effet, L'IRC est définie par la diminution irréversible du DFG résultant d'une néphropathie ou d'une MRC. L'IRC est en somme la conséquence d'une réduction du nombre de néphrons fonctionnels total, c'est à dire une diminution globale du nombre de néphrons fonctionnels concernant classiquement les deux reins lors de MRC (Brown et al., 2016).

Au premier stade de la classification IRIS (voir infra), l'animal n'est pas encore symptomatique, sa créatinémie n'est pas augmentée. En revanche une MRC est bien d'ores et déjà présente. Ainsi, une IRC ne peut pas exister sans MRC mais l'inverse n'est pas vrai car une MRC dans les stades précoces, peut être présente sans azotémie (Polzin, 2013).

La physiopathologie de la MRC débute initialement par la survenue de lésions du parenchyme rénal dépendant de l'affection initiale (soit de l'origine de la maladie) entraînant alors une destruction des néphrons. Cette destruction conduit à une diminution du DFG. Un travail supplémentaire pour l'élaboration de l'urine par les néphrons sains est alors créé par cette perte de néphrons fonctionnels. Ce phénomène d'adaptation entraîne donc une hypertrophie des néphrons sains mais il est cependant rapidement délétère, initiant également une destruction précoce de ces néphrons hypertrophiés par apparition de fibrose (Brown et al., 2016).

En effet, le système rénine/angiotensine/aldostérone est un des acteurs clefs de ces mécanismes adaptatifs dont le rôle est de permettre l'augmentation de la pression intraglomérulaire via une vasoconstriction de l'artériole efférente. Cependant, ce système induit également la synthèse de facteurs profibrosants (comme le TGF β) délétères pour le rein. Ainsi, quel que soit la lésion rénale primitive, une glomérulosclérose apparaîtra en lien avec ces mécanismes adaptatifs compensatoires. De plus, l'augmentation de pression intraglomérulaire induit une protéinurie qui est également responsable d'une aggravation des lésions rénales déjà présentes (Bartges, 2012; Polzin, 2013).

La destruction des néphrons sains hypertrophiés de manière compensatoire entraîne une accentuation de la diminution du débit de filtration glomérulaire ainsi qu'une incapacité des reins à remplir leur fonction excrétrice et leur fonction endocrine. C'est seulement à ce stade de la maladie que l'on peut caractériser l'insuffisance rénale via l'élévation des marqueurs biologiques tels que la créatinine ou l'urée, la Diméthylarginine Symétrique (SDMA), ou encore une diminution de la densité urinaire. C'est également à ce moment que les signes cliniques apparaissent (Polzin, 2013 ; Brown et al., 2016).

Pour résumer, l'organisme met en place des moyens de compensation à terme délétères et encourageant la progression de la maladie rénale chronique. Les néphrons deviennent progressivement non fonctionnels au fur et à mesure que la maladie progresse. Les lésions primaires ne sont alors plus identifiables histologiquement, car irrémédiablement remplacées par une fibrose rénale terminale (Fontaine et al., 2019).

□ Principales causes primaires de maladie rénale chronique chez le chat

Une étude portant sur l'autopsie de 74 chats suivis pour MRC (voir tableau ci-dessous ; Polzin, 2013 ; Brown et al., 2016) a montré que la première cause de MRC chez le chat était une néphropathie tubulo-interstitielle idiopathique soit d'origine inconnue. Il s'agit d'une affection dégénérative et pas moins de 52% des chats de l'étude en étaient atteints. Le lymphome rénal bilatéral est également une cause fréquente de MRC (16% dans l'étude). Concernant les lésions glomérulaires, également fréquentes (17,5% des chats de l'étude), on retrouve l'amyloïdose (maladie génétique conduisant à des dépôts de protéines amorphes au niveau des glomérules rénaux notamment chez les chats de race Abyssin) et les glomérulonéphrites (via l'action d'immuns complexes). Les pyélonéphrites chroniques (9,5% des chats de l'étude) sont également une cause de MRC et surviennent classiquement lorsqu'une autre affection rénale est présente (des calculs rénaux par exemple). On peut également évoquer d'autres causes plus rarement rencontrées (chez moins de 3% des chats de l'étude) telles que la polykystose rénale (maladie génétique fréquemment rencontrée chez le Persan) ou une néphrite granulomateuse due au virus de la péritonite infectieuse féline (dans sa forme sèche) (Polzin, 2013 ; Brown et al., 2016).

Tableau 3 : Principales étiologies de maladie rénale chronique chez le chat (d'après Polzin, 2013 ; Brown et al., 2016)

ETIOLOGIE	POURCENTAGE DE CHATS (%)
Néphropathie tubulo-interstitielle idiopathique	52
Lymphome rénal bilatéral	16
Lésion glomérulaire (amyloïdose, glomérulonéphrite)	17,5
Pyélonéphrite chronique	9,5
Polykystose rénale	2
Néphrite granulomateuse (pif)	1
Autres causes	2

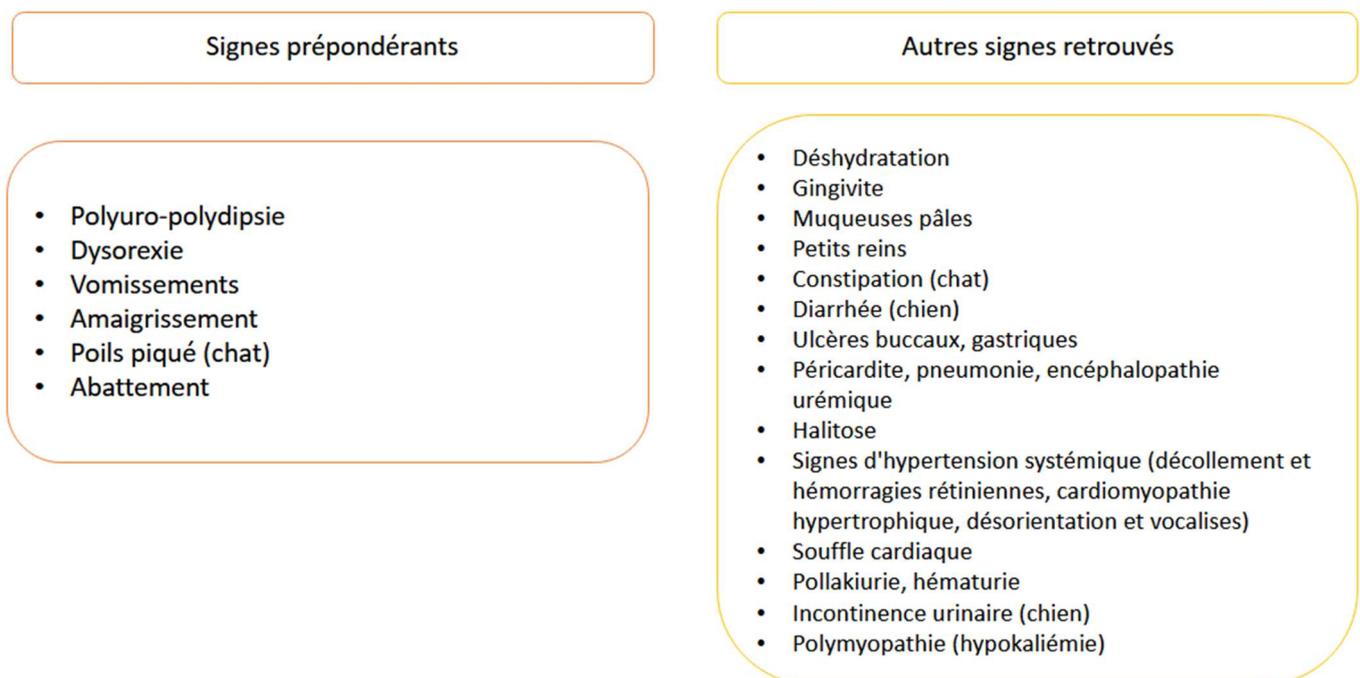
□ Diagnostic, stades IRIS et pronostic

Les tests sanguins de routine pour détecter l'insuffisance rénale incluent les dosages de l'urée et de la créatinine, cette dernière étant plus précise pour évaluer la fonction rénale. Cependant, la créatinine peut être faussement basse en cas de perte musculaire, nécessitant l'utilisation de la SDMA, qui n'est pas influencée par la masse musculaire et permet une détection plus précoce des MRC (Marino et al., 2014; Polzin, 2013).

La SDMA peut détecter une diminution de 40% du DFG contre 75% pour la créatinine, ce qui est particulièrement utile dans les stades précoces de la MRC. Le dosage de la SDMA est recommandé par l'International Renal Interest Society (IRIS) pour évaluer la fonction rénale, notamment chez les animaux amyotrophiés ou âgés (International Renal Interest Society, 2023; Polzin, 2013).

L'IRIS classe les MRC en quatre stades en fonction des paramètres cliniques et biologiques. Le stade I correspond à une néphropathie compensée sans symptômes, détectable par une baisse du DFG ou de la concentration urinaire. Le stade II se caractérise par une réduction de la capacité de concentration urinaire sans signes cliniques. Les signes cliniques apparaissent au stade III, avec une azotémie permanente, indiquant que les deux tiers des néphrons sont non fonctionnels. Le stade IV est le plus sévère. Le suivi simultané de la créatinine sérique, de la SDMA, de la pression sanguine artérielle et de la protéinurie est recommandé pour déterminer le stade de la MRC et guider le traitement (Polzin, 2013).

Figure 8 : Anamnèse et signes cliniques évocateurs de MRC (d'après Polzin, 2013)



Le stade IV de la maladie rénale chronique (MRC) correspond au stade terminal, nécessitant des perfusions régulières pour la survie de l'animal. Chaque stade IRIS est subdivisé en sous-stades basés sur le rapport protéines urinaires/créatinine urinaire (PU/CU) et la pression artérielle systémique (PAS) (International Renal Interest Society, 2023). Des valeurs élevées de ces paramètres indiquent une progression vers un stade supérieur. Pour éviter un surdiagnostic de la MRC, il est crucial de distinguer la MRC d'une insuffisance rénale aiguë (IRA). Le diagnostic et la classification IRIS nécessitent deux mesures de créatininémie et de SDMA à plusieurs semaines d'intervalle, prises lorsque l'animal est stable. La PAS doit être mesurée par Doppler, répétée, et confirmée par un examen ophtalmologique si nécessaire. Les patients doivent être hydratés et nourris adéquatement avant l'analyse pour garantir la précision du diagnostic (Polzin, 2013).

Tableau 4 : Classification IRIS des stades et sous-stades de la MRC chez le chat (d'après International Renal Interest Society, 2023)

	Stade 1 Pas d'azotémie	Stade 2 Discrète azotémie	Stade 3 Azotémie modérée	Stade 4 Azotémie sévère
Créatinine (mg/L)	< 16 (< 140 µmol/L)	16-28 (140-250 µmol/L)	29-50 (251-440 µmol/L)	> 50 (> 440 µmol/L)
SDMA (µg/dL)	< 18	18-25	26-38	> 38
RP/CU (Ø)	Absence de Protéinurie < 0,2		Protéinurie douteuse 0,2-0,4	Protéinurie > 0,4
PAS (mmHg)	Tension normale < 140	Préhypertension 140-159	Hypertension 160-179	Hypertension sévère > 180

Le rapport protéines urinaires/créatinine urinaire (RP/CU) et la pression artérielle systolique définissent les sous-stades et sont indépendants des stades de la MRC. Une baisse de concentration urinaire (en dessous de 1,035 chez le chat et 1,030 chez le chien) est observable dès les stades 2 ou 3, souvent avant les signes cliniques, et s'aggrave avec la maladie. Cependant, cette baisse ne détermine pas les stades ou sous-stades et ne doit pas être utilisée seule pour diagnostiquer la MRC (International Renal Interest Society, 2023; Polzin, 2013).

□ L'anémie, une complication fréquente de la maladie rénale chronique

Au sein de cette thèse, Il s'agit de l'une des complications de la MRC qui nous intéresse le plus chez le chat. C'est donc de cette complication qui sera particulièrement détaillée dans ce manuscrit.

La majorité des chats souffrant de MRC sont anémiés (Batchelor et al., 2020). Certains auteurs donnent une large fourchette allant de 30 à 65% de chats anémiés parmi ceux souffrant de MRC (Chalhoub et al., 2011). Par ailleurs, lors de MRC, le diagnostic d'anémie peut être sous-évalué. En effet, le diagnostic d'anémie par mesure de l'hématocrite doit être réalisé sur un animal normohydraté, ce qui est rarement le cas lorsque l'animal souffre d'une MRC (Polzin, 2013).

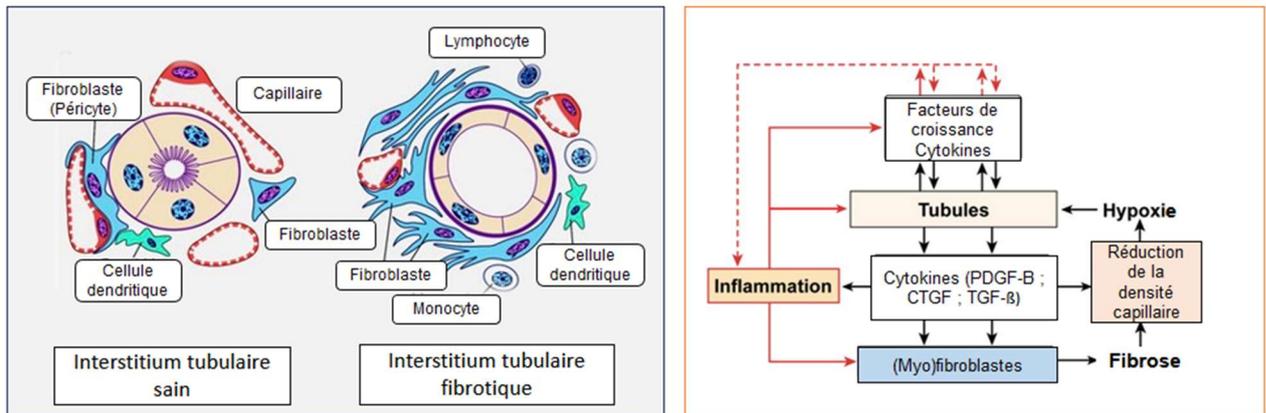
Il s'agit principalement d'une anémie normocytaire, normochrome et hyporégénérative ou arégénérative (Babitt and Lin, 2012; Polzin, 2013).

Le lien entre anémie et MRC a été établi pour la première fois il y a plus de 180 ans par Richard Bright (Babitt and Lin, 2012). Deux articles datant des années 1950 montraient déjà l'existence d'un facteur circulant responsable de la croissance des érythroblastes, précurseurs des érythrocytes et suspectaient que le rein en soit la principale source au sein de l'organisme (Erslev, 1953; Jacobson et al., 1957).

Ces hypothèses ont été confirmées aujourd'hui par de nombreuses études complémentaires et ce facteur de croissance, nommé aujourd'hui érythropoïétine, a été cloné et purifié dans les années 1970 et 1980. Cela a ensuite permis la quantification de l'EPO au sein de l'organisme (Miyake et al., 1977).

Aujourd'hui, on sait que lors de MRC, une population de tubules anormaux est responsable d'une signalisation profibrosante persistante. Cette signalisation provoque notamment une différenciation anormale des péricytes en myofibroblastes, l'atrophie des tubules rénaux et la prolifération et le dépôt de fibrose ainsi que la désintégration et la raréfaction des capillaires sanguins au sein du parenchyme rénal. Cette pathologie microvasculaire initiée empêche également la régénération tubulaire. Au fil de ce processus, les péricytes perdent leur capacité à produire l'EPO, engendrant un état d'anémie par défaut d'apport de facteur de croissance aux érythrocytes (Shih et al., 2018; Venkatachalam et al., 2015).

Figure 9 : Schématisation de la mise en place de fibrose interstitielle tubulaire rénale (d'après Venkatachalam et al., 2015)



Par ailleurs, il est très probable que le stress oxydatif engendré par l'anémie lors de MRC soit responsable de l'aggravation de la maladie. Il est suggéré dans certaines études, que l'hypoxie liée à l'anémie lors de MRC contribuerait à la progression de l'insuffisance rénale. En effet, la diminution de l'oxygénation des reins serait responsable de stress oxydatif au sein des tubules, induisant de dommages tissulaires rénaux. Ainsi, l'anémie serait donc délétère en cas d'insuffisance rénale chronique, et favoriserait une progression plus rapide de la MRC (Rossert and Froissart, 2006). Une anémie normochrome normocytaire hyporégénérative voire arégénérative par défaut de synthèse rénale d'érythropoïétine constitue donc un élément pronostic péjoratif de la MRC (Shih et al., 2018; Venkatachalam et al., 2015). En médecine humaine, la présence d'anémie lors de MRC est associée à une augmentation du taux de mortalité et du taux d'hospitalisation chez les patients atteints de MRC (Del Vecchio and Minutolo, 2021).

Il ne faut toutefois pas oublier qu'un état inflammatoire chronique, une diminution de la clairance rénale, ainsi qu'une carence en fer peuvent également être à l'origine d'une anémie en cas de maladie rénale chronique, même si la baisse de l'EPO en reste le principal facteur (Batchelor et al., 2020; Ganz and Nemeth, 2016).

Tableau 5 : Tableau récapitulation des causes d'anémie par diminution de l'érythropoïèse intervenant lors de MRC (Batchelor et al., 2020)

CAUSE D'ANEMIE PAR DIMINUTION DE L'ERYTRHOPOÏESE	PRECISIONS SUR LE MECANISME IMPLIQUE
DIMINUTION DE L'EPO	- Principalement baisse de production par le rein
AUGMENTATION DU TAUX D'HEPCIDINE	- Due à la diminution de clairance rénale et à l'augmentation de la concentration en IL-6 - Conduit à la séquestration du fer principalement dans les macrophages
CARENCE EN FER	- Due à la diminution de l'absorption intestinale du fer via l'augmentation de la concentration sanguine en hepcidine
RELARGAGE DE CYTOKINES INFLAMMATOIRES	- A lieu lors d'inflammation aigüe présente

Comme énoncé dans le tableau ci-dessus, les principales causes d'anémie intervenant au cours de la progression de la MRC chez le chat sont multiples. Tout d'abord, on retrouve la diminution de la production de l'EPO par le rein en premier plan. Cette anémie peut également être liée directement à l'inflammation par relargage de cytokines inflammatoire mais également indirectement via à l'augmentation du taux d'hepcidine, classiquement retrouvé lors de cette MRC via l'instauration d'un environnement inflammatoire au sein du tractus rénal. Il est également à garder en mémoire que l'augmentation du taux d'hepcidine circulant est aussi observée lors d'une diminution de clairance rénale. En outre, l'augmentation des taux en hepcidine conduit à la diminution de l'absorption intestinale ferrique et à la séquestration des ressources de l'organisme en fer au sein des macrophages (Batchelor et al., 2020).

Heureusement, des traitements existent pour lutter contre cet état d'anémie classiquement retrouvé chez les chats atteints de MRC. En effet, le vétérinaire est en mesure de mettre en place un traitement de l'anémie, visant à diminuer voire supprimer certains symptômes d'anémie liée à la MRC comme la léthargie et la fatigabilité à l'effort, participant ainsi à procurer un certain confort de vie aux animaux atteints de cette maladie (Batchelor et al., 2020).

En effet, il est nécessaire de supplémenter les chats anémiés atteints de MRC en fer de manière à rétablir des taux ferriques normaux au sein de l'organisme et ainsi contre-carrer les effets de l'augmentation du taux d'hepcidine. La deuxième pierre angulaire du traitement contre l'anémie en cas de MRC est le recours aux ESAs. Beaucoup plus détaillés dans la seconde partie, leur rôle est d'augmenter l'érythropoïèse de manière pulsatile. Cependant, ce traitement est demandeur d'une concentration sanguine ferrique transitoirement élevée, il est donc recommandé voire nécessaire d'instaurer cette supplémentation en fer lors de recours aux ESAs (Batchelor et al., 2020).

Il existe également une autre piste pour le traitement de l'anémie en cas de MRC, il s'agit du recours aux inhibiteurs du facteur HIF dont l'objectif est d'accroître les taux de relargage d'EPO endogène et d'absorption du fer. Cependant, ces traitements aux inhibiteurs du facteur HIF ne sont pas très utilisés en pratique vétérinaire courante (Batchelor et al., 2020).

□ Autres complications liées à la maladie rénale chronique

Il existe également d'autres complications associées à la MRC chez le chat, en dehors de l'anémie. On retrouve fréquemment les infections du tractus urinaire, le plus souvent asymptomatiques, surtout chez les femelles (Polzin, 2013).

Des troubles acido-basiques et électrolytiques sont également fréquemment rencontrés en cas de MRC. Les chats peuvent présenter une ventroflexion soit un abaissement de la nuque (par absence de ligament nuchal dans cette espèce) lors d'acidose hypokaliémique rencontrée chez 20 % des chats victimes d'insuffisance rénale chronique (Polzin, 2013).

Bien souvent, une hyperphosphatémie plus ou moins associée à une hyperparathyroïdie secondaire via une diminution de production de calcitriol par le rein est également observée. En effet, l'excrétion majoritaire du phosphore étant rénale, une hyperphosphatémie est constatée si le rein ne fonctionne plus convenablement. De même, le rein synthétisant le calcitriol, une diminution de sa concentration est observée lors d'une baisse de la fonction rénale, entraînant secondairement une dyscalcémie via une hyperparathyroïdie secondaire, pouvant ensuite conduire à une ostéodystrophie rénale et à des calcifications ectopiques des tissus mous (Polzin, 2013).

L'hypertension artérielle constitue une complication majeure de la MRC puisqu'elle l'entretient et l'aggrave en étant elle-même responsable de lésions rénales irréversibles, et laisse donc le patient rentrer dans un cercle vicieux. La prévalence de l'hypertension artérielle chez les chats atteints de MRC est, d'environ de 20 % mais assez variable selon les études. D'autres organes peuvent souffrir de lésions irréversibles dues à l'hypertension artérielle comme le cœur, le cerveau et l'œil. Associé à une hypertension artérielle mise en évidence par examen Doppler, on peut parfois constater des hémorragies rétiennes voire des décollements de rétine à l'examen ophtalmologique (Polzin, 2013).

2. Traitement des anémies par les érythropoïétines de synthèse

A. Recours aux ESAs

De nos jours, les ESAs constituent le traitement de référence de l'anémie chez les patients atteints d'IRC, que ce soit chez l'Homme ou chez les carnivores domestiques (Del Vecchio and Minutolo, 2021). Au sein de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement l'érythropoïétine de synthèse la plus utilisée chez le chat, à savoir la darbépoétine.

a. Définition et principe d'un ESA

Les ESAs sont des érythropoïétines de synthèse, créées à partir du modèle de la molécule d'EPO endogène humaine. Ainsi, un ESA est utilisé principalement comme facteur de croissance et de différenciation pour les érythrocytes (Del Vecchio and Minutolo, 2021).

Tous les ESAs partagent un mécanisme d'action commun : l'activation du récepteur de l'érythropoïétine. Leur rôle thérapeutique est identique à celui de l'érythropoïétine endogène étant donné que le principe même d'un ESA est de remplacer l'érythropoïétine endogène manquante. Comme évoqué précédemment, le récepteur à l'EPO et donc aux ESAs, est exprimé principalement sur les cellules progénitrices de la lignée érythroïde, mais aussi dans d'autres tissus, où l'érythropoïétine exerce des effets pléiotropes différents de l'érythropoïèse (Del Vecchio and Minutolo, 2021).

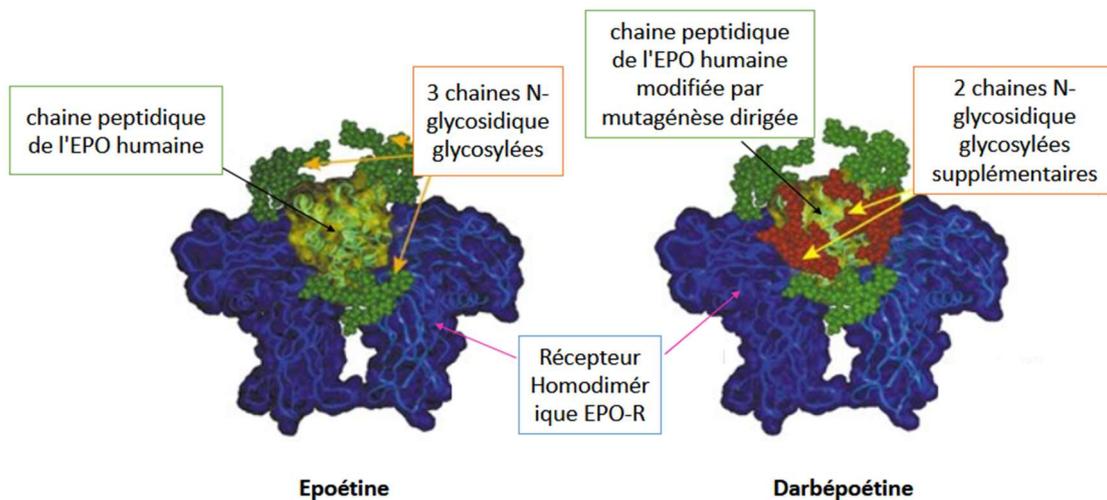
b. Propriétés pharmacologiques et structurales

Les ESAs sont classiquement synthétisés à partir de cellules ovariennes de Hamster (CHO) transfectés avec le gène de l'EPO humaine (Del Vecchio and Minutolo, 2021; Storrington et al., 1998).

Plusieurs études ont montré qu'il était possible d'obtenir différentes chaînes glucidiques glycosylées sur l'EPO en fonction des cellules dans lequel le gène de l'EPO était exprimé. En effet, ces isoformes de l'EPO diffèrent notamment en taille, en ramification et en quantité d'acide sialique. Grâce à cette propriété, il est possible d'introduire le gène de l'EPO humain dans des cellules de différentes lignées pour obtenir de nouvelles isoformes alors dénommées époétines (Storrington et al., 1998).

Il peut être intéressant de retenir que plus la molécule d'ESA est grosse, plus son affinité avec le récepteur est faible et plus sa demi-vie est longue. Cela met en jeu principalement des différences dans les cinétiques d'activation et d'internalisation des récepteurs (Del Vecchio and Minutolo, 2021).

Figure 10 : Structure de l'époétine α et de la darbépoétine fixées au récepteur homodimérique EPO-R (modifiée d'après (Elliott et al., 2003))



c. Historique

- *L'ESA recombinant humain*

Le recours à l'utilisation de la protéine humaine recombinante r-HuEPO dans les années 1980 a complètement révolutionné le traitement des anémies dues à des MRC en médecine humaine en permettant aux patients de ne plus recourir à des transfusions sanguines systématiques (Can et al., 2013; Del Vecchio and Minutolo, 2021).

Les deux premiers ESAs recombinants humains (r-HuEPO) ont été l'époétine α et l'époétine β . Comme énoncé précédemment, ils ont tous les deux été synthétisés à partir de cellules ovariennes de Hamster et sont rentrés dans la pratique clinique il y a une trentaine d'années (Del Vecchio and Minutolo, 2021; Storrington et al., 1998). A l'époque, dans une étude regroupant des essais cliniques de phase I et II, le taux d'hématocrite de personnes anémiées traitée avec une forte dose de r-HuEPO a atteint jusqu'à dix points de pourcentage d'hématocrite supplémentaire en trois semaines de traitement, à raison de trois injections chaque semaine (Eschbach et al., 1987). Une autre étude indique que le taux de survie des érythrocytes augmenterait lors de traitement à la r-HuEPO (Polenakovic and Sikole, 1996).

Quelques années plus tard, la darbépoétine a été créée. Elle possède une demi-vie plus longue que les ESAs mis au point précédemment grâce à sa teneur en glycosylation plus élevée. Plus récemment, depuis une quinzaine d'années, des biosimilaires de l'époétine α et de l'époétine β ont été mis à disposition pour un usage clinique comme alternative aux autres ESAs, leur principal atout étant leur faible coût (Del Vecchio and Minutolo, 2021; Goldsmith et al., 2018).

- *Chez l'animal*

Les ESAs ont commencé à être introduits chez les carnivores domestiques il y a une trentaine d'années (Chalhoub et al., 2012).

- L'ESA recombinant humain

L'administration de r-HuEPO peut réduire l'anémie et améliorer le bien-être clinique des chiens et des chats. Cependant, son administration présente des risques de production d'anticorps et d'effets indésirables associés à la correction de l'hématocrite (Cowgill et al., 1998).

L'utilisation de la r-HuEPO chez les carnivores domestiques n'est donc pas optimale. Elle a été employée en évaluant le rapport des bénéfices et des risques à chaque utilisation, jusqu'à ce que des formes homologues d'érythropoïétine soient disponibles (Cowgill et al., 1998).

- Les recombinants canins et félins

Etant donné que des échecs thérapeutiques importants ont été observés en réaction à l'injection des ESAs précédemment cités, des traitements plus spécifiques aux chats et aux chiens ont été développés (Randolph et al., 2004b).

Chez le chat, l'érythropoïétine recombinante féline r-fEPO a alors été synthétisée à partir de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) transfectées avec le gène de l'EPO féline (r-fEPO) (Randolph et al., 2004b).

Une étude a évalué le traitement par r-fEPO chez 26 chats dont certains avaient préalablement été réfractaires au traitement à la r-HuEPO (Randolph et al., 2004b). Une érythropoïèse active a pu être rétablie chez la plupart des chats atteints d'IRC, même chez les chats réfractaires à la r-HuEPO. Malheureusement, le développement d'une érythroblastopénie pendant le traitement a quand même été observé chez plusieurs individus alors qu'il s'agissait d'une préparation spécifique aux félins (Randolph et al., 2004b).

De même chez le chien, une érythropoïétine recombinante canine (r-cEPO) a été développée. Son efficacité et sa sécurité ont été évaluées chez 19 chiens souffrant d'anémie due à une MRC (premier groupe) et également chez six chiens souffrant de MRC et réfractaire au traitement à la r-HuEPO (deuxième groupe) (Randolph et al., 2004a).

Malheureusement, la r-cEPO n'a pas été aussi efficace pour restaurer la production d'érythrocytes chez les chiens du deuxième groupe, contrairement à ceux du premier alors qu'il s'agissait là aussi d'une préparation spécifiquement canine (Randolph et al., 2004a).

B. La darbépoétine, un ESA d'importance en médecine humaine et vétérinaire

Testée par essais cliniques depuis 1996 et commercialisée depuis près de 20 ans, la darbépoétine est aujourd'hui plus utilisée en médecine humaine que la protéine humaine recombinante la r-HuEPO (Macdougall, 2002). Elle est l'ESA le plus utilisé à l'heure actuelle également en médecine vétérinaire, le plus souvent pour lutter contre les anémies d'origine rénale. Sa formulation ARANESP a reçu une AMM humaine européenne centralisée le 8 juin 2001. Il est très utilisé depuis et de nouvelles indications thérapeutiques ont été ajoutées (Haute Autorité de Santé, 2015).

a. Différences pharmacologiques et structurales vis-à-vis des autres ESAs

Des expériences ont montré qu'il existe une relation directe entre la teneur en carbohydrates et l'activité biologique *in vivo* ainsi que la demi-vie de l'érythropoïétine. La darbépoétine a donc été créée dans le but d'élaborer une EPO plus efficace que l'EPO endogène, à des fins thérapeutiques (Egrie and Browne, 2002).

La darbépoétine diffère donc de la r-HuEPO et de l'EPO endogène par l'ajout de deux chaînes N-glucidiques supplémentaires ; elle en possède donc cinq au total. Cet ajout de résidus glucidiques supplémentaires confère à la darbépoétine une demi-vie trois à quatre fois plus longue que celles de la r-HuEPO et de l'EPO endogène. En conséquence, une administration moins fréquente de cette molécule par rapport à celles préexistantes est possible (Haute Autorité de Santé, 2015).

Les deux nouvelles chaînes N-glucidiques ont été introduites en changeant cinq acides aminés présents sur la r-HuEPO par mutagénèse dirigée (Egrie and Browne, 2001). Les sites d'introduction de ces chaînes ne gênent pas la liaison de la darbépoétine à l'EPO-R et ne perturbent pas la forme tertiaire de la molécule (Egrie et al., 2003).

b. Pharmacocinétique

Il n'existe à l'heure actuelle pas de données chez l'animal concernant la pharmacocinétique de la darbépoétine. Les données ci-dessous proviennent de la médecine humaine.

- *Absorption*

Chez le chat, l'administration de la darbépoétine est essentiellement réalisée par injection sous-cutanée. En médecine humaine, lorsque l'administration de la darbépoétine a lieu par voie sous-cutanée (SC), sa biodisponibilité est de seulement 37%. Les concentrations maximales en darbépoétine varient entre 0,75 et 6,3 ng/ml selon les études et sont généralement atteintes entre 30 et 60 heures après l'injection (Macdougall et al., 2007).

- *Distribution*

Chez l'Homme, le volume de distribution de la darbépoétine est le même que celui des époétines et environ égal au plasma soit d'environ 60 mL/kg, ce qui signifie que la distribution extravasculaire est très faible (Macdougall et al., 2007).

- *Métabolisme et élimination*

La demi-vie de la darbépoétine administrée par voie SC est de 70h à 105h selon les études alors qu'elle n'est que de 25h lors d'administration par voie IV. (Macdougall et al., 2007). L'altération de la fonction rénale ne semble pas affecter l'élimination de la darbépoétine car la voie rénale n'est certainement pas la principale voie d'élimination, ce qui serait cohérent avec les précédentes observations faites sur les autres ESAs. En effet, une étude montre que moins de 5% d'époétine β est excrétée par voie rénale chez des hommes sains après administration IV. De même, les taux d'époétine α ne sont pas non plus altérés par la fonction rénale et elle n'est retrouvée qu'à hauteur de 7% dans le dialysat urinaire après une administration IV (Macdougall et al., 2007; Petersen et al., 1996).

A l'heure actuelle, la voie principale d'élimination des EPOs et des ESAs n'est pas encore bien décrite. Une hypothèse selon laquelle elles seraient dégradées par des mécanismes intracellulaires après internalisation par le EPO-R est cependant privilégiée dans la littérature. Cela semble cohérent avec le fait que la darbépoétine possède moins d'affinité pour l'EPO-R que l'EPO endogène et l'époétine.

En effet, la darbépoétine se lie moins facilement au récepteur à l'EPO et s'en dissocie aussi plus rapidement. Ainsi, elle est éliminée plus lentement que les autres ESAs, ce qui coïncide avec les valeurs de demi-vie décrite plus haut (Macdougall et al., 2007).

Les performances pharmacocinétiques de la darbépoétine ne dépendent ni de la dose, ni de la fréquence d'administration, ni du niveau d'atteinte rénale ou encore de l'âge du patient (Macdougall et al., 2007).

c. Pharmacodynamique

La pharmacodynamie étudie la façon dont un médicament agit sur sa cible, et la manière dont il exerce son effet une fois sur son site d'action. Deux notions se distinguent alors pour comprendre la pharmacodynamie de la darbépoétine, à savoir la pharmacologie de liaison au récepteur et la pharmacologie de l'effet. La pharmacologie de liaison étudiée dans la littérature est la liaison de la darbépoétine à l'EPO-R bien qu'il existe d'autres récepteurs à l'EPO (cf. première partie). La darbépoétine, tout comme les autres ESAs ou encore l'EPO endogène est un agoniste du récepteur à l'EPO-R, son effet est donc activateur (Kohlhauer et al., 2019).

De la même façon que pour l'EPO endogène, la darbépoétine est distribuée aux progéniteurs de l'érythropoïèse possédant un récepteur EPO-R après absorption. Elle vient ensuite se fixer aux récepteurs EPO-R et tout comme l'EPO, elle déclenche la dimérisation de celui-ci, ce qui provoque une cascade de phosphorylations aboutissant à la transcription de certains gènes inhibiteurs de l'apoptose. L'effet de la darbépoétine est donc le même que celui de l'EPO endogène. Il aboutit à la croissance des hématies (Rieu, 2009).

Cependant, l'affinité de la darbépoétine pour le récepteur EPO-R est moins importante que celle de l'EPO endogène ou des autres ESAs pour ce même récepteur. Ce phénomène est dû à l'ajout de deux chaînes carbohydratees à sa structure (Egrie and Browne, 2002).

C. Mise en place d'un traitement

a. Indication

En médecine humaine, la darbépoétine est utilisée pour lutter contre l'anémie liée à l'insuffisance rénale chronique chez l'adulte et l'enfant. Une extension de cette indication a été faite en 2003 concernant le traitement de l'anémie liée à des tumeurs solides ou des hémopathies malignes non hématologiques et recevant une chimiothérapie (Haute Autorité de Santé, 2015).

La darbépoétine ne possède pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) vétérinaire. Elle est cependant utilisée selon le principe de la cascade comme médicament humain n'ayant pas d'équivalent aussi efficace en médecine vétérinaire pour les indications pour lesquelles il est prescrit.

Chez l'animal, le recours au traitement à la darbépoétine a lieu comme chez l'Homme principalement lors d'anémies liées à l'insuffisance rénale chronique. Le traitement peut aussi être envisagé lors d'anémie d'origine inflammatoire (Fiocchi et al., 2017).

b. La complémentation ferrique

- *Le fer, un adjuvant de traitement important*

La mise en place d'un traitement par tout ESA dont la darbépoétine, doit impérativement être associée à une complémentation en fer pour s'avérer efficace. Malheureusement, elle est parfois omise et lorsque cette complémentation en fer est bien prescrite chez les patients atteints de MRC, le fer est principalement administré par voie orale, dont l'efficacité est limitée (Stack et al., 2018).

Chez les carnivores domestiques, certains auteurs conseillent comme chez l'homme, une évaluation du taux de fer sanguin présent dans l'organisme mais les analyses nécessaires à cette évaluation sont peu disponibles. Elles sont donc très rarement réalisées en pratique, si bien qu'une grande majorité d'auteurs préconisent une supplémentation en fer systématique lors du recours aux ESAs chez les carnivores domestiques (Bartges, 2012; Chalhoub et al., 2012; Fiocchi et al., 2017; Polzin, 2013).

- *Protocole de complémentation ferrique*

En médecine humaine comme chez l'animal, l'administration orale de fer engendre des désordres gastro-intestinaux fréquents et l'état inflammatoire coexistant limite fortement son absorption intestinale (Stack et al., 2018). Comme décrit dans de nombreuses études, la réponse à la supplémentation orale en fer est sous-optimale en termes de correction de la carence et d'augmentation de l'hémoglobine par rapport à la voie d'administration intraveineuse, même dans les essais excluant les patients présentant une intolérance au fer oral ainsi que des signes d'inflammation avec une concentration sanguine en protéine C-réactive (CRP) supérieure à 20 mg/L (Shepshelovich et al., 2016).

Parmi une population de patients atteints de maladie cardiaque chronique, une réduction significative du risque d'hospitalisation (Anker et al., 2018; Ponikowski et al., 2015), et des NT-proBNP (Toblli et al., 2007) ont été mises en évidence dans certaines études lors d'administration de fer par voie intraveineuse. La plupart des études sur le sujet ont également mis en évidence une réduction des effets indésirables due à la maladie cardiaque chronique lors d'administration du fer par voie intraveineuse (Ponikowski et al., 2015; Toblli et al., 2007). Cependant, l'administration du fer par voie intraveineuse serait responsable de risques cardiovasculaires et d'épisodes infectieux plus fréquents que lors d'administration par voie orale pour certains auteurs, mais cela reste débattu dans la communauté scientifique (Del Vecchio and Minutolo, 2021).

Chez le chat, tout comme chez l'Homme, la complémentation en fer peut être réalisée par voie orale. La dose quotidienne de sulfate ferreux est alors de 50 à 100 mg par chat. Elle peut aussi être réalisée par injection intramusculaire de fer dextran à hauteur de 50 mg par animal.

Cette complémentation est renouvelable toutes les trois à quatre semaines. En outre, le sulfate ferreux par voie orale a un goût amer non appétant pour les chats rendant son administration parfois difficile (Bartges, 2012; Polzin, 2013).

Pour toutes les raisons citées ci-dessus, l'injection intramusculaire de fer dextran est souvent préférée à l'administration par voie orale. Cependant, une réaction allergique peut survenir quelques heures après l'injection. Il convient donc de rester vigilant quant à la survenue de cette complication (Bartges, 2012; Polzin, 2013).

c. Posologie et fréquence d'administration

□ En médecine humaine

En médecine humaine, il a été démontré que des doses de darbépoétine de 0,45 et 0,75 µg/kg SC ou IV une fois par semaine permettaient d'obtenir des réponses optimales que les auteurs ont définies comme une augmentation de 1 à 3 g/dL de la concentration d'hémoglobine sur quatre semaines, chez 60 à 70 % des patients humains de l'étude (Chalhoub et al., 2012).

La Haute Autorité de Santé (HAS) confirme que le médicament ARANESP peut être administré par voie sous-cutanée ou intraveineuse, en une seule injection, une fois par semaine (Haute Autorité de Santé, 2015). D'après plusieurs études, les administrations parentérales de darbépoétine peuvent être espacées de deux semaines voire d'un mois (Jadoul et al., 2004; Robinson and Easthope, 2005; Roger et al., 2014).

En effet, une étude rapporte que dans la majorité des cas de MRC humains, un traitement à la darbépoétine permet de maintenir les niveaux d'hémoglobine stables, même si les traitements sont espacés de deux semaines (Robinson and Easthope, 2005). Dans deux autres études, l'intervalle entre deux injections de darbépoétine pouvait même atteindre quatre semaines du moment où l'espacement a été progressif (Jadoul et al., 2004; Roger et al., 2014). Dans l'une des études, les patients n'étaient pas hémodialysés (Roger et al., 2014) contrairement à l'autre (Jadoul et al., 2004).

De même, chez des patients recourant à l'hémodialyse, le traitement à la darbépoétine avait la même efficacité administrée une à deux fois par semaine, que la r-HuEPO administrée jusqu'à trois fois par semaine (Egrie and Browne, 2001). Ces observations démontrent que la demi-vie de la darbépoétine est jusqu'à trois fois plus importante que celle de la r-HuEPO (Egrie et al., 2003; Roger et al., 2014). De plus, l'injection étant douloureuse, il est donc préférable pour le confort et l'adhérence à la poursuite du traitement des patients de l'administrer aussi peu souvent que nécessaire (Roger et al., 2014).

La posologie et la fréquence d'administration sont donc à adapter par le médecin en fonction de la réponse de l'individu au traitement, l'objectif étant d'arriver chez ces patients à une concentration sanguine en hémoglobine comprise entre à 11 g/dL et 14 g/dL maximum (Haute Autorité de Santé, 2015).

Toujours selon la HAS, l'augmentation de la concentration sanguine en hémoglobine doit être de 1 à 2,5 g/dL en quatre semaines sans dépasser les 14 g/dL. S'il y a dépassement, il faut interrompre le traitement jusqu'à ce que la concentration redescende en-dessous de 13 g/dL et reprendre ensuite le traitement en diminuant la dose de 25%. Si l'augmentation de la concentration sanguine en hémoglobine n'est pas satisfaisante, il faut en revanche augmenter la dose de 25% (Haute Autorité de Santé, 2015).

□ Chez l'animal

Chez le chien, une étude évaluant l'efficacité de la darbépoétine en injection sous-cutanée (SC) chez des chiens atteints de MRC a été réalisée (Fiocchi et al., 2017). Cette efficacité a été jugée par le taux de PCV (packed red cell volume) qui ne devait pas être inférieur à 30%. La dose médiane de début de traitement était de 0,5 µg/kg mais elle a dû être ajustée à 0,8 µg/kg en moyenne pour que le traitement réponde bien à l'objectif fixé. De la même manière, le traitement a été initié à la fréquence d'une fois par semaine chez certains chiens et d'une fois toutes les deux semaines ou plus chez d'autres. Or, quatre chiens qui ont été traités toutes les deux semaines ou plus ont dû subir un réajustement de fréquence et ont été également traités une fois par semaine pour maintenir un PCV >30% et trois chiens n'ont pas eu besoin de cet ajustement. Les 11 chiens ayant eu une injection tous les 28 jours ont dû également procéder à ce même réajustement de traitement. Un taux de 85% de chiens sont jugés répondeurs au traitement, qui a duré trois à quatre semaines en moyenne. Selon cette étude, les chiens seraient donc plus susceptibles de répondre à une posologie d'au moins 0,8 µg/kg une fois par semaine en injection SC (Fiocchi et al., 2017).

Chez le chat, une seule étude évaluant rétrospectivement une population de chats traités à la darbépoétine atteints d'anémie et d'IRC a recherché à définir un dosage de traitement efficace (Chalhoub et al., 2012). Les dossiers médicaux de chats traités à la darbépoétine entre janvier 2005 et décembre 2009 dans un hôpital vétérinaire ont été examinés. Les individus n'ont été intégrés à l'étude que si les données de suivi étaient disponibles pendant au moins 56 jours, souffraient d'IRC et n'étaient pas morts dans les deux mois suivant l'administration de la darbépoétine. Ils n'ont pas été exclus s'ils avaient reçu une transfusion de sang total ou de culot globulaire.

Le choix de ce nombre de jours d'observation était basé sur l'expérience clinique des auteurs selon laquelle les résultats du traitement, les échecs et les complications étaient observées dans ce laps de temps avec ce médicament. Initialement, une posologie de départ de 0,45 µg/kg SC une fois par semaine a été prescrite. Puis, à partir de 2007, la plupart des cliniciens de cet hôpital vétérinaire ont augmenté la dose de traitement à 1 µg/kg en raison d'échecs de traitements chez de nombreux chats ayant commencé à 0,45 µg/kg (Chalhoub et al., 2012).

La dose de darbépoétine (ARANESP 10 mg) classiquement administrée à l'hôpital des animaux de compagnie de l'ENVA (CHUV-AC) chez le chat est également de 1 µg/kg, à raison d'une fois par semaine pendant en général trois à quatre semaines. Ensuite, l'hématocrite du chat traité est mesuré et comparé à l'hématocrite relevé avant traitement. L'individu est alors classé en répondeur ou non répondeur au traitement, en fonction l'évolution de cette mesure d'hématocrite.

d. Efficacité du traitement

- *Chez l'Homme*

La HAS s'appuie sur deux études et conclut à une efficacité du traitement à la darbépoétine identique à celle du traitement à la r-HuEPO (Haute Autorité de Santé, 2015).

En effet, chez des patients dialysés en IRC stabilisés sous r-HuEPO dont l'administration est réalisée une à trois fois par semaine selon les individus, le changement de traitement pour celui à la darbépoétine (ARANESP) également administré une fois par semaine, maintient un taux d'hémoglobine identique à celui obtenu via la r-HuEPO (Haute Autorité de Santé, 2015).

De même, l'efficacité de la r-HuEPO a été comparée à celle de la darbépoétine chez des enfants atteints de MRC. Cette efficacité était comparable dans les deux lots de patients, sans avoir décelé l'apparition d'effet secondaire notable, seul un cas d'hypertension a été recensé parmi les enfants traités avec la darbépoétine (Can et al., 2013).

Comme indiqué précédemment, chez des patients atteints de MRC et hémodialysés, le traitement à la darbépoétine avait la même efficacité administré une à deux fois par semaine, que celui à la r-HuEPO administré jusqu'à trois fois par semaine (Egrie and Browne, 2001).

Une étude de 2019 indique que chez des patients humains atteints de MRC et placés sous hémodialyse, le recours aux ESAs de longue action tels que la darbépoétine, serait associé à un plus fort taux de mortalité toutes causes confondues que le recours aux ESAs de courte durée d'action tels que les époétines α et β . Le suivi des patients a été effectué pendant deux années après la première administration d'ESA et plus de 31 000 patients sont décédés sur près de 194 700. Le taux de mortalité était 13% plus important chez les patients traités à la darbépoétine (Sakaguchi et al., 2019).

- *Chez l'animal*

Une seule étude à l'heure actuelle s'est intéressée à l'efficacité du traitement à la darbépoétine chez le chat et au moins deux études chez le chien. Il y a encore peu de données scientifiques sur le sujet chez les carnivores domestiques à l'heure actuelle (Chalhoub et al., 2012).

Une seule étude disponible à l'heure actuelle a donc eu pour objectif de montrer l'efficacité du traitement à la darbépoétine chez des chats anémiés atteints de MRC (Chalhoub et al., 2012). Cette étude a pu inclure 25 chats dans son protocole expérimental, 28 cas ont été écartés car ils ont pour la plupart été euthanasiés à cause d'une détérioration de leur état général ayant pour origine probable la progression de leur MRC, et dix ont été perdus de vue. Il est important de noter que les auteurs ont écarté les chats ayant vécu moins de 56 jours après avoir reçu le traitement car ils ont jugé que l'efficacité du traitement ainsi que l'apparition d'effets indésirables dus à ce traitement s'établissait au bout de ces deux mois (Chalhoub et al., 2012).

Les résultats ont été considérés concluants si le taux d'hématocrite post traitement avait dépassé les 25% et si ce taux avait été maintenu jusqu'au 56^{ème} jour de l'étude ou si les érythrocytes avaient dépassé un certain volume et si celui-ci avait été maintenu jusqu'au 56^{ème} jour de l'étude (Chalhoub et al., 2012).

La darbépoétine a donc été administrée une fois par semaine en SC à la dose de 0,45 µg/kg entre 2005 et 2007 puis à la dose de 1 µg/kg à partir de 2007 et les taux d'Ht et les volumes de PCV ont été mesurés généralement chaque semaine sur les 25 chats inclus dans l'étude. Une fois l'objectif des 25% d'Ht ou du volume de PVC était atteint, la fréquence initiale ou la dose administrée a pu être diminuée selon la préférence du clinicien. (Chalhoub et al., 2012).

Onze chats ont été classés « non répondeurs » car ils possédaient soit un taux de Ht supérieur à 25% soit un bon volume d'érythrocytes mais ils ne l'ont pas maintenu les semaines suivantes sous traitement à la darbépoétine. Quatorze chats ont été classés « répondeurs » car ils ont maintenu un taux de Ht supérieur à 25% ou un bon volume d'érythrocytes pendant toute la durée du traitement à la darbépoétine (Chalhoub et al., 2012). Les groupes étaient comparables sur la créatininémie (5,3 mg/dL pour les répondeurs et 5,7 mg/dL pour les non répondeurs). Les chats répondeurs n'ont pas eu de transfusion après un jour avant le traitement à la darbépoétine et le nombre de chats transfusés avant le premier jour de traitement est comparable dans les deux groupes (six répondeurs et sept non répondeurs). Il est cependant important de noter que les chats n'ont pas tous été traités de manière égale quant à la complémentation en fer. En effet, plus de chats répondeurs ont été complémentés en début de traitement (trois de plus que dans l'autre groupe), la majorité des chats ayant été complémentés en fer au bout de 40 jours de traitement (Chalhoub et al., 2012).

Le délai médian de réponse adéquate au traitement à la darbépoétine des chats répondeurs de cette étude était de 21 jours sachant qu'il était très variable pour chaque individu et allant de sept à 47 jours (Chalhoub et al., 2012).

Par ailleurs, la dose efficace serait d'au moins 1 µg/kg. En effet, dans cette étude, un seul des sept chats de l'étude ayant reçu cette dose initiale comprise entre 0,45 µg/kg et 0,71 µg/kg a répondu (Chalhoub et al., 2012).

Dans les trois mois suivant cette étude, trois chats sur les 14 répondeurs ont ensuite développé de nouveau une anémie : deux d'entre eux suite à une diminution de dose (respectivement aux jours 78 et 132), l'autre ayant développé une insuffisance cardiaque au 105^{ème} jour (Chalhoub et al., 2012).

La médiane de survie est significativement différente entre les deux groupes puisqu'elle est de 236 jours chez les chats répondeurs contre 83 jours pour les chats non répondeurs. De même, la médiane de survie de quatre chats répondeurs ayant ensuite arrêté le traitement est à 80 jours. Cependant, 64% des chats non répondeurs avaient une maladie intercurrente contre seulement 29% des chats répondeurs, ce qui constitue un biais (Chalhoub et al., 2012). Cette différence nous amène à penser que le traitement à la darbépoétine aurait tendance à mieux fonctionner chez les chats ne comportant pas de maladie intercurrente (Chalhoub et al., 2012). Par ailleurs, cette médiane de survie est comparable aux données publiées sur la survie des chats au stade IV de l'IRIS (Boyd et al., 2008).

De même, les hémorragies gastro-intestinales peuvent contribuer à l'absence de réponse au traitement par la darbépoétine. En effet, l'urémie peut provoquer des saignements digestifs chez les patients atteints de MRC. La perte de sang continue aggrave alors l'anémie chronique et rendre relativement difficile la correction de l'anémie par le médicament. Enfin, des conditions inflammatoires chroniques peuvent également avoir contribué à l'absence de réponse au traitement (Chalhoub et al., 2012).

De même, une étude rétrospective relativement récente s'est intéressée à l'efficacité du traitement à la darbépoétine chez les chiens atteints de MRC. La dose médiane de départ était de 0,5 µg/kg SC une fois par semaine et a parfois été augmentée jusqu'à atteindre une dose maximale de 0,8 µg/kg. La réponse au traitement a été définie comme l'obtention d'un PCV ≥30 % ou d'une augmentation du PCV ≥10 % en prenant comme référence le PCV obtenu avant la première injection. Vingt-huit chiens sur 33 (soit 85 %) ont répondu à ces critères. Une dose initiale plus élevée a été associée à l'obtention d'une augmentation de la différence de PCV avant et après traitement. Aucun chien n'a répondu au traitement lorsque l'intervalle des injections était supérieur à 21 jours (Chalhoub et al., 2012; Fiocchi et al., 2017).

D'après ces études, chez le chien, la dose efficace de darbépoétine semble discrètement moins élevée que chez le chat, mais tout de même assez similaire, entre 0,8 et 1µg/kg (Chalhoub et al., 2012; Fiocchi et al., 2017).

e. Effets indésirables rapportés

- *En médecine humaine*

Malheureusement, des effets indésirables cardiovasculaires dépendant de la dose utilisée sont assez fréquemment observés lors du recours aux ESAs. En effet, les doses utilisées en médecine humaine pour maintenir l'hématocrite des patients atteints d'IRC dans les normes de l'espèce (soit plus de 40% d'Ht correspondant à au moins 13 g/dL d'hémoglobine) sont trop élevées et conduisent à un risque accru de développer une insuffisance cardiaque congestive, une cardiopathie ischémique, une thrombose artérielle ou veineuse, ou encore un accident vasculaire cérébral (Del Vecchio and Minutolo, 2021; Pfeffer et al., 2009; Singh et al., 2006).

D'après plusieurs études, il est préférable de viser un hématocrite un peu en dessous des normes soit autour de 30% que de risquer des complications cardiovasculaires compromettant la survie du patient en lui administrant des doses d'ESAs trop élevées. Il existe donc un large consensus en médecine humaine à l'heure actuelle sur le fait d'éviter au maximum de viser intentionnellement des taux d'Hb supérieur à 13 g/dL lors de traitement par les ESAs (Del Vecchio and Minutolo, 2021; Pfeffer et al., 2009; Singh et al., 2006). Pour certains auteurs, cette borne supérieure est même encore trop élevée lorsque les patients ont déjà des antécédents cardiovasculaires ou présentent des comorbidités telles que du diabète ou un cancer (Pfeffer et al., 2009).

Aujourd'hui, les doses classiquement administrées visent à obtenir des concentrations sanguines en hémoglobine comprises entre 11 et 12 g/dL, en gardant en mémoire que la prise en charge de chaque patient doit donc être individualisée et la dose adaptée également à chacun des patients.

Chez les patients chez qui l'Ht reste très faible malgré l'administration d'ESAs à faible dose, il est d'ailleurs recommandé de recourir aux transfusions sanguines plutôt que d'augmenter la dose du traitement (Del Vecchio and Minutolo, 2021; Locatelli et al., 2013).

Les effets indésirables des différents ESAs semblent similaires (Del Vecchio and Minutolo, 2021). Bien que certaines études aient relevées des effets indésirables plus importants pour la darbépoétine que pour les époétines de génération antérieure (Sakaguchi et al., 2019), d'autres semblent indiquer exactement le contraire (Minutolo et al., 2021). Il n'y a à l'heure actuelle pas de consensus sur le sujet. En outre, un vaste essai randomisé testant le risque d'événements cardiovasculaires indésirables majeurs ou de mortalité toutes causes chez plus de 2 000 patients dialysés ou atteints d'insuffisance rénale chronique terminale n'a pas confirmé l'existence d'éventuels problèmes de sécurité d'utilisation d'une molécule d'ESA par rapport à une autre (Locatelli et al., 2019). Une méta-analyse réalisée par deux auteurs indépendants datant de février 2023 conclut à un taux important de biais existant dans les études indiquant que les ESAs seraient responsables de mortalité cardiovasculaire, d'infarctus du myocarde, d'accident vasculaire cérébral, de thrombose vasculaire, d'insuffisance rénale ou d'essoufflement. D'après cette analyse d'une centaine d'études sur le sujet, il serait donc impossible de conclure et ces effets indésirables sont classés comme incertains (Chung et al., 2023). En revanche, l'hypertension serait un effet secondaire que l'on pourrait considérer avec un niveau de confiance supérieur, toutefois non retrouvée lors de l'emploi d'époétine biosimilaire (Chung et al., 2023). Dans cette même méta-analyse, l'effet secondaire « fatigue » n'a été observé que très rarement donc il n'a pas été retenu (Chung et al., 2023). Les différents ESAs sont, à l'heure actuelle, prescrits surtout en fonction de leur voie d'administration (Del Vecchio and Minutolo, 2021).

En outre, lors d'une réponse trop précoce à la darbépoétine se traduisant par une augmentation trop rapide de l'Ht, il a été fréquemment observé des conséquences néfastes telles que l'hyperviscosité, la surstimulation cardiaque, les événements vasculaires cérébraux et l'hypertension. Ce phénomène est fréquemment observé lors de recours à des dosages trop élevés ne respectant pas les recommandations de la HAS (Berns, 2010; Novak and Szczech, 2008).

Tableau 6 : Tableau des principaux effets indésirables recensés lors de traitement à la darbépoétine en médecine humaine (Berns, 2010; Chung et al., 2023; Novak and Szczech, 2008)

EFFET SECONDAIRE	NIVEAU DE CONFIANCE
HYPERTENSION	Probable – retrouvé dans presque la totalité des études analysées
MORTALITE CARDIOVASCULAIRE	
INFARCTUS DU MYOCARDE	Incertain
ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL	Suspecté par de nombreuses études mais des biais existent et sont à prendre en compte
TROMBOSE VASCULAIRE	
INSUFFISANCE RENALE	Probable lors de dépassement de doses
ESSOUFFLEMENT	

- *En médecine vétérinaire*

Peu d'études sont aujourd'hui disponibles sur les effets indésirables des traitements à la darbépoétine chez les carnivores domestiques, c'est pourquoi principalement deux études (l'une chez le chien, l'autre chez le chat) incluant un nombre relativement faible d'individus seront détaillées ci-après.

Les effets indésirables semblent cependant fréquents, environ la moitié des individus traités étant suspectés de déclarer au moins un effet secondaire au traitement à la darbépoétine (Chalhoub et al., 2012; Fiocchi et al., 2017). Ce propos est tout de même à nuancer car il est parfois difficile dans ces études de déterminer avec clarté si ces effets sont réellement dus au traitement, ou bien plutôt à la progression de l'IRC ou encore à une maladie intercurrente sous-jacente (Chalhoub et al., 2012; Fiocchi et al., 2017).

□ L'hypertension

Il s'agit de l'effet secondaire le plus fréquemment rencontré également en médecine vétérinaire (Chalhoub et al., 2012; Fiocchi et al., 2017).

Dans une étude réalisée sur 33 chiens victimes de MRC, environ un tiers des individus recevant des doses de darbépoétine comprises entre 0,5 et 0,8µg/kg souffraient d'hypertension (Fiocchi et al., 2017).

La PAS a été prise sur 22 chats de l'étude rétrospective précédemment citée. Les chats ont été considérés hypertendus lorsque leur PAS dépassait les 180 mmHg. Trois chats hypertendus avant traitement le sont restés sous traitement. Trois des huit chats non-hypertendus avant traitement le sont devenus sous traitement. Trois autres chats sont devenus hypertendus pendant le traitement mais aucune valeur prétraitement n'a été réalisée. Chez trois de ces chats hypertendus, l'augmentation n'était pas reproductible et aucun médicament antihypertenseur n'a été prescrit (Chalhoub et al., 2012).

Il est à garder à l'esprit que l'hypertension étant une conséquence fréquente de la MRC, il peut être difficile de trancher sur l'origine de cette hypertension chez des patients atteints de MRC traités à la darbépoétine (Chalhoub et al., 2012).

□ L'érythroblastopénie

Nous définirons mieux ce qu'est l'érythroblastopénie ou PRCA (en anglais pour Pure Red Cell Aplasia) dans la prochaine section car nous nous y intéressons tout particulièrement dans cette thèse. Nous allons simplement le citer comme effet secondaire ci-après sans nous y attarder pour le moment.

Sur les 11 chats non répondeurs de l'étude préalablement citée, l'érythroblastopénie n'a été cliniquement faiblement suspectée que chez deux d'entre eux, car d'autres conditions étaient présentes et expliquaient de manière rationnelle la faible réponse chez les neuf autres individus restants (Chalhoub et al., 2012).

Chez le chien, dans l'étude de Fiocchi et al, deux individus sur 33 ont développé une érythroblastopénie (Fiocchi et al., 2017).

□ Autres effets indésirables

En médecine vétérinaire, dans une étude de 2017, 33 chiens en MRC recevant des doses comprises entre 0,5 et 0,8 µg/kg SC de darbépoétine ont développé les effets indésirables suivants par ordre de fréquence (hors hypertension et érythroblastopénie) : crises convulsives, troubles digestifs à savoir diarrhées et vomissements (Fiocchi et al., 2017).

Dans l'étude rétrospective de 2012 réalisée sur des chats en MRC recevant un traitement à la darbépoétine (précédemment citée), les effets secondaires rapportés étaient similaires. De même, par ordre de fréquence (hors hypertension et érythroblastopénie), on retrouvait : des vomissements, des crises convulsives, et moins fréquemment des épisodes d'hémorragie gastro-intestinale aiguë chez deux individus ainsi qu'une insuffisance cardiaque chez un individu (Chalhoub et al., 2012).

En effet, 90% des chats inclus dans l'étude avaient déjà un historique de vomissements ou d'inappétence avant leur inclusion, ce qui paraît logique dans un contexte de MRC. Il est donc assez difficile de considérer la présence de vomissements ou troubles digestifs au sens large (y compris les épisodes d'hémorragie gastro-intestinale) comme étant un effet secondaire dû au traitement dans ce contexte (Chalhoub et al., 2012).

Concernant les crises convulsives objectivées dans ces deux études, il est difficile de conclure sur l'implication de la darbépoétine dans la survenue des crises sachant également que la maladie rénale étant responsable de l'augmentation de l'urémie, et qu'une azotémie peut engendrer une encéphalopathie hypertensive et donc des crises convulsives (Chalhoub et al., 2012; Fiocchi et al., 2017). En outre, tous les animaux ayant eu des crises présentaient une azotémie modérée à sévère et un stade IRIS III à IV (Chalhoub et al., 2012).

Etant donné qu'un seul individu a présenté une insuffisance cardiaque et que les cardiopathies sont fréquentes dans l'espèce féline, il est impossible de conclure à un lien entre les injections de darbépoétine et le développement de troubles cardiaques sans études supplémentaires attestant de l'existence de ce lien (Chalhoub et al., 2012).

Une étude chez le chien soutient même le contraire en avançant qu'un traitement à la darbépoétine à la dose de 1 µg/kg une fois par semaine par voie SC préviendrait le dysfonctionnement et la dilatation progressifs du ventricule gauche chez les chiens non anémiques souffrant d'une insuffisance cardiaque avancée. L'étude a été réalisée sur quatorze chiens répartis en deux groupes, l'un traité à la darbépoétine, l'autre non, et cela pendant trois mois (Rastogi et al., 2008).

Tableau 7 : Effets indésirables suspectés de la darbépoétine chez les carnivores domestiques (d'après Chalhoub et al., 2012a; E. H. Fiocchi et al., 2017)

EFFETS INDESIRABLES	COMMENTAIRE	ESPECE
HYPERTENSION	Peut être dû à la MRC	Chat - Chien
VOMISSEMENTS	Peut être dû à la MRC	Chat - Chien
CRISES CONVULSIVES	Peut être dû à la MRC	Chat - Chien
HEMORRAGIE GASTRO-INTESTINALE	Peut être dû à la MRC	Chat
INSUFFISANCE CARDIAQUE	Très peu d'individus concernés	Chat
ERYTHROBLASTOPENIE	Parfois suspectée, peu/pas testée	Chat - Chien

Le tableau ci-dessus relate des effets indésirables recensés en médecine vétérinaire concernant les carnivores domestiques en MRC ayant reçu un traitement à la darbépoétine. Les effets secondaires sont classés par ordre de fréquence d'observation (les plus fréquents se retrouvent plus haut dans le tableau) et les espèces chez qui la fréquence d'observation est la plus importante sont mises en gras. Nous manquons encore de recul quant à l'évaluation des effets secondaires de la darbépoétine chez les carnivores domestiques. En effet, une incertitude persiste encore sur bon nombre d'entre eux pouvant être attribués à d'autres maladies comme la MRC (Chalhoub et al., 2012; Fiocchi et al., 2017).

D. Présence d'anticorps anti-ESA : une cause d'échec au traitement

a. Concept d'érythroblastopénie (PRCA)

- *Principe et définition*

L'érythroblastopénie est l'un des effets indésirables les plus graves des ESAs et se produit généralement après cinq à 38 semaines de traitement, avec une médiane de 14 semaines et demie, et ce après une période de réponse au traitement. (Chalhoub et al., 2012; Cowgill et al., 1998; Randolph et al., 2004b).

Certains patients ayant reçu plusieurs administrations d'un même ESA dans le cadre du traitement de leur anémie ont développé des anticorps anti-ESA, en médecine humaine comme en médecine vétérinaire (Chalhoub et al., 2012). En effet, les ESAs n'étant pas une reproduction à l'identique de l'EPO endogène, une réponse immunologique inappropriée se met en place chez certains individus. L'ESA est reconnu comme un antigène qu'il faut éliminer de l'organisme (Susantad et al., 2021).

Les patients présentant cette allo-immunité présentent alors une érythroblastopénie aussi appelée Pure Red Cell Aplasia en anglais (PRCA). Il s'agit d'une réticulocytopenie sévère due à une réduction marquée voire à une absence d'érythroblastes, sans pour autant qu'il n'y ait d'anomalie des autres lignées sanguines. Ce phénomène est responsable de la survenue d'une anémie sévère, normochrome, normocytaire et arégénérative (Lobbes, 2023; Sia et al., 2020).

La durée de la persistance des anticorps dans le sang est variable selon les individus et les patients deviennent dépendants des transfusions sanguines pendant toute la durée de leur anémie (Chalhoub et al., 2012; Cowgill, 1992).

- *Mécanisme immunologique*
 - Rappels sur l'immunité adaptative humorale

La réponse immunitaire adaptative contre un antigène étranger à l'organisme (ou considéré comme tel) est déclenchée lorsque celui-ci persiste dans l'organisme et résiste à la réponse immunitaire innée (Susantad et al., 2021).

Des cellules sentinelles, situées dans les tissus périphériques, prennent en charge cet antigène et vont aller le présenter sous forme de peptide antigénique associé aux molécules du CMH pour activer les lymphocytes T. Ces lymphocytes T, notamment les LT CD4+ vont ensuite aller interagir avec les LB pour stimuler la production d'anticorps (Susantad et al., 2021).

Un anticorps peut avoir un effet direct en neutralisant un antigène, ou indirect en faisant intervenir la cascade protéique du complément pour éradiquer cet antigène ou activer d'autres cellules inflammatoires (Toskala, 2014).

Les anticorps ou immunoglobulines sont des glycoprotéines composées de polypeptides et de glucides. Ils sont sécrétés par les cellules B activées grâce au contact avec les LT CD4+ et les cytokines qu'ils produisent (Toskala, 2014). Toutes les molécules d'immunoglobuline sont constituées de deux chaînes lourdes identiques et de chaînes légères (kappa ou lambda) dont la séquence d'acides aminés varie d'un anticorps à l'autre. C'est la juxtaposition de ces chaînes qui crée une loge dans laquelle vient se lier l'antigène (Toskala, 2014).

Au sein des chaînes lourdes et légères, il existe une partie constante qui est la même pour chaque sous-classe d'anticorps ou isotype. Les régions constantes de la chaîne lourde s'associent pour former le domaine Fc de la molécule. Elle permet notamment la liaison aux récepteurs Fc présents sur des cellules immunitaires de l'organisme, mais aussi l'activation du complément. La partie variable des chaînes légères est, comme son nom l'indique, variable et spécifique de chaque antigène (Toskala, 2014).

Il existe plusieurs isotopes d'anticorps différents. Un isotype partage la même modification de chaîne lourde ayant lieu pendant une étape nommée « commutation isotypique ». Les anticorps les plus fréquemment rencontrés et également ceux qui nous intéressent ici, sont d'isotype IgG (Toskala, 2014).

Les lymphocytes B spécifiques de l'antigène se différencient ensuite soit en plasmocytes capables de produire des anticorps comme énoncé précédemment, soit en lymphocytes B mémoires, sentinelles responsables de la surveillance de la survenue de futurs antigènes au sein de l'organisme. A la rencontre d'un nouvel antigène identique à celui préalablement rencontré, les cellules mémoires sont ainsi capables de stimuler plus rapidement la production d'immunoglobulines spécifiques (Toskala, 2014).

□ La darbépoétine, un antigène

Dans de rares cas, le mécanisme détaillé ci-dessus est responsable de la production d'anticorps anti-darbépoétine lors d'une reconnaissance de la darbépoétine comme du non-soi, déclenchant une réponse humorale médiée par l'intervention des lymphocytes B dans le cadre du déploiement d'une réponse immunitaire adaptative (Casadevall, 2005; Toskala, 2014).

En médecine humaine, la présence de ces anticorps neutralisants au sein de l'organisme inhibe à la fois l'activité érythropoïétique des ESAs, mais également celle de l'EPO endogène. Ce phénomène est donc directement et indirectement délétère pour l'organisme. En effet, il s'oppose à l'augmentation des taux en EPO en contrecarrant l'effet attendu du médicament administré mais également via un mécanisme d'auto-immunité car la structure de l'EPO endogène est assez proche de la darbépoétine pour être également reconnue par les anticorps neutralisants et éliminée de l'organisme (Casadevall, 2005; Sia et al., 2020).

- *Démarche diagnostique*

En médecine humaine, lors d'une suspicion d'érythroblastopénie due à la présence d'anticorps neutralisants, il est important de la confirmer en laboratoire via des tests cytologiques. Pour cela, on réalise alors un myélogramme couplé à un test spécifique. Lors d'une confirmation diagnostique, ce myélogramme démasque un taux faible voire une absence de précurseurs érythroïdes. Ensuite, on réalise un test validé de mise en évidence de présence d'anticorps anti-EPO dans le sérum du patient, qui doit impérativement s'avérer positif pour conclure à une érythroblastopénie due à la présence d'anticorps (Casadevall, 2005).

Ce dernier test spécifique de mise en évidence d'anticorps n'est pas toujours disponible en médecine vétérinaire. En effet, il n'est pas disponible chez le chat dans le cas de la darbépoétine d'après nos connaissances et fait ainsi l'objet de cette thèse.

b. Comparaison de L'EPO endogène féline à l'EPO humaine

Comme évoqué ci-dessus, une différence entre les séquences des érythropoïétines féline et humaine pourrait être à l'origine d'une réponse immunitaire inappropriée de l'organisme vis-à-vis du médicament soit de la darbépoétine. Il est donc intéressant de comparer les séquences protéiques de ces deux érythropoïétines de manière à obtenir un pourcentage d'homologie de séquences.

On pense que cette absence d'homologie de séquence est à l'origine de l'augmentation du taux d'érythroblastopénie chez les animaux par rapport à celui des humains (Wen et al., 1993).

A l'aide de l'outil « BLAST » de la plateforme Pubmed, il est possible de réaliser un alignement de séquences protéiques pour les comparer et identifier le pourcentage de similitude. C'est donc ce que j'ai fait.

Toujours à l'aide de l'outil « BLAST » de la plateforme Pubmed, nous avons pu comparer le pourcentage de similitude entre la séquence protéique de la darbépoétine et les séquences protéiques des érythropoïétines humaine, féline et canine. Les résultats sont énoncés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Comparaison interspécifique de séquences protéiques d'EPO endogènes puis comparaison à celle de la darbépoétine (d'après ("NCBI Blast erythropoietin Canis lupus familiaris," n.d.; "NCBI Blast erythropoietin Felis catus," n.d.; "NCBI Blast erythropoietin Homo sapiens sapiens," n.d.)

Protéine de référence	Protéine comparée	Homologie de séquence
EPO endogène humaine	EPO endogène féline	77,72 %
EPO endogène humaine	EPO endogène canine	80,84 %
EPO endogène humaine	Darbépoétine	96,89 %
EPO endogène féline	Darbépoétine	82,90 %
EPO endogène canine	Darbépoétine	80,72 %

En comparant la séquence protéique de l'EPO endogène féline avec celle de l'EPO endogène humaine, on constate une similarité de 77,72% ("NCBI Blast erythropoietin Felis catus," n.d.). La similarité de l'EPO endogène canine avec l'EPO endogène humaine est de 80,84% ("NCBI Blast erythropoietin Canis lupus familiaris," n.d.).

En comparant ensuite la séquence protéique de la darbépoétine avec celle de l'EPO endogène humaine, on constate une similarité de 96,89%, soit un pourcentage d'homologie de séquence important. En revanche, lorsque l'on compare la séquence protéique de la darbépoétine avec celle de l'EPO endogène féline, on observe une similarité de 82,90 % seulement, soit environ quatorze points de moins. La comparaison de la séquence protéique de la darbépoétine avec celle de l'EPO endogène canine nous renvoie un résultat similaire avec une homologie de séquence de seulement 80,72% ("NCBI Blast erythropoietin Homo sapiens sapiens," n.d.). La séquence de la darbépoétine a été trouvée sur le site internet drugbank.com (Drugbank, 2015).

Dans la littérature, on retrouve également des données selon lesquelles l'homologie structurale (et non de séquence) de l'EPO féline avec l'EPO endogène humaine serait de 83,3% (Chalhoub et al., 2012). Concernant l'espèce canine, l'homologie structurale de l'EPO endogène canine avec l'EPO endogène humaine serait de 81,3% (MacLeod et al., 1998).

Contrairement à l'homologie de séquence, l'homologie structurale ne repose pas sur une similitude de séquence d'acides aminés mais sur une similitude quant à la structure tridimensionnelle d'une protéine par rapport à une autre. Elle est donc également importante à prendre en compte (Malbranke et al., 2021).

La présence d'anticorps anti-darbépoétine chez certains individus pourrait s'expliquer par la différence de séquences protéiques mise en évidence dans le tableau ci-dessus, ce qui justifie l'élaboration de notre protocole expérimental de mise au point d'un test sérologique visant à mettre en évidence la présence de ces anticorps chez les chats traités à la darbépoétine et potentiellement réfractaires au traitement (cf. partie expérimentale).

c. Application au traitement par les ESAs

- *Historique d'érythroblastopénie lors de traitement à la darbépoétine*
- En médecine humaine

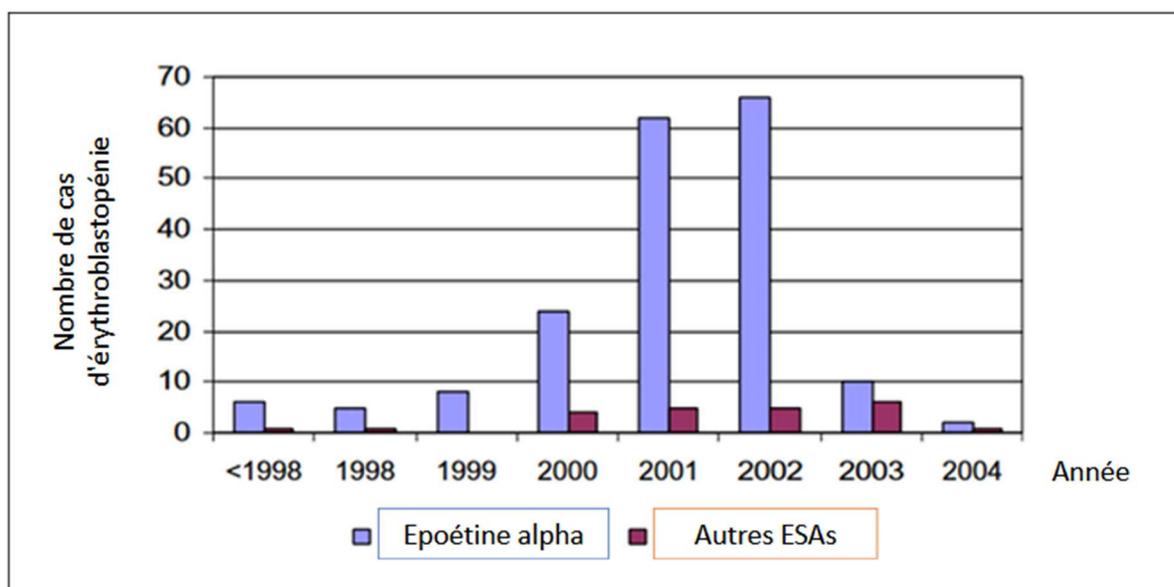
En médecine humaine, l'occurrence d'anticorps anti-darbépoétine est extrêmement rare. En effet, cela peut sembler logique car la darbépoétine est synthétisée à partir de l'EPO humaine (Chalhoub et al., 2012).

A priori, aucun anticorps anti-darbépoétine n'a pu être mis en évidence chez l'Homme jusqu'en 2003 (Casadevall, 2003). Plus récemment, quelques cas sporadiques de personnes atteintes d'érythroblastopénie médiée par des anticorps anti-darbépoétine ont été détectés dans la littérature (Padhi et al., 2020; Sia et al., 2020). Cependant, il s'agit de très rares cas. En effet, par exemple, dans une étude dans laquelle 121 patients atteints de MRC ont été traités à la darbépoétine pendant un an, aucun patient n'a eu de symptôme d'érythroblastopénie et aucun anticorps anti-darbépoétine n'a été trouvé malgré des recherches systématiques effectuées sur chaque patient en fin de traitement. Il s'agirait donc d'un phénomène déjà observé mais très rare chez l'Homme (Sinha et al., 2021).

Prenons l'exemple d'un cas rapporté : une femme 63 ans atteinte de MRC a été traitée par la darbépoétine par voie SC pendant dix mois. Une hausse du taux d'hémoglobine a été observée en début de traitement puis des signes d'anémie sont apparus au bout de ces dix mois. Des analyses sanguines ont révélé l'absence de précurseurs érythroïdes, ce qui a conduit au diagnostic d'érythroblastopénie. Des analyses sérologiques réalisées par radio-immunoprécipitation ont ensuite révélé la présence d'anticorps anti-darbépoétine dans le sérum de la patiente (Sia et al., 2020).

Moins de trois cents cas d'échecs de traitement dû à la présence d'anticorps anti-ESAs ont été recensés et confirmés à travers le monde, la plupart lors de traitements à l'époétine α . Ces cas ont majoritairement été décelés entre 1998 et 2002. Ainsi, à partir de 2003, une baisse importante du nombre de cas est notée (Chalhoub et al., 2012; Macdougall, 2005).

Figure 11 : Nombre de cas d'érythroblastopénie médiée par les anticorps anti-ESAs confirmés chez l'Homme, en fonction des années et des ESAs utilisés (modifié d'après Macdougall, 2005)



Les personnes développant une résistance à l'EPO et une anémie sévère après une période de réponse réussie au traitement par une époétine α présentent ensuite des diminutions caractéristiques du taux d'Ht ainsi que du nombre de réticulocytes circulants (Casadevall, 2005). Il a été montré que des anticorps anti-EPO neutralisants reconnaissent le noyau protéique de la molécule d'EPO chez ces patients (Casadevall, 2005).

Le fait de pouvoir reprendre un traitement après thérapie immunosuppressive dans les cas d'érythroblastopénie due à la présence d'anticorps anti-ESAs est encore débattu dans la littérature mais semble efficace pour environ 70% des patients (Casadevall, 2003; Macdougall, 2005). La greffe de rein est recommandée dans les autres cas. L'arrêt simple d'un traitement aux ESAs sans thérapie immunosuppressive est rarement efficace selon (Casadevall, 2003).

Selon une étude, l'augmentation de la signalisation de cas irait de pair avec le retrait de l'albumine de sérum humain de la formulation de l'époétine α , dans le but de se conformer aux nouvelles réglementations des autorités réglementaires européennes. Ces nouvelles formules seraient moins stables et permettraient la formation d'anticorps anti-époétines (Casadevall, 2003).

Une hypothèse selon laquelle la voie d'administration SC serait plus immunogène que la voie d'administration IV a été émise car c'est ce qui semblait avoir été rapporté. Le gouvernement a donc demandé que tous les patients éligibles à cette thérapie aient une voie d'administration IV et non SC. À la suite de cette recommandation, le nombre de cas de PRCA dû à la présence d'anticorps anti-époétine a drastiquement diminué (Macdougall, 2005).

A l'heure actuelle, il n'est pas encore possible de prédire quels patients développeront une érythroblastopénie ou à quel moment de leur traitement celle-ci sera susceptible de se développer (Casadevall, 2005). En revanche, des tests capables de détecter les anticorps anti-darbépoétine ont été développés en médecine humaine (Chalhoub et al., 2012; Mytych et al., 2009).

□ Chez les carnivores domestiques

Chez les chats traités à l'époétine, la prévalence de l'érythroblastopénie est d'environ 25 à 30 % (Chalhoub et al., 2012). En raison de cette prévalence élevée, des chercheurs ont tenté de trouver une alternative pour stimuler l'érythropoïèse chez les chats souffrant de MRC. Comme énoncé précédemment, ils ont synthétisé l'EPO féline recombinante, mais finalement la prévalence de l'érythroblastopénie n'a pas été substantiellement réduite chez les chats testeurs (Chalhoub et al., 2012; Randolph et al., 2004b).

Dans l'étude précédemment citée portant sur l'efficacité de la darbépoétine chez le chat, l'absence de test définitif pour l'érythroblastopénie nous empêche de déterminer avec certitude sa prévalence au sein des 26 chats de l'étude. Un diagnostic présumé d'érythroblastopénie est cependant envisageable sur deux chats de l'étude non répondeurs chez qui aucune autre cause n'a permis d'expliquer cette absence de réponse (Chalhoub et al., 2012). La prévalence d'érythroblastopénie lors de traitement de chats à la darbépoétine serait proche de 10% selon les auteurs soit moins importante que lors de l'utilisation d'époétines α ou β (Chalhoub et al., 2012). Elle serait d'environ 6% chez le chien (Fiocchi et al., 2017).

Dans une étude datant de 1998 sur l'efficacité de l'époétine α chez les carnivores domestiques, cinq des sept chats et deux des trois chiens suivis pendant plus de 90 jours ont développé une anémie réfractaire attribuée à de potentiels anticorps anti-époétine α (Cowgill et al., 1998). En effet, il est montré dans cette étude que des anticorps dirigés contre l'EPO endogène se sont formés chez environ la moitié des chiens sains recevant de l'époétine α . Le fait que les anticorps soient dirigés contre l'EPO endogène de ces chiens nous laisse suspecter un mécanisme d'auto-immunité engendré par la présence du médicament. Par ailleurs, une anémie cliniquement apparente ne s'est mise en place que chez 33% des chiens ayant développé ces anticorps (Chalhoub et al., 2012; Cowgill et al., 1998).

Globalement, toutes les études sur le sujet manquent de pouvoir statistique en raison de la faible taille des échantillons. De plus, la confirmation d'érythroblastopénie par myélogramme est très rarement réalisée dans ces études, même si son interprétation reste dépendante des auteurs. En effet, il y a actuellement peu de consensus sur la définition de l'érythroblastopénie via le myélogramme chez les carnivores domestiques (Chalhoub et al., 2012).

Il n'existe pas de test disponible dans le commerce pour révéler la présence d'anticorps anti-époétines chez les chats ou les chiens (Chalhoub et al., 2012). Il n'existe pas non plus de test permettant la détection d'anticorps anti-darbépoétine chez les carnivores domestiques, à notre connaissance.

d. Tests de détections des anticorps anti-darbépoétine

Il existe à l'heure actuelle plusieurs techniques en médecine humaine, capables de détecter des anticorps anti-époétine et anti-darbépoétine (Hoesel et al., 2004; Mytych et al., 2009). Les techniques les plus fréquentes sont abordées ci-après.

- *Le test SPR*

Un essai immunologique par biocapteur basé sur une technique de résonance plasmonique de surface (SPR) a été développé et validé pour détecter, semi-quantifier et caractériser les anticorps sériques dirigés contre la darbépoétine α (ARANESP) et l'époétine α (EPOGEN). Ce test SPR fonctionne grâce à une puce de détection recouverte de carboxyméthyl dextran. A l'aide de ce dispositif, la liaison des anticorps sériques aux protéines immobilisées sur la puce est détectée et enregistrée en temps réel. Une fois la liaison effectuée, un anticorps secondaire d'immunoglobuline humaine est ajouté au sein du dispositif pour attester de cette liaison. La concentration relative des anticorps des échantillons positifs est ensuite déterminée en utilisant un anticorps de lapin anti-époétine α purifié, comme contrôle de référence. Approximativement 80 échantillons de sérum peuvent être analysés simultanément sur chaque puce de détection et ce test peut détecter jusqu'au seuil minimal de 80 ng/ml et 100 ng/ml d'anticorps dirigés contre l'époétine α et la darbépoétine α , respectivement (Mytych et al., 2009).

En médecine humaine, chez des patients en érythroblastopénie, les anticorps anti-darbépoétine les plus retrouvés par cette méthode SPR sont les IgG1 et IgG4. En général, cela s'accompagne d'un taux d'anticorps de 1 $\mu\text{g/mL}$, soit bien au-dessus du seuil de détection (Mytych et al., 2009).

- *Le test par radio-immunoprécipitation*

La technique de radio-immunoprécipitation (RIP) permet la détection de ces anticorps anti-ESAs à partir d'un seuil de 8 ng/mL (Mytych et al., 2009). Ce test demande par ailleurs beaucoup de travail, ne permet pas de détecter les anticorps d'isotype IgM et manque également de spécificité (Mytych et al., 2009).

Il existe plusieurs déclinaisons validées de cette méthode. On peut par exemple utiliser de l'époétine α marquée à l'iode¹²⁵ et une suspension de *S. aureus*, qui contient de la protéine A, pour lier le complexe époétine α marqué à l'iode¹²⁵ ou l'anticorps anti-darbépoétine α (Mytych et al., 2009).

- *Le test ELISA*

La technique de ELISA permet la détection de ces anticorps anti-ESAs à partir de 1 ng/mL, un seuil un peu moins élevé que pour la méthode RIP (Mytych et al., 2009). De plus, cette méthode ELISA semble avoir une meilleure sensibilité que le test RIP car elle peut détecter une prévalence de 4% contre 0,14% pour le test RIP. Selon les auteurs, ce gain de sensibilité non négligeable est dû au fait que la méthode ELISA est capable d'identifier tous les isotypes d'anticorps possibles, contrairement à la technique RIP. Si l'on souhaite aller plus loin, il est également possible de connaître les isotypes les plus souvent impliqués grâce à cette méthode ELISA (Mytych et al., 2009).

Cette méthode ELISA est très largement utilisée et a été décrite par plusieurs auteurs pour l'analyse des anticorps anti-ESAs (Tacey et al., 2003; Voulgari et al., 2001). Cependant, l'inconvénient majeur des méthodes ELISA réside en la nécessité de réaliser de multiples étapes de lavage pouvant entraîner une perte ou une sous-estimation des anticorps faiblement liés ou se dissociant trop rapidement (Mytych et al., 2009).

La méthode ELISA est celle que nous avons choisi de développer au sein de cette thèse afin de tenter de mettre en évidence la présence d'anticorps anti-darbépoétine chez les chats réfractaires au traitement à la darbépoétine.

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

L'objectif de cette thèse vétérinaire était de mettre en évidence la présence d'anticorps-anti-darbépoétine chez le chat atteint d'anémie secondaire à une maladie rénale chronique, à qui de la darbépoétine a été administrée dans le but de corriger cette anémie. En effet, une grande partie des chats traités à la darbépoétine (environ 50% au CHUV-AC) répond mal à ce traitement, l'anémie persistant. D'après les observations des cliniciens, les injections de darbépoétine n'entraînent pas systématiquement une augmentation de l'Ht chez les individus traités. Cette persistance de l'anémie malgré l'initiation d'un traitement à la darbépoétine chez les carnivores domestiques, est également soulignée par plusieurs auteurs dans la littérature (Chalhoub et al., 2012; Fiocchi et al., 2017). Notre hypothèse est qu'il existerait des anticorps anti-darbépoétine, neutralisant ainsi le médicament et son effet, le rendant inefficace chez une grande proportion des sujets traités.

A. Choix du test ELISA

Pour mettre en évidence la présence de tels anticorps dans ce contexte, il nous a été nécessaire de développer un nouveau test sérologique à façon ou sur-mesure afin de pouvoir détecter ces anticorps dans le sérum de chat car aucun kit n'est disponible dans le commerce.

Le test sérologique choisi pour cette thèse est l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en raison de sa sensibilité supérieure à celle des autres techniques diagnostiques. L'ELISA permet de détecter de très faibles quantités d'anticorps, ce qui aurait été problématique avec l'immunoprécipitation. Les techniques réalisables uniquement en milieu non soluble comme l'immunofluorescence ont été exclues, étant donné que nous avons à notre disposition des échantillons sanguins. L'ELISA est également plus économique et automatisable, facilitant la création de tests rapides pour une utilisation clinique. De plus, l'ELISA est une méthode qui présente également une bonne spécificité. Le test développé dans cette thèse est adapté d'un test ELISA mis au point dans une autre étude qui visait à mesurer des IgG et des IgM anti-*Toxoplasma gondii* chez des chats (Le Roux et al., 2020).

B. Description du test ELISA indirect

L'objectif du test ELISA indirect est de révéler la présence d'anticorps anti-antigène spécifique. La technique de l'ELISA indirect nécessite l'utilisation de puits au fond desquels sont fixés des antigènes spécifiques. Dans notre cas, il s'agit de la darbépoétine.

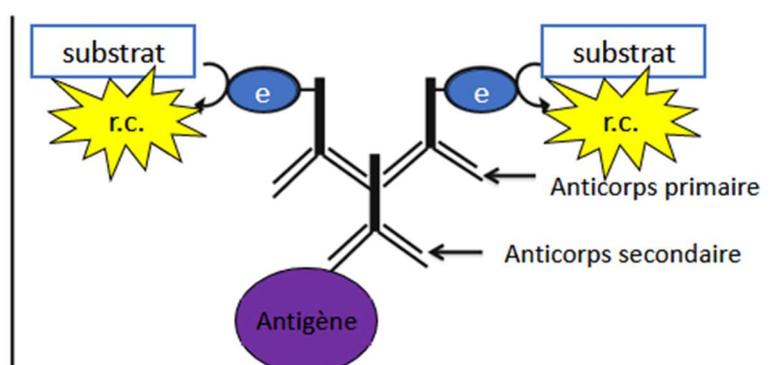
Un sérum contenant potentiellement des anticorps anti-antigène spécifique est ensuite versé dans les puits, ce qui permet aux anticorps présents dans le sérum de se fixer à leur antigène spécifique au fond des puits. Une étape de lavage est ensuite nécessaire pour éliminer tout ce qui aurait pu se fixer de manière aspécifique au fond des puits (Lin, 2015).

Ensuite, un anticorps secondaire spécifique d'espèce couplé à une enzyme est ajouté au fond des puits. En effet, cette spécificité d'espèce permet aux anticorps secondaires de se fixer sur la partie Fc des anticorps primaires. Une nouvelle étape de lavage est de nouveau nécessaire après cette nouvelle fixation, dans le même but que celle réalisée précédemment (Lin, 2015).

Puis, le substrat relatif à l'enzyme fixée sur l'anticorps secondaire est ensuite ajouté pour produire une réaction colorimétrique proportionnelle à la quantité d'anticorps primaire présente dans les puits. L'intensité de cette réaction colorimétrique est mesurable et peut être ensuite corrélée à une concentration en anticorps (Lin, 2015).

C'est la densité optique (DO) qui est mesurée par spectrophotométrie et qui quantifie l'intensité de la réaction. En effet, plus l'intensité de la réaction est importante, plus le titre en anticorps du sérum d'intérêt est important. La mesure de la DO est proportionnelle à la concentration en anticorps anti-antigène soit ici en anticorps anti-darbépoétine, ce qui en fait un test quantitatif en médecine humaine. Cependant, nous nous appuyons ici sur une gamme étalon humaine en médecine vétérinaire, ce qui en fait un test semi-quantitatif (Lin, 2015).

Figure 12 : Schématisation de la technique de l'ELISA indirect (Lin, 2015)



La figure ci-dessus illustre une schématisation de la technique de l'ELISA indirect expliquée ci-dessus. Le « e » situé au sein du cercle bleu représente l'enzyme et « r.c. » la réaction colorimétrique ayant lieu lors de la mise en contact du substrat et de son enzyme spécifique. Le cadre noir représente le puit d'une plaque ELISA dans lequel l'expérience s'effectue (Lin, 2015).

2. Matériels et méthodes

A. Echantillonnage

Au cours de cette étude, trois sérums de chats diagnostiqués comme atteints de MRC et anémiés ayant reçu une à plusieurs injections de darbépoétine ont été testés, ainsi que des sérums de chats témoins non diagnostiqués en MRC ou atteints d'anémie, et n'ayant pas reçu d'injection de darbépoétine.

a. Sérums de chats témoins

Les chats témoins proviennent d'une banque de sérums de chats disponible à l'UMR BIPAR, récoltés à la suite d'une étude publiée en 2020 (Le Roux et al., 2020). Parmi les chats témoins, il y a donc des sérums de chats possédant des anticorps de type IgG mais dirigés contre les antigènes du parasite *T. gondii* à la suite d'un test d'épreuve (témoin positif Toxo+) ou dépourvu d'IgG anti-*T. gondii* (témoin négatif Toxo-). Il s'agit de chats femelles dont les numéros de référence sont respectivement le 1894 (témoin positif Toxo+) et le 1523 (témoin négatif Toxo-) (Le Roux et al., 2020).

b. Sérums d'intérêt

Les échantillons testés sont des sérums de chats qui ont reçu de la darbépoétine avant le prélèvement sanguin. Ils sont au nombre de trois au sein de cette thèse. Les noms et numéros de dossiers ne sont pas révélés pour les chats de propriétaires ayant souhaité conserver l'anonymat. Il s'agit de W (A09-5970), X (A23-2XX6) et Y (A23-1XX5). Ces chats ont tous présenté une baisse de leur hématoците prolongée due à une MRC, ayant motivé la réalisation de plusieurs injections de darbépoétine.

- *Classement des échantillons d'intérêt*

Concernant le classement des chats en tant que répondeurs ou non répondeurs au traitement, une augmentation de l'hématoците d'au moins 10 points à la suite de l'administration du traitement à la darbépoétine semble être le critère le plus efficace pour différencier les répondeurs des non répondeurs d'après la thèse d'Antoine Vassal sur l'utilisation de la darbépoétine en milieu vétérinaire (Vassal, 2020). Un autre critère est utilisé dans la littérature et indique que tous les chats atteignant ou dépassant 25 % d'hématoците sont considérés répondeurs mais il semble moins robuste que le premier critère d'après l'étude rétrospective menée par Antoine Vassal.

En effet, selon cette étude, l'augmentation de l'hématocrite semble être un facteur plus fiable que le dépassement d'une valeur seuil pour statuer sur la réponse au traitement. Il s'agit du seul critère permettant d'objectiver une différence significative du taux de survie entre les animaux répondeurs et non répondeurs (Vassal, 2020). C'est donc le premier critère qui a été retenu pour classer les trois chats d'intérêts de notre étude.

- *Description des chats d'intérêt*

W (A09-5970) est un chat sacré de Birmanie femelle stérilisée de 16 ans et demi suivi au CHUV-AC pour une persistance d'anémie dans un contexte de MRC de stade IRIS III. Elle a un antécédent de pyélonéphrite datant de septembre 2021, soit un an avant son intégration à l'étude. Elle est également atteinte d'une cardiomyopathie de stade ACVIM B1.

Au total, W a été traitée trois fois à la darbépoétine d'après nos relevés : une première fois au moment de son hospitalisation pour pyélonéphrite, une seconde fois quelques mois plus tard à partir de juin 2022 pour persistance d'une anémie associée à son MRC et une troisième fois à partir du 1^{er} décembre 2022 pour le même motif. C'est lors de la dernière initiation de traitement à la darbépoétine le 1^{er} décembre 2022, que des prélèvements sanguins ont été réalisés pour nos expériences.

Par ailleurs, W a reçu une complémentation en fer (COFAFER ND) par injection intramusculaire de 50 mg le 18/09/2021, soit trois jours avant l'initiation de son premier traitement à la darbépoétine. Le 21/09/2021, jour d'initiation du traitement à la darbépoétine, la SAA de W est mesurée à plus de 150 mg/L, traduisant d'une inflammation importante au sein de l'organisme. Neuf jours plus tard, le 30/09/2021, l'inflammation créée par la pyélonéphrite semble nettement améliorée, la SAA étant revenue dans les normes de l'espèce.

X (A23-2XX6) est un chat Maine Coon mâle castré de quatre ans et demi suivi au CHUV-AC pour une urétrostomie dans un contexte d'obstruction du bas appareil urinaire. Il est par ailleurs également atteint de cardiomyopathie restrictive et d'une MRC débutante visible échographiquement. Au moment de son intégration à l'étude, il est hospitalisé au service de médecine interne et reçoit également du clopidogrel à 18,75 mg/j, du pimobendane et du furosémide d'abord à 0,9 mg/kg/j puis à 0,45 mg/kg/j, de la méthadone, de la buprénorphine, du maropitant à 1 mg/kg/j, du métoprolol à 0,3 mg/kg TID et de l'ampicilline sulbactan à 20 mg/kg TID en plus des injections de darbépoétine.

X n'avait jamais été traité à la darbépoétine avant d'être intégré à notre étude.

Y (A23-1XX5) est un chat européen mâle castré de neuf ans suivi au CHUV-AC pour une dérivation pyélo-vésicale à droite et une triade féline (pancréatite, cholangite, cholécystite). Il est par ailleurs atteint de MRC débutante visible échographiquement. Tout comme X, au moment de son intégration à l'étude, il est hospitalisé au service de médecine interne et reçoit également de la méthadone, de la buprénorphine, du maropitant à 1 mg/kg/j, de l'acide ursodésycolique à 20 mg/kg BID et de l'ampicilline sulbactan à 20 mg/kg TID et une fois de la dexaméthasone à 0,2 mg/kg en plus des injections de darbépoétine.

Y n'avait jamais été traité à la darbépoétine avant d'être intégré à notre étude.

- *Prélèvements des chats d'intérêt*

Ces chats ont été prélevés une à plusieurs fois au CHUV-AC entre le 1^{er} décembre 2022 et mars 2023 par prise de sang classique. Une méthode de centrifugation a ensuite été effectuée pour récupérer le sérum.

c. Validation de notre test ELISA «à façon» via l'utilisation du kit humain

- *Description de l'objectif de l'expérience du kit humain*

L'objectif de cette partie est de tester si notre « coating » des puits avec la darbépoétine achetée chez un fabricant américain (Creative Biomart, USA) fonctionne bien. Pour cela, il faut vérifier que des contrôles issus du kit Kribiolosa™ Darbepoetin ELISA (ARANESP) (KRISHGEN BioSystem, Inde) fonctionnent bien. Il faut également vérifier que ces contrôles fonctionnent aussi bien sur la plaque pré-coatée du kit (de concentration inconnue en darbépoétine) que sur la nôtre, coatée par nous-même.

Cette expérience constitue une référence pour l'établissement de notre ELISA voué à tester des échantillons de chats. En effet, les anticorps humains anti-darbépoétine des standards du kit doivent être capables de se lier aussi bien à la darbépoétine présente dans les puits du kit que dans les puits « coatés » par nous-même.

- *Préparation des standards de la gamme étalon – préparation commune à l'expérience du kit et à celle de notre ELISA « à façon »*

La solution standard correspond à du sérum humain comportant des anticorps anti-darbépoétine de concentration connue. Nous avons choisi de réaliser une gamme étalon sur chaque barrette du kit et chaque plaque de notre ELISA « à façon », en réalisant des dilutions successives de cette première solution mère. De cette manière, certains puits auront une quantité plus importante d'anticorps anti-darbépoétine que d'autres et nous pourrons comparer les résultats observés dans ces différents puits, sur chaque plaque.

Pour effectuer la préparation de ces différents standards, la poudre de sérum humain contenant des anticorps anti-darbépoétine a été resuspendue en y ajoutant de la solution de dilution des Standards (standard diluent) présente dans le kit de manière à obtenir une solution de standards correspondant à une concentration de 5 µg/mL en anticorps anti-darbépoétine, homogénéisée ensuite pendant 15 minutes. Il s'agit de la solution mère des solutions standards, la plus concentrée en anticorps anti-darbépoétine. Puis, une dilution a été effectuée au 2,5^{ème} de la solution mère à l'aide de la solution standard diluent pour obtenir une solution fille de 2µg/mL soit 2000 ng/mL.

De même, des dilutions en cascade de cette solution mère ont permis d'obtenir une gamme étalon à diverses concentrations de standards. Ces concentrations ont été réparties dans huit tubes 1,5mL (Eppendorf, France) précédemment identifiés. Les concentrations des différents standards sont les suivantes (en ng/mL) : 2000, 1000, 500 et 250.

B. Mise au point des protocoles de l'expérience du kit et de celle de l'ELISA « à façon »

a. Présentation du kit Kribiolosa™ Darbepoétin ELISA (ARANESP)

Il s'agit du kit KRIBIOLISA™ Darbepoétin ELISA (ARANESP) provenant du fabricant KRISHGEN Biosystems.

Le kit utilisé pour nos expériences est constitué d'une plaque de 96 puits dont les puits sont recouverts de darbépoétine à une concentration inconnue (non divulguée par le laboratoire), de sérums standards humains de concentrations connues comportant des anticorps anti-darbépoétine accompagnés de leur solution de dilution pour suspension spécifique, d'une solution de lavage Wash Buffer, d'une solution constituée d'anticorps secondaires anti-IgG humains couplés à la peroxydase de raifort (HRP) capable de se fixer aux anticorps anti-darbépoétine, d'une solution de révélation TMB, ainsi que d'une solution STOP pour figer cette réaction de révélation.

**Tableau 9 : Description des composants du kit KRIBIOLISA™ Darbepoetin ELISA
(ARANESP) fabriqué par KRISHGEN Biosystems**

COMPOSANT DU KIT	DESCRIPTION
PLAQUE COATEE A LA DARBEPOETINE	Plaque de 96 puits recouverts de darbépoéine à une concentration inconnue
SAMPLE DILUENT – SOLUTION DE DILUTION DES ECHANTILLONS	Base protéique tamponnée avec un conservateur au thiomersol (<0,01%) servant de solution de dilution pour nos échantillons d'intérêt (à diluer au 1000 ^{ème})
LYOPHILIZED STANDARDS – STANDARDS DE LA GAMME ETALON EN POWDRE	Poudre constituée d'anticorps anti-darbépoéine humains lyophilisés pour obtenir une solution concentrée à 5µg/mL si elle est correctement diluée avec la solution standard diluent, en suivant le protocole du kit
STANDARD DILUENT – SOLUTION DE DILUTION DES STANDARDS DE LA GAMME ETALON	Base protéique tamponnée avec du sérum humain dilué au 1000 ^{ème} et un conservateur au sodium azide (<0,01%) servant de solution de dilution pour les différents standards humains de la gamme étalon
WASH BUFFER – SOLUTION TAMPON DE LAVAGE	Solution 20 fois concentrée de surfactant tamponné avec un conservateur au thiomersol (<0,01%)
DARBEPOETIN HRP CONJUGATE – SOLUTION D'ANTICORPS SECONDAIRES HUMAINS COUPLES A UNE ENZYME HRP	Solution constituée d'anticorps secondaires humain couplés à une enzyme HRP ayant pour substrat le chromogène stabilisé présent dans la solution de révélation TMB
TMB SUBSTRATE – SOLUTION DE REVELATION TMB	Solution de chromogène stabilisé, substrat de l'enzyme couplée aux anticorps secondaires humains, servant de révélateur
STOP SOLUTION – SOLUTION STOP	Solution à l'acide sulfurique, stoppant la réaction colorimétrique de la solution de darbepoetin HRP conjugate avec celle de révélation TMB

Les concentrations des différents produits sont non divulguées par le laboratoire.

b. Présentation de notre « coating » pour l'ELISA « à façon » et du matériel associé

- *Présentation du matériel associé à l'ELISA « à façon »*

Le matériel de mise au point de notre ELISA « à façon » est décrit dans le tableau ci-dessous. Pour plus de clarté, le tableau est composé d'une colonne concernant le matériel ne provenant pas du kit utilisé précédemment, d'une colonne reprenant le matériel utilisé précédemment pour l'expérience inhérente au kit également utilisé pour l'ELISA « à façon » et la dernière colonne traite des échantillons qui sont testés dans les expériences où l'ELISA « à façon » est utilisé.

Tableau 10 : Matériel utilisé essentiel à la mise au point de l'ELISA « à façon » de recherche d'anticorps anti-darbépoétine

Matériel hors kit	Matériel du kit	Echantillons testés
<u>Matériel spécifique :</u> -1 mg de darbépoétine en poudre (médicament ARANESP)	-solution standard diluent -solution tampon coating Buffer -solution d'anticorps anti-IgG humains HRP -deux barrettes de huit puits coatées à la darbépoétine utilisées	<u>Echantillons humains contrôles :</u> -solutions de standards (première plaque ELISA)
<u>Eléments de notre laboratoire :</u> -solution de PBS -plaques de 96 puits -spectrophotomètre : MultiskanFC (Thermo Scientific, USA).		<u>Chats témoins (contrôles négatifs) du test « à façon » :</u> -chat toxo + -chat toxo –
<u>Solutions provenant d'autres laboratoires :</u> -albumine sérique bovine (BSA) en poudre pour préparation de solution de blocage PBS 1% de BSA (Sigma, USA)		<u>Echantillons d'intérêt :</u> -W (A9-5970) : deux prélèvements -X (A23-2XX6) : trois prélèvements -Y (A23-1XX5) : un prélèvement (seconde plaque ELISA)

-solution Wash Buffer PBS 1X et de 0,05% de Montanox20 (SEPPIC, France) -solution d'anticorps anti-IgG de chat HRP couplés à la peroxydase de raifort (anticorps Bio-Rad, France) -solution de révélation du kit Duoset Ancillary (R&D System, USA) -solutions stop du kit Duoset Ancillary (R&D System, USA)		
--	--	--

- *Préparation du « coating » de la plaque 96 puits pour l'ELISA « à façon »*

Pour recouvrir les puits de notre plaque ELISA avec de la darbépoétine, nous avons commencé par solubiliser la darbépoétine dans du PBS de manière à obtenir une solution mère en darbépoétine de 1 µg/mL. Ensuite, cette solution a été diluée à 10 µg/mL et à 5 µg/mL avec du PBS également. Ces solutions de darbépoétine diluées ont ensuite été déposées dans les puits de la plaque (100 µL/puit) puis laissées incuber à température ambiante pendant 18h.

Le lendemain, les standards ont été préparés puis distribués dans les puits précédemment « coatés » la veille par nous-même en darbépoétine (concentrée à 10 µg/mL ou à 5 µg/mL) ainsi que dans les puits de la plaque du kit pré-coatée par le fournisseur (une concentration inconnue en darbépoétine est présente dans ces puits).

- *Préparation des solutions de lavage, de contrôle, de blocage et de darbépoétine relative à la mise au point de l'ELISA « à façon ».*

En amont, tout comme pour l'expérience liée au kit, la solution de lavage Wash Buffer de notre ELISA « à façon » a été préparée. Il s'agit d'une solution constituée de PBS 1X et de 0,05% de Montanox20 (SEPPIC, France).

Une solution uniquement constituée de PBS 1X a été choisie pour remplir les puits contrôles. Il s'agit d'un tampon salin, censée ne réagir avec rien de notre expérience.

Une solution de blocage de PBS additionnée de 1% d'albumine sérique bovine (BSA) a été préparée puis homogénéisée grâce à une solution de PBS et de la BSA en poudre, préalablement conservée au réfrigérateur à 4°. La BSA sert à bloquer les sites de fixation aspécifiques des anticorps. Elle sert donc à éliminer le bruit de fond lié à ces fixations aspécifiques.

c. Plans de plaques

- *Etablissement d'un plan de plaque pour l'expérience relative au kit*

Figure 13 : Plan de plaque pour l'expérience relative au kit

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0										
B	62,5	62,5										
C	125	125										
D	250	250										
E	500	500										
F	1000	1000										
G	2000	2000										
H												

Les puits grisés sont ceux dans lesquels rien n'a été mis, ils sont restés vides. Les chiffres rattachés aux autres puits correspondent à la concentration de solution standard placée dans chaque puit. Cette plaque ELISA provenant du kit, tous les puits sont déjà « coatés » avec de la darbépoétine à une concentration inconnue. Comme visualisable sur le plan ci-dessus, seulement deux barrettes de huit puits de cette plaque ont été utilisés.

- *Etablissement d'un plan de plaque pour l'expérience relative à l'ELISA « à façon » - expérience 1*

Sur une plaque 96 puits, nous avons réalisé 18 puits de darbépoétine concentrée à 10 µg/mL (D10) (9x2 car des duplicatas ont été réalisés) et cinq puits de darbépoétine à 5 µg/mL (D5) (un seul duplicata a été réalisé, car les erreurs de pipetage n'ont pas suffisamment été prises en compte pour en réaliser un second). Pour mieux comprendre la répartition des puits, se référer au plan de plaque ci-dessous.

Pour chaque puit testé avec de la darbépoétine, un puit contrôle rempli du même volume de PBS a été réalisé. Pour mieux comprendre la répartition des puits, se référer au plan de plaque. Nous avons laissé la darbépoétine se fixer dans les puits toute la nuit soit pendant 18h à 4°C au réfrigérateur du laboratoire.

Figure 14 : Plan de plaque pour la réalisation de l'expérience 1 de l'ELISA « à façon »

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	CT tox-	CT tox-	CT tox-	CT tox-				
B	62,5	62,5	62,5	62,5	CT tox+	CT tox+	CT tox+	CT tox+				
C	125	125	125	125								
D	250	250	250	250	250	250	250					
E	500	500	500	500	500	500	500					
F	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000					
G	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000					
H												
	PBS	PBS	D10	D10	PBS	PBS	D5	D5				

La figure ci-dessus représente un plan de plaque caractérisé à partir d'une plaque de 96 puits. Les puits grisés sont ceux dans lesquels rien n'a été mis, ils sont restés vides ou non interprétés. Les chiffres rattachés aux autres puits correspondent à la concentration de solution standard placée dans chaque puit et aux échantillons testés (ici sérums de chat toxo + et toxo -).

Dans les colonnes 1, 2, 5 et 6, a été placé de l'eau saline au lieu de la darbépoétine. Il s'agit de notre contrôle négatif ; Dans les colonnes 3 et 4, de la darbépoétine à 10 µg/L a été fixée au fond des puits ; Dans les puits D7, E7, F7 et G7 de la darbépoétine à 5 µg/L a été fixée au fond des puits. Dans les puits D8, E8, F8 et G8 de la darbépoétine à 5 µg/L a également été fixée au fond des puits mais nous avons manqué de solution standard pour réaliser l'expérience jusqu'au bout, ils ne sont donc pas interprétés, considérés comme vides ; Dans les puits A5, A6, A7 et A8 a été déposé le sérum d'un chat témoin ne produisant pas d'anticorps anti-toxoplasmose (tox-). Dans les puits B5, B6, B7 et B8 a été déposé le sérum d'un chat témoin produisant des anticorps anti-toxoplasmose (tox+). Ces chats témoins jamais exposés à la darbépoétine ne produisent normalement pas d'anticorps anti-darbépoétine et servent également de contrôle négatif, par rapport à l'expérience réalisée sur les échantillons de chats exposés à la darbépoétine.

- *Etablissement d'un plan de plaque pour l'expérience relative à l'ELISA « à façon » - expérience 2*

Une deuxième expérience ELISA a été nécessaire dans le but de réduire le bruit de fond constaté lors de la première expérience (cf. infra). C'est sur celui-ci que nos échantillons d'intérêt ont été testés. Un nouveau plan de plaque correspondant à cette nouvelle expérience a donc été établi comme présenté ci-dessous et les sérums des chats ont été ajoutés.

Figure 15 : Plan de plaque pour la réalisation de l'expérience 2 de l'ELISA « à façon »

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0	0	0	0	CT tox-	CT tox-	CT tox-	CT tox-
B	62,5	62,5	62,5	62,5	CT tox+	CT tox+	CT tox+	CT tox+
C	125	125	125	125	X (A23-2XX6) T0	X (A23-2XX6) T0	X (A23-2XX6) T0	X (A23-2XX6) T0
D	250	250	250	250	X (A23-2XX6) T- 1inj/J-7	X (A23-2XX6) T- 1inj/J-7	X (A23-2XX6) T- 1inj/J-7	X (A23-2XX6) T- 1inj/J-7
E	500	500	500	500	X (A23-2XX6) T- 3inj/J-21	X (A23-2XX6) T- 3inj/J-21	X (A23-2XX6) T- 3inj/J-21	X (A23-2XX6) T- 3inj/J-21
F	1000	1000	1000	1000	W (A09-5970) T0	W (A09-5970) T0	W (A09-5970) T0	W (A09-5970) T0
G	2000	2000	2000	2000	W (A09-5970) T- 1inj/J-15	W (A09-5970) T- 1inj/J-15	W (A09-5970) T- 1inj/J-15	W (A09-5970) T- 1inj/J-15
H					Y (A23-1XX5) T- 2inj/J-20	Y (A23-1XX5) T- 2inj/J-20	Y (A23-1XX5) T- 2inj/J-20	Y (A23-1XX5) T- 2inj/J-20
	PBS	PBS	D5	D5	PBS	PBS	D5	D5

d. Protocoles expérimentaux relatifs aux expériences du kit et de l'ELISA « à façon »

- *Protocol expérimental relatif au kit*
- Incubations et lavages successifs

Les solutions standards à différentes concentrations ont été déposées dans les puits (100 µL/puit) de chaque plaque selon le plan de plaque indiqué en figure 13 et 14. Ensuite, ces plaques ont été incubées pendant 60 minutes à 37°C.

Après l'incubation, des étapes de lavages avec le Wash Buffer et le laveur automatique présent au BioPole ont été réalisées afin d'enlever les anticorps en excès.

Après ces étapes de lavages, l'anticorps secondaire présent dans le kit a été préparé (si besoin) puis distribué dans les puits (100ul/puits) des deux plaques, les standards utilisés étant des sérums contenant des anticorps humains. Ces plaques ont été à nouveau incubées à 37°C pendant 60 minutes.

Après une heure d'incubation, la plaque a été récupérée, son contenu vidé dans l'évier comme décrit précédemment, puis lavée sur le même schéma que précédemment. Ainsi, le conjugué HRP libre a été éliminé par lavage.

□ Révélation et lecture des résultats

Pour révéler la présence d'anticorps anti-darbépoétine, une solution de TMB a été ajoutée dans chaque puit testé et la plaque a été placée dans un placard à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. Une coloration bleutée est ensuite apparue à différentes intensités au sein de la gamme étalon, créée par les diverses concentrations de standards. Une solution stop a alors été ajoutée pour fixer la réaction, faisant virer le bleu au jaune mais ne modifiant pas l'intensité de la couleur.

La lecture des plaques a eu lieu conformément à la notice du kit, 30 minutes après l'addition de la solution stop, via une mesure d'absorbance à 450 nm.

- *Protocol expérimental relatif à l'ELISA « à façon »*

□ Incubations et lavages successifs

La plaque ELISA incubée au réfrigérateur à 4°C a été ensuite sortie et quatre lavages successifs ont été réalisés avec la solution Wash Buffer ELISA (de couleur jaune) préalablement préparée la veille, comme décrit pour le kit.

Après chaque lavage, les plaques ont été bloquées avec la solution de blocage constituée de PBS 1X et de 1% de BSA (Sigma, USA), dans chaque puit, puis laissées incuber 60 minutes à température ambiante.

Ensuite, après un nouveau cycle de lavages, les solutions de standards ont été réparties dans les puits en utilisant la bonne concentration pour chaque puit, conformément au plan de plaque préétabli. Les échantillons de chats témoins (tox+ et toxo -) et les échantillons de chats d'intérêt ont été respectivement dilués au 200^{ème} et au 1000^{ème} avec la solution *sample* diluent du kit. Puis, ils ont été également répartis dans les puits d'après le plan de plaque et laissés incuber 60 minutes à 37°C.

L'étape suivante a de nouveau consisté en la réalisation de quatre lavages successifs de la plaque ELISA comme précédemment effectués.

Ensuite, la solution d'anticorps conjugués du kit a été utilisée et répartie sur la plaque ELISA, dans chaque puit sauf ceux dans lesquels les sérums de chats témoins (tox + et tox -) ont été disposés. En effet, un anticorps conjugué compatible avec les éventuels anticorps produits par l'espèce doit être ajouté dans ce cas, car seul ce dernier est capable de se lier à la partie fixe (Fc) des anticorps produits par les chats.

Pour les échantillons de chats témoins ainsi que les échantillons de chats d'intérêt, une solution constituée d'anticorps secondaires conjugués à la partie Fc des IgG de chat couplé à la peroxydase de raifort (anti-Fc HRP) a été utilisée. Il s'agit d'anticorps anti-Fc HRP couplés à la peroxydase de raifort (anticorps Bio-Rad, France). Ils ont été ajoutés à la dilution recommandée dans du PBS 1X pour obtenir une solution d'anticorps anti-Fc HRP de concentration inconnue, non divulguée par le laboratoire. Nous avons alors déposé cette solution dans les huit puits concernés et les avons de nouveau laissés incuber 60 minutes à 37°C.

Un dernier cycle de lavages à l'aide de la solution Wash Buffer ELISA précédemment décrite a été effectué avant de procéder à l'étape de révélation.

□ Révélation et lecture des résultats

Immédiatement après le dernier lavage, les résultats ont été révélés à l'aide d'une solution de révélation du kit Duoset Ancillary (R&D System, USA) différente de celle du kit Kribiolosa™ Darbepoetin ELISA (KRISHGEN BioSystem, Inde). Nous avons alors laissé la plaque ELISA 30 minutes à 37°C.

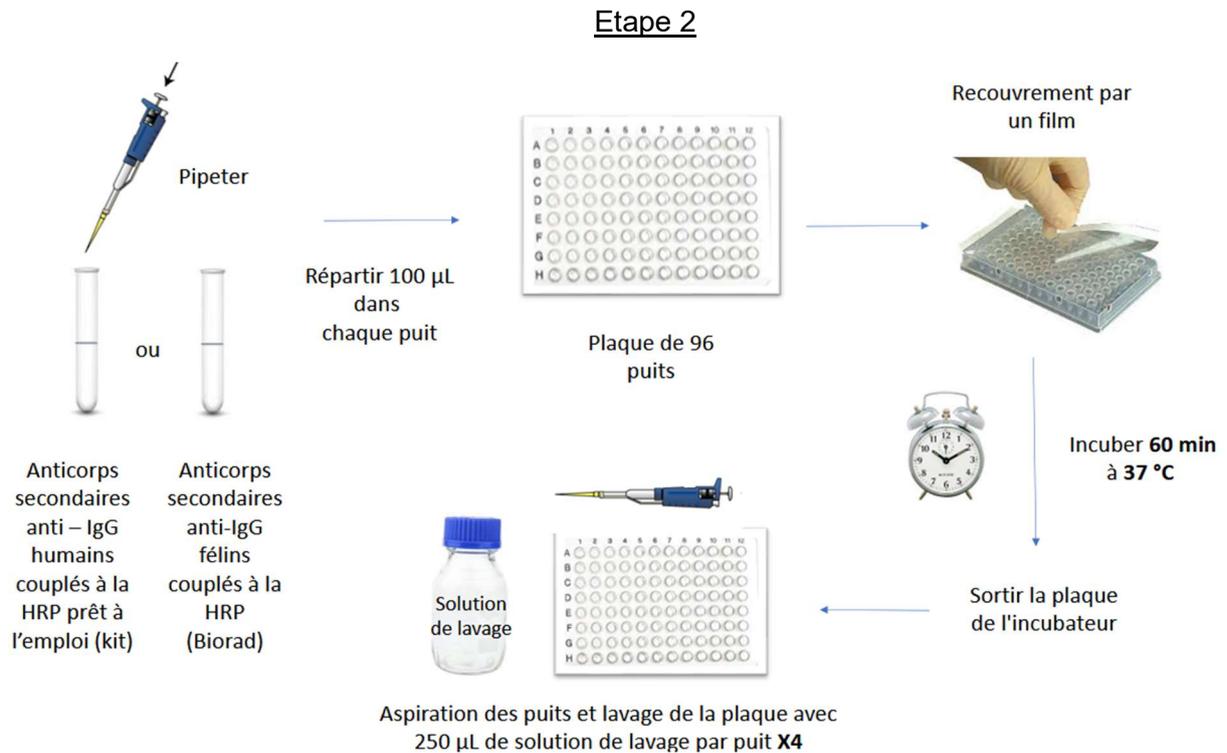
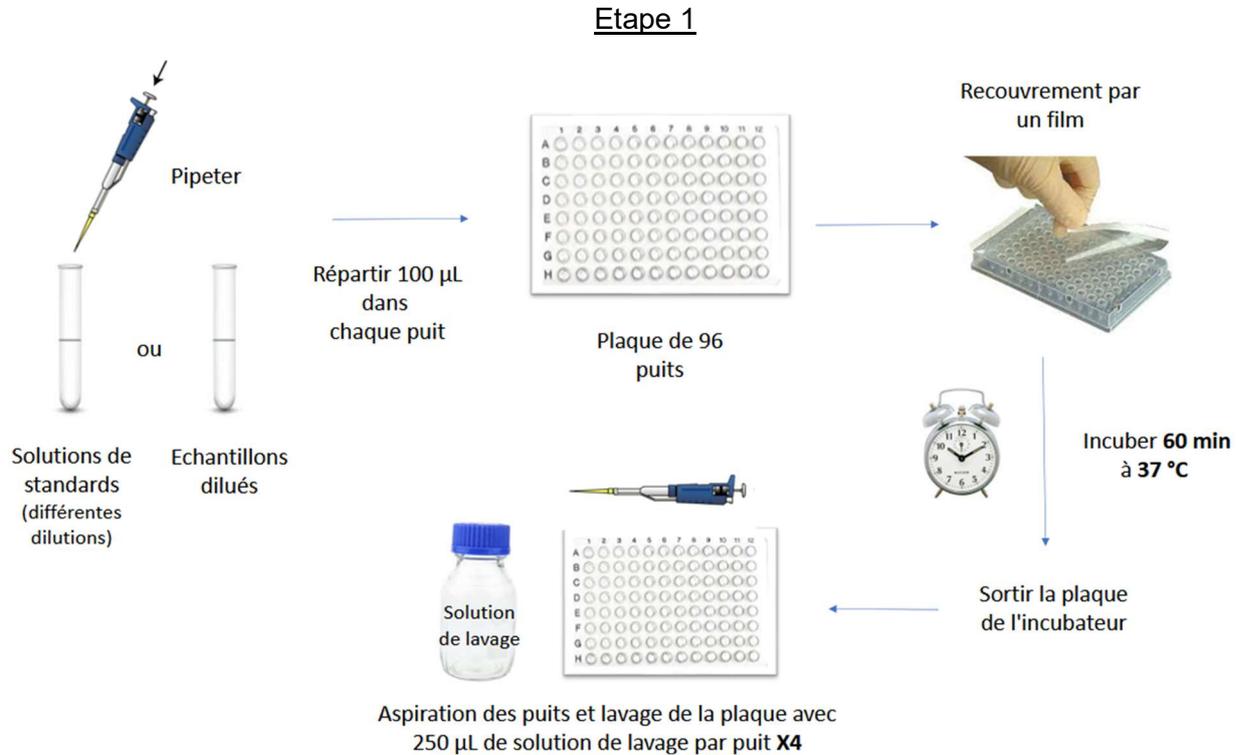
Ensuite, la réaction a été arrêtée avec une solution stop du kit Duoset Ancillary (R&D System, USA). Par analogie à l'expérience du kit décrite précédemment, la plaque ELISA a cette fois-ci été laissée incuber 30 minutes dans le noir à température ambiante.

Les compositions de ces deux solutions de révélation et de stop sont inconnues et détenues par le laboratoire fabricant.

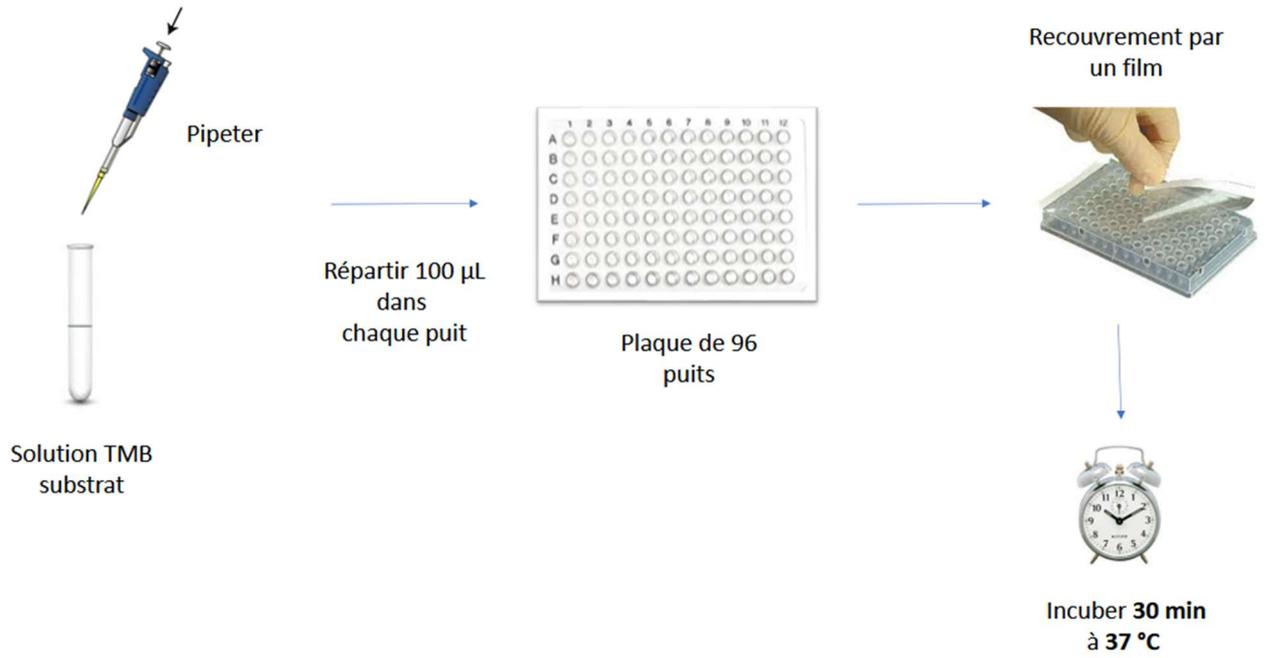
Enfin, nous avons effectué une lecture des résultats à 450 nm via une mesure d'absorbance par un spectrophotomètre, soit le MultiskanFC (Thermo Scientific, USA). Nous avons ensuite analysé ces données à l'aide du logiciel SkanIt Research Edition 4.1 (thermofisher, France) et du logiciel Excel (Microsoft, USA).

□ Schéma récapitulatif du déroulé de la méthode

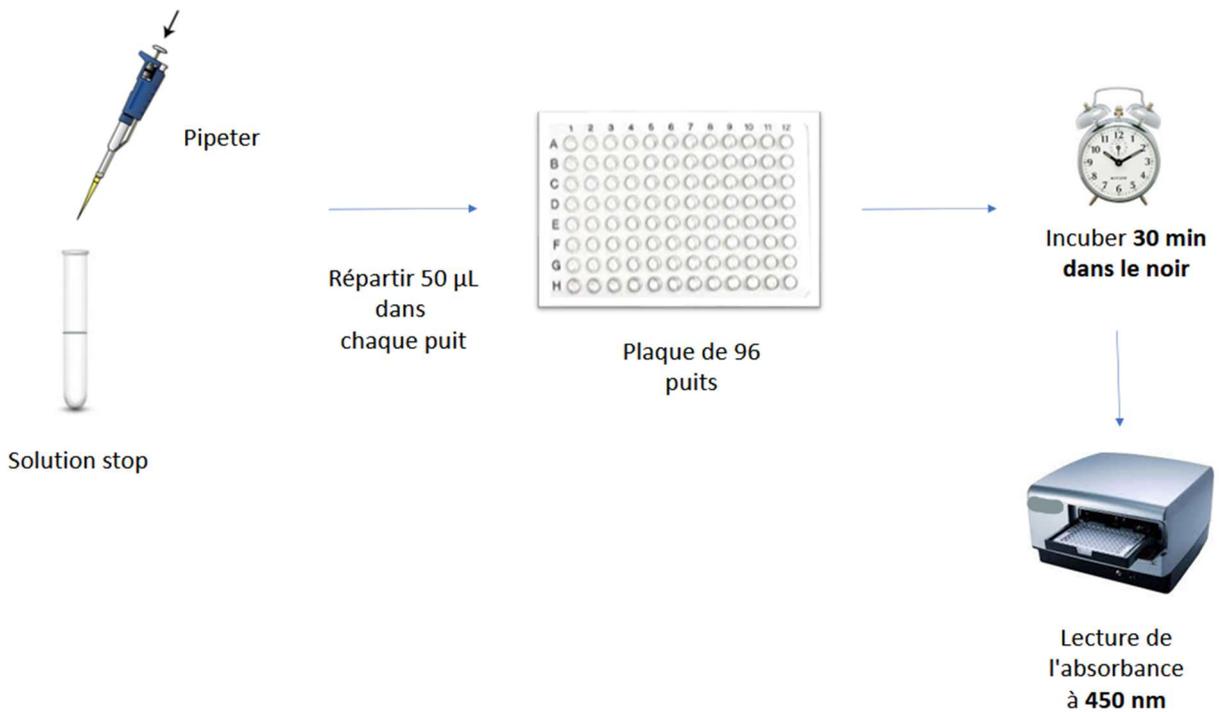
Figure 16 : Schéma récapitulatif du déroulé de la méthode de mise au point de notre expérience de détection d'anticorps anti-darbépoéline chez le chat en quatre étapes successives



Etape 3



Etape 4

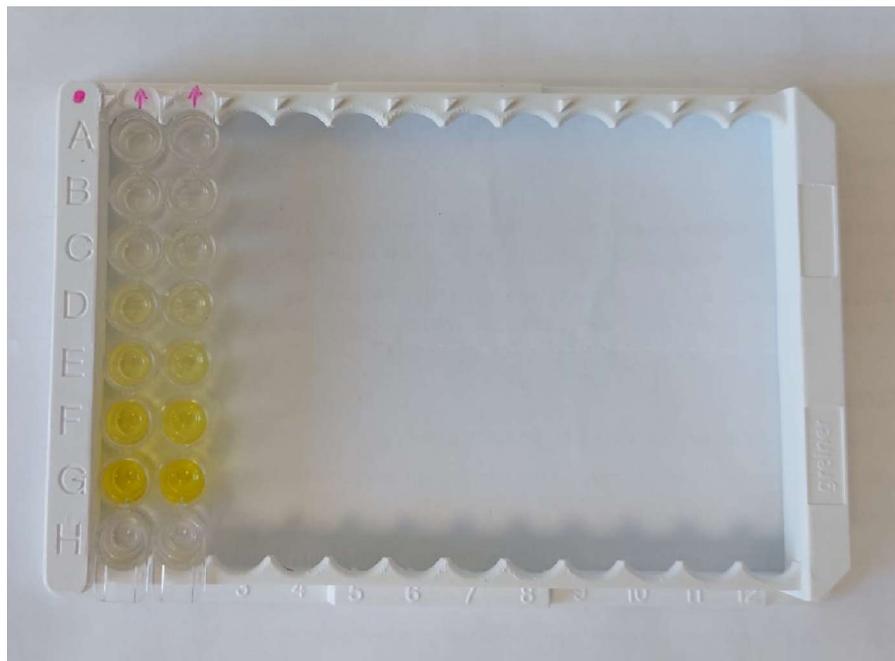


3. Résultats

A. Expérience du kit

Concernant l'expérience du kit, une variation de l'absorbance proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-darbépoétine est mise en évidence. Les résultats sont présentés selon le plan de plaque, illustré dans la partie « matériel et méthode ».

Figure 17 : Photographie de présentation des résultats de l'expérience du kit



La figure ci-dessus est une photographie des résultats de l'expérience du kit dont les résultats chiffrés sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11 : Mesure de densité optique de la plaque du kit humain à la longueur d'onde de 450 nm

	Barrette 1	Barrette 2
A	0,037	0,007
B	0,044	0,04
C	0,08	0,088
D	0,2	0,175
E	0,393	0,37
F	0,794	0,756
G	1,468	1,405
H	0	0

Le tableau ci-dessus a été réalisé à partir d'une plaque ELISA de 96 puits dont seulement 14 ont été utilisés. Les valeurs correspondent à des DO rattachées à différentes concentrations de standard : 0 ng/mL pour la ligne A ; 62,5 ng/mL pour la ligne B ; 125 ng/mL pour la ligne C, 250 ng/mL pour la ligne D, 500 ng/mL pour la ligne E, 1000 ng/mL pour la ligne F, 2000 ng/mL pour la ligne G ;

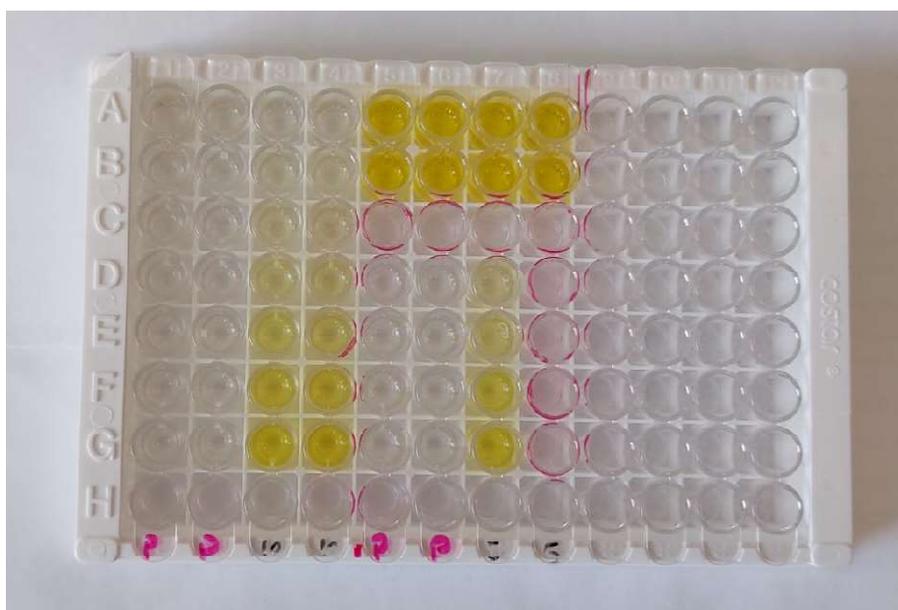
D'après les valeurs du tableau ci-dessus, nous pouvons observer des valeurs de DO presque nulles dans les puits sans darbépoétine. Ces valeurs sont considérées comme nulles, l'absence de nullité absolue étant due au bruit de fond, ce qui valide le contrôle négatif de cette expérience et rend la suite des résultats interprétable. Visuellement, on constate que les puits sont tout d'abord totalement transparents et s'opacifient au fur et à mesure de la progression des lettres (les puits A sont transparents alors que les puits G sont jaune intense). Ce visuel représenté par la photographie présentée ci-dessus est en adéquation avec les résultats chiffrés de DO récoltés.

B. Mise au point de l'ELISA "à façon" et test des sérums de chats témoins

a. Première expérience

Les résultats sont présentés selon le plan de plaque (cf. ci-dessus).

Figure 18 : Photographie de présentation des résultats de la mise au point de l'ELISA



Certains puits apparaissent visuellement transparents et d'autres colorés (en jaune) de manière plus ou moins intense. Cette intensité est directement en lien avec la concentration en IgG anti-darbépoétine. Elle sera lue et interprétée via la mesure de la densité optique de chaque puit grâce à une analyse spectrophotométrique de la plaque ELISA.

Tableau 12 : Tableau de mesure des densités optiques de la plaque ELISA à la longueur d'onde de 450 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,033	0,029	0,027	0,024	1,248	1,122	1,218	1,123
B	0,019	0,019	0,065	0,063	1,429	1,495	1,326	1,397
C	0,021	0,017	0,117	0,114	0,004	0,005	0	-0,001
D	0,016	0,017	0,192	0,184	0,015	0,017	0,173	0
E	0,017	0,016	0,314	0,275	0,016	0,017	0,279	0,003
F	0,018	0,015	0,491	0,469	0,016	0,015	0,47	0
G	0,014	0,015	0,654	0,676	0,015	0,017	0,717	-0,001
H	-0,002	-0,001	0,002	0,006	0,001	0,002	-0,002	0,005
	PBS	PBS	D10	D10	PBS	PBS	D5	D5

Le tableau ci-dessus a été réalisé à partir d'une plaque ELISA de 96 puits. Les chiffres apparaissant en gris dans la ligne H, la ligne C et la colonne 8 sont vides ou non interprétables, ils sont donc laissés de côté ; L'échantillon de sérum de chat témoin toxo- est représenté en bleu sur la ligne A du tableau. Cet échantillon a été dilué au 200^{ème}. De même, l'échantillon de sérum de chat témoin toxo+ est représenté en rouge sur la ligne B du tableau. Cet échantillon a été dilué au 200^{ème} également ; Les autres chiffres correspondent à des DO rattachées à différentes concentrations de standard : 0 ng/mL pour la ligne A, 62,5 ng/mL pour la ligne B, 125 ng/mL pour la ligne C, 250 ng/mL pour la ligne D, 500 ng/mL pour la ligne E, 1000 ng/mL pour la ligne F, 2000 ng/mL pour la ligne G ; « PBS » signifie que les puits des colonnes concernées n'ont pas été « coatés » à la darbépoétine, cette fixation de darbépoétine a été remplacée par l'ajout d'une solution de PBS servant de contrôle négatif ; « D5 » signifie que les puits des colonnes concernées ont été « coatés » avec de la darbépoétine à 5 µg/mL ; « D10 » signifie que les puits des colonnes concernées ont été « coatés » avec de la darbépoétine à 10 µg/mL ;

Dans cette première expérience, il semble qu'il y ait peu de différence de variation de la valeur de densité optique en fonction de la concentration en IgG anti-darbépoétine lorsque la darbépoétine est fixée à 10 µg/mL dans les puits que lorsqu'elle y est fixée à 5µg/mL. Nous pouvons donc en déduire qu'une concentration de darbépoétine à 5µg/ml est suffisante et peut donc être utilisée à cette concentration pour le « coating » des expériences suivantes.

Nous pouvons voir que dans notre expérience de mise au point de l'ELISA « à façon », les mesures de DO des puits de chats témoins toxo+ et toxo- sont anormalement élevées par rapport à ce qu'il était attendu. En effet, il s'agit de contrôles négatifs qui ne sont pas censés dépasser un certain seuil de négativité.

Or, ils possèdent ici les résultats les plus élevés de la plaque ELISA, près de deux fois plus élevés que pour les puits ayant reçu 2 µg/L de standard. Ce bruit de fond est probablement dû à une insuffisance de dilution des sérums de chats témoins au départ. En effet, ces échantillons ont été dilués au 200^{ème} et non au 1000^{ème} comme recommandé dans la notice du kit. L'objectif de la prochaine expérience a donc été de répéter celle-ci en atténuant nettement ce bruit de fond pour que l'expérience soit validée et applicable à nos échantillons de chats exposés au médicament ARANESP, soit à la darbépoétine.

L'objectif à ce stade était de réduire ce bruit de fond dans une expérience ultérieure.

a. Deuxième expérience : Test de l'ELISA « à façon » sur les standards

Nous avons dilué la darbépoétine dans du PBS au lieu de la solution de standard diluent du kit, de manière à obtenir une concentration en darbépoétine égale à 5µg/mL. Concernant l'étape de lecture des résultats, les valeurs de DO des puits en « condition PBS » ont été soustraites du signal obtenu avec les puits « coatés » à la darbépoétine correspondants, dans le but de réduire au maximum le bruit de fond, comme cela avait été réalisé avec succès lors des expériences menées précédemment (Le Roux et al., 2020).

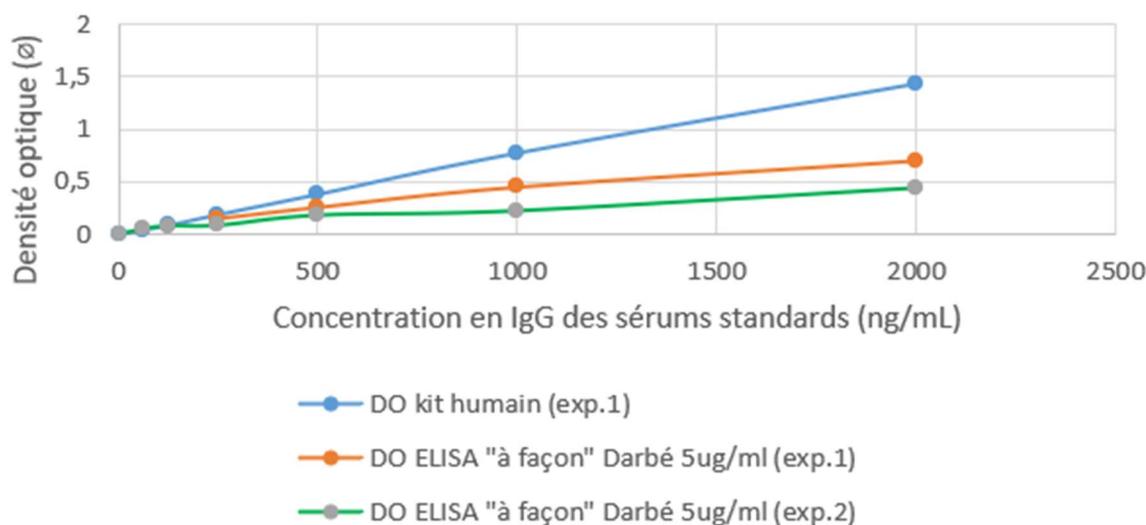
Tableau 13 : Tableau comparatif des mesures de densités optiques des plaques ELISA « à façon » et kit des séries d'expériences 1 et 2 à la longueur d'onde de 450 nm

	Expérience kit	Expérience 1 ELISA « à façon »	Expérience 2 ELISA « à façon »
IgG anti-Darbé (ng/ml)	DO kit humain (exp.1)	DO Darbé 5ug/mL (exp.1)	DO Darbé 5ug/mL (exp.2)
0	0		0
62,5	0,042		0,055
125	0,084		0,081
250	0,1875	0,1565	0,086
500	0,3815	0,2625	0,183
1000	0,775	0,4535	0,2255
2000	1,4365	0,7025	0,4435

Dans le tableau ci-dessus, une moyenne des deux valeurs a été réalisée lorsqu'un duplicata a été réalisé, soit pour l'expérience du kit et la deuxième expérience de l'ELISA « à façon ».

La première colonne du tableau ci-dessus correspond à la concentration des standards placés dans les puits, ils sont valables pour toute la ligne correspondante ; La deuxième colonne correspond aux DO relevées sur le kit aux différentes concentrations de standards de la colonne 1 ; La troisième colonne correspondent aux DO relevées lors de la première expérience aux différentes concentrations de standards de la colonne 1 sur la plaque ELISA ; La 4^{ème} et dernière colonne correspond aux DO relevées lors de la deuxième expérience aux différentes concentrations de standards de la colonne 1 ; « Darbé 5 µg/mL » signifie que les puits des colonnes concernées ont été « coatés » avec de la darbépoétine à 5 µg/mL;

Figure 19 : Graphique comparant les densités optiques en fonction de la concentration en anticorps des sérums standards humains des expériences 1 et 2



Les valeurs du tableau précédent sont reprises dans le graphique ci-dessus pour une meilleure illustration des données.

Nous pouvons voir que la densité optique des standards de l'ELISA « à façon » de la deuxième expérience est beaucoup moins importante que celle des standards de l'ELISA « à façon » de la première expérience. Nous avons donc réussi à éliminer une bonne partie du bruit de fond rendant plus facile l'interprétation des résultats sur les échantillons (voir la prochaine partie).

b. Deuxième expérience : Test des sérums de chats témoins exposés à la darbépoétine

Dans cette deuxième expérience, deux modifications du protocole initial ont été réalisées dans l'optique de réduire le bruit de fond constaté lors de la première expérience.

Premièrement, les échantillons des sérums de chats témoins ont été dilués au 1000^{ème} au lieu d'une dilution au 200^{ème}, comme recommandé dans la notice du kit et comme cela avait été prévu pour les échantillons d'intérêt.

Deuxièmement, nous avons dilué la darbépoétine dans du PBS au lieu de la solution de standard diluent du kit, de manière à obtenir une concentration en darbépoétine égale à 5µg/mL. Concernant l'étape de lecture des résultats, les valeurs de DO des puits en « condition PBS » ont été soustraites du signal obtenu avec les puits « coatés » à la darbépoétine dans le but de réduire au maximum le bruit de fond, comme cela avait été réalisé avec succès lors des expériences menées précédemment (Le Roux et al., 2020).

Tableau 14 : Tableau de résultats des valeurs de densité optique des échantillons de chats témoins

Chats témoins				
	5	6	7	8
A	0,87	0,843	0,992	0,964
B	0,886	0,834	1,021	0,822
	PBS	PBS	D5	D5

Le tableau ci-dessus a été réalisé à partir d'une plaque ELISA de 96 puits. Les lignes A et B correspondent aux valeurs de DO des sérums de chats témoins (respectivement toxo- pour la ligne A où les valeurs sont inscrites en bleu et toxo+ pour la ligne B où les valeurs sont inscrites en rouge) ;

Encore une fois, nous remarquons que l'utilisation du PBS pour diluer la darbépoétine à la place du standard diluent semble augmenter toutes les valeurs de densité optique.

Cependant, en retranchant les valeurs obtenues avec des puits « coatés » avec de la darbépoétine aux valeurs obtenues dans les mêmes conditions mais avec du PBS au lieu de la darbépoétine, nous obtenons comme précédemment pour les standards, une importante réduction du bruit de fond dans les puits contenant les sérums de chats témoins (contrôle négatif). Ce retranchement a également été effectué dans un autre tableau ci-dessous.

Tableau 15 : Tableau de résultats des valeurs de densité optique retranchées à celles obtenues au PBS des échantillons de chats témoins

Echantillons d'intérêt	DO spé Darbé	Positivité
Chat toxo -	0,122	neg
Chat toxo +	0,062	neg

La première colonne du tableau ci-dessus correspond aux DO relevées sur les différents sérums de chats témoins non exposés à la darbépoétine ; La deuxième colonne statue sur la positivité de l'échantillon testé : « neg » pour un résultat négatif est d'office attribué aux chats témoins constituant notre contrôle négatif (chez qui il est théoriquement impossible de retrouver des anticorps anti-darbépoétine).

c. Deuxième expérience : test des sérums de chats exposés à la darbépoétine

Dans cette partie, nos échantillons d'intérêt ont été testés sur une nouvelle plaque ELISA, en suivant le même protocole que nos échantillons contrôles dans la partie précédente.

- ***Précisions sur les prélèvements des sérums d'intérêt***

Les dates précises de ces prélèvements ainsi que le nombre de jour écoulés entre la première injection de darbépoétine reçue par les individus et la date de prélèvement ont été répertoriés dans des tableaux concernant les chats d'intérêt en annexe 1. Ces tableaux relatent des dates de prélèvements et des injections de darbépoétine réalisées pour chacun des chats d'intérêt.

Pour deux d'entre eux (W et X), ils ont été prélevés à T0 juste avant leur première injection de darbépoétine, le jour où elle leur a été administrée contrairement au dernier chat (Y) pour lequel ce prélèvement n'a pas été réalisé. D'autres prélèvements ont ensuite été réalisés et ont été également utilisés comme échantillons d'intérêt dans notre test ELISA « à façon ».

W a été prélevée le 1^{er} décembre 2022 à T0 avant de recevoir sa première injection de darbépoétine de la série étudiée. En effet, il ne s'agissait pas sensu stricto de la première injection que W avait reçu dans sa vie. W a également été prélevée le 15 décembre 2022 à J15 post première injection de darbépoétine.

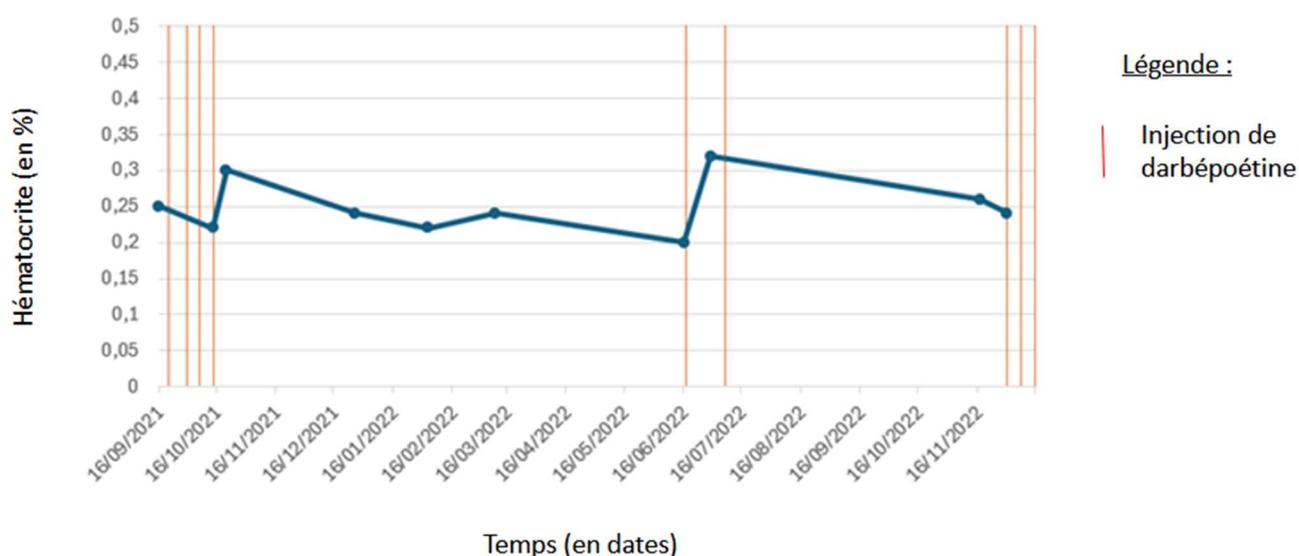
X a été prélevé le 24 février 2023 à T0 avant de recevoir sa première injection de darbépoétine et également le 3 mars 2023 à J7 post première injection de darbépoétine ainsi que le 17 mars 2023 à J21 post première injection de darbépoétine.

Y a été prélevé une seule fois le 16 mars 2023 à J20 post première injection de darbépoétine. Il n'a pas été prélevé à T0 comme indiqué précédemment.

- *Classement des échantillons d'intérêts en fonction de l'efficacité de la réponse au traitement*

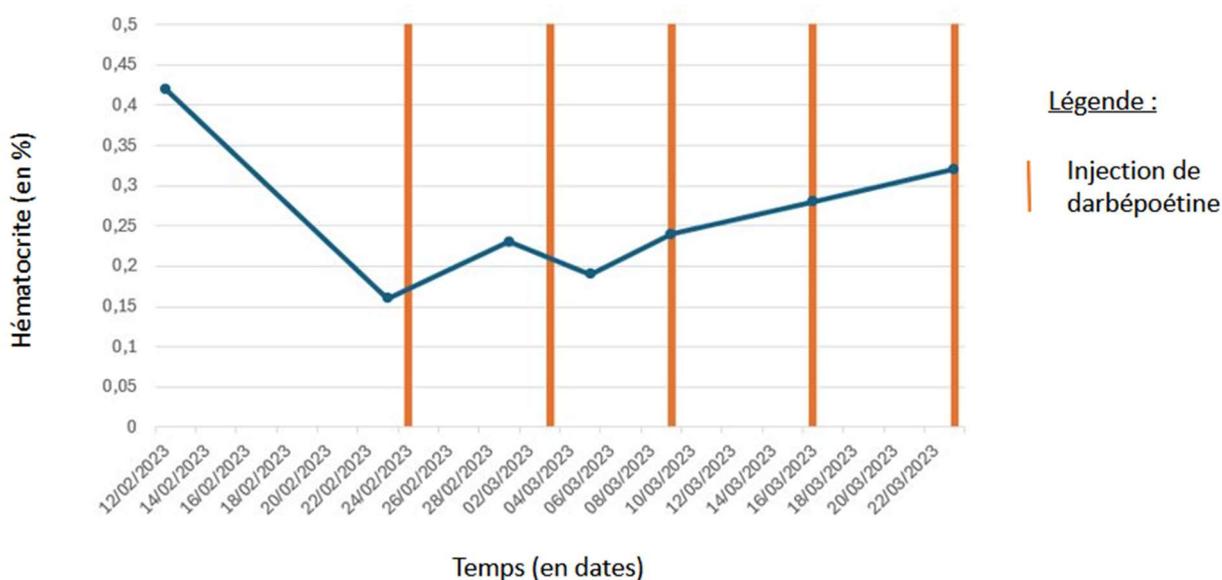
Pour juger de l'efficacité de la réponse à la darbépoétine réalisée par administration sous-cutanée à la dose de 1 µg/kg et à des fréquences variables chez chacun des chats, un graphique de relevés d'hématocrite au cours du temps et en fonction des injections de darbépoétine a été réalisé pour chacun des chats. Ces graphiques sont présentés ci-dessous. Les tableaux correspondants avec les dates précises d'injections de darbépoétine et de prélèvements sanguins ainsi que les valeurs précises d'Ht sont présents en annexe 1.

Figure 20 : Graphique des relevés d'hématocrite au cours du temps et en fonction des injections de darbépoétine chez W (A09-5970)



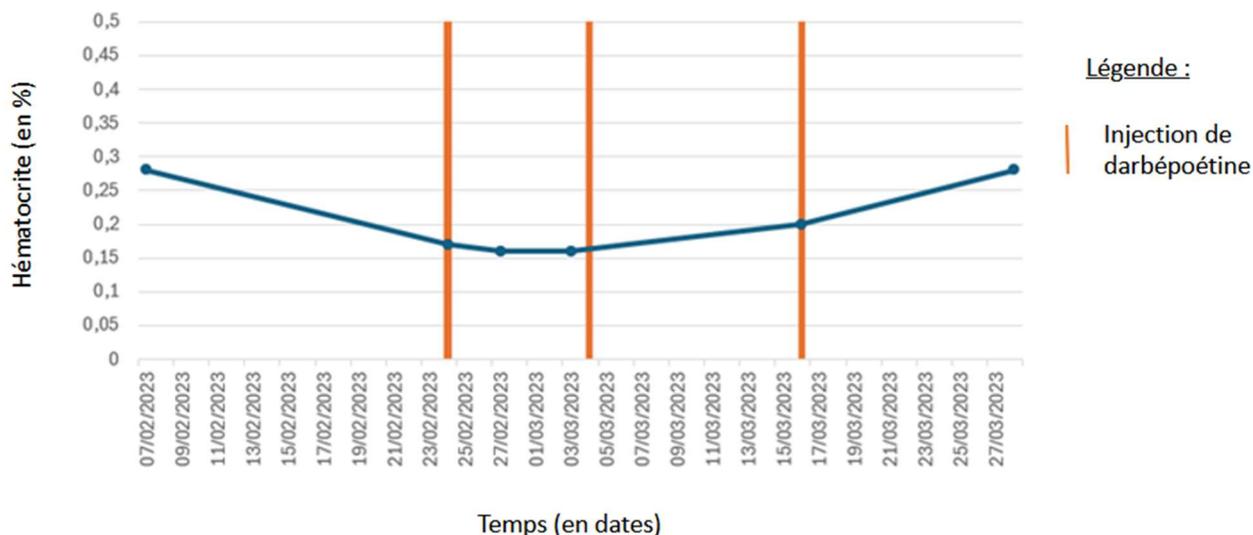
On remarque que W n'a pas répondu aux injections de darbépoétine lors de la première série d'injections, lorsqu'elle a été hospitalisée pour une pyélonéphrite. En effet, si l'on applique la classification répondeur/non répondeur adoptée par Antoine Vassal, on remarque sur le graphique ci-dessus que son Ht n'a jamais augmenté de 10 points dans l'intervalle de temps où les injections ont débuté et la fin du traitement (Vassal, 2020). Puis, en été 2022, cela fait un moment que son taux d'hématocrite ne fait que de diminuer lors des rendez-vous de contrôle de sa MRC. Cette fois-ci, W semble répondre rapidement à une nouvelle initiation du traitement, et ce dès la première injection de darbépoétine. En effet, on observe graphiquement une différence supérieure à 10 points entre l'Ht d'initiation de traitement et l'Ht post première injection de darbépoétine, ce qui nous permet de classer W comme répondeur dès la première injection. En revanche, lors de la dernière initiation de traitement à la darbépoétine, nous n'avons pas eu de données suffisantes pour conclure sur son statut de répondeur, étant donné que les relevés d'hématocrite n'ont pas été effectués. Cependant, étant donné qu'elle a pu être classée en répondeur seulement quelques mois auparavant, il semble logique de considérer ce statut de répondeur pour cette troisième initiation de traitement.

Figure 21 : Graphique des relevés d'hématocrite au cours du temps et en fonction des injections de darbépoétine chez X (A23-2XX6)



D'après le graphique ci-dessus, chez X, le traitement à la darbépoétine semble fonctionner, son taux d'hématocrite remontant petit à petit au fil des injections de darbépoétine jusqu'à devenir un peu plus de 10 points supérieur au taux initial. Il est donc classé comme répondeur au traitement.

Figure 22 : Graphique des relevés d'hématocrite au cours du temps et en fonction des injections de darbépoétine chez Y (A23-1XX5)



De même, d'après le graphique ci-dessus, chez Y, le traitement à la darbépoétine semble fonctionner au bout de la deuxième injection. Son taux d'hématocrite est également remonté petit à petit au fil des injections de darbépoétine jusqu'à devenir un peu plus de 10 points supérieur au taux initial. Il est donc également classé comme répondeur au traitement.

L'établissement de ces graphiques nous aident à appréhender de manière plus objective la qualité de la réponse au traitement à la darbépoétine. Finalement, aucun de nos échantillons ne semble non répondeur au traitement à la darbépoétine, même si un doute persiste pour W étant donné qu'il manque des données pour conclure. Il ne s'agit donc pas de sujets privilégiés pour réaliser nos expériences mais nous avons manqué de temps pour rassembler plus de sujets.

Nous avons tout de même réalisé nos expériences comme prévu initialement.

- Résultats concernant les sérums d'intérêt

Tableau 16 : Tableau de résultats des valeurs de densité optique des échantillons de chats d'intérêt

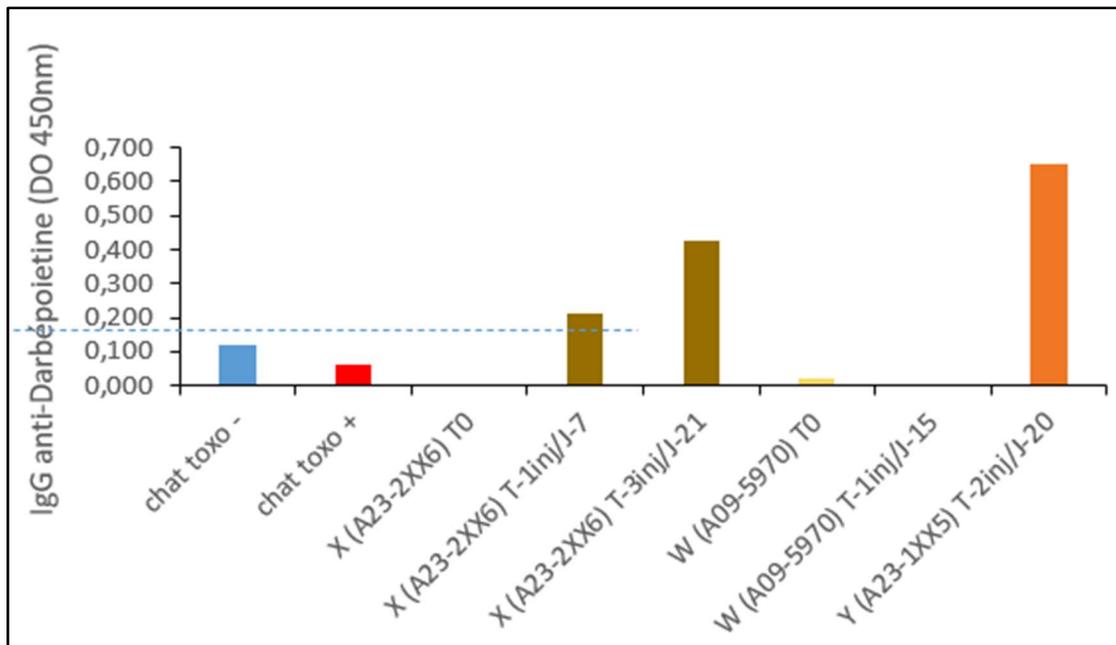
	Chats d'intérêt			
	5	6	7	8
C	1,755	1,596	1,731	1,528
D	1,351	1,399	1,588	1,587
E	1,235	1,182	1,65	1,617
F	3,042	3,093	3,158	3,014
G	2,855	2,922	2,786	2,695
H	2,107	2,084	2,313	3,187
	PBS	PBS	D5	D5

Le tableau ci-dessus a été réalisé à partir d'une plaque ELISA de 96 puits. Les lignes C à H correspondent aux valeurs de DO des sérums de chats d'intérêt, respectivement X (A23-2XX6) pour les lignes C à E, W (A09-5970) pour les lignes F et G et Y (A23-1XX5) pour la ligne H.

Pour X, la ligne C correspond au T0 avant injection de darbépoétine soit à un sérum non exposé à la darbépoétine, la ligne D correspond au T-1inj/J-7 post injection de darbépoétine, et la ligne E correspond au T-3inj/J-21 post injection de darbépoétine. Pour W, la ligne F correspond au T0 avant injection de darbépoétine et la ligne G au T-1inj/J-15 post injection de darbépoétine. Pour Y, la ligne H correspond au T-2inj/J-20 post injection de darbépoétine.

Les valeurs présentées ci-dessus sont les valeurs de DO brutes. Comme expliqué précédemment, pour obtenir de meilleurs résultats, avec moins de bruit de fond, il est nécessaire de retrancher les valeurs de DO obtenues dans les puits « coatés » à la darbépoétine avec les valeurs de DO des puits correspondants, où la darbépoétine a été remplacée par du PBS. C'est ce qui a été réalisé dans le tableau ci-dessous.

Figure 23 : Figure 22 : Graphique représentant les mesures de DO pour chaque échantillon témoin et d'intérêt testé



Les résultats sont présentés dans le graphique ci-dessus pour une meilleure illustration des données. Les données ayant servi à l'élaboration de ce graphique sont présentes en annexe 2.

La valeur seuil choisie est une valeur proposée en fonction de nos résultats mais n'est en rien absolue et est amenée être précisée lors de prochaines expériences. Elle est nécessaire pour la lecture des résultats. Le seuil de positivité choisi est représenté en pointillés bleu sur le graphique ci-dessus. En dessous de cette valeur seuil modélisée graphiquement, les échantillons sont considérés comme négatifs soit non pourvus d'anticorps anti-darbépoétine et au-dessus, ils sont considérés comme positifs soit pourvus d'anticorps anti-darbépoétine.

Etant donnés les résultats obtenus, nous nous proposons donc de fixer un seuil de positivité à 0,170 de DO. Cette valeur a été choisie d'une part parce que la DO des échantillons témoin négatifs par définition est en-dessous de cette valeur. D'autre part, en fonction des valeurs de DO importantes retrouvées chez les deux chats X et Y. En effet, chez X et Y à respectivement T3-inj et à T2-inj, les valeurs de DO sont très élevées, ce qui nous indique des résultats positifs. Par ailleurs, à T0, X avait une valeur de DO très proche de 0 et la valeur suivante à T-inj est d'environ 0,2, ce qui nous laisse à penser que X était déjà positif étant donnés les résultats suivants, dont la valeur de DO est encore plus importante à T3-inj. En revanche, W possède des valeurs de DO proches de 0 pour les deux prélèvements, aussi bien à T0 qu'à T1-inj.

D'après notre graphique et l'établissement d'un seuil de positivité à 0,170 de DO, nous pouvons en conclure que les chats possédant des anticorps anti-darbépoétine sont au nombre de deux sur les trois échantillons testés et exposés au médicament ARANESP soit à la darbépoétine, X (A23-2XX6) et Y (A23-1XX5).

Il est important de noter que notre ELISA « à façon » est un test semi-quantitatif. La concentration en anticorps anti-darbépoétine félines est proportionnelle à la DO mais nous n'avons pas pu établir de courbe de régression pour mesurer cette concentration.

4. Discussion

Le but de la partie expérimentale de cette thèse était de démontrer la possibilité de détecter la présence d'anticorps anti-darbépoétine dans le sérum de chats exposés à ce traitement, par la technique d'ELISA indirect. Cet ELISA n'existe pas dans le commerce, il fallait donc le créer à partir de notre expérience lors de précédents travaux de recherche (Le Roux et al., 2020).

De plus, il faut des contrôles positifs et négatifs pour ce type de technique sérologique. Le contrôle positif idéal de notre technique serait un sérum de chat, exposé à la darbépoétine et dont on sait qu'il a produit des anticorps contre la molécule, avec de plus une concentration connue de ces anticorps spécifiques. Mais tout comme il n'existe pas d'ELISA « IgG félines anti-darbépoétine » commercialement disponible, il n'existe pas de contrôle positif.

Ainsi, la technique développée dans ce manuscrit ne permet pas de donner une concentration réelle d'anticorps anti-darbépoétine dans le sérum des chats où nous avons pu les détecter de façon spécifique. Il aurait fallu, pour cela, développer à nouveau d'autres protocoles mais de temps imparti à ces expériences était restreint et n'a pas permis de le faire.

Néanmoins, nous avons pu bénéficier de sérum de chats n'ayant jamais été au contact de la darbépoétine, provenant d'un essai expérimental précédent. Ces sérums de chats sont les contrôles négatifs de notre technique. Seuls quelques-uns ont pu être testés lors de ces expériences, il faut maintenant tester toute la banque de sérums de chats non exposés, disponibles à l'Unité Mixte de Recherche en Biologie et Immunologie Parasitaires (UMR BIPAR), afin de pouvoir établir un seuil du signal négatif de façon significative.

Par le développement de cet ELISA indirect « IgG félines anti-darbépoétine », nous cherchions à démontrer la présence de ces anticorps dans l'objectif final de créer un test rapide de détection des anticorps anti-darbépoétine chez le chat et permettre aux cliniciens d'identifier une cause de non-réponse à un traitement chez des chats non répondeurs.

Nos résultats montrent qu'il est possible d'obtenir une DO plus élevée chez les chats ayant été traités à la darbépoétine que chez les animaux non traités, ce qui semble suggérer la présence d'anticorps anti-darbépoétine chez ces animaux. Nos expériences demandent à être complétées par d'autres en reprenant la même méthode mais sur un nombre de chats exposés et non exposés à la darbépoétine plus important.

Selon la méthode de classement des répondeurs et des non-répondeurs en fonction de l'augmentation de l'Ht retenue par Antoine Vassal dans sa thèse sur l'étude rétrospective de chats traités à la darbépoétine au CHUV-AC, il a été constaté parmi nos chats exposés à la darbépoétine, trois chats répondeurs au traitement, dont le taux d'hématocrite remontait significativement après les injections de darbépoétine (Vassal, 2020).

En effet, le temps médian de réponse des animaux répondeurs au traitement à la darbépoétine est défini comme le temps écoulé entre le jour de la première injection de darbépoétine et le jour de la mesure du premier hématocrite permettant de répondre au critère considéré, soit le premier hématocrite supérieur de 10 points ou plus à l'hématocrite initial (Vassal, 2020).

Dans l'étude de Chalhoub et al/ sur le chat, le temps médian de réponse à la darbépoétine était de 21 jours et correspondait au temps entre la première injection de darbépoétine et le premier hémocrite supérieur ou égal à 25%, soit le deuxième critère, moins robuste que le premier (Chalhoub et al., 2012). Le temps médian de réponse dans la thèse d'Antoine Vassal était de 19,5 jours et correspondait à l'atteinte du premier critère ou bien du deuxième critère (Vassal, 2020).

Cependant, la présence d'anticorps anti-darbépoétine a été constatée chez deux classés comme répondeurs au traitement. Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer ce phénomène. Par exemple, il est possible que les individus n'aient pas été suivis assez longtemps pour manifester une absence de réponse au traitement. En effet, d'après plusieurs études, en médecine humaine comme chez les carnivores domestiques, l'érythroblastopénie due aux ESAs se produit généralement après cinq à 38 semaines de traitement, avec une médiane de quatorze semaines et demie. Cette durée est beaucoup plus courte que celle à laquelle les anticorps ont été dosés chez ces animaux. En outre, ce phénomène survient après une période de réponse positive au traitement et c'est seulement après cette dernière que les individus y deviennent réfractaires (Chalhoub et al., 2012; Cowgill et al., 1998; Randolph et al., 2004b). Or, les chats X et Y n'ont pas été suivis au-delà de cette période de quatre à cinq semaines. Il paraît donc difficile de les classer strictement comme définitivement répondeurs au traitement sur le long terme.

En effet, le fait que ces chats développent des anticorps et que l'un d'eux ait un taux d'anticorps anti-darbépoétine plus haut au fil des injections (observable grâce à la relation de proportionnalité entre la DO et le taux d'anticorps) valide d'une part notre test ELISA « à façon » et d'autre part, cela nous laisse à penser que ces individus risquent fortement de devenir non-répondeurs par la suite, l'autre hypothèse étant que la présence d'anticorps anti-darbépoétine ne serait pas corrélée à une non-réponse chez les chats, ce qui serait théoriquement contre-intuitif. Cela suggère que le test qui a été mis au point dans le cadre de ce travail permettrait de distinguer plus précocement les animaux répondeurs des non répondeurs.

Nous n'avions donc pas des sujets idéaux et nous ne nous attendions pas nécessairement à retrouver la présence d'anticorps anti-darbépoétine chez les sujets que nous avons réussi à intégrer à notre étude, même si, encore une fois, cela restait possible chez les deux chats dont nous ignorions le statut à long terme. Or, d'après nos résultats d'expérience, nous avons réussi à mettre en évidence la présence d'anticorps anti-darbépoétine chez ces deux chats dont le statut de répondeur au traitement à la darbépoétine sur le long terme reste douteux et nous n'en avons pas retrouvé chez W, le chat répondeur à ce traitement que nous avons pu suivre sur le long terme. Il serait donc intéressant pour des études futures d'y intégrer des sujets classés comme non-répondeurs au traitement au bout d'au moins une vingtaine de semaines de suivi.

Il est établi que l'inflammation est avec la carence en fer, la principale raison d'un défaut de réponse aux ESAs chez l'Homme atteint de MRC (Ogawa and Nitta, 2015). En effet, lors d'un processus inflammatoire important au sein de l'organisme, des cytokines inflammatoires sont produites, engendrant l'activation de la synthèse de l'hepcidine, ce qui entraîne la séquestration du fer dans les différentes cellules de l'organisme. Le fer étant un substrat essentiel à la formation d'érythrocytes, il est beaucoup moins disponible lors d'inflammation importante. Ce phénomène conduit donc à une diminution importante de l'efficacité des ESAs (Camaschella and Girelli, 2020).

En médecine humaine, dans la majorité des études ayant mis en évidence la corrélation entre l'inflammation et le défaut de réponse aux ESAs, le caractère inflammatoire de l'anémie des patients était confirmé par la mesure de la protéine C-réactive, qui est une protéine de la phase aigüe sérique, dont l'équivalent chez le chat est la SAA (Ingrasciotta et al., 2019; Johnson et al., 2007; Ogawa and Nitta, 2015). Dans l'étude rétrospective d'Antoine Vassal concernant le suivi de 31 chats ayant reçu des injections de darbépoétine, il n'existait pas de corrélation entre le fait d'être en état d'anémie avec une composante inflammatoire et le fait d'être non répondeur (Vassal, 2020).

Cependant, dans cette étude, le taux d'inflammation présent chez ces chats n'a pu être apprécié par la mesure de la SAA que chez seulement trois d'entre eux en raison de sa faible disponibilité dans les dossiers étudiés (Vassal, 2020). Il reste donc possible que certains non-répondeurs répondent mal au traitement en raison de leur statut inflammatoire, exactement comme cela a été le cas pour W au départ lorsqu'elle a reçu sa première série d'injections de darbépoétine. W subissait à ce moment-là un épisode de pyélonéphrite responsable d'une inflammation trop importante pour permettre à la darbépoétine de fonctionner correctement. En revanche, plus tard, lors de la deuxième série d'injections de darbépoétine, W a répondu immédiatement et a pu être classée en répondeur, chose qui n'est théoriquement pas possible si la cause de la non-réponse est due à la présence d'anticorps anti-darbépoétine, à moins que ces derniers aient disparus lors de ce laps de temps. Dans le cas de W, cette disparition semble peu probable car il ne s'est écoulé que quelques mois entre la première et la deuxième série d'injections de darbépoétine.

Par ailleurs, le seuil de positivité choisi peut être également discuté. En effet, il se trouve relativement proche de la valeur de DO du chat témoin toxo- et de la valeur de DO à T1-inj/J-7 du chat A23-2XX6. Il pourrait être estimé plus haut à 0,250 ou 0,300 de DO en considérant la première mesure de DO du chat A23-2XX6 négative, mais étant donné qu'une autre mesure de DO pour ce chat est disponible à T3-inj/J-21 et qu'elle est deux fois plus élevée que celle réalisée à T1-inj/J-7, nous pensons qu'il y a de fortes raisons de croire que l'échantillon à T1-inj/J-7 douteux était en réalité déjà bien positif.

En effet, il est possible d'observer une progression de mesure de la DO au fil des injections chez le chat A23-2XX6, dépassant beaucoup plus largement le seuil de positivité lors de la troisième injection que lors de la première. Cette progression va dans le sens d'une apparition progressive d'anticorps anti-darbépoétine. Ainsi, cela pourrait illustrer une concentration sanguine en anticorps anti-darbépoétine plus élevée au fil des injections, bien qu'il n'y ait que deux prélèvements différents effectués.

Pour réellement montrer cette progression, il faudrait répéter l'expérience en prélevant du sang chez un même chat après chaque injection de darbépoétine jusqu'à avoir au moins trois prélèvements (voire plus) et effectuer l'expérience sur un nombre conséquent d'individus. Dans notre étude, il faut garder en tête que l'expérience n'a pas été créée dans le but d'être semi-quantitative, étant donné le faible nombre d'échantillon que nous avons à notre disposition.

Il serait judicieux dans une étude ultérieure, d'intégrer un nombre conséquent d'individus répondeurs et non répondeurs au traitement à la darbépoétine, en plus d'un groupe témoin. Pour cela, il serait nécessaire d'avoir suivi les individus pendant au moins vingt, trente voire quarante semaines après leur première exposition à la darbépoétine pour être sûr de ne pas commettre d'erreur de classement dans les échantillons.

Il est également recommandé de traiter complémentar tous les individus en fer pour éviter que des individus normalement répondeurs soient classés cette fois-ci en non répondeur par manque de fer, rendant inefficace le médicament (Del Vecchio and Minutolo, 2021). Dans l'idéal, il serait également souhaitable de suivre le taux d'inflammation présent chez les individus testés avec le marqueur SAA car une élévation importante de ce marqueur peut également diminuer l'efficacité de l'EPO et donc de la darbépoétine, via une séquestration du fer au sein de l'organisme (Camaschella and Girelli, 2020).

5. Conclusion

A travers cette thèse expérimentale, nous avons réussi à mettre au point une méthode de détection des anticorps anti-darbépoétine chez le chat par ELISA. Il s'agit d'une réelle avancée scientifique car cela n'a jamais été décrit dans la littérature jusqu'alors. Il est cependant nécessaire de corréliser ces résultats d'expérience à d'autres expériences futures. En effet, il est notamment nécessaire de répéter ces expériences sur un nombre plus important d'échantillons et d'y adjoindre des analyses statistiques, dans un but d'accroître l'objectivité de notre interprétation des résultats et d'acquiescer plus de précision quant à ces mêmes résultats.

Un seuil de détection des anticorps anti-darbépoétine a également pu être proposé au vu de nos résultats d'expériences mais doit être reconfirmé par des expériences complémentaires possédant plus d'échantillons. A notre sens, il n'est pas nécessaire de connaître le titre exact en anticorps mais un test qualitatif voire semi-quantitatif pourrait être une bonne option.

D'autres limites existent encore, il est par exemple nécessaire de connaître le statut inflammatoire des individus pour éviter de classer des individus répondeurs en non répondeurs comme cela a failli être le cas pour l'un de nos sujets d'intérêt. Dans la même idée d'éviter les erreurs de classement, il faudrait notamment suivre les chats d'intérêt à plus long terme pour être sûr de leur classement sur le long terme car il y a des chances que les sujets sur lesquels des anticorps anti-darbépoétine ont été trouvés soient encore dans la phase de réponse précédant la période de non-réponse. Cette phase a en effet été décrite par de nombreux auteurs et est d'une durée variable. Elle est par ailleurs nécessairement présente chez tous les sujets réfractaires à la darbépoétine, et semble correspondre de façon logique au temps que l'immunité adaptative ne se mette en place.

L'objectif de la réalisation d'expériences futures pouvant faire l'objet d'une nouvelle thèse pourrait être à l'avenir de créer un test rapide ELISA sur le même fonctionnement que celui que nous avons créé, utilisable en routine par les cliniciens. Ce test pourrait leur permettre de classer les individus comme non-répondeur à un traitement à la darbépoétine initié, en raison d'une production d'anticorps neutralisant anti-darbépoétine, lorsqu'un doute sera émis par le clinicien en charge du cas.

Conclusion

L'objectif premier de cette thèse était la mise au point d'un test de détection d'anticorps anti-darbépoétine chez le chat, sujet n'ayant jamais été réalisé auparavant à notre connaissance. La finalité de ce premier objectif était de mettre en évidence la présence de ces anticorps anti-darbépoétine chez les chats, ces individus répondant de manière assez décevante au traitement antianémique que constitue la darbépoétine.

Nous avons donc réussi à mettre au point un modèle ELISA dans lequel il semblerait que nous ayons trouvé la présence de ces anticorps anti-darbépoétine chez deux échantillons de chat d'intérêt sur trois testés. Cette découverte est surprenante étant donné que nos échantillons n'étaient pas classés comme non répondeurs au traitement, bien qu'un doute persistait pour les deux chats chez qui les anticorps ont finalement été mis en évidence. En effet, nous manquions de temps de suivi post initiation de traitement à la darbépoétine pour pouvoir correctement établir un statut de répondeur ou non répondeur sur le long terme chez ces deux chats.

Bien évidemment, notre étude comporte également d'autres limites dont la principale est le manque de puissance statistique, dû au faible nombre d'échantillons testés. D'ailleurs, les échantillons étant très peu nombreux, aucun test statistique n'a pu être réalisé.

Notre étude semble donc confirmer l'existence des anticorps anti-darbépoétine chez le chat mais il reste encore à réaliser d'autres études complémentaires avec un nombre conséquent d'échantillons, répondeurs comme non répondeurs dont le classement devra être correctement établi, de manière à conclure sur le lien statistique entre la présence de ces anticorps anti-darbépoétine et l'efficacité du traitement à la darbépoétine chez le chat.

Un objectif d'avenir pourrait être de créer un test rapide ELISA sur le même modèle que celui créé par nos soins, utilisable en routine par les cliniciens, directement au chevet du patient.

Liste des références bibliographiques

- ANKER, S.D., KIRWAN, B.-A., VAN VELDHUISEN, D.J., *et al.* (2018) Effects of ferric carboxymaltose on hospitalisations and mortality rates in iron-deficient heart failure patients: an individual patient data meta-analysis. *European Journal of Heart Failure* vol. 20, n° 1, p. 125-133. [<https://doi.org/10.1002/ejhf.823>]
- BABITT, J.L., LIN, H.Y. (2012) Mechanisms of anemia in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology* vol. 23, n° 10, p. 1631-1634. [<https://doi.org/10.1681/ASN.2011111078>]
- BARTGES, J.W. (2012) Chronic kidney disease in dogs and cats. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* vol. 42, n° 4, p. 669-692 [<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.04.008>]
- BATCHELOR, E.K., KAPITSINO, P., PERGOLA, P.E., *et al.* (2020) Iron Deficiency in Chronic Kidney Disease: Updates on Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Journal of the American Society of Nephrology* vol. 31, n° 3, p. 456-468. [<https://doi.org/10.1681/ASN.2019020213>]
- BELLIER, S., CORDONNIER, N. (2010) Les valeurs usuelles en hématologie vétérinaire. *Revue Francophone Des Laboratoires* vol. 2010, n° 420, p. 27-42. [[https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(10\)70419-6](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(10)70419-6)]
- BERNS, J.S. (2010) Are there implications from the Trial to Reduce Cardiovascular Events with Aranesp Therapy study for anemia management in dialysis patients? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* vol. 19, n° 6, p. 567-572. [<https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32833c3cc7>]
- BOYD, L.M., LANGSTON, C., THOMPSON, K., *et al.* (2008) Survival in cats with naturally occurring chronic kidney disease (2000-2002). *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 22, n° 5, p. 1111-1117. [<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0163.x>]
- BROWN, C.A., ELLIOTT, J., SCHMIEDT, C.W., *et al.* (2016) Chronic Kidney Disease in Aged Cats: Clinical Features, Morphology, and Proposed Pathogeneses. *Veterinary Pathology* vol. 53, n° 2, p. 309-326. [<https://doi.org/10.1177/0300985815622975>]
- CAMASCHELLA, C., GIRELLI, D. (2020) The changing landscape of iron deficiency. *Molecular Aspects of Medicine* vol. 75, n° 1, p. 100861. [<https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100861>]
- CAN, C., EMRE, S., BILGE, I., *et al.* (2013) Comparison of recombinant human erythropoietin and darbepoetin alpha in children. *Pediatrics International* vol. 55, n° 3, p. 296-299. [<https://doi.org/10.1111/ped.12085>]
- CASADEVALL, N. (2005) What is antibody-mediated pure red cell aplasia (PRCA)? *Nephrology, Dialysis, Transplantation* vol. 20, n° 4, p. 3-8. [<https://doi.org/10.1093/ndt/gfh1088>]
- CASADEVALL, N. (2003) Pure red cell aplasia and anti-erythropoietin antibodies in patients treated with epoetin. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* vol. 18, n° 8, p. 37-41. [<https://doi.org/10.1093/ndt/gfg1091>]

- CHALHOUB, S., LANGSTON, C., EATROFF, A. (2011) Anemia of renal disease: what it is, what to do and what's new. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 13, n° 9, p. 629-640. [https://doi.org/10.1016/j.jfms.2011.07.016]
- CHALHOUB, S., LANGSTON, C.E., FARRELLY, J. (2012) The use of darbepoetin to stimulate erythropoiesis in anemia of chronic kidney disease in cats: 25 cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 26, n° 2, p. 363-369. [https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00864.x]
- CHAPARRO, C.M., SUCHDEV, P.S. (2019) Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1450, n° 1, p. 15-31. [https://doi.org/10.1111/nyas.14092]
- CHUNG, E.Y., PALMER, S.C., SAGLIMBENE, V.M., *et al.* (2023) Erythropoiesis-stimulating agents for anaemia in adults with chronic kidney disease: a network meta-analysis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* vol. 2, n° 2, p. CD010590. [https://doi.org/10.1002/14651858.CD010590.pub3]
- COWELL, R.L., TYLER, R.D., MEINKOTH, J.H. (2006) Guide pratique de cytologie et hématologie du chien et du chat. Paris, Med'com.
- COWGILL, L.D. (1992) Pathophysiology and management of anemia in chronic progressive renal failure. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (small Animal)* vol. 7, n° 3, p. 175-182.
- COWGILL, L.D., JAMES, K.M., LEVY, J.K., *et al.* (1998) Use of recombinant human erythropoietin for management of anemia in dogs and cats with renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 212, n° 4, p. 521-528.
- DEL VECCHIO, L., MINUTOLO, R. (2021) ESA, Iron Therapy and New Drugs: Are There New Perspectives in the Treatment of Anaemia? *Journal of Clinical Medicine* vol. 10, n° 4, p. 839. [https://doi.org/10.3390/jcm10040839]
- DRUGBANK (2015) Darbepoetin alfa. *In Drugbank*. [https://go.drugbank.com/drugs/DB00012] (consulté le 18/03/2024).
- ECKARDT, K.-U., KURTZ, A. (2005) Regulation of erythropoietin production. *European Journal of Clinical Investigation* vol. 35, n° 3, p. 13-19. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2005.01525.x]
- EGRIE, J.C., BROWNE, J.K. (2002) Development and characterization of darbepoetin alfa. *Oncology* vol. 16, n° 10, p. 13-22.
- EGRIE, J.C., BROWNE, J.K. (2001) Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *British Journal of Cancer* vol. 84, n° 1, p. 3-10. [https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1746]
- EGRIE, J.C., DWYER, E., BROWNE, J.K., *et al.* (2003) Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Experimental Hematology* vol. 31, n° 4, p. 290-299. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x(03)00006-7]
- ELLIOTT, S., LORENZINI, T., ASHER, S., *et al.* (2003) Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nature Biotechnology* vol. 21, n° 4, p. 414-421. [https://doi.org/10.1038/nbt799]

- ERSLEV, A. (1953) Humoral regulation of red cell production. *Blood* vol. 8, n° 4, p. 349-357. [https://doi.org/10.1182/blood.V8.4.349.349]
- ESCHBACH, J.W., EGRIE, J.C., DOWNING, M.R., *et al.* (1987) Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *The New England Journal of Medicine* vol. 316, n° 2, p. 73-78. [https://doi.org/10.1056/NEJM198701083160203]
- FELDMAN, B., ZINKL, J.G., NEMI, C.J., *et al.* (2000) Schalm's veterinary hematology, 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- FIOCCHI, E.H., COWGILL, L.D., BROWN, D.C., *et al.* (2017) The Use of Darbepoetin to Stimulate Erythropoiesis in the Treatment of Anemia of Chronic Kidney Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 31, n° 2, p. 476-485. [https://doi.org/10.1111/jvim.14681]
- FONTAINE, J.-J., REYES-GOMEZ, E., MAUREY, C. (2019) Polycopié d'anatomie pathologique spéciale: Les lésions de l'appareil urinaire. Maisons-Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique d'histologie.
- GANZ, T., NEMETH, E. (2016) Iron Balance and the Role of Heparin in Chronic Kidney Disease. *Seminars in Nephrology* vol. 36, n° 2, p. 87-93. [https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2016.02.001]
- GOLDSMITH, D., DELLANNA, F., SCHIESTL, M., *et al.* (2018) Epoetin Biosimilars in the Treatment of Renal Anemia: What Have We Learned from a Decade of European Experience? *Clinical Drug Investigation* vol. 38, n° 6, p. 481-490. [https://doi.org/10.1007/s40261-018-0637-1]
- HARVEY, J.W. (2012) Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas. St. Louis, Mo, Elsevier/Saunders.
- HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ (2015) Historique des avis rendus par la Haute Autorité de Santé concernant le médicament ARANESP (darbépoétine alpha). In *Haute Autorité de Santé*. [https://www.has-sante.fr/jcms/pprd_2984512/fr/aranesp-darbepoetine-alfa] (consulté le 28/09/2022).
- HE, M., YU, P., HU, Y., *et al.* (2021) Erythrocyte-Membrane-Enveloped Biomineralized Metal-Organic Framework Nanoparticles Enable Intravenous Glucose-Responsive Insulin Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces* vol. 13, n° 17, p. 19648-19659. [https://doi.org/10.1021/acsami.1c01943]
- HOESEL, W., GROSS, J., MOLLER, R., *et al.* (2004) Development and evaluation of a new ELISA for the detection and quantification of antierythropoietin antibodies in human sera. *Journal of Immunological Methods* vol. 294, n° 1-2, p. 101-110. [https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.017]
- HU, L., YANG, C., ZHAO, T., *et al.* (2012) Erythropoietin ameliorates renal ischemia and reperfusion injury via inhibiting tubulointerstitial inflammation. *The Journal of Surgical Research* vol. 176, n° 1, p. 260-266. [https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.06.035]
- INGRASCIOтта, Y., LACAVALA, V., MARCIANO, I., *et al.* (2019) In search of potential predictors of erythropoiesis-stimulating agents (ESAs) hyporesponsiveness: a population-based study. *BMC Nephrology* vol. 20, n° 1, p. 359. [https://doi.org/10.1186/s12882-019-1554-0]

- INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (2023) IRIS Kidney - Guidelines - IRIS Staging of CKD. In *IRIS Kidney - Guidelines*. [http://www.iris-kidney.com/education/guidelines/index.html] (consulté le 11/10/2023).
- JACOBSON, L.O., GOLDWASSER, E., FRIED, W., *et al.* (1957) Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* vol. 179, n° 4560, p. 633-634. [https://doi.org/10.1038/179633a0]
- JADOUL, M., VANRENTERGHEM, Y., FORET, M., *et al.* (2004) Darbepoetin alfa administered once monthly maintains haemoglobin levels in stable dialysis patients. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* vol. 19, n° 4, p. 898-903. [https://doi.org/10.1093/ndt/gfh021]
- JOHNSON, D.W., POLLOCK, C.A., MACDOUGALL, I.C. (2007) Erythropoiesis-stimulating agent hyporesponsiveness. *Nephrology* vol. 12, n° 4, p. 321-330. [https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2007.00810.x]
- KOHLHAUER, M., TISSIER, R., PERROT, S. (2019) Polycopié de Pharmacie : Pharmacologie et toxicologie du médicament vétérinaire. Maisons-Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique de pharmacologie et de toxicologie.
- LE ROUX, D., DJOKIC, V., MORISSE, S., *et al.* (2020) Evaluation of immunogenicity and protection of the Mic1-3 knockout *Toxoplasma gondii* live attenuated strain in the feline host. *Vaccine* vol. 38, n° 6, p. 1457-1466. [https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.11.076]
- LIN, A.V. (2015) Indirect ELISA. *Methods in Molecular Biology* vol. 1318, n° 1, p. 51-59. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_5]
- LOBBES, H. (2023) Pure red cell aplasia: Diagnosis, classification and treatment *La Revue De Médecine Interne* vol. 44, n° 1, p. 19-26. [https://doi.org/10.1016/j.revmed.2022.10.385]
- LOCATELLI, F., BÁRÁNY, P., COVIC, A., *et al.* (2013) Kidney Disease: Improving Global Outcomes guidelines on anaemia management in chronic kidney disease: a European Renal Best Practice position statement. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* vol. 28, n° 6, p. 1346-1359. [https://doi.org/10.1093/ndt/gft033]
- LOCATELLI, F., HANNEDOUCHE, T., FISHBANE, S., *et al.* (2019) Cardiovascular Safety and All-Cause Mortality of Methoxy Polyethylene Glycol-Epoetin Beta and Other Erythropoiesis-Stimulating Agents in Anemia of CKD: A Randomized Noninferiority Trial. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* vol. 14, n° 12, p. 1701-1710. [https://doi.org/10.2215/CJN.01380219]
- LUND, E.M., ARMSTRONG, P.J., KIRK, C.A., *et al.* (1999) Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 214, n° 9, p. 1336-1341.
- MACDOUGALL, I.C. (2005) Antibody-mediated pure red cell aplasia (PRCA): epidemiology, immunogenicity and risks. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* vol. 20, n° 4, p. iv9-15. [https://doi.org/10.1093/ndt/gfh1087]
- MACDOUGALL, I.C. (2002) Darbepoetin alfa: a new therapeutic agent for renal anemia. *Kidney International. Supplement* vol. 61, n° 80, p. 55-61. [https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.61.s80.11.x]

- MACDOUGALL, I.C., PADHI, D., JANG, G. (2007) Pharmacology of darbepoetin alfa. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* vol. 22, n° 4, p. iv2-iv9. [<https://doi.org/10.1093/ndt/gfm160>]
- MACLEOD, J.N., TETREAUULT, J.W., LORSCHY, K.A., *et al.* (1998) Expression and bioactivity of recombinant canine erythropoietin. *American Journal of Veterinary Research* vol. 59, n° 9, p. 1144-1148.
- MALBRANKE, C., BIKARD, D., COCCO, S., *et al.* (2021) Improving sequence-based modeling of protein families using secondary-structure quality assessment. *Bioinformatics* vol. 37, n° 22, p. 4083-4090. [<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab442>]
- MARINO, C.L., LASCELLES, B.D.X., VADEN, S.L., *et al.* (2014) Prevalence and classification of chronic kidney disease in cats randomly selected from four age groups and in cats recruited for degenerative joint disease studies. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 16, n° 6, p. 465-472. [<https://doi.org/10.1177/1098612X13511446>]
- MCCOWN, J.L., SPECHT, A.J. (2011) Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: a review. *Journal of the American Animal Hospital Association* vol. 47, n° 3, p. 151-160. [<https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5553>]
- MINUTOLO, R., GAROFALO, C., CHIODINI, P., *et al.* (2021) Types of erythropoiesis-stimulating agents and risk of end-stage kidney disease and death in patients with non-dialysis chronic kidney disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* vol. 36, n° 2, p. 267-274. [<https://doi.org/10.1093/ndt/gfaa088>]
- MIYAKE, T., KUNG, C.K., GOLDWASSER, E. (1977) Purification of human erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry* vol. 252, n° 15, p. 5558-5564. [[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)63387-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)63387-9)]
- MYTYCH, D.T., LA, S., BARGER, T., *et al.* (2009) The development and validation of a sensitive, dual-flow cell, SPR-based biosensor immunoassay for the detection, semi-quantitation, and characterization of antibodies to darbepoetin alfa and epoetin alfa in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* vol. 49, n° 2, p. 415-426. [<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.11.028>]
- NAITO, K., TAMAHASHI, N., CHIBA, T., *et al.* (1992) The microvasculature of the human bone marrow correlated with the distribution of hematopoietic cells. A computer-assisted three-dimensional reconstruction study. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* vol. 166, n° 4, p. 439-450. [<https://doi.org/10.1620/tjem.166.439>]
- NCBI Blast erythropoietin Canis lupus familiaris (2024). In *NCBI Blast*. [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] (consulté le 18/03/2024).
- NCBI Blast erythropoietin Felis catus (2024). In *NCBI Blast*. [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#sort_mark] (consulté le 18/03/2024).
- NCBI Blast erythropoietin Homo sapiens sapiens (2024). In *NCBI Blast*. [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] (consulté le 18/03/2024).
- NOVAK, J.E., SZCZECH, L.A. (2008) Triumph and tragedy: anemia management in chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* vol. 17, n° 6, p. 580-588. [<https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32830c488d>]

- OGAWA, T., NITTA, K. (2015) Erythropoiesis-stimulating agent hyporesponsiveness in end-stage renal disease patients. *Contributions to Nephrology* vol. 185, n° 1, p. 76-86. [<https://doi.org/10.1159/000380972>]
- PADHI, S., BEHERA, G., PATTNAIK, S.A., *et al.* (2020) Acquired Pure Red Cell Aplasia Following Recombinant Erythropoietin (Darbepoetin-alfa) Therapy. *Indian Journal of Nephrology* vol. 30, n° 2, p. 113-116. [https://doi.org/10.4103/ijn.IJN_129_19]
- PETERSEN, J., KANG, M.S., HAYS, M.T. (1996) Erythropoietin can be administered during dialysis. A kinetic analysis. *ASAIO Journal* vol. 42, n° 1, p. 27-33.
- PFEFFER, M.A., BURDMANN, E.A., CHEN, C.-Y., *et al.* (2009) A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease. *The New England Journal of Medicine* vol. 361, n° 21, p. 2019-2032. [<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907845>]
- POLENAKOVIC, M., SIKOLE, A. (1996) Is erythropoietin a survival factor for red blood cells? *Journal of the American Society of Nephrology* vol. 7, n° 8, p. 1178-1182. [<https://doi.org/10.1681/ASN.V781178>]
- POLZIN, D.J. (2013) Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* vol. 23, n° 2, p. 205-215. [<https://doi.org/10.1111/vec.12034>]
- PONIKOWSKI, P., VAN VELDHUISEN, D.J., COMIN-COLET, J., *et al.* (2015) Beneficial effects of long-term intravenous iron therapy with ferric carboxymaltose in patients with symptomatic heart failure and iron deficiency†. *European Heart Journal* vol. 36, n° 11, p. 657-668. [<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu385>]
- RANDOLPH, J.E., SCARLETT, J., STOKOL, T., *et al.* (2004a) Clinical efficacy and safety of recombinant canine erythropoietin in dogs with anemia of chronic renal failure and dogs with recombinant human erythropoietin-induced red cell aplasia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 18, n° 1, p. 81-91. [[https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2004\)18<81:ceasor>2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2004)18<81:ceasor>2.0.co;2)]
- RANDOLPH, J.E., SCARLETT, J.M., STOKOL, T., *et al.* (2004b) Expression, bioactivity, and clinical assessment of recombinant feline erythropoietin. *American Journal of Veterinary Research* vol. 65, n° 10, p. 1355-1366. [<https://doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.1355>]
- RASTOGI, S., IMAI, M., SHAROV, V.G., *et al.* (2008) Darbepoetin-alpha prevents progressive left ventricular dysfunction and remodeling in nonanemic dogs with heart failure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* vol. 295, n° 6, p. H2475-2482. [<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00074.2008>]
- REYES-GOMEZ, E. (2020) Polycopié de pathologie spéciale: Organes lymphoïdes hématopoïétiques. Maisons-Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique d'histologie.
- RIEU, P. (2009) Erythropoietin: from the receptor to erythropoiesis stimulating agents. *Néphrologie & Thérapeutique* vol. 5, n° 5, p. 1-5. [[https://doi.org/10.1016/S1769-7255\(09\)75173-9](https://doi.org/10.1016/S1769-7255(09)75173-9)]

- ROBINSON, D.M., EASTHOPE, S.E. (2005) Darbepoetin alfa: its use in anemia associated with chronic kidney disease. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* vol. 19, n° 5, p. 327-343. [<https://doi.org/10.2165/00063030-200519050-00006>]
- ROGER, S.D., KOLMAKOVA, E., FUNG, M., *et al.* (2014) Darbepoetin alfa once monthly corrects anaemia in patients with chronic kidney disease not on dialysis. *Nephrology* vol. 19, n° 5, p. 266-274. [<https://doi.org/10.1111/nep.12214>]
- ROSSERT, J., FROISSART, M. (2006) Role of anemia in progression of chronic kidney disease. *Seminars in Nephrology* vol. 26, n° 4, p. 283-289. [<https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2006.05.004>]
- SAKAGUCHI, Y., HAMANO, T., WADA, A., *et al.* (2019) Types of Erythropoietin-Stimulating Agents and Mortality among Patients Undergoing Hemodialysis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* vol. 30, n° 6, p. 1037-1048. [<https://doi.org/10.1681/ASN.2018101007>]
- SEBAHOUN, G. (2005) *Hématologie clinique et biologique*, 2e éd. Rueil-Malmaison, Arnette.
- SEMENZA, G.L. (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* vol. 148, n° 3, p. 399-408. [<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>]
- SHEPSHELOVICH, D., ROZEN-ZVI, B., AVNI, T., *et al.* (2016) Intravenous Versus Oral Iron Supplementation for the Treatment of Anemia in CKD: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases* vol. 68, n° 5, p. 677-690. [<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.04.018>]
- SHIH, H.-M., WU, C.-J., LIN, S.-L. (2018) Physiology and pathophysiology of renal erythropoietin-producing cells. *Journal of the Formosan Medical Association* vol. 117, n° 11, p. 955-963. [<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.03.017>]
- SIA, C.S., JEN, W.Y., POON, M.L. (2020) Acquired Antibody-Mediated Pure Red Cell Aplasia Following Treatment With Darbepoetin. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* vol. 49, n° 1, p. 46-48.
- SINGH, A.K., SZCZECHE, L., TANG, K.L., *et al.* (2006) Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *The New England Journal of Medicine* vol. 355, n° 20, p. 2085-2098. [<https://doi.org/10.1056/NEJMoa065485>]
- SINHA, S.D., BANDI, V.K., REDDY, B.B., *et al.* (2021) Safety, Tolerability, and Immunogenicity of Prescribed Usage of Darbepoetin-Alfa (Hetero Biopharma) in Patients of Chronic Kidney Disease With Renal Anemia: A Post-Marketing Surveillance Study. *Cureus* vol. 13, n° 4, p. e14730. [<https://doi.org/10.7759/cureus.14730>]
- STACK, A.G., ALGHALI, A., LI, X., *et al.* (2018) Quality of care and practice patterns in anaemia management at specialist kidney clinics in Ireland: a national study. *Clinical Kidney Journal* vol. 11, n° 1, p. 99-107. [<https://doi.org/10.1093/ckj/sfx060>]
- STORRING, P.L., TIPLADY, R.J., GAINES DAS, R.E., *et al.* (1998) Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties. *British Journal of Haematology* vol. 100, n° 1, p. 79-89. [<https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00521.x>]

- SURESH, S., RAJVANSHI, P.K., NOGUCHI, C.T. (2019) The Many Facets of Erythropoietin Physiologic and Metabolic Response. *Frontiers in Physiology* vol. 10, n° 1534, p. 1-20. [https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01534]
- SUSANTAD, T., FUANGTHONG, M., THARAKARAMAN, K., *et al.* (2021) Modified recombinant human erythropoietin with potentially reduced immunogenicity. *Scientific Reports* vol. 11, n° 1, p. 1491. [https://doi.org/10.1038/s41598-020-80402-1]
- TACEY, R., GREWAY, A., SMIELL, J., *et al.* (2003) The detection of anti-erythropoietin antibodies in human serum and plasma. Part I. Validation of the protocol for a radioimmunoprecipitation assay. *Journal of Immunological Methods* vol. 283, n° 1-2, p. 317-329. [https://doi.org/10.1016/j.jim.2003.09.003]
- TENG, Y.-H., TSAI, H.-T., HSIEH, Y.-S., *et al.* (2009) Elevated erythrocyte carbonic anhydrase activity is a novel clinical marker in hyperventilation syndrome. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* vol. 47, n° 4, p. 441-445. [https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.102]
- TOBLLI, J.E., LOMBRAÑA, A., DUARTE, P., *et al.* (2007) Intravenous iron reduces NT-pro-brain natriuretic peptide in anemic patients with chronic heart failure and renal insufficiency. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 50, n° 17, p. 1657-1665. [https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.07.029]
- TOSKALA, E. (2014) Immunology. *International Forum of Allergy & Rhinology* vol. 4, n° 2, p. S21-27. [https://doi.org/10.1002/alr.21380]
- TSIFTSOGLU, A.S. (2021) Erythropoietin (EPO) as a Key Regulator of Erythropoiesis, Bone Remodeling and Endothelial Transdifferentiation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Implications in Regenerative Medicine. *Cells* vol. 10, n° 8, p. 2140. [https://doi.org/10.3390/cells10082140]
- VASSAL, A. (2020) Utilisation de la darbépoéine en médecine vétérinaire : état des preuves et étude rétrospective des chats traités au ChuvA. Thèse de médecine vétérinaire. Maisons-Alfort, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- VENKATACHALAM, M.A., WEINBERG, J.M., KRIZ, W., *et al.* (2015) Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression. *Journal of the American Society of Nephrology* vol. 26, n° 8, p. 1765-1776. [https://doi.org/10.1681/ASN.2015010006]
- VOULGARI, P.V., HATZIMICHAEL, E.C., TSIARA, S., *et al.* (2001) Investigation for the presence of anti-erythropoietin antibodies in patients with myelodysplastic syndromes. *European Journal of Haematology* vol. 66, n° 1, p. 31-36. [https://doi.org/10.1034/j.1600-0609.2001.00336.x]
- WEISS, D.J., WARDROP, K.J. (2010) Schalm's veterinary hematology, 6th ed. Ames, Wiley-Blackwell.
- WEN, D., BOISSEL, J.P., TRACY, T.E., *et al.* (1993) Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. *Blood* vol. 82, n° 5, p. 1507-1516. [https://doi.org/10.1182/blood.V82.5.1507.1507]
- ZHAO, X., ZHANG, C., CUI, X., *et al.* (2021) Interactions of Hematopoietic Stem Cells with Bone Marrow Niche. *Methods In Molecular Biology* vol. 2346, n° 1, p. 21-34. [https://doi.org/10.1007/7651_2020_298]

ZHENG, Q., YANG, H., SUN, L., *et al.* (2020) Efficacy and safety of HIF prolyl-hydroxylase inhibitor vs epoetin and darbepoetin for anemia in chronic kidney disease patients not undergoing dialysis: A network meta-analysis. *Pharmacological Research* vol. 159, n° 1, p. 105020. [<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105020>]

Annexe 1

Figure 24 : Tableau des relevés d'hématocrite, des injections de darbépoétine et des prélèvements sanguins au cours du temps chez W (A09-5970)

Date Ht	Ht	INJ darbé	Date PS sérum	J post INJ (depuis reprise en novembre 2022)
01/12/2022	24%	15/12/2022	15/12/2022	J15
17/11/2022	26%	08/12/2022	01/12/2022	J0
30/06/2022	32%	01/12/2022		
16/06/2022	20%			
10/03/2022	24%	07/07/2022		
03/02/2022	22%	17/06/2022		
		07/10/2021		
27/12/2021	24%	14/10/2021		
21/10/2021	30%	30/09/2021		
14/10/2021	22%	21/09/2021		
16/09/2021	25%	07/09/2021		

Figure 25 : Tableau des relevés d'hématocrite, des injections de darbépoétine et des prélèvements sanguins au cours du temps chez X (A23-2XX6)

Date Ht	Ht	INJ darbé	Date PS sérum	J post INJ
23/03/2023	32%	23/03/2023	17/03/2023	J21
16/03/2023	28%	16/03/2023	03/03/2023	J7
09/03/2023	24%	09/03/2023	24/02/2023	J0
05/03/2023	19%	03/03/2023		
01/03/2023	23%	24/02/2023		
23/02/2023	16%			
12/02/2023	42%			

Figure 26 : Tableau des relevés d'hématocrite, des injections de darbépoétine et des prélèvements sanguins au cours du temps chez Y (A23-1XX5)

Date Ht	Ht	INJ darbé	Date PS sérum	J post INJ
28/03/2023	28%	16/03/2023	16/03/2023	J20
16/03/2023	20%	04/03/2023		
03/03/2023	16%	24/02/2023		
27/02/2023	16%			
24/02/2023	17%			
07/02/2023	28%			

Annexe 2

Tableau 17 : Tableau statuant sur la positivité des échantillons testés

Echantillons d'intérêt	DO spé Darbé	Positivité
Chat toxo -	0,122	neg
Chat toxo +	0,062	neg
X (A23-2XX6) T0	0,000	-
X (A23-2XX6) T-1inj/J-7	0,213	+
X (A23-2XX6) T-3inj/J-21	0,425	+
W (A09-5970) T0	0,019	-
W (A09-5970) T-1inj/J-15	0	-
Y (A23-1XX5) T-2inj/J-20	0,6545	+

La première colonne du tableau ci-dessus correspond aux DO retranchées relevées sur les différents échantillons testés, à savoir les sérums de chats témoins (déjà présentées plus haut mais laissées à titre de comparaison) pour les deux premières lignes et les sérums d'intérêt de chats exposés à la darbépoétine pour les lignes suivantes ; Un résultat négatif « - » retrouvé sur un échantillon dont on ne connaissait pas le statut de positivité avant d'avoir une mesure de DO et dont le résultat négatif signale l'absence d'anticorps anti-darbépoétine dans l'échantillon est distingué d'un résultat « neg » qui est également un résultat négatif mais réservé aux chats témoins constituant notre contrôle négatif (chez qui il est théoriquement impossible de retrouver des anticorps anti-darbépoétine). Le résultat « + » signal un résultat positif soit la présence d'anticorps anti-darbépoétine dans l'échantillon.

MISE AU POINT D'UN TEST SÉROLOGIQUE DE DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-DARBÉPOÉTINE CHEZ LE CHAT

AUTEUR : Auriane MIGNON

RÉSUMÉ :

De nombreux chats sont atteints de maladie rénale chronique, la majorité d'entre eux souffrant également d'anémie chronique. En effet, le rein est de loin le principal organe responsable de la synthèse de l'érythropoïétine au sein de l'organisme, un facteur de croissance majeur des érythrocytes.

Dans l'objectif d'une amélioration de la qualité de vie des chats souffrant d'anémie chronique, un médicament provenant de la pharmacopée humaine a commencé à être utilisé chez le chat. Cependant, bien que le médicament soit bien toléré et très efficace en médecine humaine, les cliniciens observent des échecs thérapeutiques fréquents chez les chats traités par ce médicament.

Il s'agit de la darbépoétine, une érythropoïétine de synthèse réalisée à partir de la séquence protéique de l'érythropoïétine humaine. Or, la darbépoétine ne possède que 82% d'homologie de séquence avec l'érythropoïétine endogène féline contre 95% avec l'érythropoïétine endogène humaine. Nous avons donc émis l'hypothèse de la présence d'une réaction immunogène médiée par des anticorps dirigés contre ce médicament humain au sein de l'espèce féline.

Nous avons réussi à mettre au point un modèle ELISA dans lequel nous avons pu détecter la présence de ces anticorps anti-darbépoétine chez deux chats sur trois testés. Il semblerait donc qu'il existe des anticorps anti-darbépoétine chez le chat. Cependant, il reste encore à réaliser d'autres études complémentaires avec un nombre conséquent d'échantillons, de manière à conclure sur le lien statistique entre la présence de ces anticorps anti-darbépoétine et l'efficacité du traitement à la darbépoétine chez le chat.

À l'avenir, l'objectif serait de créer un test rapide ELISA sur le même modèle que celui façonné par nos soins, utilisable en routine par les cliniciens, directement au chevet du patient.

MOTS CLÉS :

ELISA – DARBÉPOÉTINE – ANTICORPS ANTI-DARBÉPOÉTINE – TEST SÉROLOGIQUE

JURY :

Présidente : Pr Christelle MAUREY-GUÉNEC
Directeur de thèse : Pr Matthias KOHLHAUER
Examinatrice : Dr Delphine LE ROUX

DEVELOPMENT OF A SEROLOGICAL TEST FOR THE DETECTION OF ANTI-DARBEPOETIN ANTIBODIES IN CATS

AUTHOR: Auriane MIGNON

SUMMARY:

Many cats suffer from chronic kidney disease, most of them also suffer from chronic anemia. In fact, the kidney is by far the main organ responsible for the synthesis of erythropoietin in the body, a major erythrocyte growth factor.

With the aim of improving the quality of life of cats suffering from chronic anemia, a drug from the human pharmacopoei has begun to be used in cats. However, although the well-tolerated and highly effective in humans, clinicians observe frequent therapeutic failures in cats treated with this drug.

This is darbepoetin, an erythropoietin synthesized from the protein sequence of human erythropoietin. However, darbepoetin has only 82% sequence homology with feline endogenous erythropoietin compared with 95% for human endogenous erythropoietin. We therefore hypothesized the presence of an immunogenic reaction mediated by antibodies to this human drug in the feline species.

We have succeeded in developing an ELISA model in which we appear to have detected the presence of these anti-darbepoetin antibodies in two out of three cats tested. It would therefore appear that anti-darbepoetin antibodies do exist in cats. However, further still needs to be carried out with a substantial number of samples, in order to number of samples, in order to determine the statistical link between the presence between the presence of these anti-darbepoetin antibodies and the efficacy of darbepoetin treatment in cats.

In the future, the aim is to create a rapid ELISA test based on the same model as the one we have developed, for routine use by clinicians directly at the patient's bedside.

KEYWORDS:

ELISA – DARBEPOETIN – ANTI-DARBEPOETIN ANTIBODIES – SEROLOGICAL TESTING

JURY:

Chairperson: Pr Christelle MAUREY-GUÉNEC

Thesis Director: Pr Matthias KOHLHAUER

Reviewer: Dr Delphine LE ROUX