

UNIVERSITE DU QUEBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
ANNE NOREAU

L'EPOR COMME INDICATEUR D'UNE ACCÉLÉRATION INDUE DE
L'ÉRYTHROPOÏÈSE

DÉPÔT FINAL
09/2002

2165

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

Lors des jeux olympiques tenus à Sydney 2000, deux nouveaux tests de détection de l'érythropoïétine ont été utilisés pour le dépistage des athlètes faisant usage de cette substance pour améliorer leurs performances. Dans le but de rendre la sonde plus performante pour les jeux olympiques à venir, nous avons vérifié la possibilité d'ajouter un paramètre, qui aurait la propriété d'être augmenté lors de dopage à l'EPO et ainsi bonifier l'actuelle sonde de détection.

Ayant préalablement été associé à une érythropoïèse accrue, le récepteur soluble à l'érythropoïétine (EPOR-S) semblait répondre à nos objectifs initiaux. Nous avons donc utilisé des méthodes immunologiques pour vérifier, à l'aide de trois protocoles, si une corrélation existait entre la quantité d'EPOR-S en circulation et l'augmentation de l'activité érythropoïétique au niveau de la moelle osseuse. Nous avons observé qu'il y avait effectivement une hausse significative de la quantité d'EPOR-S, dans un seul des trois protocoles, lors de l'arrêt des injections d'EPO. Cette hausse d'EPOR-S pourrait indiquer une possible relation entre ce récepteur soluble et l'EPO injectée.

De plus, nous avons obtenu des quantités d'EPOR-S très variables d'un athlète à l'autre, qui de toute évidence rendrait impossible l'établissement de normes utilisables dans les tests de dépistage actuels. EPOR-S ne pourrait donc pas être incorporé dans les modèles de dépistages reconnus.

REMERCIEMENTS

La réalisation de cette étude a nécessité la collaboration d'une multitude de personnes. J'aimerais profiter de l'occasion pour adresser mes plus sincères remerciements à tous ceux et celles, qui de près où de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet de maîtrise. Sans votre précieuse aide, nul doute que mon travail aurait été bien plus difficile à accomplir.

Je ne pourrais passer sous silence, les fortes amitiés qui ont créés lors de cette aventure. Amélie, Caroline, Julien, Julie, Nancy... vous avez su rendre ces deux années inoubliables. J'aimerais exprimer mes plus sincères remerciements à celles qui ont travaillé directement sur ce projet, Anne-Maire, Valérie mais surtout mille merci à Claire Chénard et Marie-Guylaine Gagnon pour le temps consacré, les nombreux conseils techniques et surtout pour leur amitié.

J'aimerais exprimer mes plus sincères remerciements au Dr Raynald Gareau, d'abord de m'avoir permis d'intégrer son équipe de recherche, ce fut une grande marque de confiance fort appréciée. Pour ces conseils, ses encouragements, sa patience, son professionnalisme et pour sa rigueur scientifique à mon égard, mille merci. Ces années ont été riches en apprentissage, autant sur le plan scientifique que personnel.

Finalement, merci à mes proches particulièrement Geneviève, Michel et Marc pour leur soutien, leurs encouragements et leur compréhension.

TABLE DES MATIÈRES

	PAGE
RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
 CHAPITRES	
1. INTRODUCTION	
Dopage dans les sports.....	1
Historique de l'EPO.....	6
Sites de synthèse de l'EPO.....	7
Gène de l'EPO.....	9

Structure de l'EPO.....	12
Mécanisme et site d'action de l'EPO.....	16
Le récepteur à l'EPO (EPOR).....	20
Activation du récepteur.....	23
Signal de transduction.....	27
La voie STAT-5.....	28
La voie RAS.....	30
Régulation négative.....	31
Différentes formes d'EPOR.....	33
Interaction EPOR-EPO.....	39
Tests de dépistage du dopage à l'EPO.....	40
Principaux objectifs à atteindre.....	45
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	
Protocole France 1997.....	48
Protocole Australie 1999.....	49
Protocole Australie 2000.....	51
Protocole de dosage d'EPOR-S par la technique ELISA.....	53
Protocole de visualisation d'EPOR-S par immunobuvardage de type Western.....	58
Purification d'EPOR-S avec Dynabeads.....	61
Protocole de préparation des billes magnétiques.....	62
Protocole de cytométrie de flux.....	63

	Protocole de visualisation d'EPOR-S par les Dynabeads.....	64
	Analyses statistiques.....	65
3.	RÉSULTATS	
	Résultats protocole France 1997.....	66
	Résultats protocole Australie 1999.....	73
	Résultats protocole Australie 2000.....	84
	Résultats visualisation d'EPOR-S par immunobuvardage de type Western et par les Dynabeads.....	90
4.	DISCUSSION	94
5.	CONCLUSION	103
6.	RÉFÉRENCES	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux

1. Liste des substances dopantes interdites par le CIO.....	4
2. Équations des modèles.....	43
3. Différents protocoles d'administration d'EPO aux athlètes.....	53
4. Compilation des paramètres sanguins obtenus, France 1997.....	69
5. Compilation des paramètres sanguins obtenus, Australie 1999	
Groupe EPO + F.I.M.....	79
6. Compilation des paramètres sanguins obtenus, Australie 1999	
Groupe EPO + F.O.....	80
7. Compilation des paramètres sanguins obtenus, Australie 1999	
Groupe PLACEBO.....	81
8. Compilation des paramètres sanguins obtenus, Australie 2000.....	86

LISTE DES FIGURES

Figures

1. Structure du gène de l'EPO humaine.....	10
2. Structure primaire de l'EPO.....	13
3. Structure secondaire de l'EPO.....	14
4. Différentiation cellulaire à partir d'une cellule souche.....	17
5. Cinétique de l'érythropoïèse.....	18
6. Séquence des événements survenant suite à la liaison de l'EPO.....	19
7. Gène d'EPOR chez la souris.....	21
8. Organisation fonctionnelle de la molécule d'EPOR.....	22
9. Principaux mécanismes d'activation du récepteur EPOR.....	24
10. Liaison de la molécule d'EPO sur deux récepteurs à la surface cellulaire.....	25
11. Signal de transduction	29
12. La régulation négative d'EPOR.....	32
13. Différentes formes d'EPOR.....	33
14. Rôles possibles des formes solubles.....	36
15. Test de dépistage direct : profil de focalisation isoélectrique.....	45
16. Principe général d'un ELISA.....	55
17. Principe général des billes magnétiques.....	62
18. Résultats individuels de la quantité d'EPOR-S, France 1997.....	67
19. Moyenne (\pm S.E.) des paramètres sanguins en fonction des jours, France 1997.....	71

20. Quantité d'EPOR-S moyen et variation moyenne, France 1997.....	72
21. Résultats individuels de la quantité d'EPOR-S, Australie 1999	
Groupe : EPO + F.I.M.....	74
22. Résultats individuels de la quantité d'EPOR-S, Australie 1999	
Groupe : EPO + F.O.....	76
23. Résultats individuels de la quantité d'EPOR-S, Australie 1999	
Groupe : PLACEBO.....	77
24. Moyenne des paramètres sanguins en fonction des jours, Australie 1999.....	82
25. Quantité d'EPOR-S moyen en fonction des jours, Australie 1999.....	83
26. Résultats individuels de la quantité d'EPOR-S, Australie 2000.....	85
27. Moyenne des paramètres sanguins en fonction des jours, Australie 2000.....	87
28. Quantité d'EPOR-S moyen et variation moyenne , Australie 2000.....	88
29. Résultats de la présence des anticorps sur les billes magnétiques.....	91
30. Rapport de calibration pour déterminer le nombre de MESF.....	92
31. Résultats d'immunobuvardage de type Western, détection limite d'EPOR-S.....	93

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AMPc	adénosine 3'5' monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
BFU-e	burst-forming-units erythroid
BSA	albumine bovine sérique
CFU-e	colony-forming-units erythroid
CFU-GEMM	colony-forming units granulocyte, erythroid, macrophage, megacaryocyte
CIO	Comité international olympique
% CV	pourcentage de coefficient de variation
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent-assay
EPO	érythropoïétine
EPOR	récepteur à l'érythropoïétine
EPOR-S	récepteur soluble à l'érythropoïétine
EPOR-T	récepteur tronqué à l'érythropoïétine
F.I.M.	fer intra-musculaire
F.O.	fer oral
FITC	fluorescéine isothiocyanate
Hb	hémoglobine

Hct	hématocrite
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1
HPC	hematopoietic cellular protein tyrosine phosphatase
HRP	horseradish peroxydase
JAK-2	protéines Janus kinases-2
Kd	constante de dissociation
KDa	kilodalton
MAP	mitogen activated protein
MESF	molecules of equivalent soluble fluorochrome
OPD	o-phénylènediamine dihydrochloride
PBS	tampon phosphate salin
PVDF	polyvinylidene fluoride
# retic	nombre de réticulocytes
RetHct	hématocrite réticulocytaire
SDS-PAGE	sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STAT	signal transduces and activators of transcription
sTfR	récepteur soluble de la transferrine

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Dopage dans les sports

L'évolution, le dépassement et l'accomplissement de soi sont les principaux buts visés par la plupart des êtres humains. L'univers des athlètes en est un, où règne un très fort sentiment de compétition. Le but ultime est évidemment d'être le vainqueur. La détermination d'atteindre un objectif précis peut souvent conduire à l'emploi de méthodes allant à l'encontre de l'éthique sportive. Il n'est donc pas surprenant de constater l'étendue des pratiques utilisées, par les athlètes, pour réaliser leur rêve.

Avec la naissance du sport moderne, une progression des records mondiaux a été accomplie. Bien entendu, les nouvelles méthodes d'entraînement ainsi que l'innovation technologique au niveau de l'équipement ne sont pas sans conséquences sur cette progression. Cependant, il ne faut surtout pas attribuer toute cette croissance seulement à ces deux facteurs. Les progrès effectués en médecine ont aussi contribué à ce mouvement. L'utilisation de substances médicinales ou de procédés servant à améliorer les capacités physiques se définissent par un seul terme : dopage.

Le dopage est loin d'être une pratique récente. Depuis toujours, l'homme a fait usage de produits pour tenter d'améliorer artificiellement ses performances. Dans les Andes, des feuilles de coca étaient mâchées pour gagner en force et en résistance [1]. Dès 1883, des militaires bavarois consommaient de la cocaïne pour demeurer en état d'alerte [1]. Sous forme d'onguent dans les cuissards, la cocaïne fût utilisée, dès 1924 lors du Tour de France [1].

Plusieurs substances sont maintenant considérées comme des agents dopants. Étant d'abord destiné à un usage médical, les nouveaux venus ont été soigneusement sélectionnés pour ne conserver que les meilleurs candidats. Évidemment, une étroite relation doit exister entre le type de sport pratiqué et la substance choisie pour améliorer les performances. Des produits conduisant à l'accroissement du potentiel aérobie seront, par exemple, utilisés dans les disciplines où une bonne oxygénation des muscles est indispensable. On peut ainsi affirmer que des agents anabolisants seront consommés avant des épreuves nécessitant une force musculaire accrue.

En plus d'être contraire à l'éthique sportive, le dopage doit être combattu parce qu'il constitue un danger pour la santé des athlètes. À cet effet, certaines méthodes sont employées pour combattre le dopage mais celles-ci ne sont pas totalement efficaces. À titre d'exemple, les programmes éducatifs destinés aux athlètes et visant à les informer sur les dangers découlant de l'utilisation de substances dopantes ne donnent pas toujours de résultats probants. Voilà pourquoi la recherche scientifique devient importante. Cette dernière est en effet la seule méthode qui permet l'établissement de

mesures de détections efficaces, reproductibles et sans équivoques possibles, du point de vue scientifique.

La recherche scientifique est par contre largement tributaire des décisions prises par les fédérations sportives nationales et les organismes régulateurs, tels que le Comité International Olympique (CIO). Ce sont en effet ces derniers qui déterminent les substances illégales de celles qui sont légales, de même que les sanctions qui s'appliquent aux contrevenants. Pour ce faire, le CIO a publié en 1967, la première liste de substances dopantes. À ce moment, la liste ne comprenait que quelques classes d'agents pharmacologiques particuliers tels : les amines sympathomimétiques, les stimulants psychomoteurs, les stimulants du système nerveux central ainsi que les analgésiques narcotiques [2]. Pour chaque substance appartenant aux classes pharmacologiques mentionnées, des tests de dépistage furent introduits l'année suivante, aux Jeux Olympiques d'hiver tenus à Grenoble.

Aujourd'hui, la liste a pris de l'expansion, en fonction des nouvelles substances disponibles sur le marché (Tableau 1) [2]. À cet effet, les membres du CIO ont effectué une mise à jour des différentes classes de substances prohibées, mais aussi des méthodes interdites conduisant par le fait même à l'amélioration artificielle des performances physiques [2].

-
- I. Classes de substances prohibées
 - A- Stimulants
 - B- Narcotiques
 - C- Agents anabolisants
 - D- Diurétiques
 - E- Peptides et hormones glycoprotéiques

 - II. Méthodes prohibées
 - A- Dopage sanguin
 - B- Manipulations pharmacologiques, chimiques et physiques

 - III. Classes de drogues sujettes à certaines restrictions
 - A- Alcool
 - B- Marijuana
 - C- Anesthésiques locaux
 - D- Corticostéroïdes
 - E- β -Bloqueurs
-

Tableau 1 : Liste des substances dopantes interdites par le CIO [2]

Dans les milieux sportifs, c'est la loi du silence qui prévaut. Mais avec le scandale du Tour de France Édition 1998, une prise de conscience générale de l'étendue de cette pratique fut observée. En effet, le 8 juillet 1998, le soigneur de l'équipe Festina fut intercepté à la frontière Franco-Belge avec un arsenal de produits dopants. Le dossier a été remis dans les mains de la justice et l'équipe fut entièrement exclue de cette prestigieuse compétition. Il est toutefois indéniable que l'équipe Festina n'est pas la seule à faire usage de ces produits. La quasi-totalité des coureurs cyclistes professionnels sont dopés et les contrôles sont inefficaces. Le débat entourant le dopage dans les sports a été ainsi réalimenté par ces nouveaux événements.

Une des substances dopantes mise en cause lors du Tour de France 1998 est l'érythropoïétine (EPO). Avec l'avènement du génie génétique, il a été possible de produire cette molécule en grande quantité. Destinée aux patients souffrant d'anémie par insuffisance rénale, les athlètes ont eut la perspicacité de l'utiliser pour accroître leur potentiel aérobie. Elle fit donc son apparition dans le monde sportif dès 1987, au niveau des épreuves nécessitant une bonne oxygénation des muscles [1]. En fait, il s'agit d'une molécule de choix pour les cyclistes mais aussi pour les marathoniens, les nageurs, les skieurs de fonds et d'autres sports encore.

L'EPO est un produit dopant possédant des avantages incontestables pour les utilisateurs [1, 3]. La molécule administrée lors de dopage est difficilement détectable pour plusieurs raisons. D'abord, il s'agit d'une hormone glycoprotéique équivalente biologiquement et immunologiquement à la molécule endogène. Il est donc difficile de faire la distinction entre la molécule administrée de celle produite naturellement par les reins. Par ailleurs, la molécule possède une demi-vie ($T_{1/2}$) plasmatique très courte, de 6 à 11 heures [3]. Si l'on considère le mode d'administration intra-musculaire, la demi-vie passe à 40 heures. Les effets de son action se font sentir sur une longue période de temps, malgré sa disparition complète de la circulation sanguine. Les bénéfices seront ainsi ressentis lors des compétitions malgré l'arrêt des traitements environ deux semaines auparavant.

Il sera donc question dans ce présent mémoire du dopage à l'érythropoïétine (EPO). L'aspect fondamental concernant cette molécule sera discuté ainsi que les moyens de détection de celle-ci. Tout d'abord, un bref historique des principales

réalisations concernant cette molécule sera discuté. Ensuite, il sera question des principaux lieux de production de l'hormone, de son gène, de sa structure et finalement de son mécanisme d'action. D'autre part, certaines précisions seront apportées au niveau de son récepteur spécifique, EPOR. La structure de ce dernier, les mécanismes d'activation et le signal de transduction seront aussi décrits. L'existence d'une forme soluble du récepteur à l'EPO (EPOR-S) sera discutée, car retrouvée dans la circulation sanguine, celle-ci pourrait être utilisée comme marqueur indirect de dopage. Par le fait même, les principales méthodes de détection utilisées par le CIO seront exposées ainsi que les possibles avantages de bonifier la sonde existante par un marqueur supplémentaire, EPOR-S.

Historique de l'EPO

Au début du 20^e siècle il fut établi, par Carnot et DeFlandre, que le sang pouvait se régénérer grâce à un facteur particulier [4]. À cette époque, il était incontestable que la production des éléments sanguins était sous contrôle hormonal et ce facteur fut simplement nommé « hémopoïétine ». C'est à partir de 1950 que cet élément humoral fut clairement identifié et appelé « érythropoïétine » [4, 5]. En modifiant ainsi son appellation, Bonsdorff et Jalavisto permirent une restriction de son action au niveau de la lignée érythroïde [4, 5, 6].

Une percée majeure fut sans contredit la purification de l'EPO urinaire humaine par Miyake et collaborateurs en 1977 [5]. Elle fut purifiée en quantité suffisante pour permettre l'établissement de sa structure primaire. Par la suite, l'isolation, le clonage du

gène ainsi que la production *in vitro* de l'EPO fut possible [6, 7]. Depuis les douze dernières années, les travaux ont surtout porté sur la compréhension du mécanisme d'action de l'EPO ainsi que de sa régulation.

Sites de synthèse de l'EPO

N'ayant pas la propriété d'être stockée au niveau cellulaire, l'EPO doit être produite sur demande, de façon plus ou moins aiguë selon la situation qui prévaut [6]. Dans ces conditions, la production de l'EPO est fortement induite lors de perte sanguine massive, conduisant essentiellement au principal stimulus, l'hypoxie tissulaire. Pour contrer ce déficit en oxygène, une production accrue d'EPO est indispensable car elle amènera une prolifération érythrocytaire, permettant le rétablissement de la situation. Que ce soit lors de ces dernières circonstances ou pour le remplacement des érythrocytes sénescents, plusieurs organes ont démontré leur capacité à produire de l'EPO .

Avant la naissance, la production de l'EPO se fait uniquement au niveau hépatique. Ce sont les cellules non-parenchymales et les hépatocytes qui ajustent leur niveau de synthèse de l'EPO en fonction des besoins ressentis [8]. À cet effet, le système de détection d'hypoxie tissulaire consiste essentiellement en un gradient d'oxygène au niveau sanguin. En se dirigeant vers la veine centrale hépatique, le sang riche en oxygène devient de plus en plus défaillant, et ce sont les cellules (non-parenchymales et hépatocytes) entourant cette veine centrale qui captent ce manque [8].

Lors des premières semaines de vie, les reins prennent la relève en produisant 90 % de toute l'EPO produite par le corps [4, 5, 6, 9, 10]. Le foie n'a pas totalement délaissé sa fonction, contribuant ainsi aux 10 % restant avec le cerveau, les testicules, les macrophages et le placenta [4, 5, 6, 9, 10]. Par ailleurs, il semblerait que certains précurseurs érythrocytaires produiraient de l'EPO en état d'hypoxie. Un caractère d'autocrinie s'ajoute donc à ces cellules car l'EPO sécrétée servira à s'auto-stimuler [11].

Il existe différents mécanismes de réponse à l'hypoxie tissulaire dans les reins, mais l'hypothèse la plus probable est que les cellules interstitielles des capillaires péri-tubulaires, nommées « fibroblastes like-cells » agissent à titre de détecteurs et producteurs d'EPO [10]. Ces cellules perçoivent le manque d'oxygène par le biais de la molécule d'hème, contenu dans les cytochromes oxydases de la chaîne respiratoire, retrouvés dans la membrane mitochondriale [12]. Cette molécule particulière change de conformation en fonction de sa liaison avec l'oxygène, qui est directement relié à sa biodisponibilité [12]. Par ailleurs, l'atome de fer contenu dans l'hème peut aussi être remplacé par le cobalt, mimant ainsi l'effet d'hypoxie tissulaire [7]. En bref, le manque d'oxygène est d'abord perçu par les cellules interstitielles qui voient leur production d'EPO augmentée.

Chez des sujets sains, le niveau d'EPO plasmatique semble assez constant, pour maintenir un remplacement régulier des érythrocytes. Par contre, cette hormone possède un cycle circadien ou diurne c'est-à-dire que son action est prédominante en

journée, avec une concentration plasmatique plus élevée à l'aube [5, 10]. Malgré la différence au niveau de la concentration en hémoglobine, la quantité d'EPO est similaire chez l'homme et la femme et contrairement à ce que l'on pourrait penser, il n'y a pas de variation significative lors du cycle menstruel chez la femme [5].

Gène de l'EPO

Lors d'une hypoxie tissulaire quelconque, la majorité des mécanismes sont dirigés vers la production massive d'EPO, en favorisant la transcription de son gène. D'abord ressenti par la chaîne respiratoire mitochondriale, il en résulte une activation d'un facteur de transcription particulier appelé « hypoxia-inducible-factor-1 » (HIF-1). Pour être sous forme active, ce facteur trans doit s'hétérodimériser, c'est-à-dire que les deux sous-unités (HFI- α et HIF- β) sont associées pour subir une translocation nucléaire, soit l'entrée de l'hétérodimère au niveau du noyau de la cellule. Ensuite, il est possible de recruter deux autres facteurs de transcription (P300 et HNF-4), essentiel à l'activation du gène de l'EPO. Ce complexe ainsi formé, peut se lier à une séquence particulière sur le gène (élément cis-régulateur) et influencer la transcription en ARNm de l'EPO [6, 8]. Parallèlement, ce groupement de facteurs de transcription aura directement un rôle à jouer lors de la traduction de l'ARNm en protéine (Figure 1).

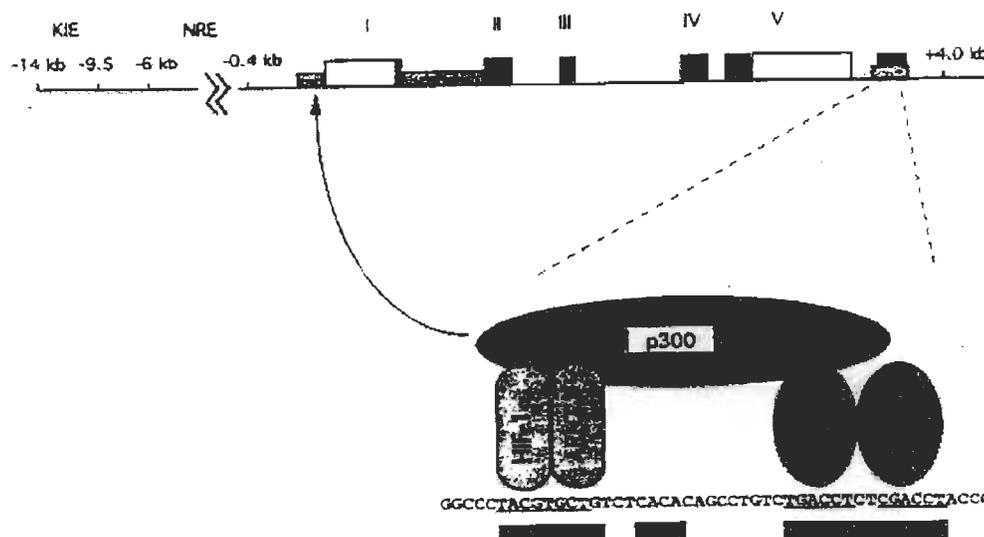


Figure 1 : Structure du gène de l'EPO. Les sites de liaison pour les facteurs de transcription HNF-1, HNF-4 et P-300 y sont représentés. Les 5 principaux exons sont indiqués par des rectangles. Source : Ebert B.L. and Bunn H.F. Regulation of the erythropoietine gene. *Blood*, 1999, 94, 1866.

La figure précédente représente la séquence codante du gène humain de l'EPO. Présent en une seule copie et retrouvé au milieu du bras long du chromosome 7 (7 pter-q22), il est d'une longueur totale de 5,4 Kb. Que ce soit au niveau du gène à proprement dit (4 introns et 5 exons) ou des régions situées en aval et en amont de ce dernier, un fort pourcentage d'homologie a été observé chez plusieurs espèces étudiées. Puisqu'elles ont un rôle à jouer au niveau de la régulation du gène de l'EPO, il n'est pas surprenant de constater le degré de conservation de la région en 5' du premier intron ainsi que la région non-transcrite en 3'.

Au niveau du promoteur (région en 5') il existe trois principaux éléments cis-régulateurs qui permettent la liaison de certains facteurs de transcription. Le premier est un élément de réponse pour les métaux « metal-response element ». Lorsqu'il y a fixation d'une molécule de cobalt, de manganèse ou de nickel sur cet élément de réponse, le gène est stimulé de façon plus ou moins aiguë [5]. Le même effet est observé lorsque des glucocorticoïdes vont se lier au deuxième élément cis-régulateur appelé « glucocorticoïde-response element ». Finalement, le dernier emplacement correspond à un site de liaison pour l'adénosine 3'5' monophosphate cyclique (AMPC). Lorsqu'il y a liaison de la molécule d'intérêt sur son élément de réponse, l'enzyme responsable de la transcription du gène peut se lier au promoteur et débiter son action. Certaines séquences conservées en 3' peuvent aussi agir en augmentant le taux de transcription du gène de l'EPO (« enhancer »). En outre, le gène de l'EPO contient une séquence sensible au taux d'azote et d'oxygène (nitrogen-regulatory/oxygen sensing consensus sequence). Cette séquence en 3' agit donc comme un stimulateur sensible à l'hypoxie tissulaire car elle permet aussi la liaison du principal facteur de transcription HIF-1.

Une stimulation continue du gène de l'EPO conduirait à des effets néfastes ainsi, lorsque la production n'est plus nécessaire, d'autres facteurs de transcription négatifs prennent la relève. Au niveau du promoteur en 5', il existe au moins un élément régulateur négatif, permettant la liaison d'un facteur appelé GATA qui inhibe l'expression du gène de l'EPO.

En bref, l'hypoxie tissulaire conduit essentiellement à l'augmentation de la transcription en ARNm du gène de l'EPO. Il y aura ensuite traduction, étape normale de synthèse d'une glycoprotéine, libérant l'EPO en circulation. L'hormone effectuera son rôle biologique en contrant l'hypoxie tissulaire grâce à la production d'érythrocytes, principaux transporteurs d'oxygène.

Structure de l'EPO

L'ARNm découlant du gène de l'EPO doit subir quelques modifications avant d'être transporté dans le cytoplasme et traduit en protéine. Entre autre, il doit subir un épissage des introns, ne conservant que les séquences nécessaires à la formation de la protéine, nommés exons. La traduction s'effectue au niveau des ribosomes, formant une protéine de 193 acides aminés. Comme la molécule retrouvée dans la circulation sanguine ne contient que 165 acides aminés, certaines modifications post-traductionnelles ont lieu. L'EPO est une hormone sécrétée, il y a donc un peptide leader qui est supprimé, amenant une délétion des 27 premiers acides aminés. De plus, pour une raison encore inconnue, il y a perte d'une arginine carboxy-terminale effectuée par des enzymes intracellulaires. Ceci restreint donc la taille de la protéine à 165 acides aminés, pour un poids moléculaire de 18 KDa. La figure 2 représente la structure primaire de l'EPO humaine. On peut remarquer la présence de quatre cystéines liées deux à deux (cys 7-161 et cys 29-33) par des ponts disulfures. Ceux-ci sont nécessaires à l'activité biologique normale de la molécule [4, 5].

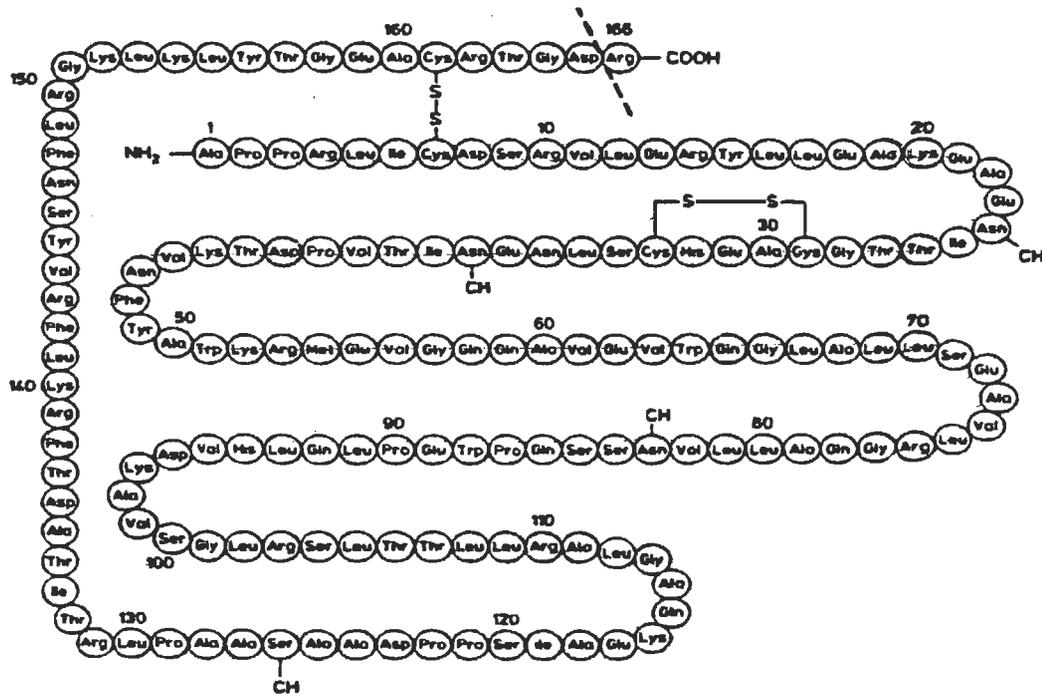


Figure 2 : Structure primaire de l'EPO. Source : Fisher, J.W. Minireview Erythropoietin : Physiologic and pharmacologic aspects. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1997, 216, 359.

La structure secondaire (Figure 3) est quant à elle composée de deux paires d'hélices- α anti-parallèles, la rendant similaire à l'hormone de croissance humaine, GH [4, 6]. On peut aussi noter la présence de quatre sites de glycosylation. Ce phénomène particulier est une autre modification post-traductionnelle que subit la molécule d'EPO. Il ne faut pas négliger la présence de glucides car ceux-ci contribuent à environ 40 % du poids moléculaire total de l'hormone qui est d'environ 30 KDa. L'EPO est composée de trois sites de N-glycosylation (Asp 24-38-83) et d'un site de O-glycosylation (Ser 126) [4, 5]. On peut donc retrouver de 20 à 30 formes d'EPO différentes dans le sérum humain, la séquence primaire étant toujours identique mais où l'association de

glucides peut varier [4, 14]. Plusieurs glucides sont retrouvés au niveau de ces quatre sites de glycosylation, les principaux étant les suivants : le fucose, le mannose, la N-acetylglucosamine, le galactose, et l'acide N-acetyleneuraminique [4, 5]. Différentes combinaisons de glucides vont permettre la génération de différentes formes d'EPO qui seront caractérisées par des points isoélectriques variés [14]. Les isoformes de la molécule possèdent donc une charge nette nulle, lorsque le pH entourant celles-ci se situe entre 3 et 4 [4].

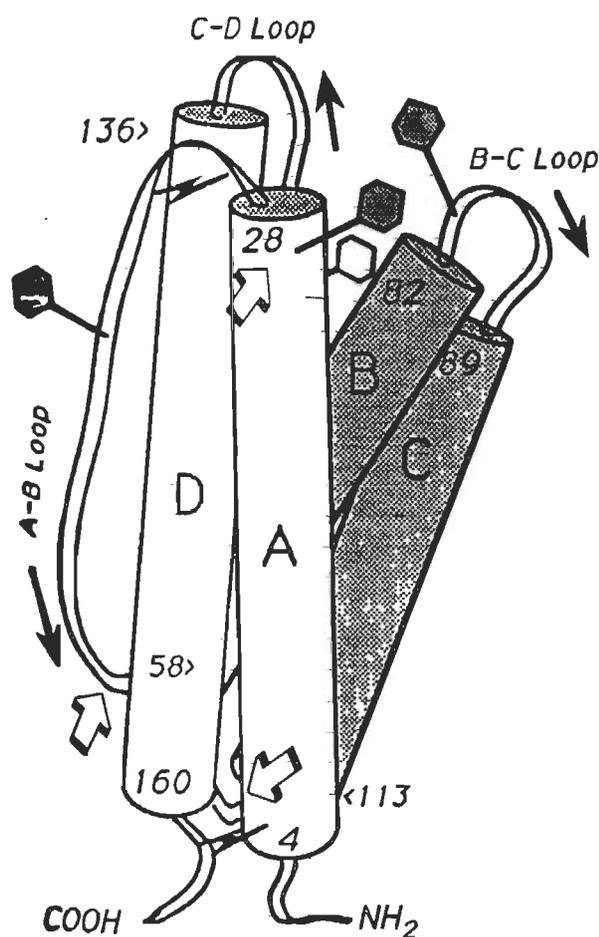


Figure 3 : Structure secondaire de l'EPO. Source : Krantz S.B. Erythropoietin. Blood, 1991, 77, 421.

Il ne faut pas nier le rôle primordial de la glycosylation de l'EPO pour son maintien en circulation. Ce mécanisme est nécessaire à l'activité physiologique normale ainsi qu'à son exportation [13]. En effet, en utilisant une substance chimique qui inhibe la glycosylation, il a été possible d'observer une séquestration de celle-ci ou une accélération de son catabolisme au niveau hépatique. De plus, une agrégation de celle-ci peut aussi survenir des suites d'une mauvaise glycosylation.

Au niveau pharmaceutique, il existe cinq principales formes d'EPO synthétique connues à ce jour. Les deux premières formes ont la même séquence en acides aminés que l'EPO mais elles diffèrent dans la composition en glucides. La forme alpha (α) est composée de 39 % de glucides tandis que le forme bêta (β) en possède 24 %. La troisième forme, appelée Aranesp ou darbepoïétine alpha, possède cinq sites de N-glycosylation, comparativement à trois retrouvés chez l'EPO. Les deux dernières formes d'EPO, peu connues, sont les formes delta (δ) et omega (ω) qui diffèrent au niveau de leur site de production et leur niveau de glycosylation. Lors de dopage à l'EPO, une de ces cinq formes synthétiques est utilisée par les athlètes. Il y aura donc prédominance de celle-ci au niveau plasmatique, contrairement au sujet sain (non dopé) où de 20 à 30 formes seront retrouvées, et ainsi il y aura une modification du profil de migration électrophorétique. Ceci est à la base d'un test de dépistage qui sera discuté ultérieurement.

Mécanisme et site d'action de l'EPO

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui conduisent à la fabrication et au remplacement continu des cellules sanguines. Cette considérable activité de production est assurée par une population particulière de cellules de la moelle osseuse appelée cellule souche hématopoïétique.

Lors de la vie intra-utérine, ces cellules souches sont d'abord retrouvées au niveau du tissu conjonctif embryonnaire. Ensuite l'hématopoïèse se poursuit au niveau splénique et hépatique pour finalement devenir médullaire lors du développement des ébauches osseuses. Après la naissance, l'hématopoïèse normale est localisée exclusivement dans la moelle osseuse. En bas âge, ce sont tous les os qui contribuent au remplacement des cellules sanguines mais progressivement, cette activité est concentrée au niveau des os courts et plats. La moelle osseuse est le milieu par excellence pour le développement des cellules sanguines. Constitué d'un vaste réseau de fibroblastes et de cellules endothéliales, la moelle fournit une armature dans laquelle sont retrouvées les cellules souches [15].

Toutes les cellules sanguines (lymphocytes, monocytes, érythrocytes, plaquettes...) sont produites à partir d'une même cellule souche indifférenciée, qui sous l'influence de facteurs stimulants, s'engage vers une lignée spécifique (Figure 4). Après plusieurs divisions, les progéniteurs deviennent spécifiques d'une seule lignée et

poursuivent leur maturation jusqu'à leur passage dans le sang, où ils pourront effectuer leur rôle biologique.

La première cellule souche se dirige d'abord vers la lignée myéloïde et elle est appelée CFU-GEMM (colony-forming-unit granulocyte, erythroïde, macrophage et mégakaryocyte) (Figure 4). Caractérisée ainsi, elle garde le potentiel de différenciation de toutes les lignées mentionnées. Cette cellule poursuit sa différenciation et donne naissance à des progéniteurs encore plus engagés, répondant aux facteurs de croissance et cytokines retrouvés dans le milieu.

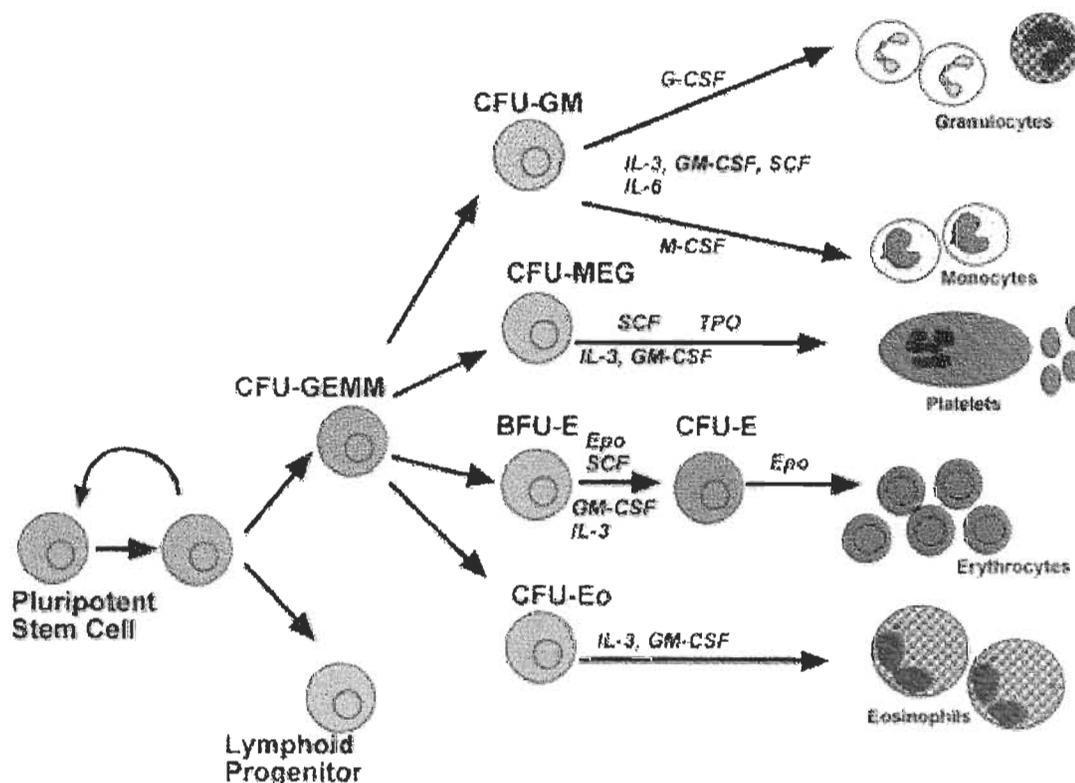


Figure 4 : Différenciation cellulaire à partir d'une cellule souche. Source :

<http://web.wi.mit.edu/lodish/pub/research/figures/Fig-B1.html>

La figure 5 représente la cinétique de l'érythropoïèse, la principale lignée d'intérêt où le facteur de croissance le plus important est l'EPO. Pour arriver à la formation des érythrocytes, différents stades successifs de maturation sont observés, donnant naissance à divers types cellulaires. L'EPO agit faiblement au niveau des premiers progéniteurs spécifiques BFU-E (Burst-Forming-Units erythroids) mais son action est beaucoup plus prononcée chez les CFU-E (Colony-Forming-Units erythroids). La présence d'une plus haute densité de récepteurs spécifiques, EPOR justifie cette sensibilité à l'EPO [16]. Pour ce faire, la densité d'EPOR à la surface cellulaire tend à croître jusqu'au stade de proérythroblaste et par la suite décroît pour disparaître complètement au niveau des réticulocytes. Lors du passage en circulation, les hématies sont dépourvues d'EPOR, les rendant insensibles à l'action de l'EPO [5].

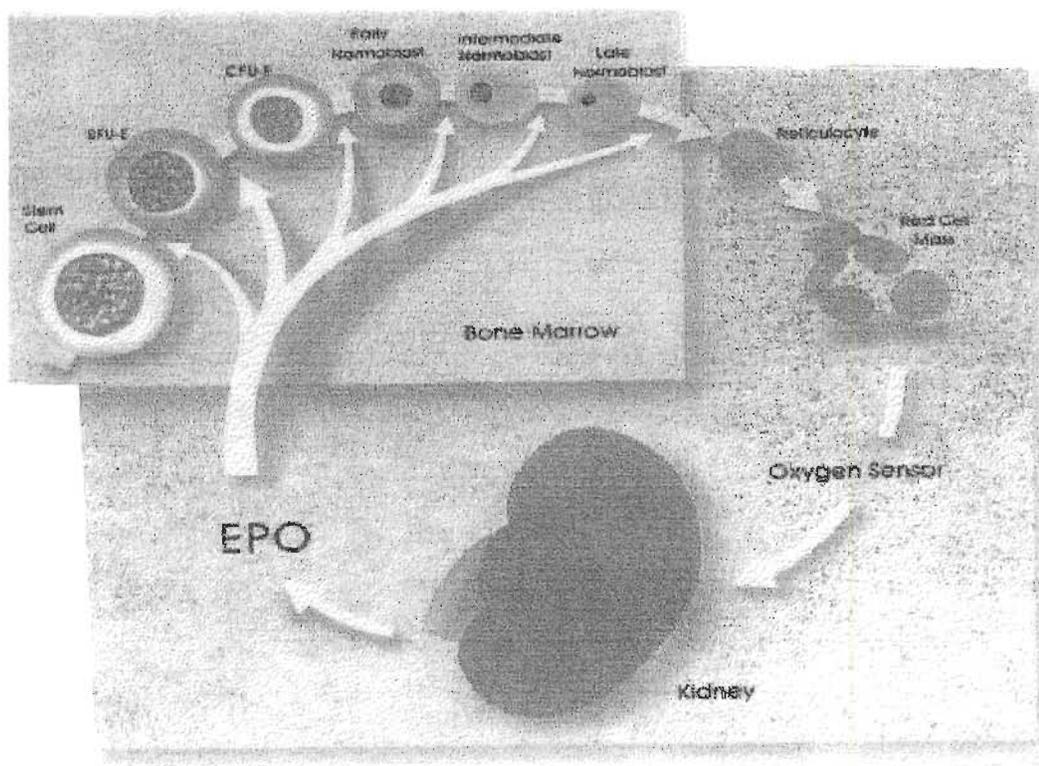


Figure 5 : Cinétique de l'érythropoïèse. Source : Dépliant publicitaire Intermedico.

En réponse à la liaison de l'EPO à son récepteur spécifique, tous les mécanismes convergent vers la maturation des érythrocytes. La figure 6 résume la série d'événements survenant suite à la liaison de l'EPO, en fonction du temps [13].

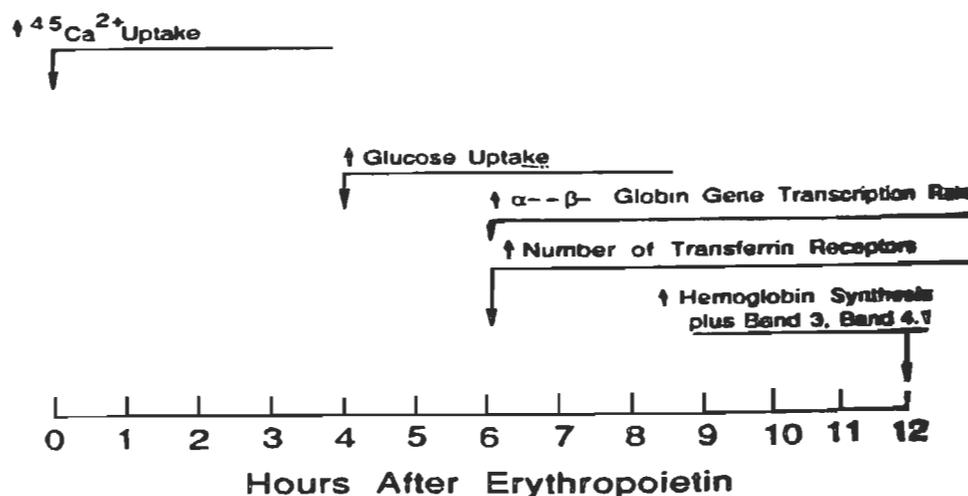


Figure 6 : Séquence des événements survenant suite à la liaison de l'EPO sur son récepteur à la surface cellulaire. Source : Krantz S.B. Erythropoietin. *Blood*, 1991, *77*, 424.

L'ensemble de ces étapes entraîne différents changements morphologiques, caractérisant chacune des cellules faisant partie intégrante de la lignée érythrocytaire (figure 5). D'abord, le noyau diminue de taille mais reste constamment arrondi, sa chromatine se condense progressivement. Au stade d'érythroblaste basophile, le noyau pycnotique est expulsé pour ainsi former le réticulocyte. Au niveau du cytoplasme, la

basophilie décroît par diminution progressive de la quantité d'ARN et l'acidophilie augmente par accumulation du produit de synthèse : l'hémoglobine.

Le récepteur à l'EPO (EPOR)

Les récepteurs sont des protéines indispensables à la communication intra et inter-cellulaire. Pour ce faire, l'EPO exerce son action en se liant à son récepteur spécifique EPOR. Ce récepteur fait partie intégrante de la famille des récepteurs de cytokines transmembranaires de type I, au même titre que plusieurs interleukines et autres facteurs de croissance. En effet, à proximité du domaine transmembranaire un motif particulier y est retrouvé : WSXWS (Trp-Ser-X-Trp-Ser) [6, 17]. Ce motif est nécessaire au transport du récepteur à la surface cellulaire [7]. Ensuite, la présence de quatre cystéines (C) situées en des endroits précis fait de la molécule d'EPOR un membre de la famille des récepteurs de cytokines de type I [17].

Au même titre que le gène de l'EPO, un fort pourcentage d'homologie du gène du récepteur EPOR est observé entre les espèces, dont 82 % avec la souris [17]. La molécule dérive d'un gène constitué de huit exons et sept introns (Figure 7) codant pour les 508 acides aminés du récepteur. Une protéine de 66 à 78 KDa sera ainsi formée, cette différence de poids moléculaire est attribuable à un site additionnel de glycosylation. N'ayant pas de rôle physiologique chez les cellules non-érythroïdes, le récepteur aura un poids moléculaire de 66 Kda, qui est attribuable à une absence de glycosylation, qui rend le récepteur non-fonctionnel chez ces cellules. À l'inverse,

quand EPOR est fortement glycosylé il devient fonctionnel chez les cellules de la lignée érythroïde [5, 18].

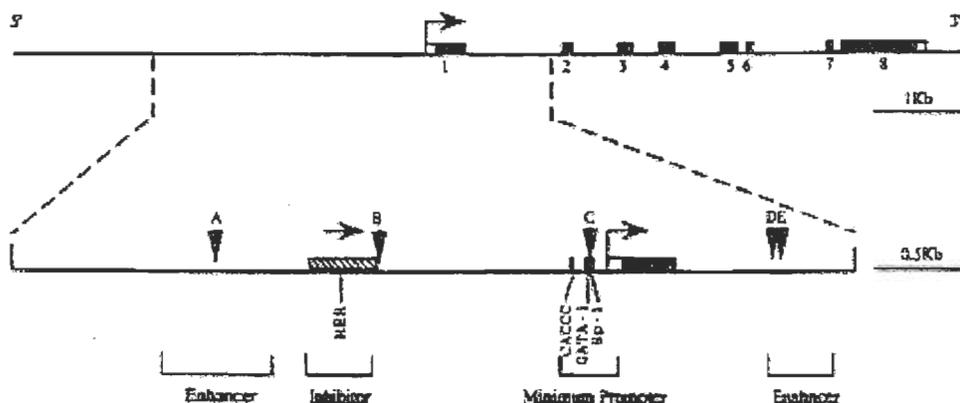


Figure 7 : Gène d'EPOR chez la souris. Source : Youssoufian H., Longmore G., Neumann D., Yoshimura A. and Lodish H.F. Structure, function and activation of the erythropoietin receptor. *Blood*, 1993, 81, 2230.

Le gène d'EPOR code pour un récepteur constitué de trois principaux domaines : extra-cellulaire, transmembranaire et cytoplasmique (Figure 8). Le domaine extracellulaire du récepteur EPOR est codé par les cinq premiers exons du gène (251 acides aminés). Le sixième exon, quant à lui, engendre les 20 acides aminés constituant le domaine transmembranaire hydrophobe. Finalement, le domaine cytoplasmique, contenant les régions régulatrices positives et négatives, est composé de 236 acides aminés, codés par les deux derniers exons [6].

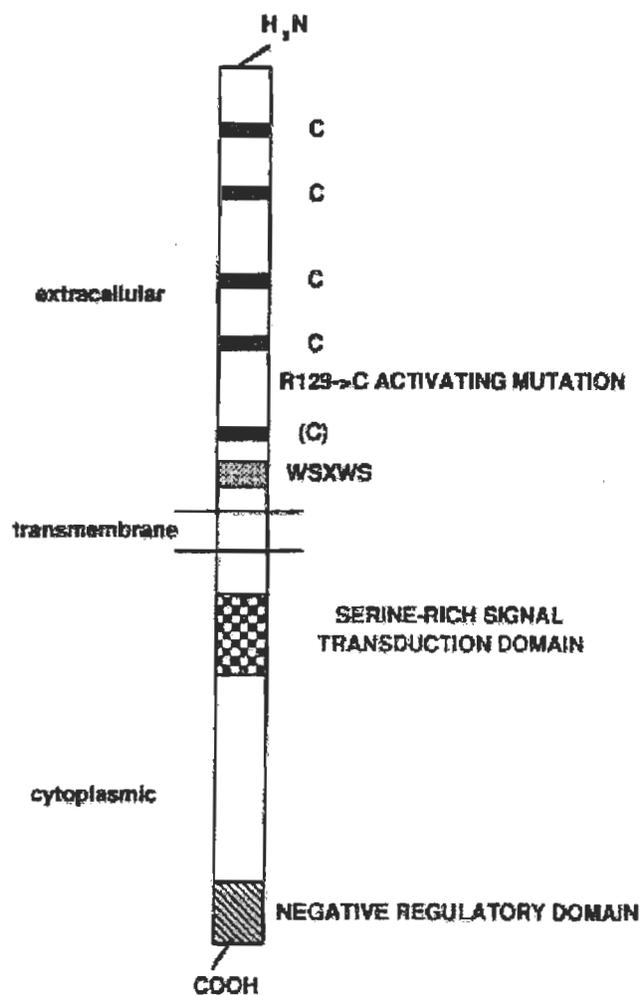


Figure 8 : Organisation fonctionnelle de la molécule d'EPOR. Source : Youssoufian H., Longmore G., Neumann D., Yoshimura A. and Lodish H.F. Structure, function and activation of the erythropoietin receptor. *Blood*, 1993, 81, 2224.

Activation du récepteur

Un récepteur présent à la surface d'une cellule est capable, grâce à sa structure tridimensionnelle de reconnaître différents ligands. La molécule complète d'EPOR sera donc retrouvée à la surface, exposant son domaine de liaison (domaine extracellulaire) vers l'environnement médullaire. La liaison du ligand a pour effet l'activation du récepteur par différentes phosphorylations, permettant de transmettre un signal de l'extérieur vers le noyau de la cellule.

À cet effet, plusieurs mécanismes d'activation d'EPOR ont été caractérisés jusqu'à maintenant, comme il est possible de le constater à la figure 9. Que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, l'activation du récepteur nécessite obligatoirement le rapprochement de deux molécules d'EPOR, conduisant à une homodimérisation de celles-ci. L'homodimérisation est nécessaire et suffisante pour la croissance et la différenciation cellulaire [19, 20, 21, 22].

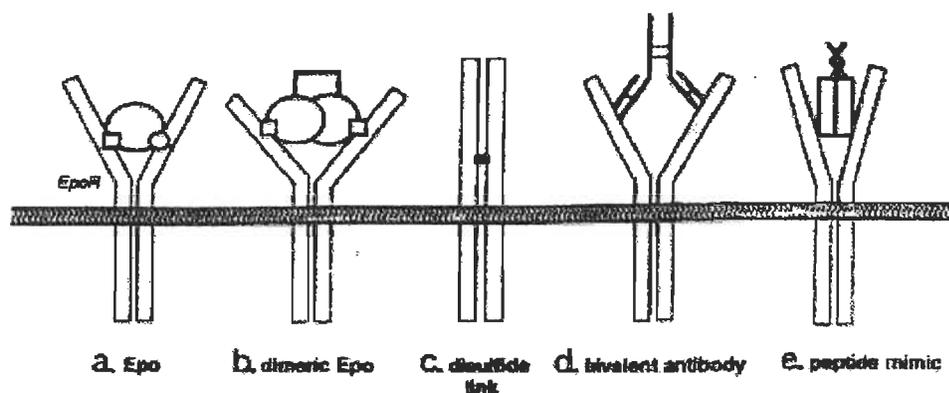


Figure 9 : Principaux mécanismes d'activation du récepteur EPOR. Source : Qiu H., Belanger A., Yoon H.-W.P. and Bunn H.F. Homodimerization restores biological activity to an inactive erythropoietin mutant. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 273, 11176.

Le premier mécanisme d'activation est bien entendu la liaison du ligand naturel, l'EPO. Une molécule d'EPO contient, à cet effet, deux sites de liaisons pour le récepteur, ces deux motifs étant différents et indépendants l'un de l'autre (arginine¹⁵⁰-glycine¹⁵¹-lysine¹⁵²) (arginine¹⁴-arginine¹⁰³-sérine¹⁰⁴) [22]. Une molécule d'EPO se lie à deux domaines extracellulaires d'EPOR, rapprochant ces deux récepteurs dans une certaine proximité, permettant ainsi l'activation du signal de transduction qui sera décrit ultérieurement. À l'opposé, le site de liaison de l'EPO sur la molécule d'EPOR est unique (phénylalanine⁹³-methionine¹⁵⁰-phénylalanine²⁰⁵) et ces acides aminés sont évidemment retrouvés au niveau du domaine extracellulaire du récepteur (Figure 10) [7, 21].

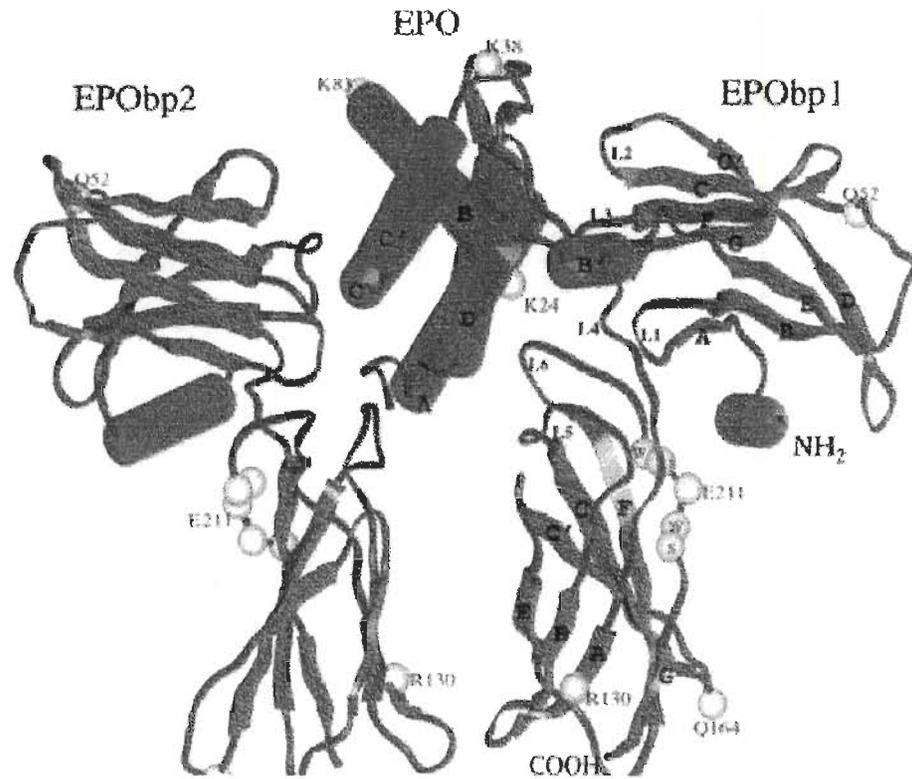


Figure 10 : Liaison d'une molécule d'EPO sur deux récepteurs EPOR à la surface cellulaire. Source : <http://www.util.ucsf.edu/stroud/abstracts/syed99nature.html>

Plus la concentration d'EPO est élevée, plus l'activation du récepteur sera importante. La liaison de la molécule d'EPO sur la première molécule d'EPOR se fait avec une grande affinité ($K_d = 1 \text{ nM}$) contrairement à la deuxième liaison qui est beaucoup plus faible ($K_d \sim 2 \text{ }\mu\text{M}$) [7, 23].

Certains médicaments peuvent aussi être des agonistes du récepteur à l'EPO. En effet, un agent immunosuppresseur nommé Tacrolimus (FK506) possède la propriété de stimuler le récepteur [19, 24, 25]. Par ailleurs, un peptide mimétique de l'EPO peut aussi entraîner l'activation du récepteur (Figure 9). Ce peptide de 14 acides aminés possède une forme cyclique et une séquence particulière qui est totalement absente de la structure primaire de l'EPO. Malgré cette constatation, le signal induit par ce peptide est identique à celui du ligand naturel [26, 27]. Sa constitution particulière permet donc le rapprochement de deux molécules d'EPOR.

Il a aussi été possible de créer en laboratoire un dimère d'EPO, où les deux motifs de liaisons sont identiques (Figure 9). L'activation du récepteur est observée mais de façon moins prononcée qu'avec un monomère natif d'EPO, contenant deux sites de liaisons pour EPOR qui sont distincts. Il est possible que l'encombrement stérique causé par le dimère soit la cause de la baisse d'efficacité observée [22].

Dans le même ordre d'idée, il existe un autre mécanisme d'activation du récepteur qui a été observé *in vivo*. Il s'agit d'une protéine, la gp55 provenant de l'enveloppe d'un rétrovirus, le virus Friend (Friend Spleen Focus Forming Virus SFFV) [17, 28] et qui cause une érythroleucémie par stimulation continue d'EPOR.

Certaines mutations ponctuelles du gène EPOR vont aussi conduire en la formation d'un pont disulfure entre certains acides aminés, au niveau du domaine extracellulaire. La mutation la plus connue est la substitution d'une cytosine (C) en une thymine (T) au niveau de l'ADN, substituant l'arginine 129 pour une cystéine (Figure 9) [7, 17, 22]. Il existe d'autres mutations plus inhabituelles qui causent le même effet, qui se situent aux « glu » (glutamine ou glutamate) 132 et 133 [7, 21]. Ces mutations confèrent ainsi l'habileté aux cellules de croître de façon autonome, en absence d'EPO [17].

En laboratoire, il a été démontré qu'il est possible d'activer EPOR avec un anticorps bivalent, dirigé contre son domaine extracellulaire (Figure 9). D'autre part, un anticorps monovalent peut se lier au récepteur, sans toutefois entraîner son activation [7, 22, 29, 30, 31]. Vu cet état de fait, il semblerait que l'homodimérisation est nécessaire et suffisante à l'activation du récepteur.

Signal de transduction

En réponse à l'activation du récepteur, un signal doit être généré permettant la transmission d'un message de la membrane jusqu'au noyau. Pour ce faire, plusieurs intermédiaires sont impliqués, mais avant tout le signal doit se propager jusqu'au domaine cytoplasmique. Comme tous les membres de la famille des récepteurs

hématopoïétiques, EPOR ne possède pas d'activité intrinsèque tyrosine kinase [4, 7]. La présence de protéines accessoires est ainsi nécessaire pour la progression du signal. Ces protéines seront phosphorylées ce qui les rendra aptes à phosphoryler d'autres intermédiaires, pour finalement conduire à l'activation des facteurs de transcription du gène de l'EPO. Il existe deux principales voies de transduction connues, travaillant en synergie : la voie STAT-5 et la voie RAS. La figure 11 représente le signal de transduction complet, survenant suite à l'activation du récepteur.

La Voie STAT-5

L'homodimérisation, processus défini par le rapprochement de deux molécules, amène la juxtaposition des domaines cytoplasmiques d'EPOR [32]. La première protéine associée de façon constitutive au récepteur, nommée JAK-2 (Janus Kinase-2), est d'abord activée par son homologue avant d'effectuer son rôle biologique [19, 32, 33]. Il s'agit d'un processus d'autophosphorylation possible chez JAK-2 grâce à la présence d'un site catalytique actif au niveau C-terminal [33].

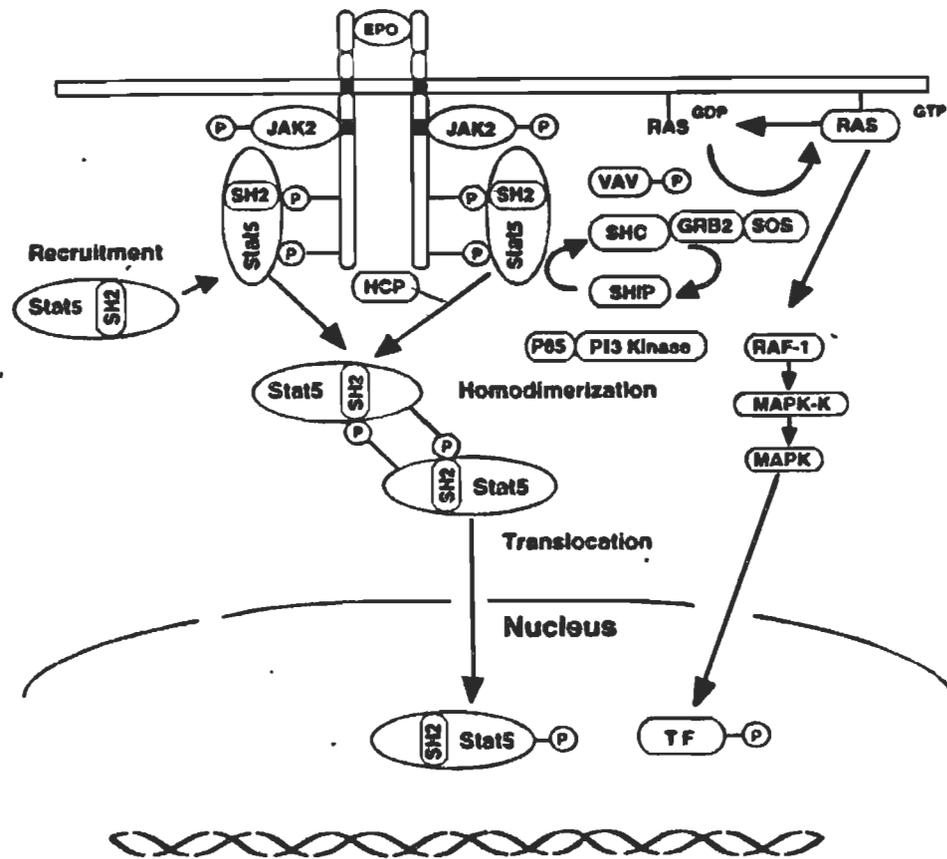


Figure 11 : Signal de transduction survenant suite à la liaison de l'EPO à son récepteur.
 Source : Fisher, J.W. Minireview Erythropoietin : Physiologic and pharmacologic aspects.
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1997, 216, 365.

Le véritable rôle de JAK-2 est de phosphoryler huit tyrosines situées dans le domaine cytoplasmique d'EPOR [7, 34]. La phosphorylation de ces tyrosines crée des sites d'ancrages (docking sites) pour une variété de protéines intracellulaires possédant des domaines SH 2. Ces domaines ont la propriété de reconnaître ces tyrosines phosphorylées

et de s'y lier. STAT-5 (signal transducers and activators of transcription) est d'ailleurs une protéine de ce type, qui se fixera au niveau des deux premières tyrosines (tyr 343 et 401) appartenant au domaine cytoplasmique d'EPOR [5, 7 19, 34]. STAT-5 est effectivement phosphorylé pour ensuite être relâché dans le cytoplasme où une deuxième STAT-5 vient s'y joindre. Sous forme de dimère, elle subit une translocation nucléaire et elle peut agir directement sur l'ADN en activant la transcription des gènes d'intérêts [33].

La Voie Ras

Il a été démontré qu'EPOR possède une seconde voie de transduction, travaillant de concert avec la voie précédente. En effet, pour que cette cascade soit observée, les huit tyrosines doivent d'abord être phosphorylées par JAK-2. Ensuite, la protéine SHC est recrutée et phosphorylée pour interagir avec GRB-2-SOS. La protéine SOS permet le changement d'une guanosine di-phosphate en guanosine tri-phosphate, ($GDP \rightarrow GTP$) ce qui rend la protéine RAS active [5, 7, 33]. Un changement de conformation de RAS survient exposant une région cible pour l'effecteur RAF. RAF à son tour active une MAP-kinase-kinase (MAP = mitogen-activated protein) qui ensuite activera deux types de MAP-kinases (ERK-1 et 2). ERK est transloqué au noyau et y stimule plusieurs facteurs de transcription, conduisant à la prolifération cellulaire [5, 7, 33].

D'autres protéines peuvent aussi être impliquées dans le signal de transduction mais leur importance est moindre. Par exemple, la protéine VAV est aussi une petite protéine G alternative qui active RAS de la même façon. Il en est de même pour la PI-3 kinase (phosphatidyl-inositol-3 kinase) lié à P85 qui active ERK-2 (la MAP-kinase)[21].

Régulation négative

Une stimulation continue d'EPOR pourrait entraîner des effets néfastes de type érythroleucémiques. Pour prévenir ces manifestations indésirables, il doit y avoir arrêt de la phosphorylation d'EPOR pour faire place à une action de phosphatase, effectuée par les protéines HPC (hematopoietic cellular protein tyrosine phosphatase). Ces protéines ont un rôle de régulateur négatif car elles vont s'associer à la tyrosine 429 d'EPOR et déphosphoryler JAK-2 [7]. Par le fait même, une inhibition complète de la cascade de phosphorylation est observée, inhibant ainsi la croissance cellulaire. La figure 12 représente la régulation négative d'EPOR. Au niveau de la régulation négative, il ne serait pas surprenant de voir, dans les années à venir, des agents empêchant l'inhibition qui seraient utilisés comme agents dopants.

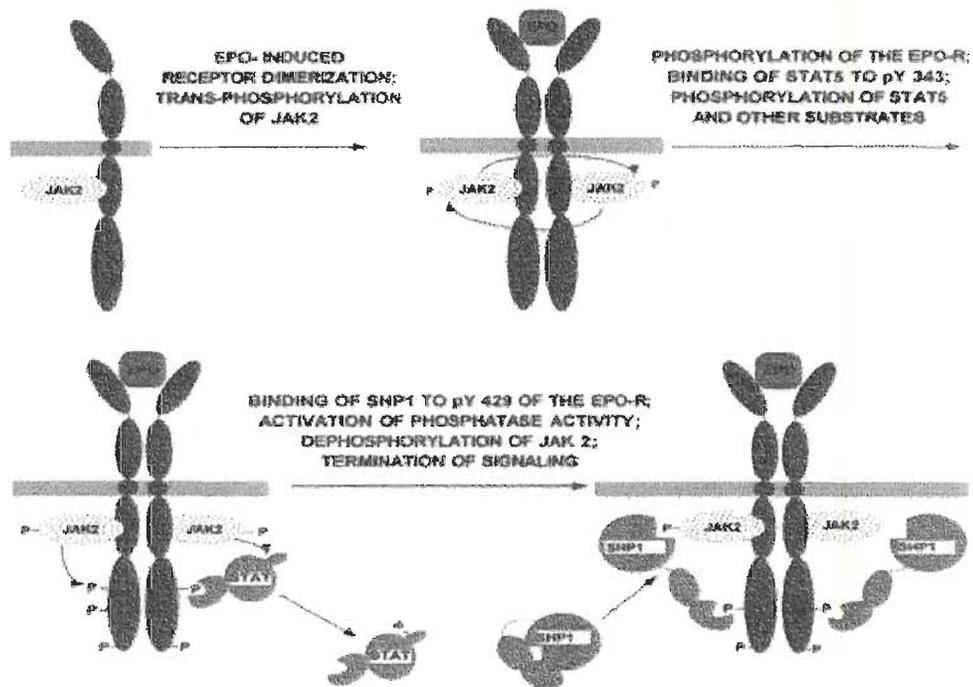


Figure 12 : La régulation négative d'EPOR. Source : <http://www.web.wi.mit.edu/lodish/pub/research/figures/Fig-A2.html>

En bref, lors d'une situation physiologique normale, l'EPO est produite par les reins suite à une hypoxie tissulaire. Dans le but d'accroître la quantité d'érythrocytes retrouvés dans la circulation sanguine, l'EPO effectue son rôle biologique en se liant aux précurseurs retrouvés dans la moelle osseuse. Une liaison spécifique avec son récepteur EPOR entraîne un signal de transduction qui conduit à l'activation des facteurs de transcription essentiels aux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire.

Différentes formes d'EPOR

Jusqu'à maintenant il a toujours été question du récepteur complet EPOR, retrouvé à la surface des cellules érythroïdes [6, 35]. En fait, il a été démontré qu'il existe deux autres formes d'EPOR, provenant du même gène initial. La figure 13 représente les trois types d'EPOR retrouvés chez l'humain.

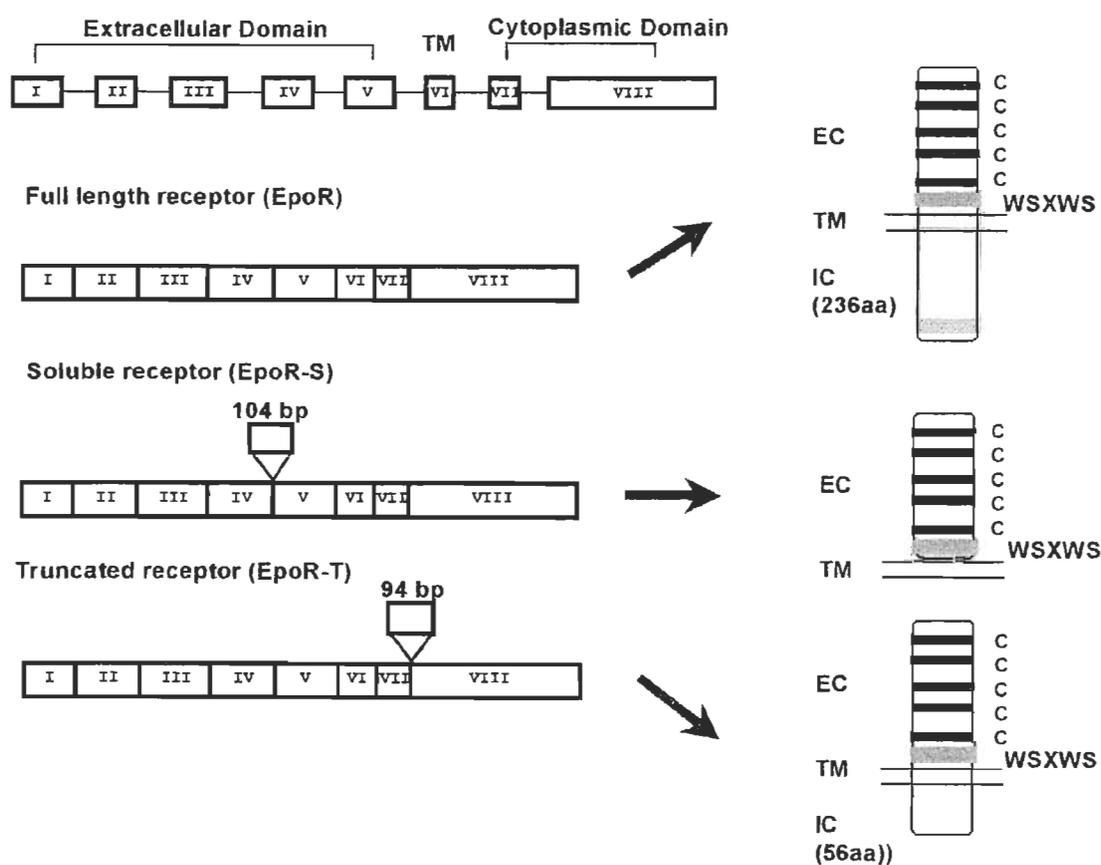


Figure 13 : Différentes formes d'EPOR. Source : Moritz K.M., Lim G.B. and Wintour E.M. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis, Invited review. *American Journal of Physiology*, 1997, 273, R-1833.

La première forme est appelée « full-length » car elle représente la transcription complète du gène. Il s'agit de la forme prédominante chez les cellules qui répondent fortement à l'action de l'EPO.

La seconde forme est l'EPOR-T qui est, quant à elle, privée d'une partie de son domaine cytoplasmique. Surtout retrouvé chez les cellules érythroïdes immatures, il peut permettre la transmission d'un signal mitotique mais il ne réussit pas à prévenir l'apoptose [6, 35, 36, 37, 38]. Les cellules exprimant EPOR-T ne peuvent donc pas devenir des érythrocytes fonctionnels car ils subissent l'apoptose avant d'arriver à maturation. La proportion d'EPOR-T est cinq fois plus importante chez les cellules immatures (CD34+, CD 71-), puisque ce ne sont pas toutes ces cellules souches qui sont appelées à devenir des érythrocytes. Par contre, lors de la poursuite de la maturation des cellules souches, la proportion d'EPOR-T diminue pour faire place à EPOR complet. Ces cellules seront donc de plus en plus sensibles à l'action de l'EPO [35].

EPOR-T est formé par épissage alternatif du gène où l'intron situé entre les exons 7 et 8 est conservé, mais suite à la transcription du gène, le domaine cytoplasmique n'est pas traduit en entier, étant donnée la présence d'un codon stop au niveau du septième intron [35]. En fait, le domaine cytoplasmique sera composé de 56 acides aminés provenant de l'exon 7 et de l'intron 7 [6]. Malgré l'absence de la portion cytoplasmique, l'expression du récepteur à la surface cellulaire ainsi que la liaison de l'EPO est toujours possible. Cependant, il semblerait que la formation d'un hétérodimère (EPOR-EPOR-T) soit envisageable [6]. Comme l'homodimérisation de deux molécules d'EPOR est nécessaire à l'activation, si une hétérodimérisation est

observée le signal mitotique ne se transmet pas efficacement, conduisant la cellule vers l'apoptose. Au niveau clinique, une diminution d'EPOR-T a été observée chez des gens atteints de polyglobulie de Vasquez. Cette pathologie présente une très forte production d'érythrocytes malgré une faible concentration d'EPO [39].

Finalement, le dernier type d'épissage alternatif conduit à la formation du troisième type d'EPOR (Figure 13). Il y a création d'un codon stop dû à la présence d'un insert de 104 paires de bases avant le domaine transmembranaire. La traduction de cet ARNm génère donc une forme soluble d'EPOR (EPOR-S) [6, 35]. Cette forme semble avoir un taux constant de production, peu importe le stade de maturation, soit environ 20 % de tous les EPOR exprimés [35]. Ne possédant pas les domaines cytoplasmique et transmembranaire, la forme soluble est retrouvée dans la circulation sanguine plutôt que d'être exprimée à la surface cellulaire.

L'EPOR n'est pas le seul récepteur possédant une forme soluble. Et contrairement à certaines autres formes solubles, la fonction réelle d'EPOR-S n'est toujours pas établie. Un rôle physiologique possible de la forme soluble serait la stabilisation du ligand (Figure 14) [40]. En se liant à l'EPO le récepteur soluble devient son transporteur dans la circulation sanguine. Ceci pourrait permettre une prolongation de la demi-vie plasmatique de l'EPO en prévenant sa dégradation, jusqu'à ce que l'hormone puisse jouer son rôle. L'autre fonction serait de moduler la concentration du ligand, en le rendant moins disponible pour les récepteurs EPOR situés à la surface cellulaire [40]. À la limite, la présence de l'EPO-S pourrait conférer un phénotype répondant à des cellules insensibles à l'EPO. C'est-à-dire qu'en se liant

spécifiquement au ligand, le complexe ainsi formé (EPO-EPOR-S) pourrait activer le récepteur à la surface cellulaire (Figure 14) [40].

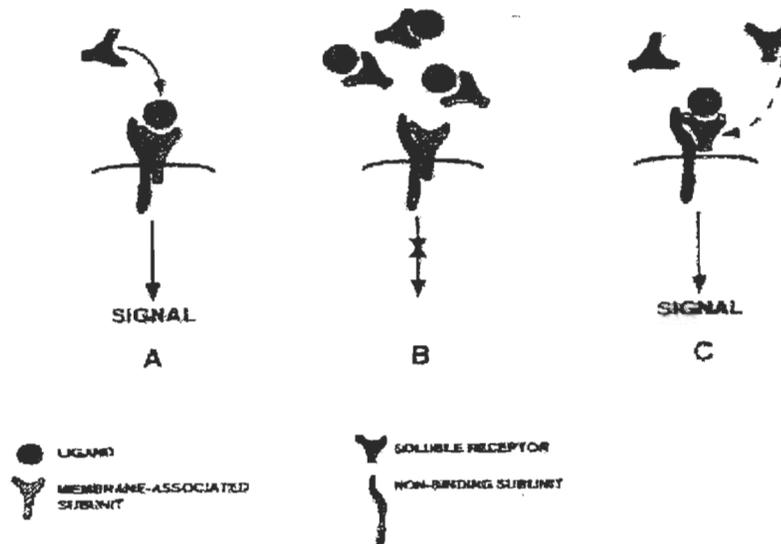


Figure 14 : Rôles possibles des formes solubles. Source : Heaney M.L. and Golde D.W. Soluble hormone receptors. *Blood*, 1993, 82, 1946.

Chez la souris, une deuxième forme d'EPOR-S a été mise en évidence. En plus d'être soustraite de ses domaines cytoplasmiques et transmembranaire, il lui manque une partie du domaine extracellulaire. Cette région manquante inclut le motif WSXWS, qui est nécessaire à l'exportation du récepteur. Il y aura donc rétention de l'EPOR-S au niveau du réticulum endoplasmique, pour ensuite être dirigé vers les lysosomes où elle

sera dégradée [41]. Cependant, chez l'humain la présence de cette forme d'EPOR ne semble pas encore avoir été mise en évidence.

Il a été démontré qu'il existait une certaine relation entre la quantité d'EPOR-S dans le sang et le niveau d'activité de la moelle osseuse. Par contre, une controverse semble exister à ce niveau entre les différents groupes de chercheurs. Selon Baynes [42], une augmentation de la quantité d'EPOR-S serait présente chez les gens possédant une érythropoïèse accrue. Suite à une migration électrophorétique et à des techniques de détections par immunobuvardage de type Western, une protéine de 34 KDa est observée. Chez les gens sains, le taux d'EPOR-S ne serait pas détectable, pas plus que chez les gens souffrant d'anémie par déficit en fer, d'anémie chronique et de maladie rénale chronique. Par contre, lorsqu'il y a stimulation accrue de l'érythropoïèse par injections d'EPO, résultant du traitement de la dite déficience, la protéine de 34 KDa devient apparente [42]. À l'inverse, dans les cas de thalassémie majeure et d'anémie falciforme la bande à 34 KDa est présente et disparaît lorsque l'activité de la moelle redevient normale [42].

Selon Harris [43], il n'y aurait pas de corrélation entre l'érythropoïèse et la quantité d'EPOR-S retrouvée dans la circulation sanguine. Chez des sujets sains, une moyenne de 550 ± 735 ng/ml fut observée, démontrant une forte variation même présente chez des gens n'ayant pas de pathologie particulière qui pourraient affecter cette quantité d'EPOR-S. De plus, parmi les sujets sains qui ont été évalués, 30 % possèdent une quantité d'EPOR-S sous la limite de détection de l'essai (10 ng/ml) [43]. Peu importe les traitements apportés aux échantillons sanguins

(traitement à la protéine A, immuno-délétion, ultracentrifugation), aucune variation n'a été observée dans le taux d'EPOR-S.

Une deuxième controverse semble exister entre les groupes de chercheurs au niveau du poids moléculaire détecté par immunobuvardage de type Western. Une protéine de 27 KDa est détectée par Harris contrairement à Baynes, qui a mis en évidence une protéine de 34 KDa [42, 43]. Selon Harris, cette différence de poids moléculaire est probablement attribuable à la présence d'une glycosylation différente dans le domaine extracellulaire d'EPOR-S, probablement associée au fait que les sujets étaient atteints d'une leucémie. De plus, Harris a observé un taux d'EPOR-S beaucoup plus élevée dans le plasma par rapport au sérum chez un même sujet. Une cause possible serait qu'EPOR-S pourrait adhérer au caillot de fibrine lors de la coagulation. Il y aurait donc une étrange relation entre l'hémostase et l'érythropoïèse, deux phénomènes que l'on croyait indépendant [43].

Selon Yoshida [44], chez des gens ne souffrant d'aucune pathologie à caractère hématologique, il n'y aurait pas de corrélation entre le taux d'EPOR-S et certains paramètres incluant la quantité de réticulocytes, la concentration en hémoglobine et la concentration sérique d'EPO car une grande variation du taux d'EPOR-S a été observée chez les sujets sains. Chez les gens souffrant de pathologies tel anémie hypoproliférative et d'anémie dans la leucémie myéloïde aiguë un taux d'EPOR-S élevé a été observé. Par contre, chez les gens atteint d'anémie par déficience en fer, d'anémie hyperproliférative et d'anémie hémolytique, il y aurait présence d'une faible concentration d'EPOR-S dans le

plasma [44]. Dans tous les cas pathologiques mentionnés précédemment, lorsqu'il y a traitement avec des injections d'EPO, il est possible de voir une augmentation du taux d'EPOR-S.

Interaction EPOR-EPO

Des études de dénaturation à la chaleur ont permis de démontrer la présence d'un élément dans le sérum qui prévient la dégradation de l'EPOR [45]. En effet, il a été possible de mesurer une plus forte quantité d'EPOR-S lorsque du sérum est ajouté à de l'EPOR dénaturé à la chaleur [45]. Le sérum pourrait ainsi contenir un élément qui prévient EPOR-S de la dénaturation par la chaleur. Certaines spéculations concernant la liaison d'EPOR-S à l'EPO ont été avancées [45, 46].

En effet, par différentes techniques biophysiques, l'équipe de Philo a prouvé que la liaison de la forme soluble du récepteur à la molécule d'EPO était possible. La formation d'un complexe 1 :1 EPOR-EPO est retrouvé en solution et cette liaison s'effectue avec une affinité relativement élevée [46, 47, 48]. Cette constante est sensiblement la même que celle de haute affinité observée lors de la liaison de l'EPO à son récepteur directement à la surface cellulaire (0,25 nM) [47].

Il a aussi été démontré que deux molécules d'EPOR-S peuvent se lier à une seule molécule d'EPO. Par contre, la liaison de la seconde molécule d'EPOR-S est beaucoup plus faible que la première. La formation du complexe EPOR-S-EPO-EPOR-S sera ainsi

possible uniquement lors de concentrations élevées des constituants, en particulier d'EPOR-S. De plus, la dissociation du complexe pourra survenir plus fréquemment étant dû à l'instabilité engendrée par le complexe [48].

Test de dépistage du dopage à l'EPO

Depuis quelques années, un mouvement de lutte a été amorcé pour contrer le phénomène du dopage à l'EPO. D'abord, la mise à jour des substances prohibées a été effectuée ainsi que la mise en œuvre de sanctions pour les contrevenants. Mais pour ce faire, il faut avoir en main des méthodes de dépistages efficaces, simples, reproductibles et fiables.

À cet effet, le CIO a entrepris, par le biais d'équipes de chercheurs, une étude pour déterminer les paramètres qui seraient des marqueurs de dopage à l'EPO. Il s'agit d'un ensemble de paramètres sanguins, qui conduirait à la mise en évidence de l'utilisation illicite d'EPO de façon indirecte. Il sera donc possible de déterminer, hors de tout doute, les athlètes faisant usage de ce produit pour l'amélioration de leurs performances. À cet effet, lors des jeux olympiques de Sydney 2000, un nouveau test anti-dopage a été utilisé, où deux modèles de détection indirects ont aidé à la détection des utilisateurs illicites d'EPO. En fait, l'approche du CIO est de combiner plusieurs paramètres sanguins indiquant une accélération de l'érythropoïèse.

L'hématocrite peut être un marqueur de dopage puisque l'effet primaire de l'EPO est de stimuler la production des érythrocytes. Par contre, l'hématocrite est directement reliée au niveau d'hydratation de l'individu. Comme une déshydratation survient suite à un effort physique soutenu, l'hématocrite pourrait en être affecté. De surcroît, l'entraînement en altitude a aussi un effet sur l'hématocrite rendant ce marqueur moins significatif, mais tout de même valable.

Le taux de réticulocytes peut aussi être un indicateur de l'activité érythropoïétique. Normalement, ceux-ci sont retrouvés en très faible quantité dans le sang, mais lorsque l'érythropoïèse est stimulée par des injections d'EPO, alors la quantité de réticulocytes dans le sang augmente [49, 50, 51]. Comme la moelle osseuse éprouve des difficultés à répondre à la demande en érythrocytes, alors les réticulocytes sont expulsés dans la circulation sanguine malgré leur immaturité. On peut donc conclure que lorsque la quantité de réticulocytes est élevée dans le sang, c'est qu'une stimulation accrue de la moelle osseuse a eu lieu.

Le paramètre le plus prometteur est le taux de récepteur soluble de la transferrine (sTfR). Ce taux est directement relié à l'activité érythroïde de la moelle osseuse. Une corrélation a été mise en évidence entre le taux de sTfR et l'injection d'EPO [52, 53, 54]. L'EPO stimule la production d'érythrocytes mais le fer, transporté par la transferrine dans le sang, est un constituant nécessaire au bon fonctionnement de l'érythropoïèse. Suite à l'incorporation du fer par les cellules, le récepteur de la transferrine est internalisé et dégradé pour ensuite être expulsé dans la circulation sanguine, sous une forme soluble [55,

56]. Par conséquent, cette protéine peut être mesurée et son niveau est étroitement relié à l'activité de la moelle osseuse.

En combinant ces différents marqueurs de l'activité érythropoïétique, il a été possible de créer deux modèles pouvant être utilisés pour le dépistage du dopage à l'EPO. Le premier modèle, appelé « ON-Model », est une combinaison de cinq paramètres sanguins individuels. Ceux-ci sont donc associés et comparés à des valeurs normales, pour une population athlétique. Les cinq paramètres utilisés dans ce système sont : l'hématocrite (Hct), l'hématocrite reticulocytaire (RetHct), le pourcentage de macrocytes (% macrocytes), la concentration sérique d'EPO (EPO) et la concentration de récepteur soluble de la transferrine (sTfR). Ce modèle est effectif deux semaines après l'arrêt des injections d'EPO. Associée à une hématocrite élevée, une valeur calculée de ON-model (Tableau 2) excédent 2,5 pour un homme et 2,4 pour une femme est considéré positif, démontrant l'utilisation illicite d'EPO lors du prélèvement sanguin [57].

Le second modèle, appelé « OFF-model » est constitué de trois paramètres sanguins soit : l'hématocrite (Hct), l'hématocrite reticulocytaire (RetHct) et la concentration sérique d'EPO. Ces facteurs sont utilisés car l'hématocrite demeure élevée plusieurs semaines après l'arrêt de l'EPO et les deux autres paramètres diminuent sous des valeurs normales rencontrées dans une population d'athlètes. Ce modèle est désigné pour détecter des athlètes qui ont cessé d'utiliser de l'EPO plus d'une semaine avant le prélèvement sanguin. Il est effectif chez les athlètes ayant cessé l'administration de 12 à 21

jours précédents l'analyse. Pour que le « OFF-model » soit déclaré positif, un résultat dépassant 2,75 chez l'homme et 2,55 chez la femme devra être obtenue grâce à l'équation retrouvée dans le tableau suivant (2) [57].

	Équation
« ON-model »	$= (30,45 * \text{RetHct}) + (3,721 \text{ Hct}) + (0,1871 * \log_e \text{EPO}) +$ $(0,1267 * \log_e \text{sTfR}) + (0.115 \log_e (\% \text{ macrocytes} + 0.1))$
« OFF-model »	$= (-92,87 * \text{RetHct}) + (6.149 \text{ Hct}) + (-0.1463 * \log_e \text{EPO})$

Tableau 2 : Équations des modèles [57]

À l'aide de ces deux modèles, il a été possible de déterminer trois scénarios possibles conduisant à un résultat positif de dopage. Le premier scénario utilise trois analyses sanguines. Le premier échantillon doit avoir un hématoците élevé et les deux autres prélèvements sanguins doivent montrer un changement dans les modèles ON et OFF de manière à indiquer une utilisation préalable d'EPO. En plus, au moins un des deux échantillons doit montrer une haute valeur « OFF-model » [57].

Le second scénario utilise aussi trois analyses sanguines. Le premier test doit donner une hématoците élevée et le résultat « OFF-model » doit être aussi très élevé.

Finalement le troisième prélèvement doit indiquer un changement montrant un état post-EPO [57].

Le troisième scénario est une combinaison d'une analyse sanguine ainsi que deux échantillons d'urinaire. L'échantillon sanguin doit avoir un résultat « ON-Model » élevé et au moins un des deux échantillons d'urine doit indiquer la présence d'EPO [57].

Le test de dépistage dans l'urine permet une détection directe de la molécule d'EPO. Les deux types d'EPO, naturelle et recombinante, ont des différences structurales observées au niveau des carbohydrates. Il est possible, par focalisation isoélectrique de distinguer les différentes glycoformes de l'EPO [58]. Chez une personne non-dopée, les points isoélectriques se situeront entre 3,92 et 4,42 [59]. Par contre, lors de dopage, l'étendue de points isoélectriques se situera entre 3,92 et 5,11 (Figure 15 de la page suivante) [59]. Cette mise en évidence permet d'en faire une preuve directe de dopage à l'EPO. En combinaison avec un test sanguin positif, il semble raisonnable de croire qu'il y a présence de dopage à l'EPO. Depuis quelques temps, ce test de dépistage possède une efficacité améliorée. En effet, il est possible de détecter l'EPO dans l'urine dans les trois à six jours après le traitement à l'EPO. Il sera donc possible d'identifier les athlètes faisant encore usage de l'EPO lors du prélèvement mais il sera impossible de déceler ceux ayant arrêté les injections plus d'une semaine auparavant.

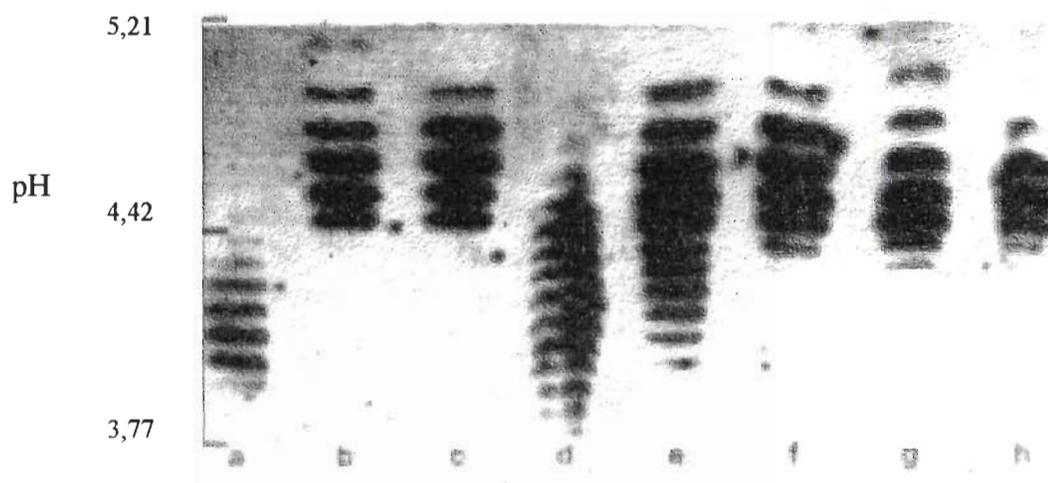


Figure 15 : Test de dépistage direct : profil de focalisation isoélectrique. Légende : a : Purified commercial human urinary naturel EPO (Sigma); b : Recombinant EPO- β (Neorecormon, France); c : Recombinant EPO- α (Eprex, France); d : Urine from a control subject; e,f : Urine from two patients treated with Neorecormon EPO; g, h : Urine from two cyclist Tour de France. Source : Lasne F. and De Ceauvriez J. Nature, 2000, 405, 635.

Principaux objectifs à atteindre

Dans le présent travail, il était question d'étudier le récepteur soluble à l'érythropoïétine (EPOR-S) comme marqueur de l'accélération induite de l'érythropoïèse. Cette molécule aurait pu être utilisée comme marqueur dans le cadre de la lutte anti-dopage, au même titre que le taux de réticulocytes et la quantité de récepteurs solubles de la transferrine sTfR. En ajoutant un marqueur de plus dans les tests de dépistage actuel, ceux-ci seraient plus performants. L'objectif initial du travail

était de développer des moyens techniques (ELISA, immunobuvardage) permettant de quantifier l'EPOR-S dans le sang. Les objectifs subséquents étaient d'abord une vérification de l'adéquation entre la quantité d'EPOR-S circulant et l'activité hématopoïétique, puis une corrélation entre la quantité d'EPO administrée et la quantité d'EPOR-S circulant. Pour ce faire, des sujets humains ont reçu des injections d'érythropoïétine selon un protocole bien établi. Leur sang a été recueilli pour permettre de quantifier l'EPOR-S en période pré, per et post-administration d'EPO. Les différentes techniques mentionnées ultérieurement ont été réalisées grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre le domaine extracellulaire d'EPOR-S, qui correspond à la forme soluble retrouvée dans le sang. Il pourrait donc être possible de déterminer les sujets ayant recours à l'EPO comme produit dopant, ayant bonifié la sonde existante d'un marqueur supplémentaire soit le récepteur soluble à l'EPO.

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre, il sera question des différents protocoles d'administration d'EPO aux athlètes, de la mise au point de la technique ELISA et de l'immunobuvardage de type Western. Ce projet comporte trois différents protocoles d'administration d'EPO, que l'on désignera par : Protocole France 1997, Protocole Australie 1999 et Protocole Australie 2000. Les particularités de ceux-ci seront décrites ultérieurement et synthétisées à la page 53, au niveau du Tableau 3. Il faut noter que tous les sujets de ces trois protocoles ont fourni un consentement éclairé en ce qui a trait aux procédures expérimentales. De plus, le Protocole France 1997 était légalement en accord avec le comité d'éthique régional tandis que les protocoles Australie 1999 et 2000 avaient été approuvés par le comité d'éthique de l'Institut des sports de l'Australie et tous trois étaient en accord avec la déclaration d'Helsinki. Les échantillons sanguins utilisés sont demeurés congelés (- 20 °C) jusqu'au moment des analyses, ayant au préalable démontré, par un test de stabilité, que la congélation n'avait aucun effet sur la protéine EPOR-S [43].

Protocole France 1997

Neuf sujets ont participé à cette étude, soit deux femmes et sept hommes, tous âgés entre 18 et 30 ans. Tous les sujets avaient préalablement suivi un entraînement régulier pendant quelques années et lors de l'étude, ils devaient poursuivre ce programme, à raison de 15 à 25 heures d'entraînement par semaine. Il convient également de souligner qu'aucun des sujets ne souffraient d'une déficience à caractère hématologique.

Des injections d'EPO (50 IU/Kg) sous-cutanées (Eprex, Issy-les-Moulinaux, France) leur ont été administrées pour une durée de 26 jours consécutifs, à raison de sept injections par semaine. L'atteinte d'une valeur d'hématocrite de 0,5 était un critère d'exclusion. Simultanément aux injections d'EPO, un supplément de 200 mg de sulfate de fer (Ferrograd, Abbott Laboratories, Rungis, France) était consommé, sous forme orale.

Les prélèvements sanguins ont été effectués au même moment, chaque matin pour éliminer les fluctuations engendrées par le cycle circadien de l'hormone. Le sérum a été utilisé pour la détermination de la concentration d'EPO et de sTfR. Le sang a donc été prélevé dans un tube sans anti-coagulant. Le sérum est ensuite recueilli, suite à la séparation survenue lors de la centrifugation à 900 * g pour une durée de 15 minutes, à 4° C. La concentration d'EPO a été déterminée avec un essai immunoradiométrique, un test utilisant deux types d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'EPO (¹²⁵I-EPO COATRIA kit, BioMérieux, Lyon, France). Le sTfR sérique a quant à lui été mesuré à l'aide d'un ELISA standard (Ramco Laboratories Inc., Houston, Texas).

Concernant les autres paramètres sanguins, ils ont été obtenus à partir du plasma. Ces paramètres hématologiques (retic, Hct, Hb) ont été mesurés par des procédures de laboratoire standard en hématologie à l'aide d'analyseurs automatiques.

Protocole Australie 1999

Un groupe de 22 volontaires ont participé à cette étude. Aucun d'entre eux n'était membre d'une équipe sportive reconnue mais ceux-ci suivaient un entraînement continu (4-22 heures/semaine), depuis au moins un an. Ce groupe de 22 athlètes amateurs a été divisé selon trois principaux modes d'administration d'EPO et de fer (Tableau 3). Le premier groupe est constitué de 9 athlètes a reçu de l'EPO ainsi qu'un supplément de fer sous forme intra-musculaire (EPO + F.I.M.). Le second groupe (n = 6) a été traité à l'EPO mais un supplément de fer oral leur a été administré (EPO + F.O.). Finalement le dernier groupe (n = 7) est le groupe contrôle, recevant non seulement un placebo d'EPO mais aussi de fer (PLACEBO). Avant le début des injections d'EPO, un entraînement d'une durée de cinq semaines a été poursuivi, par la suite il y a eu une période d'administration d'EPO ou de placebo de 25 jours et finalement une période de retour à la normale d'une durée de quatre semaines. Le tableau 3 relate les détails concernant les doses d'administration des différents groupes d'athlètes de ce présent protocole.

Toutes les injections d'EPO (EPREX 4000, Janssen-Cilag, Australia) ont été administrées sous forme sous-cutanée, trois fois par semaine, à 50 UI/Kg (jours 0, 2, 4,

8, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23 et 25). Parallèlement, les injections de fer, (Ampoules de Ferrum H, Sigma Company Ltd, Clayton, Australie) ont été données sous forme intramusculaire, 1 fois par semaine. Les comprimés de fer oral ont été consommés à tous les jours, en supposant une absorption d'environ 105 mg, sur une possibilité de 350 mg de sulfate ferreux (Ferrogradumet, Abbott, Australie). Pour ce qui est des injections du groupe placebo, de la solution saline a été utilisée (NaCl 0,9% BP, Astra Pharmaceuticals, Australie) pour remplacer l'EPO et des comprimés de lactose ont été consommés en substitut du sulfate ferreux.

Les paramètres érythrocytaires et réticulocytaires ont été analysés au niveau du plasma, en utilisant un appareil H*3 Hematology Analyzer (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY). Celui-ci permet l'obtention de mesures directes tel que: le décompte du nombre d'érythrocytes (RBC), la taille des érythrocytes (MCV) et la concentration en hémoglobine ([Hb]). D'autre part, il est possible d'obtenir le premier paramètre calculé qui est l'hématocrite (Hct) représentant le produit du nombre d'érythrocytes (RBC) par la taille de ceux-ci (MCV). Le second paramètre calculé est le décompte réticulocytaire (# retic) qui est le produit du nombre d'érythrocytes (RBC) par le pourcentage de réticulocytes (% retic). Par ailleurs, la concentration d'EPO et du récepteur soluble de la transferrine ont été déterminés dans le sérum, en utilisant des ELISA standards (R&D Systems, Quantikine IVD Kits, Minneapolis, USA).

Les prélèvements sanguins ont été recueillis aux jours 1, 3, 10, 15, 17, 22 et 24 pendant l'administration d'EPO et aux jours 5, 7, 12, 14, 19, 21, 26 et 28 lors de la période post-EPO. Pour fins d'analyses dans le présent travail, les échantillons des

jours 22 et 24 en période de traitement ainsi que les jours 5, 12, 19, 26 et 28 en période post-EPO ont été analysés, en raison de la disponibilité des échantillons. Tous les prélèvements sanguins ont été effectués au même moment de la journée, toujours pour éviter les variations possibles causées par le cycle diurne de l'hormone.

Protocole Australie 2000

Ce présent protocole est semblable au précédent (Australie 1999) à l'exception des modifications suivantes. Douze sujets ont participé à cette étude, constituée de 25 jours de traitement à l'EPO et quatre semaines complètes de retour à la normale. La totalité de ces athlètes ont reçu trois injections par semaine d'EPO, à 50 UI/Kg (Eprex, 4000, Janssen-Cilag, Australie) et un supplément de fer (Ferrogradumet, Abbott, Australie), à raison d'un comprimé par jour (Tableau 3). On suppose également une absorption moyenne d'environ 105 mg de fer élémentaire sur une possibilité de 350 mg de sulfate ferreux. Lorsque l'hématocrite calculé atteignait 0,55, pour des raisons de santé, les injections d'EPO étaient substituées par des injections de solution saline (NaCl 0,9 %, BP, Astra Pharmaceuticals, Australie).

Les prélèvements sanguins ont été effectués selon un horaire pré-établi que l'on retrouve au tableau 3. Une fraction de sang a été recueillie sur un anticoagulant, pour extraire le plasma (K₃ EDTA Vacuette tubes, Greiner Labortechnik, Frikenhausen,

Germany). A l'inverse, une autre portion a été recueillie dans un tube contenant un activateur de coagulation, pour obtenir le sérum (Greiner Labortechnik). Celui-ci devra être centrifugé à 3500-4000 rpm, 10 min pour séparer les cellules du sérum.

Le plasma a été analysé à l'aide d'un ADVIA Hematology Analyzer (Bayer Diagnostics, TarryTown, NY, USA) permettant l'obtention des mesures érythrocytaires et réticulocytaires. Cet appareil fournit des mesures directes tel : le nombre d'érythrocytes par unité de sang, le pourcentage de réticulocytes, la taille des érythrocytes et son contenu en hémoglobine. Par extension, il sera possible de déterminer un paramètre important soit l'hématocrite.

Le sérum est conservé pour la détermination de la concentration en EPO ainsi que la concentration du sTfR. La concentration sérique en EPO a été déterminée en utilisant un essai automatisé par procédé de chimiluminescence (Immulite EPO assay, Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). En contrepartie, le sTfR a été mesuré par un essai automatisé appelé «immunonephelometric assay» (Dade Behring GmbH, Marburg, Germany).

Protocole	Groupe de sujets	n	EPO	Fer	Jours d'injections d'EPO	Jours de prélèvements sanguins
France 1997	Traité EPO + F.O.	9	50 UI/Kg	200 mg 1 co./jour	J 0 à J 26	J 3, 7, 14, 17, 21, 24 A 1, 7, 18, 21, 25, 28
Australie 1999	Traité EPO + F.I.M.	9	50 UI/Kg	100 mg 1 inj./sem	J 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25	J 22, 24 A 5, 12, 19, 26
	Traité EPO + F.O.	6	50 UI/Kg	350 mg 1 co./jour		
	PLACEBO	7	Saline 0,9 %	Lactose (comprimé)		
Australie 2000	Traité EPO + F.O.	12	50 UI/Kg	350 mg 1 co./jour	J 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25	J 1, 3, 10, 14, 24 A 6, 13, 20, 27

Tableau 3 : Différents protocoles d'administration d'EPO aux athlètes.

Protocole du dosage d'EPOR-S par la technique ELISA

Étant donné l'absence de trousse de détection d'EPOR-S sur le marché, un essai a été mis au point au laboratoire, permettant le dosage d'EPOR-S par ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Le but de cette technique est de permettre la quantification d'une molécule particulière, sous sa forme native, par le biais d'anticorps dirigés contre la molécule recherchée. Le principe de la technique ELISA est simple malgré les problèmes rencontrés lors des essais. Une description du principe général de cette technique, les différentes étapes de mise au point ainsi que les conditions optimales seront élaborées dans cette présente section.

L'ELISA est une technique permettant d'estimer la quantité d'un constituant particulier, ici l'EPOR-S, à partir d'un échantillon biologique. La figure 16 de la page suivante résume le principe général d'un ELISA standard. D'abord, le support utilisé est une plaque de polystyrène constituée de 96 puits (Nunc-Immuno Plates Maxi Sorp Nunc, Danemark). Ces puits seront recouverts d'anticorps dirigés contre la molécule d'intérêt, lors de la première incubation. Ensuite, une série de lavages doit être effectuée pour permettre l'élimination des anticorps non fixés aux puits. Un blocage des sites libres est nécessaire pour éviter une liaison non-spécifique qui entraînerait l'apparition de faux-positifs. Les plaques sont maintenant prêtes à recevoir les échantillons sanguins, où une période d'incubation et une température optimale, permettra la liaison de la molécule recherchée aux anticorps fixés au fond des puits. L'étape suivante consiste en l'ajout d'un anticorps de révélation reconnaissant essentiellement la même molécule, en plus d'être conjuguée à la biotine. Cette dernière possède la propriété de se lier à l'avidine de façon plus prononcée que les liens entre anticorps. Donc l'incubation avec l'avidine couplée à une enzyme, la peroxydase, entraînera le changement de couleur d'un substrat spécifique pour celle-ci. L'intensité de coloration sera proportionnelle à la quantité d'EPOR-S présent dans l'échantillon sanguin.

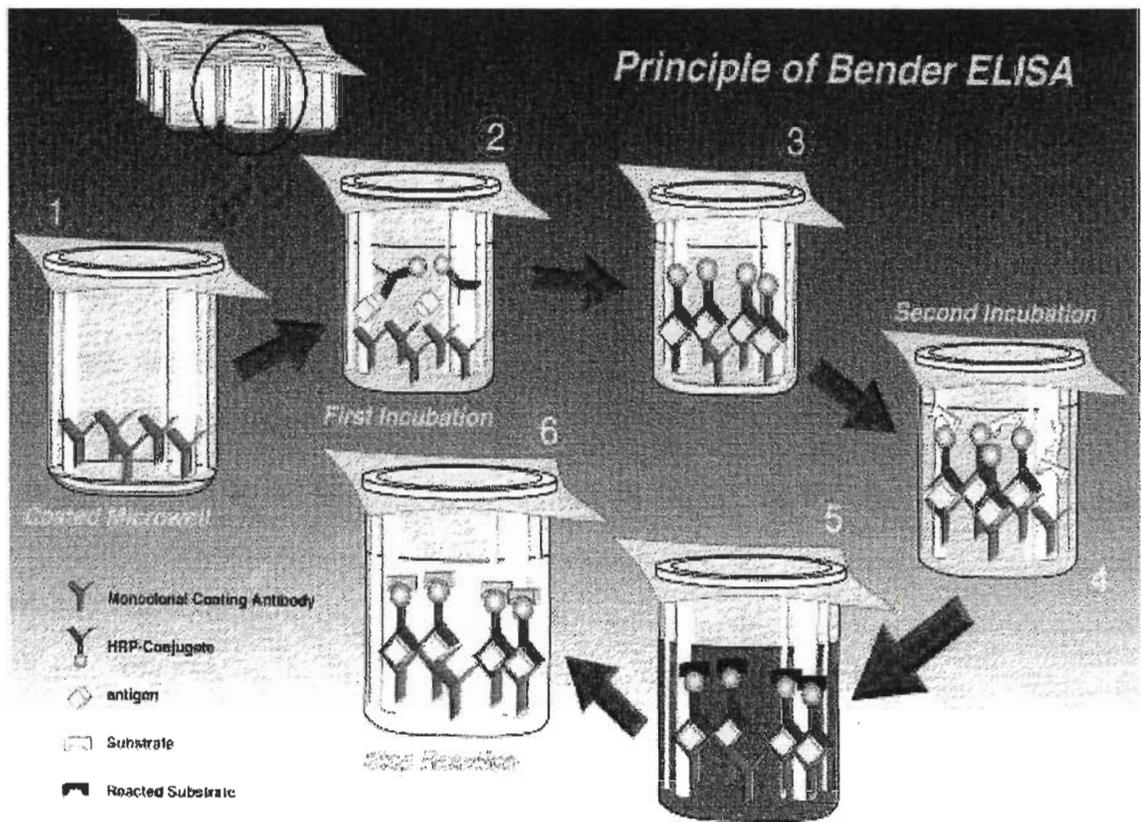


Figure 16 : Principe général d'un ELISA. Source : Dépliant publicitaire Bioproducts, Boehringer Ingelheim, 1996.

Chacune des étapes mentionnées précédemment requiert l'établissement de conditions optimales en ce qui a trait au temps d'incubation, à la température d'incubation, à la concentration d'anticorps utilisée, aux solutions utilisées pour la dilution des anticorps, au choix du substrat et finalement au processus de lavage requis entre chaque étape de l'essai. Pour ce faire, une série d'essais a été effectuée permettant l'établissement des conditions optimales.

La première étape, c'est-à-dire le recouvrement des plaques ELISA par les anticorps, a été effectué avec l'anti-EPOR-S humain polyclonal (AF-322-PB, R&D Systems, Minneapolis, USA) à une concentration de 2 µg/ml, où 150 µl ont été déposés dans chacun des puits. Le meilleur rendement a été obtenu suite à une incubation la nuit entière, au réfrigérateur (4° C) dans un tampon de 50 mM phosphate, 100 mM NaCl pH 7,5 (PBS pH 7,5). Par la suite, quatre lavages ont été pratiqués toujours en utilisant la solution de tampon phosphate. Ces lavages ont été exécutés entre chaque étape de l'ELISA pour éliminer les constituants ne s'étant pas liés. Ceux-ci ont donc leur raison d'être et ils doivent être faits de façon identique, soit le dépôt de 300 µl de tampon PBS pH 7,5 et ensuite une aspiration de la solution de lavage avec un appareil conçu spécialement pour les lavages d'ELISA (Nunc-Immuno Wash 12, Nunc, Danemark).

La seconde étape est le blocage des sites libres adjacents aux anticorps fixés au fond des puits. Cette phase est réalisée à une température de 37 °C, à l'aide d'un appareil chauffant pour les plaques ELISA (Heat Block, VWR, NJ, USA). La solution permettant le blocage des puits, sans augmenter considérablement le bruit de fond, est de l'albumine bovine sérique (BSA) à une concentration de 3 % (wt/vol) diluée dans le tampon PBS pH 7,5.

La troisième étape est celle de l'incubation avec l'EPOR-S de concentration connue (courbe étalon) ou inconnue (échantillons plasmatiques). Pour l'établissement de la courbe standard, une forme purifiée d'EPOR soluble (Recombinant Human EPOR-S, 307-ER, R&D Systems, Minneapolis, USA) est diluée dans une solution de PBS pH 7,5 contenant 0,5 % (wt/vol) BSA, et 150 µl est déposé dans chaque puits.

Une dilution sériée est effectuée pour obtenir des concentrations de 40, 35, 30, 25, 20, 10 et 5 ng/ml. Pour s'assurer d'une bonne reproductibilité entre les puits de concentrations identiques, chaque concentration de la courbe étalon a été dosée en triplicata. Une incubation de deux heures, à 37 °C permettra la liaison optimale de l'EPOR-S aux anticorps fixés au fond des puits.

Suite aux traditionnels lavages, l'ajout d'un anticorps polyclonal dirigé contre EPOR-S mais lié à une molécule de biotine sera ajouté à chaque puits (Biotinylated Anti-human EPOR-S, BAF307, R&D Systems, Minneapolis, USA). Préparé dans un tampon PBS pH 7,5 contenant 1,5 % (wt/vol) BSA, 150 µl d'une concentration de 1 µg/ml sont ajouté aux puits, pour une durée de deux heures à 37 °C, toujours sur le support chauffant. L'anticorps ira se lier à la molécule d'EPOR-S, qui est fixée à l'anticorps au fond du puit.

La dernière incubation prolongée sera celle avec l'avidine liée à la peroxydase (Sigma, St-Louis, Missouri, USA). D'une durée d'une heure, celle-ci sera utilisée selon une dilution de 1/2000, dans le PBS contenant 1,5 % (wt/vol) BSA. L'avidine possède la propriété de se lier spécifiquement à la biotine. La peroxydase quant à elle permettra le changement de couleur du substrat, proportionnel à la concentration en EPOR-S. Le substrat utilisé est l'o-phénylènediamine (OPD) dihydrochloride (OPD comprimé de 3 mg, Sigma, St-Louis, Missouri, USA) selon les recommandations du fabricant, c'est-à-dire dissout dans un tampon 50 mM citrate- 100 mM phosphate, pH 5. À la concentration finale de 0,3 mg/ml d'OPD est ajouté 4 µl de peroxyde d'hydrogène 30 % (Fischer Scientifics, St-Louis, MO, USA) et finalement 150 µl de ce

substrat est ajouté à chaque puits. La plaque est conservée à la noirceur, à la température de la pièce (~ 22 °C) pour une période de dix minutes et finalement, la réaction enzymatique est arrêtée à l'aide de 50 µl d'une solution d'acide sulfurique (4 M). La densité optique de chaque puits sera lue grâce à un lecteur de plaques ELISA, en utilisant un filtre à 492 nm (Microplate Reader, Biorad, modèle 450, Mississauga, ON, Canada).

Protocole de visualisation d'EPOR-S par immunobuvardage de type Western

Pour analyser la molécule d'EPOR-S en ELISA, la technique de l'immunobuvardage de type Western fut utilisée. Comme le plasma contient une multitude de protéines, il est nécessaire d'effectuer un électrophorèse sur gel de polyacrylamide appelé SDS-PAGE (sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel-electrophoresis). La méthode est réalisée selon Lameli [60] avec l'appareil à mini-gel (Miniprotean II, Biorad, Mississauga, ON, Canada). Un gel de compression de 4 % et gel de séparation de 9 % sont préparés, ce qui permettra la séparation des protéines situées près de 30 KDa.

Les échantillons ont été préparés dans un tampon permettant la dénaturation des protéines. Ce tampon est constitué des solutions suivantes : 0,25 M Tris-HCl, 8 % (wt/vol) SDS, 20 % (vol/vol) mercaptoéthanol et 40 % (vol/vol) de glycérol. Les échantillons ont été déposés sur le gel où un des puits a été réservé pour le marqueur de poids moléculaire marqué à la biotine (Biotinylated SDS-PAGE Standards Kit, Low range avidine-HRP, Biorad, Mississauga, ON, Canada). La migration a débutée avec un

voltage constant de 75 Volts, pour permettre aux protéines d'être au même niveau avant leur entrée dans le gel de séparation. Environ une heure plus tard, lorsque les échantillons entrent dans le gel de séparation, le voltage est augmenté à 120 Volts et la migration se poursuit jusqu'à ce que les protéines atteignent 0,5 cm de la fin du gel.

Avant d'effectuer le transfert (immunobuvardage de type Western) sur une membrane de polyvinylidène fluoride (PVDF), le gel doit être équilibré une quinzaine de minutes dans le tampon de transfert : 48 mM Tris 39 mM glycine contenant 20 % (vol/vol) méthanol. Comme la membrane de PVDF est hydrophobe, elle doit être préparée afin de recevoir les protéines. Elle est d'abord déposée dans un bain de méthanol, ensuite un bain d'eau déminéralisée et finalement dans un bain contenant le tampon de transfert mentionné précédemment.

Le transfert du gel vers la membrane se fait à l'aide du Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfert-Cell (Biorad, Mississauga, ON, Canada). Dans l'ordre, sont déposés sur l'anode de l'appareil : un papier Whatmann de trois mm d'épaisseur, la membrane PVDF, le gel et un dernier papier Whatmann. Ces produits proviennent tous de Biorad (Biorad, Mississauga, ON, Canada). La cathode est déposée sur le tout et le transfert s'effectue à 12 Volts, pour une durée de 15 minutes.

Suite au transfert, la membrane PVDF est déposée dans un bain de tampon 0,2 M phosphate, 140 mM NaCl, pH 7,4 (PBS pH 7,4) contenant 1 % (wt/vol) de lait en poudre, la nuit entière, au réfrigérateur (4° C). Cette étape permet le blocage des sites

libres de la membrane PVDF, éliminant les liaisons non-spécifiques lors des étapes subséquentes.

Pour la révélation des protéines, une série d'incubation est effectuée pour arriver à la mise en évidence d'EPOR-S dans le plasma. La première incubation se fait avec le premier anticorps, l'anti-EPOR lié à une molécule de biotine (Biotinylated Anti-human EPOR-S, BAF307, R&D Systems, Minneapolis, USA), pour une durée de 2 heures, à la température ambiante (~ 22 °C), avec agitation. Cet anticorps a été préalablement dilué à une concentration finale de $0,1 \mu\text{g/ml}$ dans une solution de PBS pH 7,4, contenant 0,1 % (wt/vol) de lait en poudre. Il a été déposé sur la membrane, placée dans une pochette de plastique.

Suite à l'incubation, la membrane devra subir deux lavages au PBS pH 7,4 contenant 0,02 % (vol/vol) de Tween 20 et deux derniers lavages sans Tween 20, tous d'une durée de dix minutes, à la température ambiante et avec agitation.

Comme le premier anticorps est marqué à la biotine, la seconde étape se fera avec l'extravidine liée à une molécule de peroxidase (Extravidine-peroxidase, Sigma, St-Louis, Missouri, USA). Les conditions d'incubation ainsi que les lavages sont les mêmes que ceux rencontrés précédemment.

Pour la détection, une trousse par chémiluminescence a été utilisée (BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Mouse/rabbit), Boehringer Mannheim, Laval, PQ, Canada). Suite aux traditionnels lavages, $1000 \mu\text{l}$ de la solution de

détection, préparée selon les recommandations du fabricant, sera déposée sur la membrane pour une minute. Après avoir enlevé l'excédent, la membrane est déposée dans une cassette pour films à rayons X (Kodak X-omatic cassette, Kodak, Toronto, ON, Canada) et recouverte d'un film à rayons X (Kodak Biomax Light Film, Kodak, Toronto, ON, Canada). Le film est exposé une minute et développé dans la solution développante (Développeur D-19, Kodak, Toronto, ON, Canada) et fixé dix minutes dans le fixateur (Kodafix Solution, Kodak, Toronto, ON, Canada). Selon l'intensité du signal, de nouveaux films furent exposés pour des temps variant entre cinq minutes et une heure.

Purification d' EPOR-S avec Dynabeads

La présence de plusieurs protéines dans le plasma rendent l'analyse par immunobuvardage de type Western difficile à réaliser. Seulement une petite quantité de plasma peut être déposée sur le gel pour l'électrophorèse et comme la quantité d'EPOR-S est de l'ordre du ng/ml, il est pratiquement impossible de détecter sa présence dans le plasma. La stratégie utilisée pour contrer ce problème est par l'utilisation des billes magnétiques « Dynabeads ». La figure 17 représente le principe général de ces billes. Les billes magnétiques tosylactivées ont la propriété de lier un anticorps par sa portion FC par une liaison covalente [61]. De cette façon, il sera possible d'ajouter une certaine quantité de billes spécifiques à EPOR-S à un volume précis de plasma. Ceci permettra à EPOR-S contenu dans le plasma de se fixer aux anticorps des billes et grâce à leur magnétisme, il sera facile de conserver EPOR-S pour éliminer le surnageant contenant les protéines indésirables.

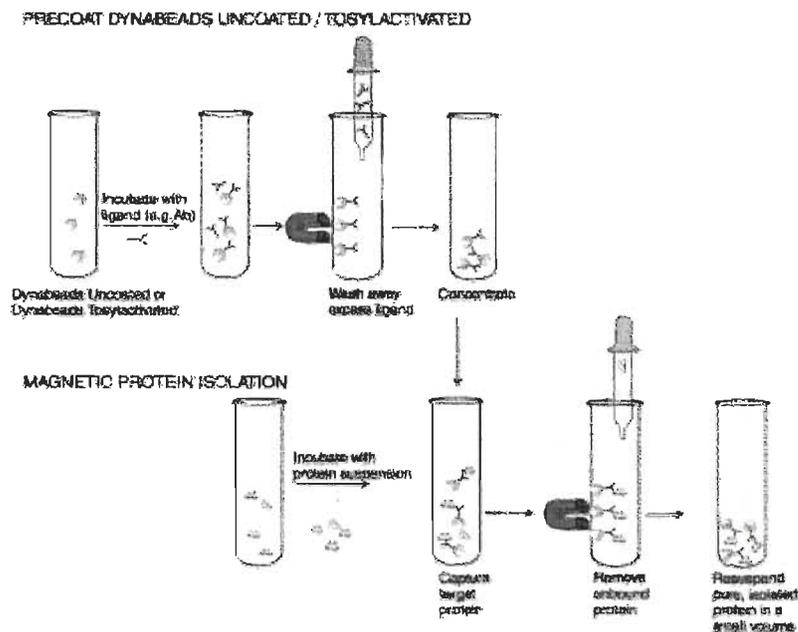


Figure 17 : Principe général des billes magnétiques. Source : <http://www.dynal.no/>

Protocole de préparation des billes magnétiques

Les billes magnétiques tosylactivées (Dynabeads M280, Dynal, Oslo, Norway) ont été couplées à un anticorps dirigé contre EPOR-S (l'anti-EPOR-S humain polyclonal, AF-322-PB, R&D Systems, Minneapolis, USA), selon les recommandations du fournisseur, avec quelques modifications [61, 62, 63]. En effet, 30 μg d'anticorps (AF-322 PB) ont été incubés avec 10^8 billes dans 200 μl d'un tampon borate de concentration 0,1 M pH 9,5. Après une période de 16 à 24 h d'incubation à 37 °C sur un agitateur, les billes ont été lavées deux fois avec un tampon PBS pH 7,4 contenant 0,1 % (wt/vol) d'albumine bovine sérique (BSA), pour une durée de cinq minutes, au réfrigérateur (4 °C). Ensuite, les billes ont été réincubées pour 24 heures, à la température ambiante (~ 22 °C), toujours avec agitation, dans 1000 μl d'une solution 0,2 M Tris contenant 0,1 % (wt/vol) BSA, pH 8,5. Cette dernière étape permet de

bloquer les groupements tosyls libres, pour éviter d'éventuelles liaisons non-spécifiques [61]. Ensuite, les billes sont lavées une première fois en utilisant du PBS 0,1 % (wt/vol) BSA, pH 7,4, dix minutes à 22 °C. Au deuxième lavage, 0,5 % (vol/vol) de Tween 20 est ajouté au tampon du premier lavage. Finalement, les billes sont lavées deux dernières fois avec le tampon sans Tween 20. Les billes spécifiques anti-EPOR-S sont maintenant prêtes à être utilisées et elles sont resuspendues dans un tampon PBS 0,1 % (wt/vol) BSA pH 7,4 à une concentration finale d'environ $6,5 \times 10^8$ billes /ml. Pour éviter la contamination bactérienne, les billes sont conservées à 4 °C avec 0,02 % (vol/vol) d'azide de sodium (NaN_3). Tous les lavages sont effectués de la même façon, soit en déposant d'abord l'échantillon contenant les billes sur un aimant (Dynal MPC E-1, Dynal, Oslo, Norway) pour une courte période d'attente. Les billes se retrouvent accolées à la paroi du tube, conséquence de la force magnétique de l'aimant et une aspiration du surnageant permet d'éliminer les éléments indésirables. Finalement, il s'agit seulement de resuspendre les billes dans la solution désirée.

Protocole de cytométrie de flux

Pour s'assurer de la présence d'anticorps sur les billes, un essai par cytométrie de flux a été mis au point. Suite à une série de lavages, les billes ont été incubées avec un anticorps dirigé contre l'anti-EPOR-S de chèvre fixé sur les billes. Pour ce faire, un anti-chèvre marqué à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) a été utilisé (Swine anti-goat IgG (H+L) FITC, TAGO Immunodiagnostic Reagents Inc., Burlingame, Californie, USA) et incubé 30 minutes à la température de la pièce, avec agitation. Suite aux lavages, les billes ont été resuspendues dans 1000 µl d'un tampon PBS pH 7,2. La

solution a été aspirée par le cytomètre de flux (EPICS XL, Beckman-Coulter, Fullerton, Californie, USA) et la zone d'intérêt contenant les billes a été analysée. L'intensité de fluorescence obtenue par les billes anti-EPOR-S a été comparée à un standard (Quantum fluorescence kits for MESF units of FITC, Sigma, St-Louis, Missouri, USA). Les données obtenues ont été analysées à l'aide d'un logiciel appelé QuickCal (Sigma, St-Louis, Missouri, USA) où les résultats sont un paramètre appelé «molecules of equivalent soluble fluorochrome» (MESF). Ceci indique la quantité de fluorescence observée sur une bille, en comparaison du standard, il est donc possible de savoir le nombre de molécule d'anticorps retrouvé sur une bille.

Protocole de visualisation d'EPOR-S par les Dynabeads.

Après avoir vérifié la présence d'anticorps sur les billes, il importe maintenant de purifier EPOR-S du plasma pour ensuite faire la correspondance entre la molécule native dosée en ELISA et la forme dénaturée lors de l'électrophorèse. Pour ce faire, environ 2×10^7 billes sont prélevées et lavées quatre fois avec du tampon phosphate pH 7,4. Une incubation avec différentes quantités d'EPOR-S ou avec du plasma suivra, d'une durée de deux heures, à 37 °C, avec agitation. La prochaine étape dépend du moyen utilisé pour visualiser EPOR-S. Si c'est par l'immunobuvardage de type Western, les billes seront préparées selon le même protocole que les échantillons standards. En fait, le tampon de préparation des échantillons permet de faire décrocher les molécules qui sont fixées sur les anticorps des billes. La procédure standard d'électrophorèse et d'immunobuvardage de type Western se dérouleront comme décrits

précédemment. Si par contre, le moyen utilisé est par la cytométrie de flux, d'autres incubations et lavages devront avoir lieu. D'abord une incubation avec l'anti-EPOR-S marqué à la biotine (Biotinylated Anti-human EPOR-S, BAF307, R&D Systems, Minneapolis, USA) et une seconde incubation avec l'avidine marquée FITC (Sigma, St-Louis, Missouri, USA) s'effectueront avec des conditions identiques à l'ELISA. Les billes seront lavées une dernière fois et resuspendues dans 1000 µl d'un tampon PBS pH 7,2. La solution a été aspirée par le cytomètre de flux, pour l'obtention de valeur de fluorescence.

Analyses statistiques

Les données obtenues ont été exprimées en moyenne et écart-types selon des calculs standards. En ce qui concerne la comparaison du taux d'EPOR-S par rapport au taux initial, un test de Student a été effectué avec un niveau de confiance de 5 %.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Les résultats de cette étude se divisent en quatre principales sections. Pour débiter, il sera question des résultats obtenus pour le protocole France 1997. Les résultats individuels de la quantité d'EPOR-S y seront représentés ainsi que la compilations des principaux paramètres sanguins, confirmant l'efficacité de l'administration d'EPO. En second lieu, les mêmes analyses seront exposées spécifiquement au protocole Australie 1999, selon les trois groupes de traitement. Dans un troisième temps, les résultats du protocole Australie 2000 y seront retrouvés. Ensuite, il sera question des tentatives effectuées pour visualiser EPOR-S par la technique d'immunobuvardage de type Western. Il sera finalement question des difficultés rencontrées ainsi que des solutions envisagées. Pour ce faire, les résultats obtenus à l'aide des billes magnétiques y seront aussi décrits, toujours dans le but de visualiser EPOR-S.

Résultats protocole France 1997

Les graphiques de la page suivante (Figure 18) représentent les résultats individuels des neuf athlètes, obtenus lors du dosage ELISA des plasmas. Les quantités d'EPOR-S sont exprimées en ng/ml en fonction des jours. On peut remarquer la limite entre les jours de traitement à l'EPO ainsi que l'arrêt des traitements, qui est identifiée

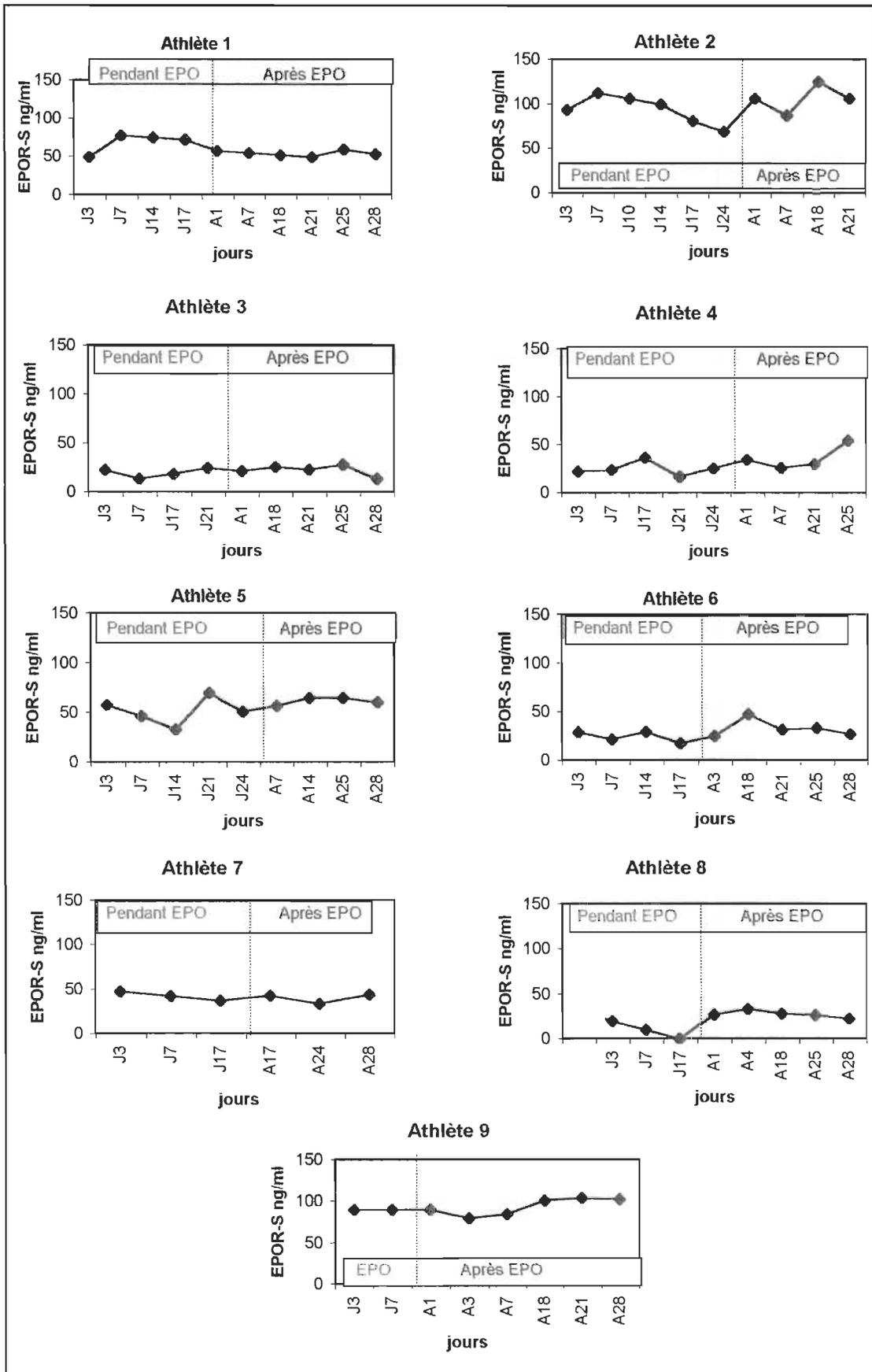


Figure 18 : Résultats individuels de la quantité d'EPOR-S, France 1997

par la ligne pointillée. Il a été impossible d'inclure des écarts-types puisque le volume d'échantillon sanguin ne permettait pas de faire le dosage des échantillons sanguins en double. Par contre, les résultats préliminaires obtenus lors de la mise au point de l'ELISA ont démontré une très forte reproductibilité et constance pour un même échantillon plasmatique dans un même essai. ($\bar{x} = 50,5 \pm 2,3$ ng/ml $n = 25$)

Seulement le tiers des athlètes ont vu leur quantité d'EPOR-S augmenter dans les premiers jours d'administration d'EPO. De plus, il est évident qu'aucune tendance peut découler de ces résultats, certains athlètes ont une hausse de la quantité d'EPOR-S tandis que d'autres obtiennent une baisse ou une certaine stabilité lorsque mesuré avec l'ELISA.

Nous avons ensuite effectué une compilation des différents paramètres sanguins, démontrant l'efficacité des injections d'EPO. Le tableau suivant (Tableau 4) représente les moyennes calculées pour les différents marqueurs de l'activité érythropoïétique, les écarts-types ainsi que les coefficients de variation exprimés en pourcentage (%).

L'hématocrite (Hct, tableau 4) calculée démontre une augmentation par rapport au premier jour de traitement, et le niveau demeure élevé pour la durée du traitement et même plusieurs jours après l'arrêt des injections d'EPO. Les valeurs d'hématocrite ont été compilées et représentées à la figure 18. Il en est de même pour les résultats de la concentration en hémoglobine (Hb, tableau 4) qui se retrouve toujours à la figure 19. Le nombre de réticulocytes (# retic, tableau 4) voit aussi sa quantité augmenter, démontrant une accélération de l'activité érythropoïétique de la moelle osseuse (Figure

Paramètres	JOURS											
	J 3	J 7	J 14	J 17	J 21	J 24	A 1	A 7	A 18	A 21	A 25	A 28
Hb (g/l)												
moyenne	14,8	15,1	15,5	15,8	15,8	16,0	16,5	16,5	15,8	15,75	15,5	15,1
écart-type	0,9	1,0	1,0	1,0	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,6	0,8	0,8
% CV	6,1	6,6	6,5	6,3	5,1	5,0	4,8	5,5	5,1	3,8	5,2	5,3
Hct												
moyenne	0,44	0,45	0,46	0,47	0,47	0,48	0,49	0,50	0,47	0,47	0,46	0,45
écart-type	0,026	0,029	0,027	0,029	0,020	0,021	0,027	0,023	0,024	0,014	0,022	0,029
% CV	5,9	6,4	5,9	6,2	4,3	4,4	5,5	4,6	5,1	3,0	4,8	6,4
# retic (10⁹/L)												
moyenne	99,1	123,2	131,0	136,1	154,0	120,7	122,1	69,1	19,8	14,3	18,7	21,9
écart-type	23,1	37,8	53,7	59,0	67,2	61,3	57,1	29,3	7,6	5,9	3,7	6,6
% CV	23,3	30,6	41,0	43,3	43,6	50,8	46,7	42,3	38,2	40,8	19,7	30,0
sTfR (µg/ml)												
moyenne	N/D	N/D	12,51	13,72	14,95	15,43	15,77	14,86	N/D	N/D	7,21	N/D
écart-type	N/D	N/D	2,04	2,66	2,85	4,26	3,44	3,11	N/D	N/D	1,95	N/D
% CV	N/D	N/D	16,3	19,4	19,1	27,6	21,8	20,9	N/D	N/D	27,0	N/D
EPO (mUI/ml)												
moyenne	N/D	N/D	34,2	37,5	38,2	34,7	43,5	13,3	N/D	4,8	5,9	5,5
écart-type	N/D	N/D	13,7	15,3	17,5	14,8	7,1	7,3	N/D	1,7	3,2	2,3
% CV	N/D	N/D	40,1	40,8	45,8	42,7	16,3	54,9	N/D	35,4	54,2	41,8
EPOR-S (ng/ml)												
moyenne	47,5	47,5	58,3	37,6	31,3	44,4	56,1	59,0	60,3	57,4	40,6	44,0
écart-type	28,2	36,8	35,0	29,7	18,8	22,1	35,2	26,7	37,9	37,9	13,6	29,2
% CV	59,4	77,4	60,0	79,2	59,9	49,8	62,7	45,2	62,8	66,0	33,5	66,2

Tableau 4 : Compilation des paramètres sanguins obtenus, France 1997

Vert : Pendant EPO

Rouge : Après EPO

N/D : non-disponible

19). En ce qui concerne le sTfR, les valeurs aux jours J3, J7, A18, A21 et A28 ne sont pas disponibles, puisque ce sont des valeurs stables et où le taux sTfR n'était pas significativement augmenté. En effet, le sTfR démontre une augmentation qui survient au moins deux semaines après le début des injections et une baisse prononcée est observée environ deux semaines après l'arrêt des injections d'EPO (Figure 19). Les résultats obtenus entre les jours J14 et A7 démontre bien que le sTfR est un indicateur de l'accélération induite de l'érythropoïèse. Il en est tout aussi évident concernant la concentration en EPO. Son profil (Figure 19) nous indique très bien sa croissance dans le plasma tout au long des jours, ainsi que sa chute abrupte lors de l'arrêt des injections de celle-ci.

Par contre, la quantité d'EPOR-S (Figure 20) ne semble pas avoir la même tendance. Il semblerait au contraire, que la concentration en EPOR-S soit relativement stable au début du traitement, pour décroître jusqu'à l'arrêt des injections. Cet arrêt des injections semble entraîner une hausse d'EPOR-S, pour atteindre finalement un niveau plus stable trois à quatre semaines après l'arrêt des traitements. Il est impossible d'avoir une tendance identique pour tous les athlètes (Figure 20) et étant donné les écarts-types très étendus, nous ne pouvons conclure qu'il y a une hausse d'EPOR-S lors d'injections à l'EPO.

Il est donc clair qu'une forte variabilité de la quantité d'EPOR-S est observée. Certains athlètes ont une concentration d'EPOR-S avoisinant les 100 ng/ml, tandis que d'autres athlètes voient leur niveau d'EPOR-S autour des 20 ng/ml. Comme Harris et son équipe l'avait déjà remarqué, la quantité d'EPOR-S présente dans le plasma varie

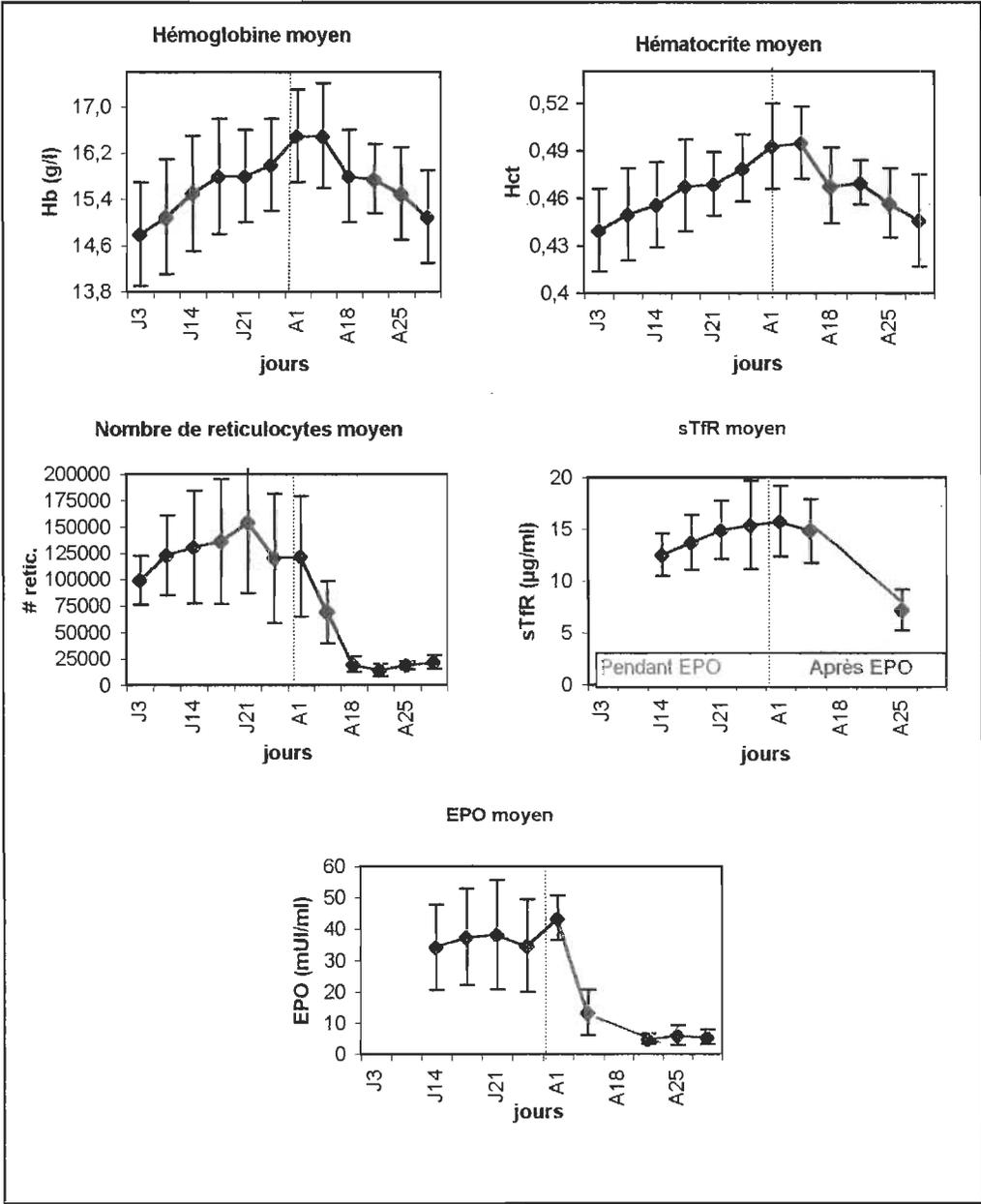


Figure 19 : Moyenne (± S.E.) des paramètres sanguins en fonction des jours, France 1997

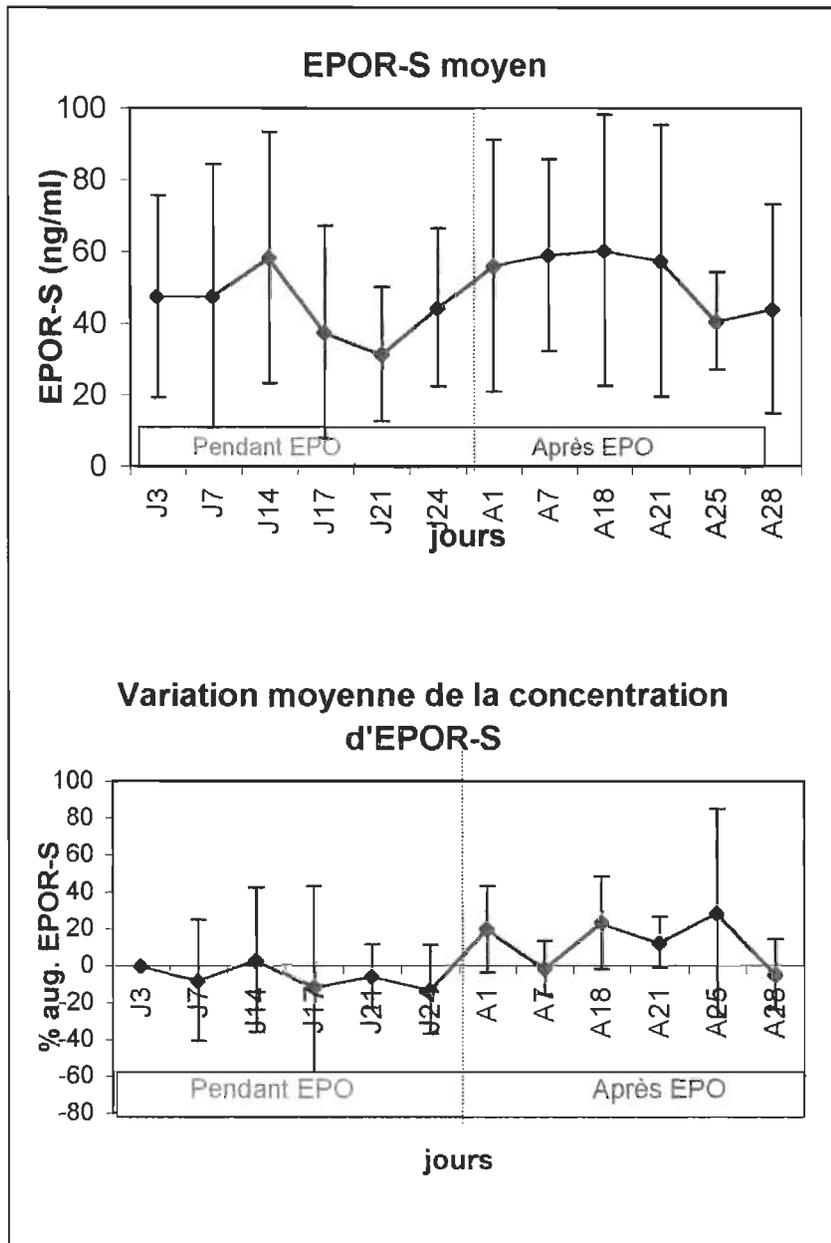


Figure 20 : Quantité d'EPOR-S moyen et variation moyenne de la concentration d'EPOR-S
France 1997

énormément d'une personne à l'autre [43]. Chez des gens sains, une moyenne d'EPOR-S de 550 ± 735 ng/ml ont été obtenus, démontrant ainsi son hyper-variabilité [43].

Étant donné cette grande variabilité, il est plus opportun de traiter les données en terme de pourcentage d'augmentation ou de diminution d'EPOR-S, par rapport au jour initial (J3). À noter qu'il aurait été préférable d'avoir un niveau basal pré-établi (J0) avant les injections d'EPO mais ces échantillons sanguins n'étaient pas à notre disposition. Pour ce faire, la figure 20 représente la variation moyenne de la concentration d'EPOR-S des neuf athlètes par rapport au jour initial (J3). Le pourcentage d'augmentation a été calculé à l'aide de la formule suivante : $[(Jx - J3) \times 100 \%] / J3$. Malgré les écarts-types relativement élevés, il est possible d'observer une tendance (Figure 20). En effet, il semblerait que le pourcentage d'augmentation d'EPOR-S serait assez stable ou quelque peu diminué pendant le traitement et ensuite une augmentation est observable après l'arrêt des injections. Cette hausse est significative pour les jours A1, A18, et A21, où $p = 0,05$. Cette valeur p indique que la hausse du taux d'EPOR-S aux jours mentionnés précédemment est significativement différente du taux d'EPOR-S initial, au jour J3.

Résultats protocole Australie 1999

La particularité de ce protocole concerne les différents traitements à l'EPO et de fer qui ont été administrés. Pour ce faire, nous allons aborder ces groupes séparément, dans l'ordre suivant : EPO + F.I.M., EPO + F.O., et PLACEBO.

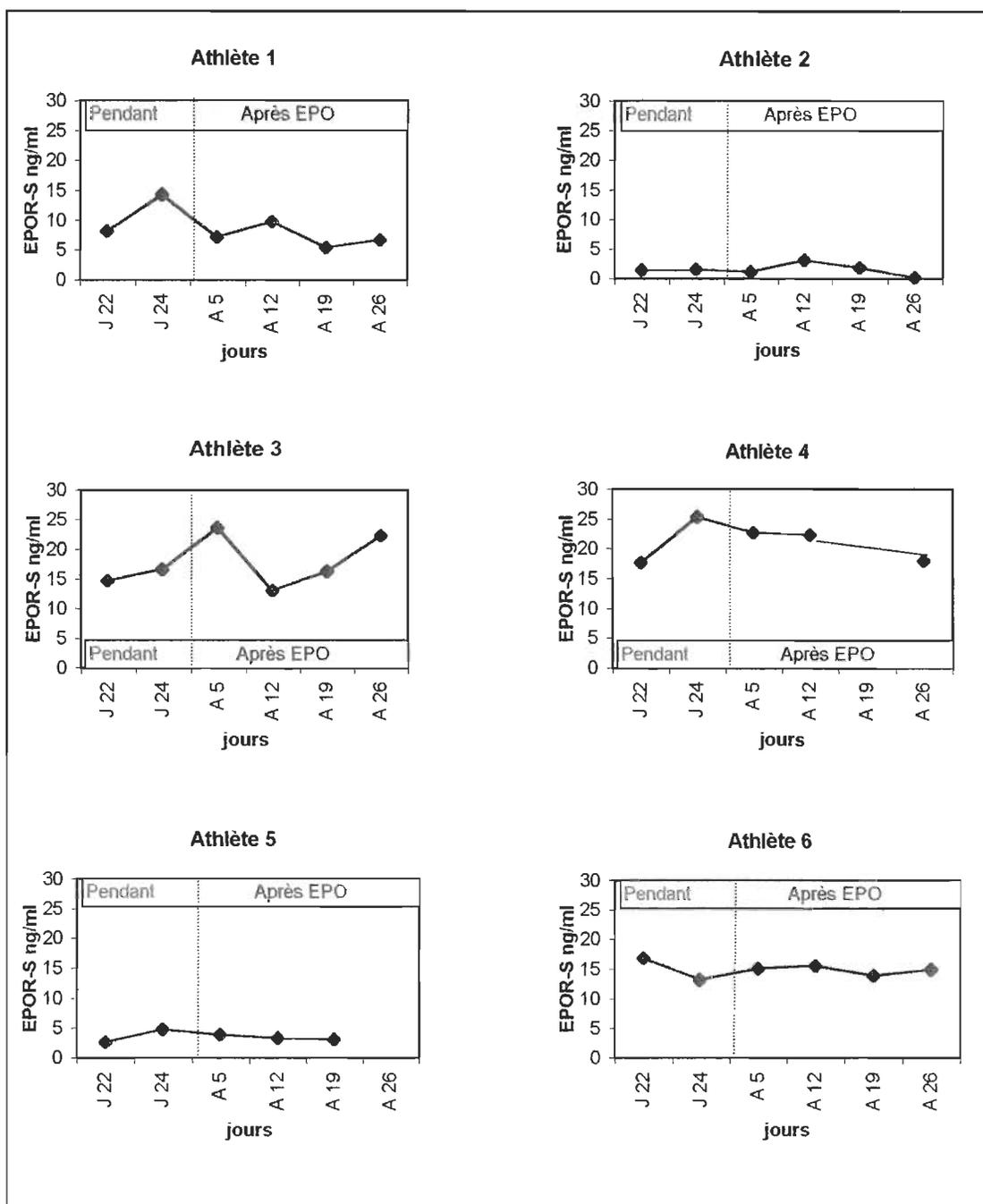


Figure 21 : Résultats individuels de la quantité d'EPOR-S, Australie 1999

Groupe : EPO + F.I.M.

Athlète 7 : 0 ng/ml

Athlètes 8 et 9 : plus de 30 ng/ml

Le profil individuel des athlètes ayant reçu de l'EPO et un supplément de fer intra-musculaire sont représentés à la figure 21. Nous prévoyons obtenir des valeurs en EPOR-S assez élevées pour ce groupe mais environ le tiers des athlètes ne répondaient pas à nos attentes. Il faut noter la présence d'un athlète ayant obtenu des valeurs sous la limite de détection de l'essai, l'athlète 7, qui n'est pas représenté au niveau de la figure 21. À l'inverse, les athlètes 8 et 9 n'ont pas été inclus dans la figure car ceux-ci ont obtenu des concentrations en EPOR-S plus élevée que la limite supérieure de l'essai. Une trop faible disponibilité de plasma ne permettait pas de refaire le dosage en y incluant une dilution. Nous pouvons remarquer que le profil est très varié d'un athlète à l'autre. En effet, environ la moitié de ceux-ci semblent avoir un taux assez constant d'EPOR-S en fonction des jours. En ce qui concerne les 50 % restants, une hausse d'EPOR-S est observée suivie d'une baisse suite à l'arrêt des injections d'EPO.

Par ailleurs, une tendance inverse est observée pour le groupe d'athlète du groupe EPO + F.O. (Figure 22). En effet, une certaine tendance vers une diminution d'EPOR-S est observable dans les premiers jours de traitement, suivie d'une augmentation de sa concentration à l'arrêt des injections. De même que le groupe précédent, deux sujets ont démontré contenir des quantités d'EPOR-S inférieures au seuil minimal de détection.

D'autre part, à la figure 23, nous pouvons observer les résultats du dernier groupe d'athlète de ce protocole, le groupe ayant reçu un placebo d'EPO et un placebo de fer. On se serait attendu à une faible quantité d'EPOR-S chez tous ces sujets, mais

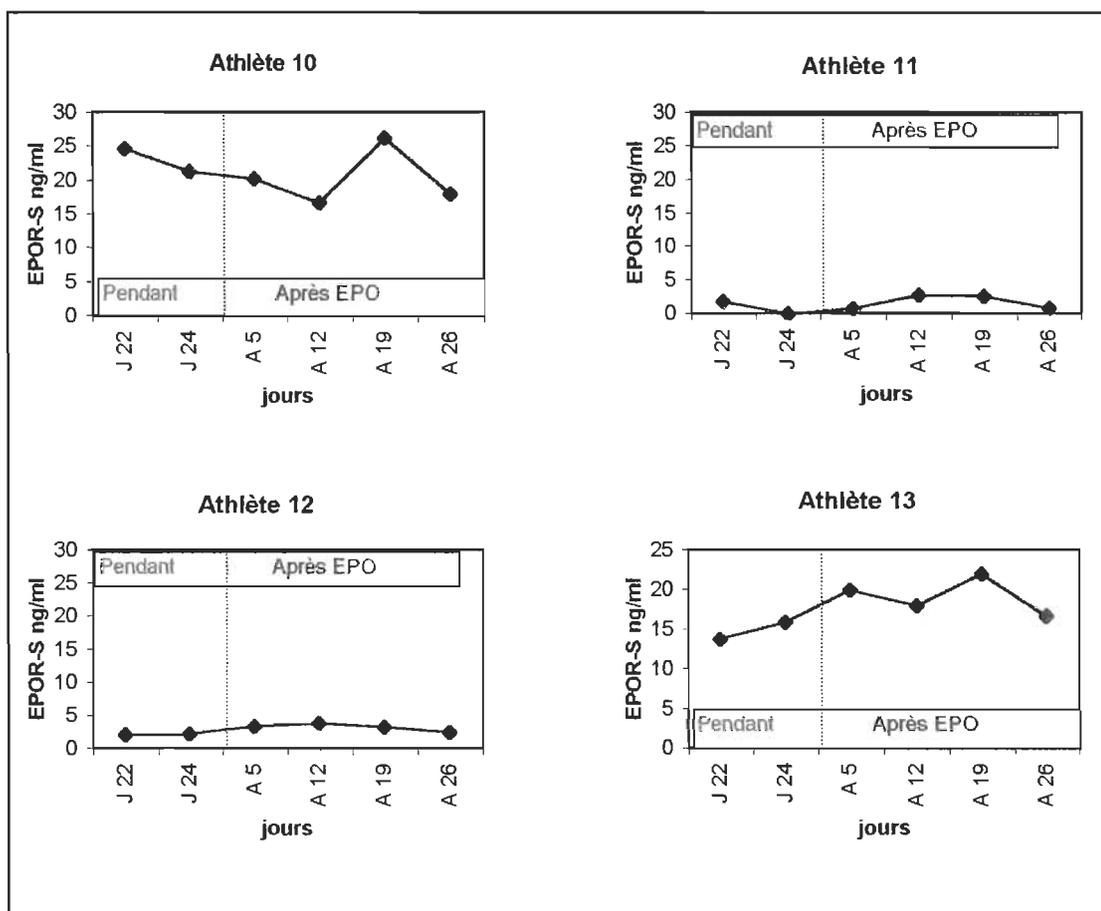


Figure 22 : Résultats individuels de la quantité d'EPOR-S, Australie 1999
Groupe : EPO + F.O.

Athlètes 14 et 15 : 0 ng/ml

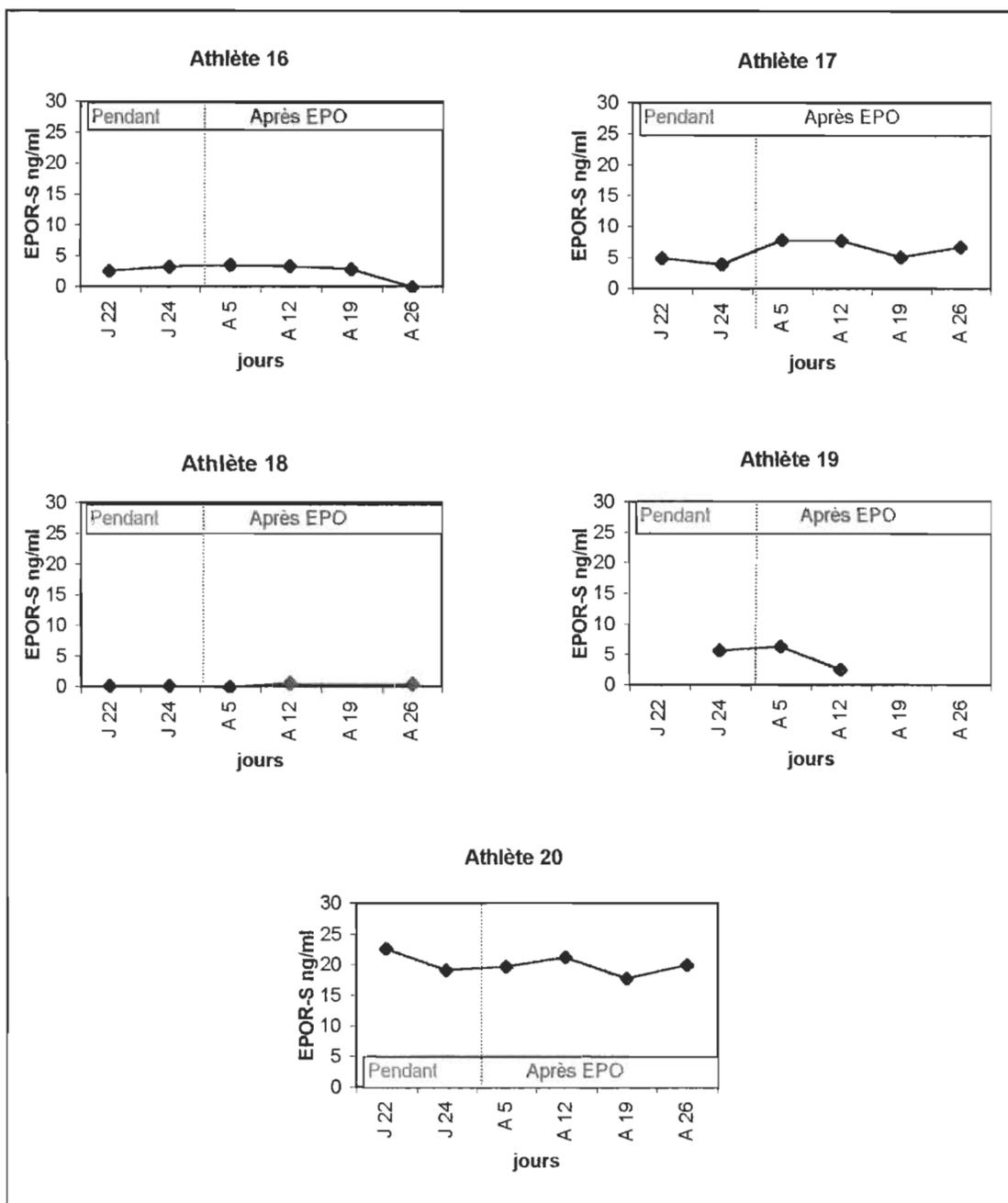


Figure 23 : Résultats individuels de la quantité d'EPOR-S, Australie 1999
Groupe : PLACEBO

Athlète 21 : 0 ng/ml

Athlète 22 : plus de 30 ng/ml

deux d'entre eux ont obtenu des valeurs supérieures à 20 ng/ml. Malgré tout, les résultats des autres candidats démontrent une certaine stabilité tout au long du traitement (Figure 23).

Pour s'assurer de la validité du traitement et de son bon fonctionnement, une compilation moyenne des différents paramètres sanguins ont été synthétisés dans les trois tableaux suivants. En premier lieu, dans le tableau 5 se retrouvent les résultats du groupe EPO + F.I.M. Ceux du second groupe de traitement, EPO + F.O. sont quant à eux retrouvés au tableau 6. Finalement, le tableau 7 contient les résultats équivalents pour le groupe PLACEBO. Les résultats obtenus pour les différents paramètres sanguins (Hct, Hb, # retic, sTfR, EPO) vont dans le même sens que les résultats du protocole France 1997.

Une synthèse visuelle des différents paramètres sanguins est représentée à la figure 24. Peu importe le facteur observé, le groupe PLACEBO demeure constant tout au long du traitement. Des résultats opposés sont obtenus pour les deux autres groupes, indiquant la réussite des protocoles d'administration en EPO. À noter que ces résultats sont concordants avec ceux obtenus au niveau du protocole France 1997.

Par ailleurs, il est possible d'observer la quantité d'EPOR-S moyen selon les trois groupes de traitement, au niveau de la figure 25. Par souci de clarté, les écarts-types n'ont pas été inclus dans la figure, il est par contre possible de les consulter dans les tableaux 5, 6 et 7 selon les groupes d'athlètes. La forte étendue des écarts types nous incitent à vérifier les pourcentages d'augmentation d'EPOR-S par rapport au jour

Paramètres	JOURS					
	J 22	J 24	A 5	A 12	A 19	A 26
Hb (g/l)						
moyenne	16,2	15,7	16,2	16,3	15,8	16,1
écart-type	1,3	1,1	1,3	1,0	1,3	1,0
% CV	8,0	6,9	8,0	6,4	7,9	6,2
Hct						
moyenne	0,49	0,47	0,46	0,46	0,47	0,49
écart-type	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03
% CV	6,1	6,4	8,7	6,5	6,4	6,1
# retic (10⁹ C/L)						
moyenne	62,0	60,9	53,0	24,8	21,9	28,6
écart-type	8,6	16,3	8,8	5,9	8,8	9,3
% CV	13,9	26,8	16,6	23,8	40,2	32,5
sTfR (µg/ml)						
moyenne	31,32	30,53	34,30	26,77	20,77	17,69
écart-type	6,79	6,90	8,71	6,13	4,79	4,64
% CV	21,7	22,6	25,4	22,9	23,1	26,2
EPO (mUI/ml)						
moyenne	24,14	24,46	7,18	3,81	3,37	3,46
écart-type	5,31	6,17	1,96	1,53	1,21	1,35
% CV	22,0	25,2	27,3	40,2	35,9	39,0
EPOR-S (ng/ml)						
moyenne	13,5	15,3	14,9	14,2	12,7	15,3
écart-type	11,4	11,8	12,2	11,3	12,2	12,1
% CV	84,4	77,1	81,9	79,6	96,1	79,1

Tableau 5 : Compilation des paramètres sanguins obtenus, Australie 1999

Groupe EPO + F.I.M.

Vert : pendant EPO

Rouge : après EPO

Paramètres	JOURS					
	J 22	J 24	A 5	A 12	A 19	A 26
Hb (g/l)						
moyenne	16,4	15,4	16,7	16,6	16,3	15,9
écart-type	0,9	0,7	1,0	1,0	1,0	1,0
% CV	5,7	4,7	5,7	5,9	6,3	6,5
Hct						
moyenne	0,49	0,51	0,51	0,51	0,51	0,48
écart-type	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03
% CV	6,1	5,9	5,9	5,9	7,8	6,3
# retic (10⁹ C/L)						
moyenne	105	90,8	90,8	32,5	23,3	25,7
écart-type	23	25,6	21	9	10	10
% CV	21,9	28,2	23,3	27,9	42,9	37,7
sTfR (µg/ml)						
moyenne	27,22	27,82	30,77	24,09	18,73	15,19
écart-type	6,28	5,46	6,68	4,24	3,74	3,06
% CV	23,1	19,6	21,7	17,6	20,0	20,1
EPO (mUI/ml)						
moyenne	24,90	23,18	7,22	2,66	2,48	5,18
écart-type	5,53	6,08	2,90	2,54	1,33	2,78
% CV	22,2	26,2	40,2	95,5	53,6	53,7
EPOR-S (ng/ml)						
moyenne	7,1	6,9	7,4	6,9	8,4	6,3
écart-type	10,1	9,3	9,9	8,2	11,1	8,6
% CV	143,3	135,6	134,1	119,0	132,8	135,9

Tableau 6 : Compilation des paramètres sanguins obtenus, Australie 1999

Groupe EPO + F.O.

Vert : pendant EPO

Rouge : après EPO

Paramètres	JOURS					
	J 22	J 24	A 5	A 12	A 19	A 26
Hb (g/l)						
moyenne	15,6	15,5	15,4	15,3	15,2	15,9
écart-type	0,4	0,9	0,7	0,8	0,7	0,8
% CV	2,5	5,8	4,2	5,4	4,5	4,9
Hct						
moyenne	0,46	0,47	0,46	0,46	0,47	0,49
écart-type	0,01	0,03	0,01	0,02	0,0	0,02
% CV	2,2	6,4	2,2	4,3	4,3	4,1
# retic (10⁹ C/L)						
moyenne	48,0	49,1	50,0	44,3	50,3	49,5
écart-type	12,6	10,7	14,8	12,2	17,7	11,1
% CV	26,3	21,8	29,6	27,5	35,2	22,4
sTfR (µg/ml)						
moyenne	17,56	16,92	18,48	17,21	17,26	17,33
écart-type	1,42	4,57	1,15	0,74	2,11	0,96
% CV	8,1	27,0	6,2	4,3	12,2	5,5
EPO (mUI/ml)						
moyenne	8,17	7,64	8,76	8,91	8,78	8,35
écart-type	5,24	3,22	3,33	2,96	4,70	4,70
% CV	64,1	42,1	38,0	33,2	53,5	56,3
EPOR-S (ng/ml)						
moyenne	10,1	8,9	9,7	9,4	9,75	9,5
écart-type	12,9	11,3	11,2	11,7	11,7	12,6
% CV	127,7	127,0	115,5	124,5	120,0	132,6

Tableau 7 : Compilation des paramètres sanguins obtenus, Australie 1999

Groupe PLACEBO

Vert : pendant EPO

Rouge : après EPO

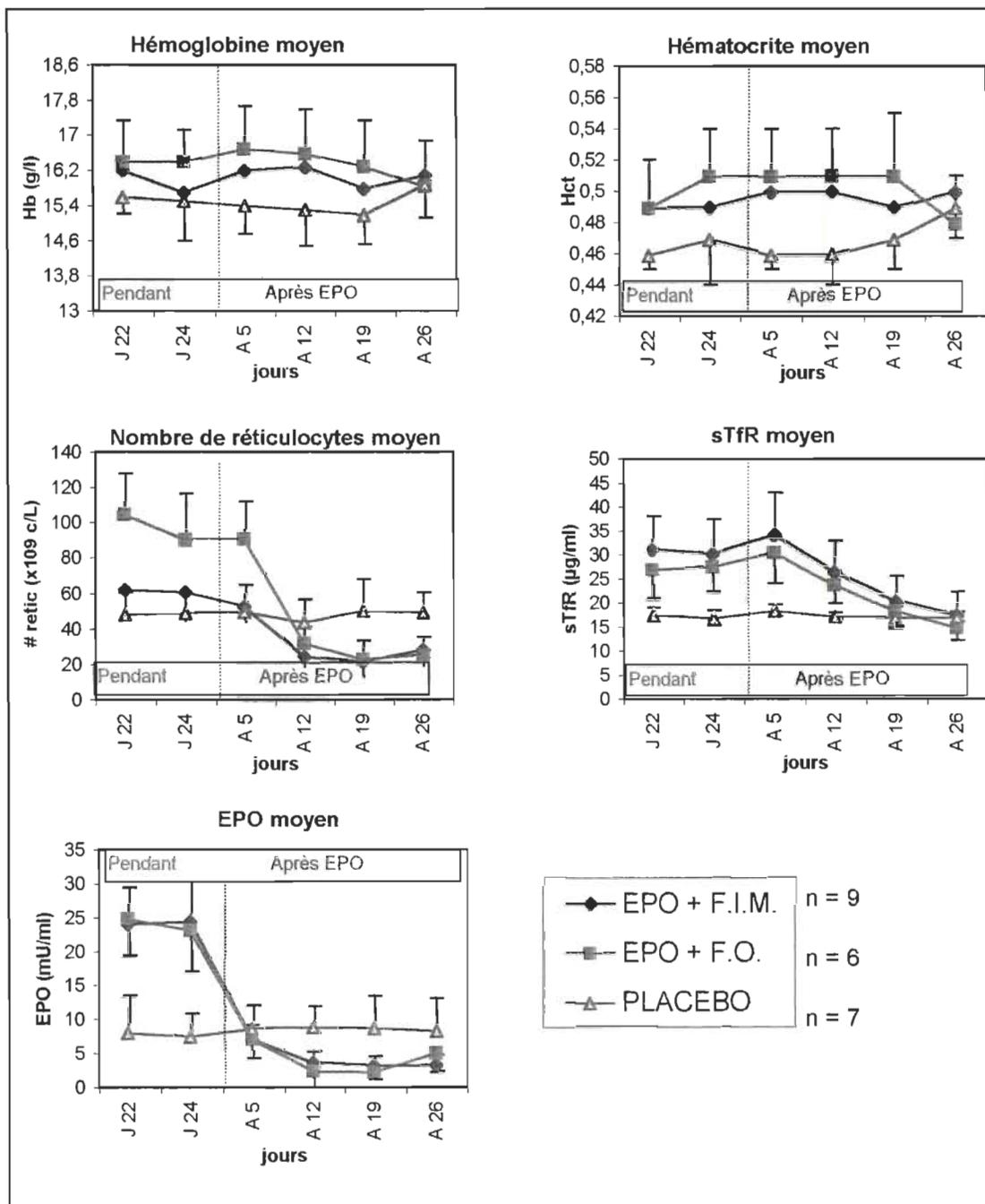


Figure 24 : Moyenne des paramètres sanguins en fonction des jours, Australie 1999

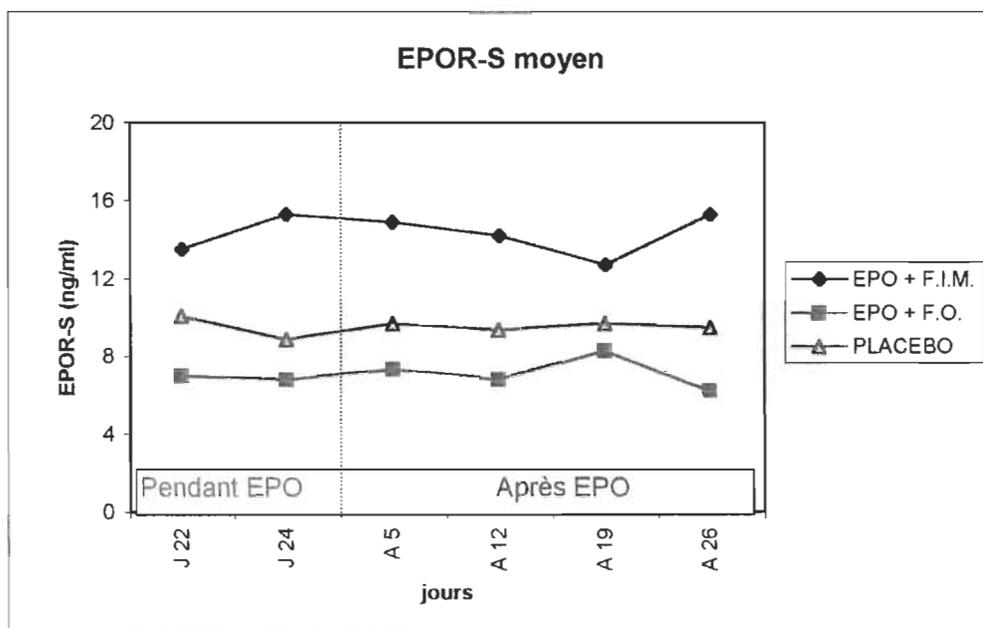


Figure 25 : Quantité moyenne d'EPOR-S en fonction des jours, Australie 1999

initial. Malheureusement, les premiers échantillons disponibles pour le dosage ELISA se situaient au 22^e jour de traitement, il ne serait pas opportun d'utiliser cette valeur comme étant le niveau basal. Il est évident qu'après trois semaines de traitement, une variation de ce niveau devrait survenir, soit à la hausse ou à la baisse. Nous voulions donc obtenir des résultats plus consistants en utilisant le dernier protocole d'administration, le protocole Australie 2000.

Résultats protocole Australie 2000

Tout comme les deux protocoles précédents, les résultats individuels de la quantité d'EPOR-S dosée en ELISA sont représentés à la figure 26. La moitié des sujets ont obtenu des valeurs d'EPOR-S situées entre 0 et 10 ng/ml. Notons l'absence des athlètes 11 et 12, en raison de la faible quantité d'EPOR-S obtenu pour l'un et une trop grande quantité pour l'autre. Ici aussi, il est difficile de faire ressortir une tendance identique pour tous les athlètes. Environ la moitié des sujets ne présentent pas de variations importantes d'EPOR-S lors du traitement à l'EPO.

En ce qui concerne les autres paramètres sanguins obtenus, une compilation est retrouvée au niveau du tableau 8. Les résultats concernant le sTfR, le nombre de réticulocytes, l'hématocrite, l'hémoglobine et la concentration en EPO vont dans le même sens que les résultats obtenus pour les protocoles France 1997 et Australie 1999. Une hausse significative de tous ces paramètres sanguins est notable suivie toujours d'une baisse, plus ou moins rapide, après l'arrêt des injections d'EPO (Figure 27).

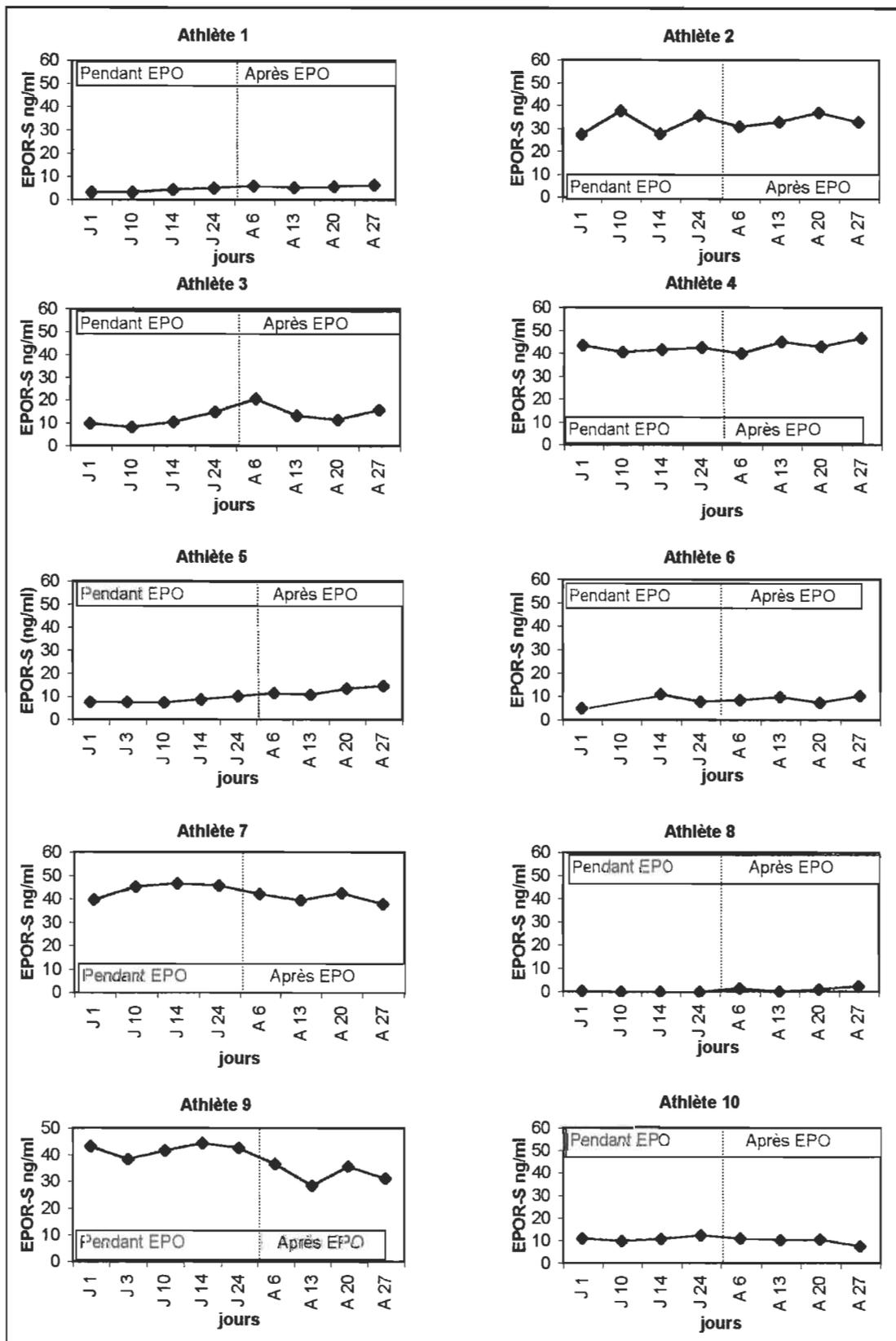


Figure 26 : Résultats individuels de la quantité d'EPOR-S, Australie 2000

Paramètres	JOURS									
	J 1	J 3	J 10	J 14	J 24	A 6	A 13	A 20	A 27	
Hb (g/l)										
moyenne	15,1	15,4	15,9	16,8	17,2	17,6	17,1	17,3	16,8	
écart-type	1,4	1,1	1,4	1,2	1,2	1,4	1,4	9,5	9,2	
% CV	9,3	7,1	8,8	7,1	7,0	8,0	8,2	54,9	54,8	
Hct										
moyenne	0,44	0,45	0,46	0,49	0,51	0,52	0,50	0,49	0,48	
écart-type	0,04	0,03	0,04	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,02	
% CV	8,2	7,1	8,0	6,5	6,7	7,9	7,6	5,5	4,8	
# retic										
moyenne	69,3	90,1	151,8	166,3	157,2	108,8	39,1	28,7	38,6	
écart-type	20,0	18,9	39,0	34,7	31,0	28,5	14,5	12,0	12,6	
% CV	28,9	21,0	25,7	20,9	19,7	26,2	37,1	41,8	32,6	
sTfR (µg/ml)										
moyenne	3,52	4,05	4,46	5,63	5,80	5,99	4,63	3,70	3,17	
écart-type	0,89	1,30	0,36	0,72	0,67	0,91	0,80	0,77	0,64	
% CV	25,3	32,1	8,1	12,8	11,6	15,2	17,3	20,8	20,2	
EPO (mUI/ml)										
moyenne	10,7	39,1	32,8	29,4	31,4	8,0	5,6	5,7	7,2	
écart-type	4,9	12,7	7,6	7,4	12,7	3,1	1,5	2,0	2,8	
% CV	45,8	32,5	23,2	25,2	40,4	38,8	26,8	35,1	38,9	
EPOR-S (ng/ml)										
moyenne	20,6	15,4	19,5	21,8	19,8	22,1	17,9	19,9	22,2	
écart-type	20,0	20,4	19,3	20,1	18,2	18,3	15,9	16,1	18,0	
% CV	97,0	132,1	99,0	92,2	91,9	82,9	88,8	80,9	81,1	

Tableau 8 : Compilation des paramètres sanguins obtenus,
Australie 2000

Vert : pendant EPO

Rouge : après EPO

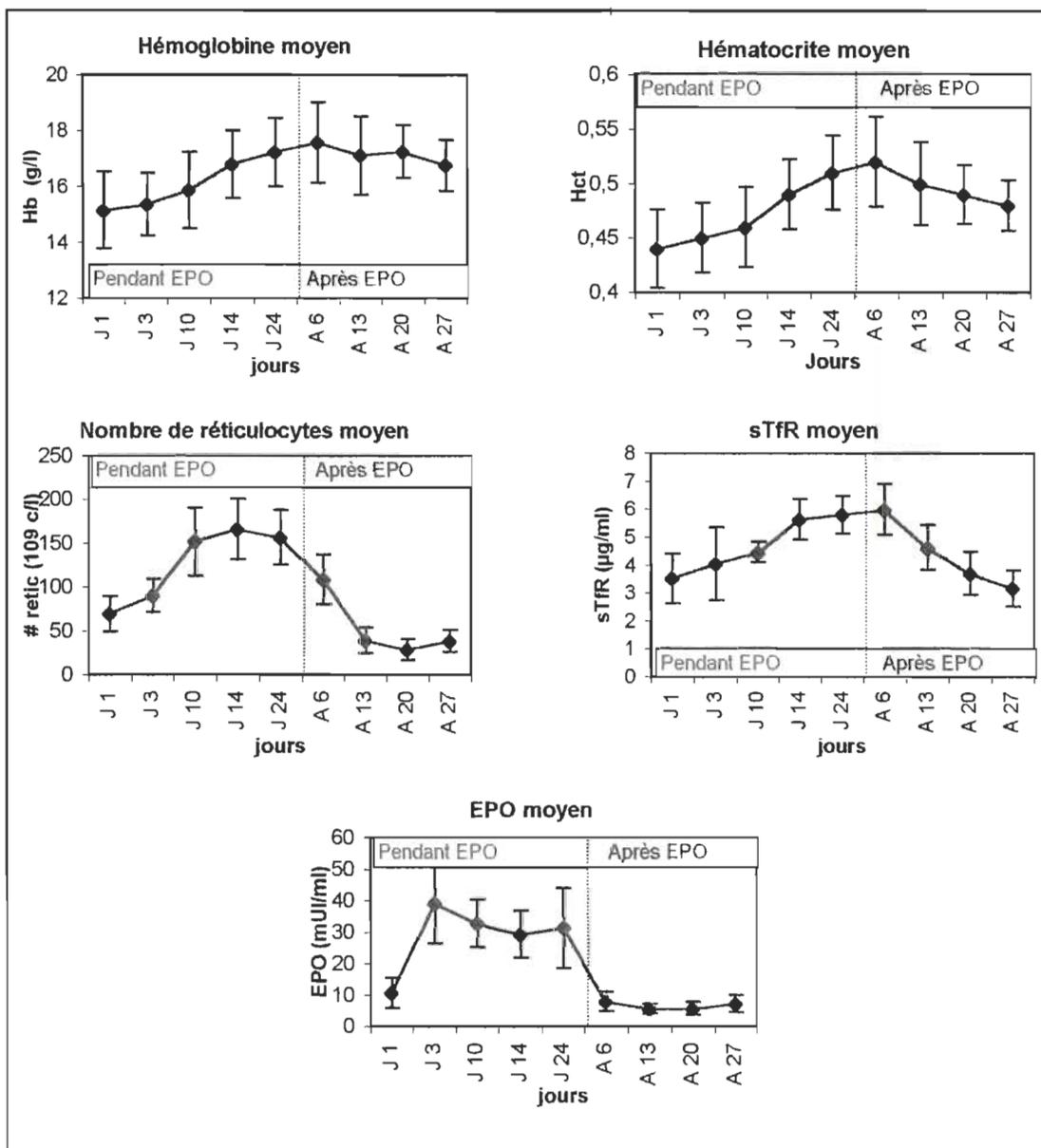


Figure 27 : Moyenne des paramètres sanguins en fonction des jours
Australie 2000

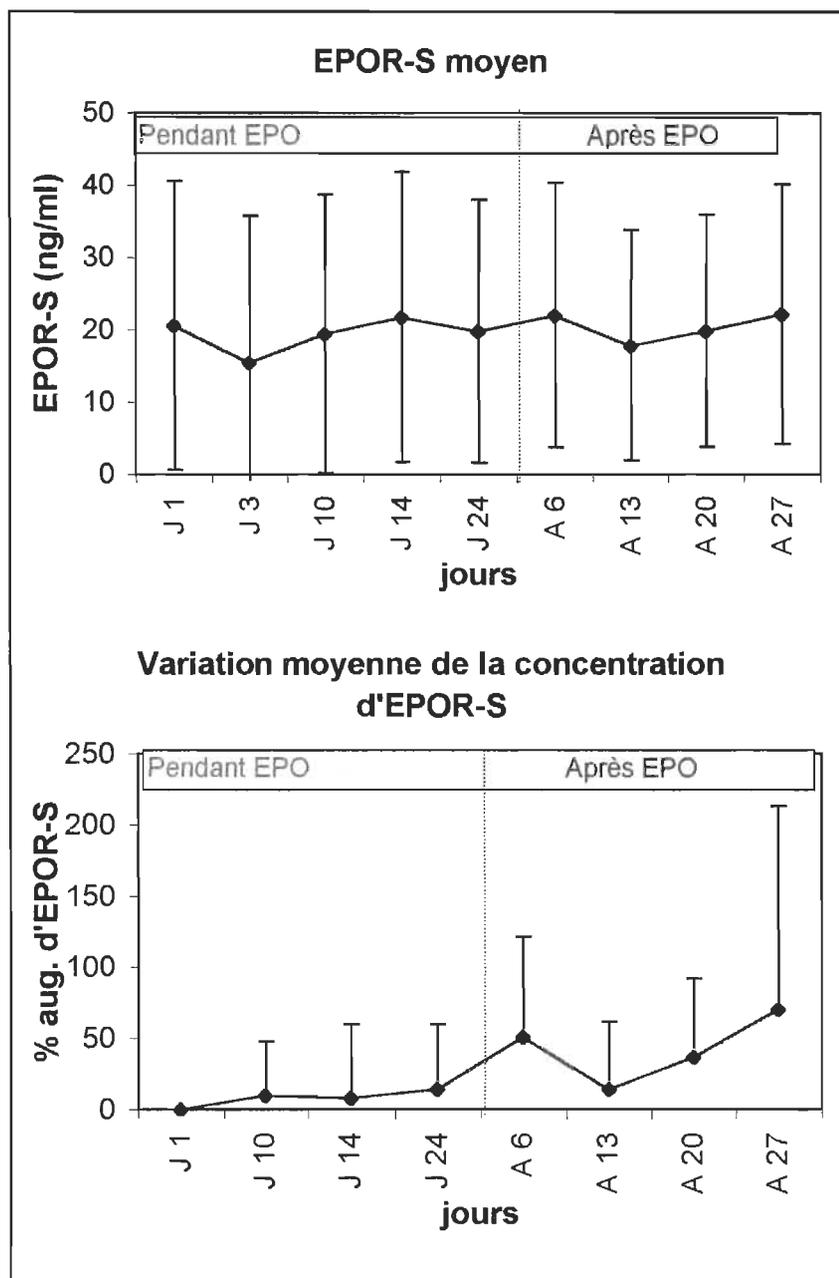


Figure 28 : Quantité d'EPOR-S moyen et variation moyenne de la concentration d'EPOR-S
Australie 2000

La concentration moyenne en EPOR-S (Figure 28) se situe autour des 20 ng/ml pour la durée de ce protocole. La forte étendue des écarts-types nous incitent à vérifier la variation moyenne de la concentration d'EPOR-S (Figure 28) par rapport au jour initial (J1). Ce jour de prélèvement est celui qui se rapproche le plus du niveau basal qu'on aurait retrouvé au jour 0. Les analyses montrent ainsi que la quantité d'EPOR-S augmente tout au long du protocole pour atteindre des valeurs autour de 10 % pendant la période d'injection d'EPO et pouvant atteindre 50 % d'augmentation après l'arrêt des injections. Les coefficients de variation (% CV) qui sont exprimés dans le tableau 8 nous confirment encore ici la grande variabilité d'EPOR-S d'un athlète à l'autre.

Différentes analyses de corrélation ont été effectuées, pour les trois protocoles, dans le but d'identifier une relation possible entre le taux d'EPOR-S et un autre paramètre sanguin. Tous les essais de corrélation effectués, ont démontré qu'aucune corrélation n'était possible entre tous les paramètres sanguins évalués. De même, nous avons voulu vérifier si le taux d'EPOR-S pouvait être affecté par un constituant plasmatique. Pour ce faire, la concentration en EPOR-S obtenus, pour chacun des jours, a été corrigée par chacun de ces paramètres (Hct, Hb, sTfR...) et aucune tendance vers une hausse d'EPOR-S a été remarquée, malgré les nombreuses tentatives.

En bref, les résultats du protocole France 1997 nous montrent une hausse non-significative d'EPOR-S, uniquement après l'arrêt des injections d'EPO. En ce qui concerne le protocole Australie 1999, très peu de variation dans le taux d'EPOR-S est observée pour les trois groupes d'athlètes, contrairement à nos attentes préliminaires. Finalement, les résultats du protocole Australie 2000 ont démontré une hausse

d'EPOR-S non-significative après l'arrêt des injections d'EPO. En effet, toutes les valeurs calculées de p étaient supérieures à 0,3 et pouvait même atteindre 0,9 pour certains jours d'administration.

Résultats visualisation d'EPOR-S par immunobuvardage de type Western et par les Dynabeads

Pour éclaircir l'ambiguïté existante dans la littérature [42, 43] concernant le poids moléculaire d'EPOR-S, nous avons voulu déterminer EPOR-S par immunobuvardage de type Western, en utilisant les mêmes anticorps qu'en ELISA. De nombreux essais ont été effectués pour mettre en évidence l'EPOR-S par la technique d'immunobuvardage de type Western. Étant donné la multitude de protéines présentes dans le plasma, il est impossible de déposer plus de 2 ou 3 μ l de plasma dans un puit d'électrophorèse. De plus, la concentration en EPOR-S est toujours dans l'ordre du ng/ml, ce qui implique qu'un athlète ayant un taux de 50 ng/ml au dosage ELISA, ne verra que 0,15 ng déposé dans un puit. Malheureusement, les rares anticorps anti-EPOR-S disponibles pour la détection de l'immunobuvardage de type Western ont une limite de détection de 5 ng par dépôt. Par conséquent, un défi de taille nous attendait.

Nous avons donc tenté de purifier EPOR-S à partir de billes magnétiques Dynabeads. Pour ce faire, différents protocoles ont été essayés pour l'incubation des billes avec le plasma ainsi que dans la façon de visualiser l'EPOR-S, selon les méthodes décrites dans le chapitre 2. Nous avons utilisé la cytométrie de flux pour d'abord s'assurer que les anticorps étaient bien fixés sur les billes magnétiques. Après avoir fixé

les anticorps anti-EPOR-S un échantillon de ces billes a été analysé par cytométrie de flux (Figure 29). On remarque dans le premier diagramme, la population cible de bille dans l'encadré A. L'intensité de fluorescence de cette population est retrouvée au niveau du pic B du deuxième diagramme. Mentionnons que l'encadré F du premier diagramme représente des doublets de billes et le pic J correspondant indique bien le double d'intensité de fluorescence. L'intensité observée a permis l'obtention de mesure de MESF, à partir du rapport de calibration de la figure 30. L'intensité de 251,4 obtenue pour le test de la présence d'anticorps sur les billes correspond à 777 052 MESF, c'est-à-dire au nombre de molécule d'anticorps retrouvés sur une bille.

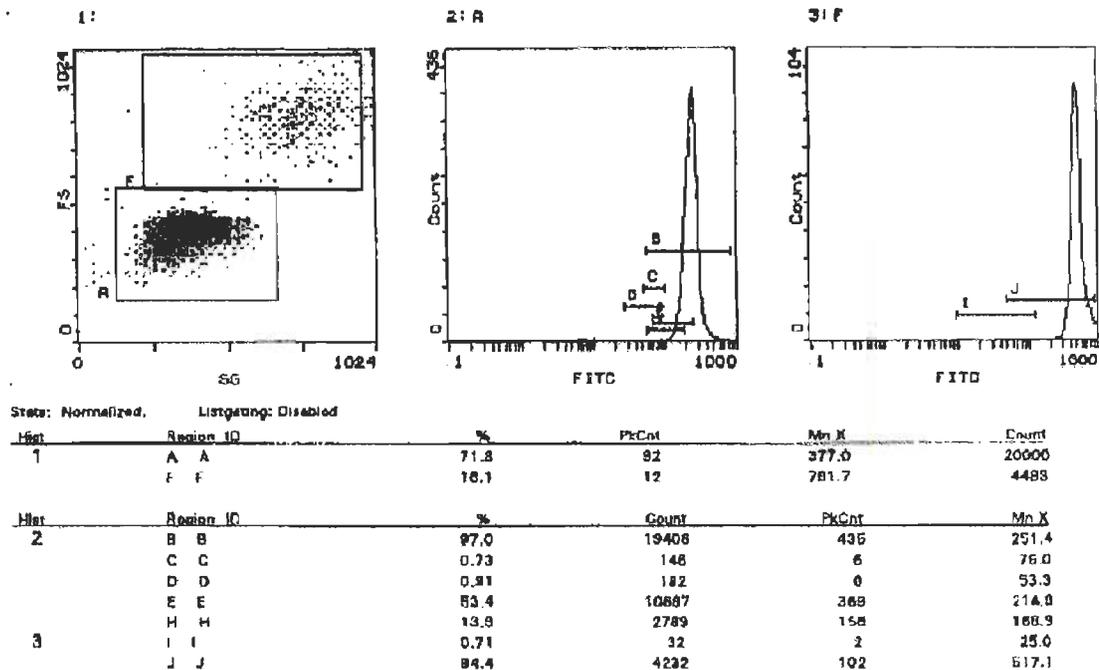


Figure 29 : Résultats de la présence des anticorps sur les billes magnétiques

QuickCal® Calibration Report

Calibration Kit Information

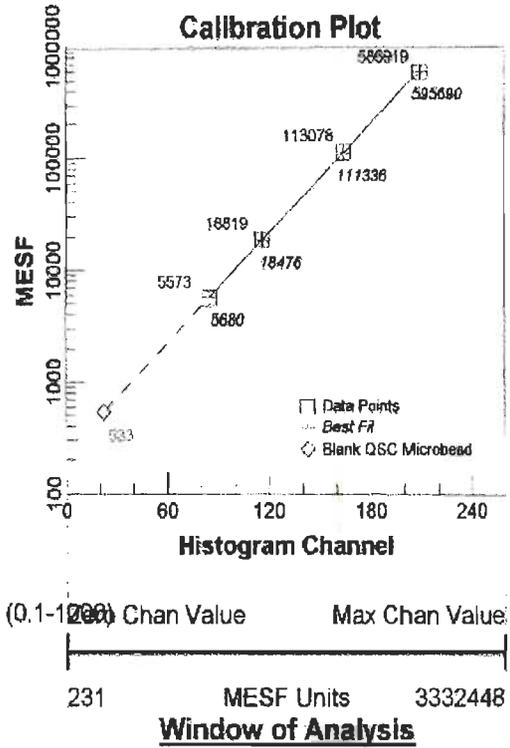
Kit: Quantum 26 FITC
 Control No.: 06/15/99
 Lot No.: A-111698
 Serial No.: N00971
 Expiration Date: 6/9/2000

Data Information

Run No.: 5
 Acquisition Date: 04/05/2000
 Entry Date: 5/3/2000

Instrument Information

Make/Model: EPICS XL
 PMT Settings: 875
 Histogram Scale: Coulter Rel. Lin. Chan. (0.1-1000) Chan Value
 Info:



	<u>Performance Parameters</u>	<u>Acceptable Range</u>		<u>Channels:</u>	
		MIN	MAX		
R-Sqr:	0.9999	0.995	1.000	Blank	0.22
Av Res %:	1.69	0.0	5.0	Bead 1	2.17
Detection Threshold:	533	0	1000	Bead 2	6.75
Coef of Response:	61.33	59.0	69.0	Bead 3	38.00
Log Amp Decades:	4.17	3.7	4.3	Bead 4	190.80
Modified:	No				
Comment:					

Figure 30 : Rapport de calibration pour déterminer le nombre de MESF

Malgré toutes les tentatives, il a été impossible de visualiser EPOR-S bien que les Dynabeads représentaient un bon moyen d'y arriver. Il a été possible de mesurer l'EPOR-S purifié à différentes concentrations dans un tampon phosphate salin, mais dans le plasma aucun résultat concluant n'a été obtenu. Nous avons tout de même réussi à réduire la limite de détection du fabriquant d'anticorps, à 0,5 ng lorsque les meilleures conditions étaient réunies (Figure 31).

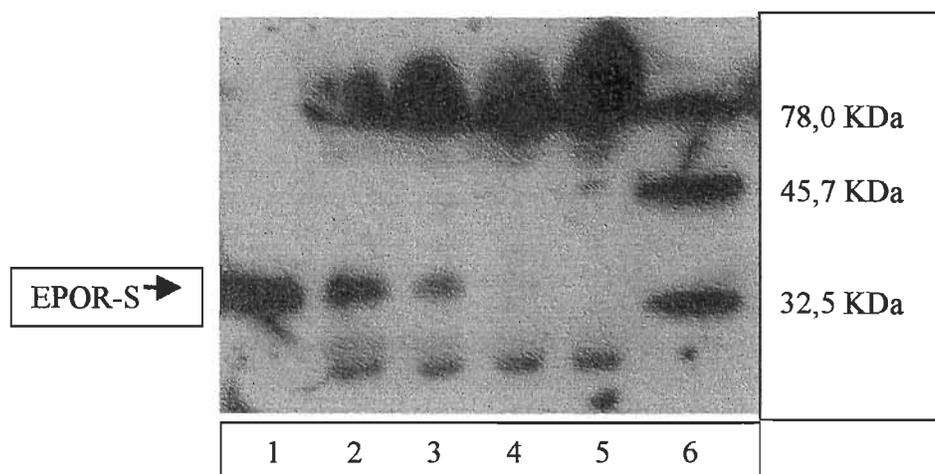


Figure 31 : Résultats d'immunobuvardage de type Western, détection limite d'EPOR-S.

Légende : Ligne 1 : contrôle positif 1 ng

Ligne 2 : plasma + 0,75 ng d' EPOR-S (ctrl +)

Ligne 3 : plasma + 0.5 ng d'EPOR-S (ctrl +)

Ligne 4 : plasma + 0,25 ng d'EPOR-S (ctrl +)

Ligne 5 : plasma + 0,10 ng d'EPOR-S (ctrl +)

Ligne 6 : marqueur de poids moléculaires marqués à la biotine

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Au cours du présent projet, notre intention était de vérifier si le récepteur soluble à l'EPO, l'EPOR-S était un indicateur de l'accélération induite de l'érythropoïèse. Pour ce faire, un dosage ELISA a été mis au point, permettant de suivre le taux d'EPOR-S selon les jours d'administration d'EPO. Suite à de nombreuses expérimentations, nous en sommes arrivés à la conclusion suivante : l'EPOR-S ne pourrait pas être utilisé comme un marqueur de dopage. Dans le présent chapitre, il sera question des différents facteurs qui ont conduit à l'élimination du marqueur EPOR-S dans les tests de dépistage de l'utilisation illicite d'EPO. Pour finaliser ce projet, nous discuterons de la poursuite des travaux, qui permettrait d'en savoir un peu plus au sujet de la forme soluble du récepteur à l'EPO.

D'abord, lors des dosages ELISA, il a été impossible de déduire une tendance observable chez la majorité des athlètes. Chez certains, le taux d'EPOR-S est demeuré stable tandis que d'autres ont vu une forte hausse ou une forte baisse survenir lors de la durée de l'étude. De nombreuses analyses de corrélation ont

aussi été effectués avec comme résultat l'absence d'un modèle régulier chez tous les athlètes. En effet, tous les coefficients de corrélation (R^2) obtenus se situaient sous 0,2 ce qui indique qu'il n'y avait pas de corrélation avec les différents marqueurs sanguins analysés. Considérant les résultats préalables obtenus par l'équipe de Baynes, nous serions attendus à une hausse d'EPOR-S suivant l'injection d'EPO [42]. Le seul de nos protocoles appuyant ces résultats est le protocole France 1997. En effet, chez ce groupe d'athlètes, une hausse significative d'EPOR-S (+20 %) a été observée après l'arrêt des injections d'EPO. Notons que cette hausse ne survient pas au début du traitement à l'EPO mais bien après l'arrêt des injections de celle-ci. Cette hausse d'EPOR-S pourrait être attribuable à la discipline et au niveau d'entraînement effectué par ces athlètes, qui aurait pour effet d'affecter la sensibilité à l'EPO. D'autre part, cette forte hausse d'EPOR-S, à ce moment précis, suggère fortement la liaison possible entre l'EPOR-S et une autre protéine du plasma. Comme il a d'ailleurs été démontré par certaines équipes de chercheurs, il semblerait que cette protéine plasmatique se liant avec EPOR-S soit l'EPO [23, 45, 46, 47, 48]. Il est logique de croire que l'EPOR-S, qui est identique au domaine extracellulaire du récepteur complet EPOR, puisse lier son ligand naturel lorsqu'il est retrouvé en circulation, sous sa forme soluble EPOR-S. L'hormone a d'ailleurs démontré son pouvoir de liaison à l'EPOR-S lors d'essais effectués *in-vitro* [64, 65]. Comme semble le montrer les résultats obtenus, l'EPO injectée se combinerait à l'EPOR-S retrouvée dans la circulation sanguine. Par conséquent, à l'arrêt des injections d'EPO, l'EPOR-S serait retrouvée en plus grande quantité, ayant perdu la possibilité de se lier à l'EPO injectée.

Cette hausse significative du taux d'EPOR-S après injections ne pourrait pas être attribuable uniquement à la cinétique du gène EPOR-S. On pourrait penser que cette augmentation d'EPOR-S arrive à ce moment précis, ce qui est possible mais peu probable. Si on analyse le mécanisme de formation de cette forme soluble, il s'agit clairement d'un épissage alternatif, mécanisme observable lors de la maturation cellulaire au niveau de la moelle osseuse. Ce mécanisme est totalement différent de la formation d'une autre forme soluble, le récepteur soluble de la transferrine, utilisé dans les tests de dépistage de dopage actuels. Les sTfR sont le résultat d'un clivage protéolytique post-maturation cellulaire, alors le sTfR devrait se retrouver dans la circulation sanguine beaucoup plus tardivement que l'EPOR-S [52, 53, 54]. Ainsi, comme EPOR-S est formé au début de la stimulation, lors de la transcription des gènes nécessaire à la maturation cellulaire, nous nous serions attendus à ce que l'EPOR-S apparaisse au tout début du cycle, du moins, avant la sortie du sTfR. C'est ce facteur primordial qui nous incite à penser que la hausse observée à l'arrêt des injections n'est pas une hausse naturelle ou primaire mais bien une hausse secondaire, c'est-à-dire survenant à l'arrêt de la disponibilité de l'EPO. Cette cinétique est perceptible uniquement lors du protocole France 1997 (Figure 19 et 20).

Pourquoi alors n'avons-nous pas observés les mêmes résultats pour les deux protocoles d'administration subséquents ? Lors du protocole Australie 1999, il est impossible d'avoir une idée du taux initial d'EPOR-S, étant donné le manque de disponibilité du matériel sanguin dans les premiers jours de traitement. Malgré tout, on se serait attendu à une hausse d'EPOR-S aux jours post-injections comparativement aux jours d'injections d'EPO. On aurait dû remarquer une différence notable entre les taux

d'EPOR-S avant et après injections et surtout entre les groupes expérimentaux. De même pour le dernier protocole, Australie 2000, qui n'a démontré aucune hausse significative.

La distinction majeure entre les deux protocoles d'administration d'Australie et celui de France 1997 est la fréquence des injections d'EPO. Rappelons que les athlètes ont reçu une injection par jour lors du protocole France 1997 comparativement à trois injections par semaine, soit un jour sur deux, pour Australie. Ainsi, l'EPO en plus grande quantité aura sûrement un effet plus important sur la production érythropoïétique, ce qui semble survenir lors du protocole France 1997. Dans un contexte où les athlètes utilisent de plus en plus de faible quantité d'EPO, ce test de dépistage ne pourrait pas être utilisé.

Si nous comparons les résultats obtenus avec ceux déjà publiés, certaines différences notables peuvent être dégagées mais aussi quelques fortes ressemblances y sont retrouvées. Rappelons les résultats obtenus par l'équipe de Baynes, où la protéine EPOR-S était rarement détectable dans le sérum d'une personne saine, c'est-à-dire ne souffrant d'aucune pathologie hématologique liée à une accélération de l'érythropoïèse [42]. Chez des patients atteints d'anémie par déficience en fer, d'anémie chronique par insuffisance rénale, aucune protéine EPOR-S était détectable. Mais lorsque ces patients recevaient un traitement à l'EPO, la protéine EPOR-S apparaissait sur un gel d'électrophorèse [42]. Cette même bande à l'électrophorèse devenait très proéminente chez des patients où l'activité érythropoïétique était augmentée, dans des cas d'anémie falciforme, de thalassémie majeure et d'anémie par déficience en vitamine B12 non-

traitée [42]. De même, lorsque la dite déficience était traitée, la concentration en EPOR-S diminuait à un tel point que la bande de 34 KDa disparaissait [42]. Chez des gens ayant subi une destruction de la moelle osseuse, la protéine était invisible jusqu'au moment de la prise de la greffe, quelques semaines suivant la transplantation, où EPOR-S redevenait visible lors d'une électrophorèse.

Comme nos athlètes étaient tous des gens sains, ne souffrant d'aucune pathologie hématologique, alors il est normal que leur taux d'EPOR-S soit difficilement détectable. Par contre, il aurait été logique de voir une hausse d'EPOR-S lors de l'administration d'EPO. Il faut noter que la quantité d'EPO administrée aux patients est une dose clinique, assez élevées, située entre 75 et 300 UI/Kg, à raison de trois injections par semaine [15]. Pour nos athlètes, les doses d'administration d'EPO étaient beaucoup plus faibles soit 50 UI/Kg, trois fois par semaine. Dans le protocole France 1997, la hausse d'EPOR-S est plus perceptible que dans les deux protocoles d'Australie, probablement du à la fréquence des injections d'EPO. Chez les Australiens, trois injections par semaine leur étaient administrées comparativement à une injection par jour chez les Français. Il est aussi logique de croire que l'action de l'EPO se fera sentir plus tardivement lors d'un supplément de fer oral, puisque le temps d'absorption est plus lent que par la voie intra-musculaire. Il faut aussi considérer que les athlètes de nos jours font de plus en plus usage de doses faibles pour deux raisons particulières, à savoir : pour éviter les risques de thromboses associés à l'utilisation d'EPO en trop forte dose et pour s'assurer de ne pas être testés positif lors des contrôles anti-dopages effectués par les fédérations sportives. Associés à de bons suppléments vitaminiques, les athlètes s'assurent d'avoir la meilleur efficacité possible provenant de

l'EPO tout en diminuant les risques pour la santé et les risques de se faire prendre au piège par les tests de dépistage.

En comparant les résultats de l'équipe d'Harris et de Yoshida, nous en avons conclu qu'il y avait de très forte ressemblance entre nos résultats et les leurs [43, 44]. En effet, Harris a noté une très forte variabilité dans le taux d'EPOR-S d'une personne à l'autre [43]. Lors de nos analyses, cette forte variabilité était présente, même certains athlètes avaient des taux d'EPOR-S sous la limite de détection de l'essai ELISA. Comme Yoshida, nous n'avons pas vu de corrélation entre les taux d'EPOR-S et certains paramètres incluant la quantité de réticulocytes, la concentration en hémoglobine et la concentration sérique en EPO [44]. À ce niveau, la forte variabilité d'EPOR-S entre nos athlètes empêcherait l'utilisation de ce paramètre sanguin (EPOR-S), car il serait impossible d'établir des normes utilisables pour un test de dépistage lors de compétitions sportives internationales. Cette forte variabilité pourrait avoir un lien avec le processus de coagulation. Il a été démontré que l'EPOR-S était coprécipité soit par une capture mécanique ou par un clivage protéolytique lors de la coagulation [68]. De plus, il semblerait qu'EPOR-S est exprimé dans toutes les lignées de cellules tumorales [68], ce qui pourrait être une cause possible de l'hypervariabilité observée.

Il semble normal que l'EPOR-S soit difficilement détectable considérant la quantité de récepteurs produits. En effet, on dénombre environ 1000 récepteurs de la forme complète à la surface cellulaire. Comme le taux de formation d'EPOR-S est de 20 % de tous les EPOR transcrit, il est facile de croire qu'il sera difficile de voir une variation d'EPOR-S dans le plasma. D'autre part, la quantité de récepteurs sTfR est à

peine perceptible et ce malgré un dénombrement de TfR, la forme complète, qui est autour de 100 000 récepteurs par cellule.

En ce qui concerne la visualisation d'EPOR-S, un défi de taille nous attendait pour la mise au point de l'essai d'immunobuvardage de type Western. D'abord, la grande quantité de protéines dans le plasma complique quelque peu l'essai en limitant la quantité de plasma à déposer dans les puits sans surcharger ceux-ci et rendre la migration électrophorétique inégale. La faible affinité ainsi que la rareté des anticorps disponibles ont contribué à compromettre la mise au point de ce genre d'essai. Il nous aurait fallu des patients avec de fortes quantités d'EPOR-S pour arriver à la visualiser cette protéine. Nous avons tout de même réussi à diminuer la limite de détection à 0,5 ng par puits de migration lorsque les meilleures conditions étaient réunies, contrairement à 5 ng par dépôt, qui était la limite de détection établit par le fournisseur. Ayant diminué le pouvoir de détection, il nous fallait donc déposer 5 μ l d'un plasma contenant au moins 100 ng/ml (ce qui est énorme pour un plasma) pour arriver à avoir 0,2 ng par puit, ce qui est encore sous la limite de détection améliorée.

Nous devons donc trouver un moyen pour concentrer EPOR-S et ce moyen fut l'utilisation des Dynabeads. Malgré les nombreux essais effectués, nous n'avons cependant pas réussi à visualiser l'EPOR-S dans le plasma. Plusieurs causes peuvent être dégagées conduisant à l'échec de cette technique. S'agit-il des méthodes utilisées pour faire décrocher l'EPOR-S des anticorps sur les billes ou dans le moyen pour visualiser qui a conduit à ces résultats ? Nous avons donc effectué un retour lors des manipulations pour s'assurer de la présence des anticorps anti-EPOR-S sur les billes.

Nous avons démontré, par cytométrie de flux, la présence de 777 052 molécules d'anticorps par billes.

Il y a aussi la possibilité qu'un phénomène physique rendent plus difficile de concentrer EPOR-S avec les billes magnétiques. Lors de l'essai ELISA, les anticorps sont fixés au fond d'un puits et le plasma y est déposé. Les protéines sont attirées vers le fond du puits, où les anticorps exposent leurs fragments FAB l'un à côté de l'autre. Tandis que pour les billes, on remarque une tendance à s'accoler au fond du tube, les unes contre les autres, il y a donc possibilité d'un manque d'accessibilité des anticorps pour l'EPOR-S. Malgré toutes les possibilités offertes pour augmenter l'efficacité des billes, dont certaines ont fait l'objet d'étude, il ne fallait pas oublier nos objectifs initiaux, c'est-à-dire une méthode de dépistage simple, rapide et efficace. Plus nous progressions dans les dédales analytiques, plus nous nous éloignons des ces critères tant recherchés. Il aurait été toutefois intéressant, dans cette étude fondamentale, d'arriver à purifier l'EPOR-S pour éliminer le doute existant concernant le poids moléculaire de la molécule.

Si nous poursuivons vers l'aspect fondamental de la recherche, il serait intéressant de préciser le rôle de la forme soluble du récepteur à l'EPO. Peu de travaux ont porté sur le rôle réel de l'EPOR-S. Agit-elle à titre de transporteur de l'EPO ou limite-t-elle l'accessibilité de l'hormone au récepteur à la surface des cellules ? Il serait éventuellement intéressant d'utiliser un nouveau modèle de culture cellulaire qui reproduit l'érythropoïèse au niveau moléculaire [66]. Ceci nous permettrait peut-être de voir la sortie d'EPOR-S lors de l'érythropoïèse, mais aussi d'explorer si le

mécanisme de formation de la forme soluble est bien un épissage alternatif. À partir d'un échantillon sanguin, l'équipe de Pope [66] a purifié le sang pour recueillir les cellules souches et par des méthodes de culture cellulaire, ils ont étudié l'expression de certains gènes. Malheureusement, l'EPOR-S ne faisait pas partie des gènes étudiés par cette équipe, quoique la forme complète d'EPOR fut analysée. Ils ont remarqué le maximum d'expression lors de la phase intermédiaire, entre 6 et 10 jours de culture, après l'ajout d'EPO dans le milieu de culture [66]. Les résultats obtenus montrent clairement la formation d'EPOR lors de ces jours de culture. Il aurait été intéressant d'étudier l'EPOR-S dans ce même contexte, dans le but d'appuyer les résultats de Nakamura, décrivant un taux de formation d'EPOR-S constant à 20 % pour tous les stades de maturation [35, 36, 37]. Il serait aussi possible de recueillir l'EPOR-S dans le milieu de culture pour ainsi déterminer le poids moléculaire réel de l'EPOR-S. Il serait aussi intéressant d'approfondir les causes de l'hypervariabilité d'EPOR-S observée dans différentes situations : sujets sains, athlètes, sujets souffrant de certaines pathologies de la coagulation, sujets atteints de cancer...

CHAPITRE 5

CONCLUSION

L'EPOR-S ne semble pas, selon notre étude, être un indicateur de l'accélération de l'érythropoïèse, lors d'injections d'EPO. Il ne pourrait pas être utilisé dans la lutte anti-dopage pour renforcer les modèles existants, car aucune hausse significative et cohérente d'EPOR-S n'a été observée pendant le traitement des athlètes à l'EPO et car il y a une trop grande variabilité d'EPOR-S observée entre les athlètes. Nous devons donc nous en remettre aux tests de dépistages déjà existants, qui sont relativement précis et acceptés par le CIO [67]. Il ne faut pas nier les limites de ces tests, mais les démarches se poursuivent pour identifier des marqueurs de dopage, il sera possible d'augmenter la capacité de dépistage de ces tests. Malheureusement, les expérimentations effectuées sur la sonde EPOR-S nous ont amenés à conclure qu'elle ne pourrait pas augmenter la force des dépistages actuels. Demeurons alertes aux nouvelles substances faisant leur apparition sur le marché, qui miment l'effet de l'EPO. Les peptides mimétiques et non-mimétiques en sont des exemples, relativement connus depuis quelques années. Il ne faudrait pas négliger un nouveau produit : la darbépoïétine, qui a des propriétés plus fortes que l'EPO, et retrouvée sur le marché européen et américain depuis 2001. Il faut donc poursuivre la recherche pour contrer l'arrivée de nouveaux produits ayant la propriété ultime l'amélioration des performances [69].

CHAPITRE 6

RÉFÉRENCES

- [1] Le dopage. Science et Vie Édition Spéciale, Le dossier du dopage, 1999, 206, 1-160.
- [2] Mottram D.R. Banned drugs in sport. Sports Medecine, 1999, 27, 1-10.
- [3] Adamson J.W. Recombinant erythropoietin to improve athletic performance. The New England Journal of Medecine, 1991, 324, 698.
- [4] Jelkmann W. Erythropoietin : structure, control of production and function. Physiological reviews, 1992, 62, 449–489.

- [5] Fisher J.W. Minireview Erythropoietin: Physiologic and Pharmacologic Aspects. Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1997, 216, 358-369.
- [6] Moritz K.M., Lim G.B. and Wintour E.M. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis, invited review. American Journal of Physiology, 1997, 273, R1829-1844.
- [7] Lacombe C. and Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. Nephrol. Dial. Transplant, 1999, 14, 22-28.
- [8] Ebert B.L. and Bunn H.F. Regulation of the erythropoietin gene. Blood, 1999, 94, 1864-1877.
- [9] Adamson J.W. Erythropoietin, iron metabolism and red blood cell production. Seminars in Hematology, 1996, 33, 5-9.

[10] Spivak, J.L. The biology and clinical applications of recombinant erythropoietin. Seminars in oncology, 1998, 25, 7-11.

[11] Stopka T, Zivny J.H., Stopkova P., Prchal J.F. and Prchal J.T. Human hematopoietic progenitor express erythropoietin. Blood, 1998, 91, 3766-3772.

[12] Lahiri S. Historical perspectives of cellular oxygen sensing and responses to hypoxia. Journal of Applied Physiology, 2000, 88, 1467-1473.

[13] Krantz S.B. Erythropoietine. Blood, 1991, 77, 419-434.

[14] Wide L. and Bengtsson C. Molecular charge heterogeneity of human serum erythropoietin. British Journal of Haematology, 1990, 76, 121-127.

- [15] Nathan D.G. Introduction à la pathologie hématologique, CECIL-Traité de médecine interne, Médecine-Sciences, Flammarion, Paris, 1997.
- [16] Sawada K., Krantz S.B., Dai C-H., Koury S.T., Horn S.T., Glick A.D. and Civin C.I. Purification of human blood burst-forming-units erythroid and demonstration of evolution of erythropoietin receptors. Journal of Cellular Physiology, 1990, 142, 219-230.
- [17] Youssoufian H., Longmore G., Neumann D., Yoshimura A. and Lodish H.F. Structure, function and activation of the erythropoietin receptor. Blood, 1993, 81, 2223-2236.
- [18] Sawyer S.T. and Hankins W.D. The functional form of the erythropoietin receptor is a 78-kDa protein : Correlation with cell surface expression, endocytosis, and phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 6849-6853.
- [19] Yoshimura A. and Misawa H. Physiology and function of the erythropoietin receptor. Current Opinion in Hematology, 1998, 5, 171-176.

- [20] Yoshimura A. Second subunit of Epo receptor ? Nature, 1994, 372, 137-138.
- [21] Constantinescu S.N., Ghaffari S. and Lodish H.F. The erythropoietin receptor : structure, activation and intracellular signal transduction. TEM, 1999, 10, 18-23.
- [22] Qiu H., Belanger A., Yoon H.-W. P. and Bunn H.F. Homodimerization restores biological activity to an inactive erythropoietin mutant. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 273, 11173-11176.
- [23] Mattews D.J., Topping R.S., Cass R.T. and Giebel L.B. A sequential dimerization mechanism for erythropoietin receptor activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 9471-9476.
- [24] Sikorski R. and Peters R. A cell growth switch, Science, 1997, 276, 1891.
- [25] Blau C.A., Kenneth R.P., Drachman J.G. and Spencer D.M. A proliferation switch for genetically modified cell. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 1997, 94, 3076-3081.

[26] Middleton S.A., Johnson D.L., Jin R., McMahon F.J., Collins A., Tullai J., Gruninger R.H., Jolliffe L.K. and Mulcahy L.S. Identification of a critical ligand binding determinant of the human erythropoietin receptor. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271, 14045-14054.

[27] Wrighton N.C., Farrel F.X., Chang R., Kashyap A.K., Barbone F.P., Mulcahy L.S., Johnson D.L., Barret R.W., Jolliffe L.S. and Dower W.J. Small peptides as potent mimetics of the proteine hormone erythropoietin. Science, 1996, 273, 458-463.

[28] Yoshimura A., D'Andrea A.D. and Lodish H.F. Friend spleen focus-forming virus glycoprotein gp55 interacts with the erythropoietin receptor in the endoplasmic reticulum and affects receptor metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 4139-4143.

[29] Elliott S., Lorenzini T., Yanagihara D., Chang D. and Elliot G. Activation of the erythropoietin (EPO) receptor by bivalent anti-EPO receptor antibodies. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271, 24691-24697.

[30] Elliot S., Chang D., Delorme E., Dunn C., Egrie J., Giffin J., Lorenzini T., Talbot C. and Hesterberg L. Isolation and characterization of conformation sensitive antierythropoietin monoclonal antibodies : Effect of disulfide bonds and carbohydrate on recombinant human erythropoietin structure. Blood, 1996, 87, 2714-2722.

[31] Schneider H., Chaovapong W., Matthews D.J., Karkaria C., Cass R.T., Zhan H., Boyle M., Lorenzini T., Elliot S.G. and Giebel L.B. Homodimerization of the erythropoietin receptor by a bivalent monoclonal antibody triggers cell proliferation and differentiation of erythroid precursors. Blood, 1997, 89, 473-482.

[32] Damen J.E. and Krystal G. Early events in erythropoietin-induced signaling. Experimental Hematology, 1996, 24, 1455-1459.

[33] Smithgall T.E. Signal transduction pathways regulating hematopoietic differentiation. Pharmacological reviews, 1998, 50, 1-19.

[34] McMullin M.F. and Percy M.J. Erythropoietin receptor and hematological disease. American Journal of Hematology, 1999, 60, 55-60.

[35] Nakamura Y, Komatsu N. and Nakauchi H. A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells. Science, 1992, 257, 1138-1140.

[36] Nakamura Y., Tokumoto Y. and Nakauchi H. Role of a truncated erythropoietin receptor for erythroid differentiation. Biochemical and Biophysical research communications, 1996, 218, 205-209.

[37] Nakamura Y. A truncated erythropoietin receptor and cell death : A reanalysis. Science, 1994, 264, 588-589.

[38] Shimizu R., Komatsu N. and Miura Y. Dominant negative effect of a truncated erythropoietin receptor (EPOR-T) on erythropoietin-induced erythroid differentiation : Possible involvement of EPOR-T in ineffective erythropoiesis of myelodysplastic syndrom. Experimental Hematology, 1999, 27, 229-233.

[39] Chiba S., Takahashi T., Takeshita K., Minowada J., Yazaki Y., Ruddle F.H. and Hirai H. Selective expression of mRNA coding for the truncated form of the

erythropoietin receptor in hematopoietic cells and its decrease in patients with polycythemia vera. Blood, 1997, 90, 97-104.

[40] Heaney M.L. and Golde D.W. Soluble hormone receptors. Blood, 1993, 82, 1945-1948.

[41] Barron C., Migliaccio A.R., Migliaccio G., Jiang Y., Adamson J.W. and Ottolenghi S. Alternatively spliced mRNAs encoding soluble isoforms of the erythropoietin receptor in murine cell lines and bone marrow. Gene, 1994, 147, 263-268.

[42] Baynes R. D., Reddy G.K., Shih Y.J., Skikne B.S. and Cook J.D. Serum form of the erythropoietin receptor identified by a sequence-specific peptide antibody. Blood, 1993, 82, 2088-2095.

[43] Harris K.W. and Winkelmann J.C. Enzyme-linked immunosorbent assay detects a potential soluble form of the erythropoietin receptor in human plasma. American Journal of hematology, 1996, 52, 8-13.

[44] Yoshida S., Bessho M., Sakate K., Hirasawa I., Murayoshi M. and Hirashima K. Lack of relationship between soluble erythropoietin receptor levels and erythroid parameters in anemic patients. Blood, 1996, 88, 3246-3247.

[45] Morishita E., Narita H., Nishida M., Kawashima N., Yamagishi K., Masuda S., Nagao M., Hatta H. and Sasaki R. Anti-Epor monoclonal antibody : Epitope mapping, quantification of the soluble receptor, and detection of the solubilized transmembrane receptor and the receptor-expressing cell. Blood, 1996, 88, 465-471.

[46] Narhi L.O., Aoki K.H., Philo J.S. and Arakawa T. Changes in conformation and stability upon formation of complexes of the erythropoietin and soluble epo receptor. Journal of Protein Chemistry, 1997, 16, 231-225.

[47] Ahaded A., Winchenne J.P., Cartron J.P., Lambin P. and Lopez C. The extracellular domain of the human erythropoietin receptor : expression as a fusion protein in *Escherichia coli*, purification, and biological properties. Prep. Biochem. & Biotechnol., 1999, 29, 163-176.

[48] Philo J.S., Aoki K.H., Arakawa T., Narhi L.O. and Wen J. Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin receptor by epo : One high affinity and one low-affinity interaction. Biochemistry, 1996, 35, 1681-1691.

[49] Major A., Bauer C., Breymann C., Huch A. and Huch R. Rh-erythropoietin stimulates immature reticulocyte release in man. British Journal of Haematology, 1994, 87, 605-608.

[50] Major A., Mathez-Lois F., Rohling R., Gantschi K. and Brugnara C. The effect of intravenous iron on the reticulocyte response to recombinant human erythropoietin. British Journal of Haematology, 1997, 98, 292-294.

[51] Parisotto R., Gore C.J., Hahn A.G., Ashenden M.J., Olds T.S., Martin D.T., Pyne D.B., Gawthorn K. and Brugnara C. Reticulocyte parameters as potential discriminators of recombinant human erythropoietin abuse in elite athletes. International Journal of Sports Medicine, 2000, 21, 471-479.

[52] Gareau R., Gagnon M.G., Thellend C., Chénard C., Audran M., Chanal J.-L., Ayotte C. and Brisson G.R. Transferrin soluble receptor : A possible probe for

detection of the erythropoietin abuse by athletes. Horm. Metab. Res., 1994, 26, 311-312.

[53] Gareau R., Audran M., Baynes R.D., Flowers C.H., Duvallet A., Senecal L. and Brisson G.R. Epo abuse in athletes. Nature, 1996, 380, 113.

[54] Audran M., Gareau R., Matecki S., Durand F., Chenard C., Sicart M.T., Marion B. and Bressolle F. Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control. Medecine and Science in Sports and Exercise, 1999, 31, 639-645.

[55] Shih Y.J., Baynes R.D., Hudson B.G., Flowers C.H., Skikne B.S. and Cook J.D. Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265, 19077-19081.

[56] Shih Y.J., Baynes R.D., Hudson B.G. and Cook J.D. Characterization and quantitation of the circulating forms of serum transferrin receptor using domain-specific antibodies. Blood, 1993, 81, 234-238.

[57] Parisotto R., Gore C.J., Emslie K.R., Ashenden M.J., Brugnara C., Howe C., Martin D.T., Trout G.J. and Hahn A.G. A novel method for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes using markers of altered erythropoiesis. Haematologica, 2000, 85, 564-572.

[58] Wide L., Bengtsson C., Berglund B. and Ekblom B. Detection in blood and urine of recombinant erythropoietin administered to healthy men. Medecine and Science in Sports and Exercise, 1995, 27, 1569-1576.

[59] Lasne F. and De Ceauvriez J. Recombinant erythropoietin in urine. Nature, 2000, 405, 635.

[60] Lameli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227, 680-684.

[61] Dynal. Cell Separation and Protein Purification. Technical Handbook, Second Edition, 1996, Oslo, Norway, 165 pages.

[62] Patel D. and Rickwood D. Optimization of conditions for specific binding of antibody-coated beads to cells. Journal of Immunological Methods, 1995, 184, 71-80.

[63] Wognum A.W., Lam V., Goudsmit R. and Krystal G. A specific in vitro bioassay for measuring erythropoietin levels in human serum and plasma. Blood, 1990, 76, 1323-1329.

[64] Zhan H., Liu B., Reid S.W., Aoki K.H., Li C., Syed R.S., Karkaria C., Koe G., Sitney K., Hayenga K., Mistry F., Savel L., Dreyer M., Katz B.A., Schreurs J., Matthews D.J., Cheetham J.C., Egrie J., Giebel L.B. and Stroud R.M. Engineering a soluble extracellular erythropoietin receptor (EPObp) in *Pichia pastoris* to eliminate microheterogeneity, and its complex with erythropoietin. Protein Engineering, 1999, vol. 12, 505-513.

[65] Binnie C., Jenish D., Cossar D., Szabo A., Trudeau D., Krygsman P., Malek L.T. and Stewart D.I.H. Expression and characterization of soluble human erythropoietin receptor made in *Streptomyces lividans* 66. Protein Expression and Purification, 1997, 11, 271-278.

[66] Pope S. H., Fibach E., Sun J., Chin K. and Rodgers G.P. Two-phase liquid culture system models normal human adult erythropoiesis at molecular level. Eur. Journal of Haematology, 2000, 64, 292-303.

[67] Abbott A. What price to Olympian ideal ? Nature, 2000, 407, 124-127.

[68] Westphal G., Braun K., Debus J. Detection and quantification of the soluble form of the human erythropoietin receptor (sEPOR) in the growth medium of tumor cell lines and in the plasma of blood samples. Clinical Experimental Medecine, 2002, 2, 45-52.

[69] Petibois C., Deleris G. and Carzola G. Perspectives in the utilisation of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy of serum in Sports Medecine. Sports Medecine, 2000, 29, 387-396.