

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

INRS-SANTÉ

EXPLORATION DES MÉCANISMES FIBRINOLYTIQUES LORS
D'UTILISATIONS ILLICITES D'ÉRYTHROPOÏÉTINE

PAR

MARIE-GUYLAINE GAGNON

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

POUR L'OBTENTION

DU GRADE DE MAÎTRE ÈS SCIENCES (M. SC.)

EN SCIENCES EXPÉRIMENTALES DE LA SANTÉ

OCTOBRE 1995

RÉSUMÉ

Le dopage à l'érythropoïétine (EPO), une hormone endogène stimulant la synthèse des érythrocytes, est de plus en plus utilisé par les athlètes d'endurance pour augmenter leur performance physique. Les érythrocytes étant les transporteurs d'oxygène de l'organisme, ce type de dopage conduit à une augmentation de la disponibilité de l'oxygène et, par conséquent, à une amélioration du VO_2 max et de la performance physique.

Le Comité International Olympique interdit le dopage à l'érythropoïétine même s'il n'existe actuellement aucune méthode de dépistage. L'EPO possède effectivement un temps de demi-vie de quelques heures (environ 5 heures), des manifestations tardives (3 à 4 jours) et une homologie quasi parfaite avec sa contre-partie endogène, empêchant le dépistage de ce type de dopage par les techniques actuelles. Les travaux se sont donc orientés vers la recherche de marqueurs secondaires du dopage à l'EPO. Le traitement à l'EPO entraînant chez certains sujets une augmentation des risques de thrombose due à l'activation des systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse, notre équipe a étudié les principales molécules de ces deux systèmes en présence d'EPO exogène. Ces études ont permis de mettre en évidence une augmentation des TDP (produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine) urinaires chez des sujets traités à l'EPO.

Dans ce mémoire, nous avons vérifié les diverses hypothèses pouvant expliquer l'origine des TDP urinaires retrouvés en présence d'EPO exogène. Ceux-ci peuvent provenir soit d'une filtration rénale suite à une augmentation de leur concentration plasmatique, d'une augmentation de la

IV

perméabilité glomérulaire ou encore d'une augmentation de la fraction filtrée due à certains changements rhéologiques en présence d'EPO exogène. Les TDP urinaires peuvent également provenir d'une production intra-rénale de TDP suite à une modification dans la synthèse des enzymes fibrinolytiques.

Ces travaux ont permis de déterminer que les TDP plasmatiques ne sont filtrés dans l'urine qu'en quantité infime et ce, quelles que soient les conditions (concentration élevée de TDP plasmatique, augmentation de la perméabilité glomérulaire et de la fraction filtrée). Les TDP proviendraient non pas d'une filtration rénale des TDP plasmatiques mais plutôt d'une production intra-rénale de TDP suite à une modification dans la synthèse intra-rénale des enzymes fibrinolytiques. Ces travaux ont effectivement permis de mettre en évidence que l'augmentation des TDP urinaires observée en présence d'EPO exogène s'accompagne d'une augmentation de l'u-PA (urokinase) urinaire, une enzyme fibrinolytique synthétisée par les cellules rénales.

REMERCIEMENTS

Je ne peux déposer ce mémoire sans remercier, sincèrement, tout ceux qui m'ont aidé à réussir ma maîtrise. J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche le Dr Raynald Gareau pour sa grande disponibilité et pour les nombreux conseils et encouragements. Je tiens aussi à remercier le Dr Guy Brisson, mon co-directeur, pour son aide.

J'aimerais également remercier Claire Chénard, pour ses conseils et pour l'atmosphère agréable dans laquelle j'ai eu la chance de travailler. Je tiens aussi à remercier Carole Lavoie pour l'aide technique et la patience démontrée à mon égard.

Finalement, mes derniers remerciements vont à Hugues pour son soutien, ses encouragements, sa patience, son écoute et sa compréhension tout au long de mes études.

Marie-Guylaine Gagnon

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
REMERCIEMENTS.....	V
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XIII

PREMIER CHAPITRE

GÉNÉRALITÉS	1
1.1 Dopage.....	1
1.2 Érythropoïétine	3
1.3 Dépistage du dopage à l'érythropoïétine.....	8
1.4 Coagulation et fibrinolyse plasmatique	10
1.4.1 Coagulation.....	10
1.4.2 Fibrinolyse.....	14
1.5 Fibrinolyse rénale	24
1.6 Érythropoïétine et TDP urinaires.....	27
1.7 Objectifs.....	29

DEUXIÈME CHAPITRE

MATÉRIELS ET MÉTHODES	31
2.1 Étude de la filtration rénale.....	31
2.1.1 Préparation des TDP.....	32
2.1.2 Dosage des produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine	32
2.1.3 Canulation.....	34
2.1.4 Perfusion.....	34
2.2 Étude de la fibrinolyse rénale.....	35
2.2.1 Dosage de l'urokinase.....	35
2.2.2 Dosage du t-PA	37

VIII

2.2.3 Dosage du PAI-1.....	38
2.2.4 Culture de cellules épithéliales glomérulaires.....	39

TROISIÈME CHAPITRE

RÉSULTATS.....	45
3.1 Étude des TDP urinaires	45
3.2 Étude de la filtration rénale	47
3.3 Étude de la fibrinolyse rénale	52

QUATRIÈME CHAPITRE

DISCUSSION ET CONCLUSION.....	61
4.1 Discussion.....	61
4.2 Conclusion.....	71
BIBLIOGRAPHIE	73

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure de l'érythropoïétine	4
Figure 2	Physiologie de l'érythropoïétine	5
Figure 3	Récepteur de l'érythropoïétine (EpoR)	8
Figure 4	Coagulation	11
Figure 5	Viscosité et coagulation	12
Figure 6	Fibrinolyse	15
Figure 7	Activation du glu-plasminogène	16
Figure 8 a)	Fibrinogénolyse par la plasmine	17
Figure 8 b)	Fibrinolyse par la plasmine	18
Figure 9	Structure de l'activateur tissulaire du plasminogène	19
Figure 10	Conversion de la pro-urokinase	20
Figure 11	Structure de l'u-PA	21
Figure 12 a)	Schéma du néphron	24
Figure 12 b)	Micrographie du glomérule	25
Figure 13	Structure des capillaires glomérulaires	26
Figure 14	Isolation des cellules épithéliales glomérulaires	42
Figure 15	Dosage des TDP urinaires chez des athlètes de niveau international et chez des sujets séjournant en altitude	46
Figure 16	Stabilité de l'u-PA urinaire lors d'une conservation à 4°C	53

Figure 17	Stabilité de l'u-PA urinaire lors d'une conservation à 22°C	53
Figure 18	Stabilité de l'u-PA urinaire lors d'une conservation à 37°C	54
Figure 19	Variation de l'u-P urinaire chez un groupe placebo et un groupe ayant reçu de l'EPO	57
Figure 20	Hématocrite et TDP urinaires chez des sujets témoins et chez des sujets traités à l'EPO.	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	L'effet de l'érythropoïétine et de l'exercice physique intense sur la concentration plasmatique des molécules de la coagulation	14
Tableau 2	Poids moléculaire des TDP	18
Tableau 3	L'effet de l'érythropoïétine et de l'exercice physique intense sur la concentration plasmatique des molécules de la fibrinolyse	23
Tableau 4	Concentration des TDP humains dans le plasma et l'urine de rats sédentaires	48
Tableau 5	Concentration des TDP humains dans le plasma et l'urine de rats entraînés	48
Tableau 6	Concentration des TDP humains dans le plasma et l'urine de rats ayant reçu de l'EPO	49
Tableau 7	Concentration des TDP humains dans le plasma et l'urine de rats sédentaires ayant reçu de l'IGF-I	50
Tableau 8	Concentration des TDP dans le plasma et l'urine de sujets humains sous traitement fibrinolytique	51
Tableau 9	Concentration en TDP, FbDP et FgDP dans les urines de sujets humains 1h30 après le début du traitement fibrinolytique	51
Tableau 10	Concentration en TDP, FbDP et FgDP humains chez des rats sous traitement fibrinolytique	52
Tableau 11	Concentration urinaire de TDP et d'u-PA chez des athlètes de niveau international en compétition	55

XII

Tableau 12	Concentration urinaire de TDP et d'u-PA chez des athlètes suspectés d'abus d'EPO mesurés en compétition et hors compétition	56
Tableau 13	Concentration urinaire des TDP et de l'u-PA chez des sujets avant (normoxie) et après (hypoxie) un séjour à une altitude de 4300 m	58
Tableau 14	Concentration de l'u-PA urinaire chez des sujets lors d'un séjour à une altitude de 2200 m	59

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP:	adénosine diphosphate
AMPc:	adénosine monophosphate cyclique
ATP:	adénosine triphosphate
BFU-E:	burst forming unit-erythroid
BSA:	albumine bovine
CFU-E:	colony forming unit-erythroid
CIO:	comité international olympique
EPO:	érythropoïétine
EpoR:	récepteur de l'érythropoïétine
FbDP:	produits de dégradation de la fibrine
FgDP:	produits de dégradation du fibrinogène
G.R.:	globule rouge
HMW-uPA:	urokinase de poids moléculaire élevé
HuTSP-1:	human T-cell associated serine protease
IGF-I:	insulin-like growth factor-I
IL-1:	interleukine-1
IL-6:	interleukine-6
kDa:	kilodalton
LMW-uPA:	urokinase de faible poids moléculaire
PAI:	inhibiteur des activateurs du plasminogène
PBS:	tampon phosphate salin
PGE ₂ :	prostaglandine E ₂
pro-uPA:	précurseur de l'urokinase
t-PA:	activateur tissulaire du plasminogène
TDP:	produits de dégradation totaux
TGF-β1:	transforming growth factor-β1
TNF:	tumor necrosis factor
u-PA:	urokinase
VO ₂ max:	consommation maximale d'oxygène

CHAPITRE 1

GÉNÉRALITÉS

1.1 Dopage

Le dopage n'est pas un phénomène récent puisque l'utilisation de certaines substances comme la caféine, le coca et la mescaline, remonte aux temps les plus reculés de l'histoire. Aujourd'hui, certains sportifs utilisent encore ces mêmes substances, et plusieurs autres, afin d'améliorer leur performance physique [1]. Depuis 1879, période où des cyclistes utilisaient l'alcool, la caféine, ainsi que divers stupéfiants pour mieux supporter les épreuves d'endurance, plusieurs agents dopants se sont ajoutées à l'arsenal des athlètes. À ce jour, environ 200 substances ont été répertoriées par le Comité International Olympique (CIO) et classées en différentes catégories (diurétique, stimulant, stéroïde, facilitateurs du métabolisme aérobie, ...) selon leurs modes d'actions.

Parmi les facilitateurs du métabolisme aérobie, on retrouve, entre autres, le dopage sanguin ainsi que le dopage à l'érythropoïétine, deux types de dopage entraînant une augmentation du nombre d'érythrocytes en circulation. Puisque le transport de l'oxygène aux différents tissus de l'organisme est assuré par l'hémoglobine, principal constituant des érythrocytes, une augmentation du nombre d'érythrocytes en circulation permet une meilleure oxygénation des tissus. Par conséquent, le dopage sanguin entraîne une amélioration de la performance physique en endurance

puisque celle-ci est étroitement liée à la disponibilité en oxygène [2]. La disponibilité en oxygène est particulièrement importante pour l'organisme puisque l'ATP, source immédiate d'énergie nécessaire aux différentes activités cellulaires, est synthétisé principalement par des mécanismes oxydatifs. L'ATP nécessaire à l'organisme provient effectivement de la glycolyse et du cycle de Krebs par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire. La chaîne respiratoire étant un processus aérobie, les cellules dépendantes de cette voie métabolique ne peuvent effectuer leurs activités durant de longues périodes sans un apport suffisant d'oxygène. En conséquence, une augmentation de l'oxygénation, favorisant la synthèse d'ATP, entraînera une amélioration de la performance physique, la contraction musculaire étant essentiellement un processus dépendant de l'ATP. D'où l'attrait de ce type de dopage pour les athlètes d'endurance.

Le dopage sanguin, banni par le CIO en 1986, consiste en l'administration intraveineuse de sang quelques jours avant une compétition sportive. Deux types de dopage sanguin, hétérologue et autologue, sont utilisés par les athlètes. Depuis quelques années, le dopage sanguin hétérologue est toutefois moins populaire en raison des risques importants de transmission de maladies, dont l'hépatite et le sida. Dans le cas du dopage par transfusion autologue, les risques liés à la transmission de maladies sont moindres mais certains demeurent, dont les risques d'infection. Ainsi, lorsque l'érythropoïétine (EPO), une hormone stimulant la synthèse d'érythrocytes, fut disponible sur le marché, le dopage à l'érythropoïétine remplaça rapidement le dopage sanguin chez les athlètes d'endurance. Cette technique, banni par le CIO en 1991, assure les mêmes avantages que le dopage sanguin tout en éliminant les risques liés aux transfusions [3].

L'utilisation d'EPO, bien qu'ayant des avantages certains, n'est toutefois pas sans danger. Une augmentation de l'hématocrite au-delà de 55% entraîne une augmentation sensible de la viscosité et du risque de thrombose et, par conséquent, une diminution de la distribution sanguine aux organes vitaux, ces modifications pouvant être mortelles. Ainsi, plusieurs décès, principalement chez des cyclistes et des marathoniens, semblent liés à l'abus d'EPO [23].

1.2 Érythropoïétine

L'érythropoïétine, hormone contrôlant l'érythropoïèse, assure le maintien d'une disponibilité adéquate en oxygène dans les différents tissus de l'organisme. Cette hormone glycoprotéique, d'un poids moléculaire d'environ 34 kDa, est constituée d'une chaîne monocaténaire de 165 résidus d'acides aminés (18.4 kDa), comportant 2 ponts disulfures (Cys 7-161 et Cys 29-33) et 4 sites de glycosylation (Asn 24, Asn 38, Asn 83 et Ser 126) (Figure 1). Selon la forme de l'EPO (alpha ou bêta), la glycosylation de la protéine compte pour 30 à 40% de son poids moléculaire total, les deux formes comprenant des mosaïques différentes composées de molécules d'acide sialique, d'hexoses, d'acide neuraminique et de N-acétylglucosamine. La glycosylation joue un rôle important dans la conformation, la sécrétion et le temps de demi-vie de la molécule (~ 5 heures) et, par conséquent, dans l'activité biologique de l'EPO. La glycosylation permet également l'activation de la réponse biologique suite à la liaison de la molécule à son récepteur.

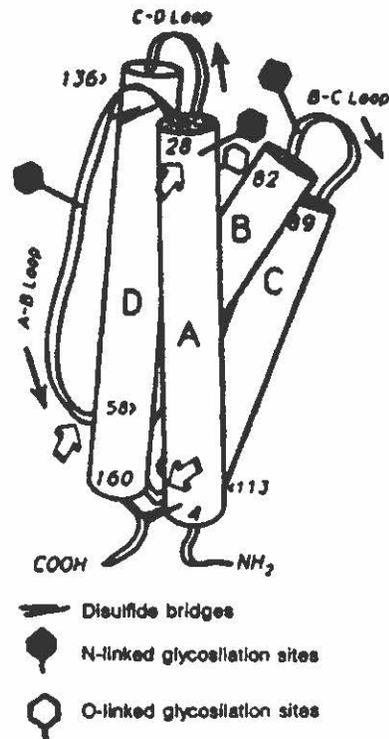


Figure 1. Structure de l'érythropoïétine. Modèle de structure tridimensionnelle de l'EPO montrant les quatre hélices et les boucles de raccordement. (Source: Journal of molecular endocrinology, 1994, vol 12, p. 132)

L'EPO, synthétisée majoritairement par le rein, plus précisément par les cellules interstitielles adjacentes au tubule proximal, possède d'autres sites mineurs de synthèse dont le foie et les macrophages. La production d'EPO, et par conséquent celle d'érythrocytes, est contrôlée par un mécanisme de rétroaction négative sensible à la quantité d'oxygène atteignant les tissus (Figure 2). Plusieurs facteurs, tels la diminution du nombre d'érythrocytes, la

diminution de la disponibilité en oxygène et l'augmentation des besoins des tissus en oxygène, conduisent à une diminution de la concentration sanguine en oxygène entraînant une production accrue d'EPO. Inversement, un approvisionnement plus grand en oxygène vers les tissus conduit à une diminution des niveaux d'EPO avec, comme résultat, une diminution de l'érythropoïèse (Figure 2).

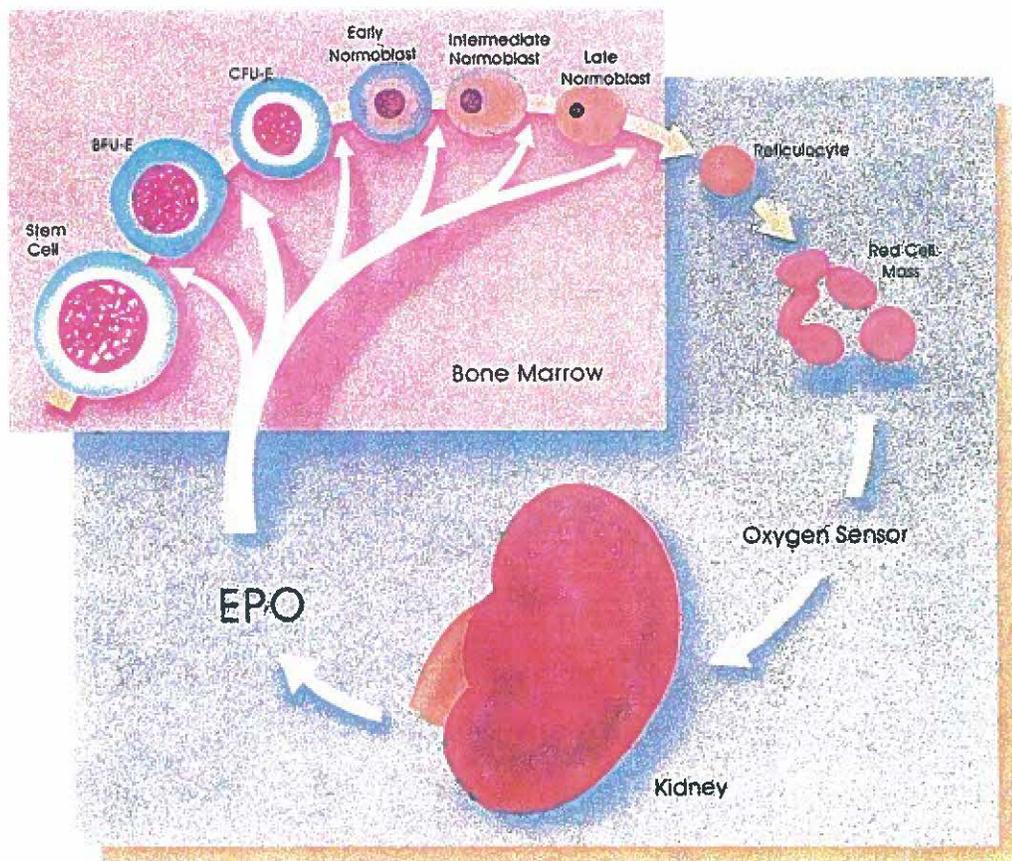


Figure 2. Physiologie de l'érythropoïétine. (Source: Intermedico)

Diverses hypothèses ont été avancées pour déterminer où et comment se produit la détection du taux d'oxygène atteignant les tissus. Il est généralement admis que ce détecteur d'oxygène est situé au niveau du rein. Une des hypothèses émises implique les cellules épithéliales adjacentes à la membrane basolatérale du tubule proximal où un hème stimulerait la synthèse d'EPO par les cellules rénales lorsqu'il serait dans la configuration désoxy [9]. Une autre hypothèse suggère que la synthèse d'EPO survient suite à un largage de prostaglandines E_2 (PGE_2) par les cellules du tubule proximal en réponse à un apport insuffisant en oxygène [10].

L'EPO stimule la maturation et la différenciation des précurseurs érythrocytaires situés dans la moelle osseuse, ainsi que le taux de synthèse de l'hémoglobine. Certaines études, tant *in vivo* [11] qu'*in vitro* [12], ont démontré qu'à fortes concentrations l'EPO stimule également la thrombopoïèse, le récepteur de l'EPO étant retrouvé en faibles quantités sur les mégacaryocytes. Toutefois, le rôle de l'EPO dans le contrôle de la thrombopoïèse serait marginal puisqu'un déficit en EPO n'entraîne pas une thrombocytopenie. L'effet physiologique de l'EPO, traduit par une augmentation de l'hématocrite survenant environ 3 jours après la synthèse d'EPO, est caractérisé, entre autres, par une augmentation du taux de réticulocytes (précurseurs érythrocytaires) quittant la moelle osseuse à un stade de maturation incomplet.

L'action de cette hormone, comme plusieurs autres d'ailleurs, s'effectue par l'intermédiaire d'un récepteur (EpoR). Ce récepteur est situé principalement sur les précurseurs érythrocytaires (BFU-E, CFU-E et pro-érythrocyte), mais également en faibles quantité, sur les mégacaryocytes.

L'EpoR, découvert en 1981 [13], est un polypeptide de 507-508 acides aminés. La purification de ce récepteur met en évidence trois complexes protéiques de 65-75, 100-110 et 85-95 kDa. Le complexe de 65-75 kDa correspondrait à l'EpoR alors que celui de 85-95 kDa serait une protéine accessoire associée à l'EpoR et impliquée dans la liaison de l'EPO à son récepteur. Certains auteurs suggèrent que le complexe de 100-110 kDa serait un homodimère de l'EpoR [14,15], alors que d'autres suggèrent que ce complexe serait formé de l'EpoR lié à une protéine accessoire [16,17]. Le consensus actuel veut que l'EpoR de haute affinité soit formé d'un homodimère associé à une protéine accessoire. Le signal de transduction entraînant l'effet biologique de l'EPO suite à sa liaison à l'EpoR implique deux protéines, soit JAK2 et SH-PTP1 [18]. La liaison de l'EPO à son récepteur entraîne l'activation de la protéine JAK2, une tyrosine kinase, laquelle s'autophosphoryle et phosphoryle la tyrosine 429 située sur la portion carboxy-terminal du récepteur (Figure 3). Suite à ces phosphorylations, le signal de l'EPO est transmis, occasionnant ainsi l'effet biologique correspondant. Les deux sites de phosphorylation deviennent le point d'ancrage de la protéine SH-PTP1 (phosphotyrosine protéine phosphatase SH), cette dernière inhibant l'action de l'EPO en déphosphorylant la kinase JAK2.

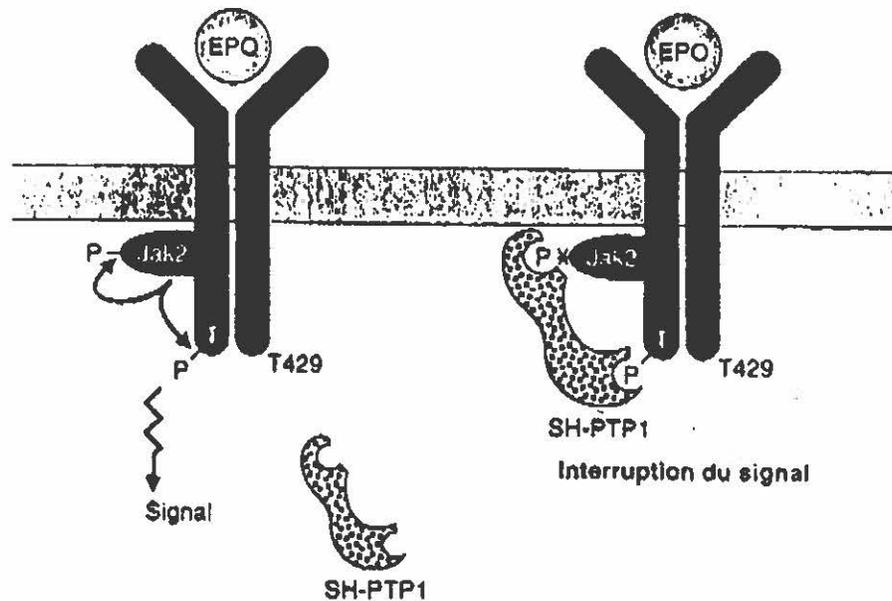


Figure 3. Récepteur de l'érythropoïétine (EpoR). Jak2: tyrosine kinase; SH-PTP1: phosphotyrosine protéine phosphatase SH; T429: tyrosine 429. (Source: *Medecine/Science*, 1995, vol 11, p. 927)

1.3 Dépistage du dopage à l'érythropoïétine

Pour améliorer leur VO_2 max et, par conséquent, leur performance physique, certains athlètes recherchent divers moyens pour augmenter leur taux d'érythrocytes. Pour ce faire, certains s'entraînent en haute altitude où la rareté de l'oxygène stimule la synthèse d'EPO endogène; d'autres, moins scrupuleux, s'administreront de l'EPO recombinante deux ou trois semaines avant une compétition. Malgré l'absence de preuves concrètes, il est tout de même admis que plusieurs athlètes de niveau international ont recours au

dopage à l'EPO [19,20,21,22,23,24]. Cependant, encore aujourd'hui, les techniques de dépistage sont totalement inefficaces à déceler les utilisateurs illicites d'EPO. La mesure de l'hématocrite ou du taux circulant de réticulocytes ne peut être utilisé pour dépister un dopage à l'EPO puisque ces deux paramètres varient autant sous l'effet d'une augmentation d'EPO endogène que sous l'effet d'une administration d'EPO exogène. La mesure directe de l'hormone ne peut être utilisée pour dépister le dopage à l'EPO car celle-ci possède un temps de demi-vie d'environ cinq heures [25] et des effets cliniques mesurables 3 à 4 jours après son administration. Ainsi, au moment de la compétition il ne reste que peu de traces d'EPO exogène dans l'organisme. De plus, l'EPO recombinante présente une homologie quasi parfaite avec sa contre-partie endogène, empêchant pour l'instant toute différenciation entre une augmentation endogène d'EPO et un dopage à cette même hormone.

La seule matrice biologique autorisée jusqu'à maintenant par le CIO étant l'urine, les travaux de notre équipe se sont orientés vers la recherche dans l'urine de marqueurs secondaires du dopage hormonal. Puisque l'EPO, en augmentant l'hématocrite peut affecter la viscosité sanguine et, par conséquent, entraîner une modification de l'homéostasie vasculaire, nos travaux ont porté sur l'étude des principales molécules associées à la coagulation et la fibrinolyse sous administration d'EPO. L'étude de ces molécules a permis de mettre en évidence une augmentation des produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine (TDP) dans l'urine suite à une administration d'EPO. Cette observation effectuée pour la première fois chez des lapins [26] a depuis, été confirmée chez des sujets hémodialysés [27].

1.4 Coagulation et fibrinolyse plasmatique

Les produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine (TDP) proviennent de l'activation de deux systèmes plasmatiques, la coagulation et la fibrinolyse, deux systèmes impliqués dans le maintien de la fluidité sanguine et dans la réparation tissulaire. À titre d'exemple, lorsqu'une rupture vasculaire se produit, il y a activation de la coagulation, aboutissant à la formation d'un caillot de fibrine. Le caillot formé recouvre la brèche vasculaire dans les délais les plus courts afin de limiter la perte sanguine et permettre la réparation tissulaire. Lorsque les tissus vasculaires ont recouvré leur intégrité, le caillot de fibrine est dégradé par le système fibrinolytique afin de rétablir une circulation sanguine normale. La fibrinolyse entraîne la dégradation du caillot de fibrine en fragments de petites tailles appelés produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine (TDP), ces derniers étant éliminés de la circulation sanguine par les cellules du système réticulo-endothélial (cellules de Kupffer, cellules de Langherans, macrophages, ...).

À l'état physiologique, il existe un équilibre entre la coagulation et la fibrinolyse, un déséquilibre pouvant conduire selon le système impliqué à des complications thrombotiques ou hémorragiques .

1.4.1 Coagulation

La coagulation est un processus complexe mettant en jeu un certain nombre de facteurs, plusieurs se trouvant dans le plasma sous forme de zymogènes (Figure 4). Suite à une activation du système de la coagulation, chaque enzyme formée transforme les zymogènes suivants, provoquant ainsi

une cascade de réactions enzymatiques conduisant à la formation d'un caillot insoluble de fibrine. La cascade enzymatique peut s'initier par deux voies différentes, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La voie intrinsèque s'active suite à l'exposition du sous-endothélium de la paroi vasculaire, entraînant ainsi l'activation de la cascade par l'intermédiaire des plaquettes et du facteur XII. L'activation par la voie extrinsèque survient suite à un relargage de facteurs tissulaires (Facteur III) dans la circulation sanguine lors d'un traumatisme ou encore lors d'une rupture vasculaire.

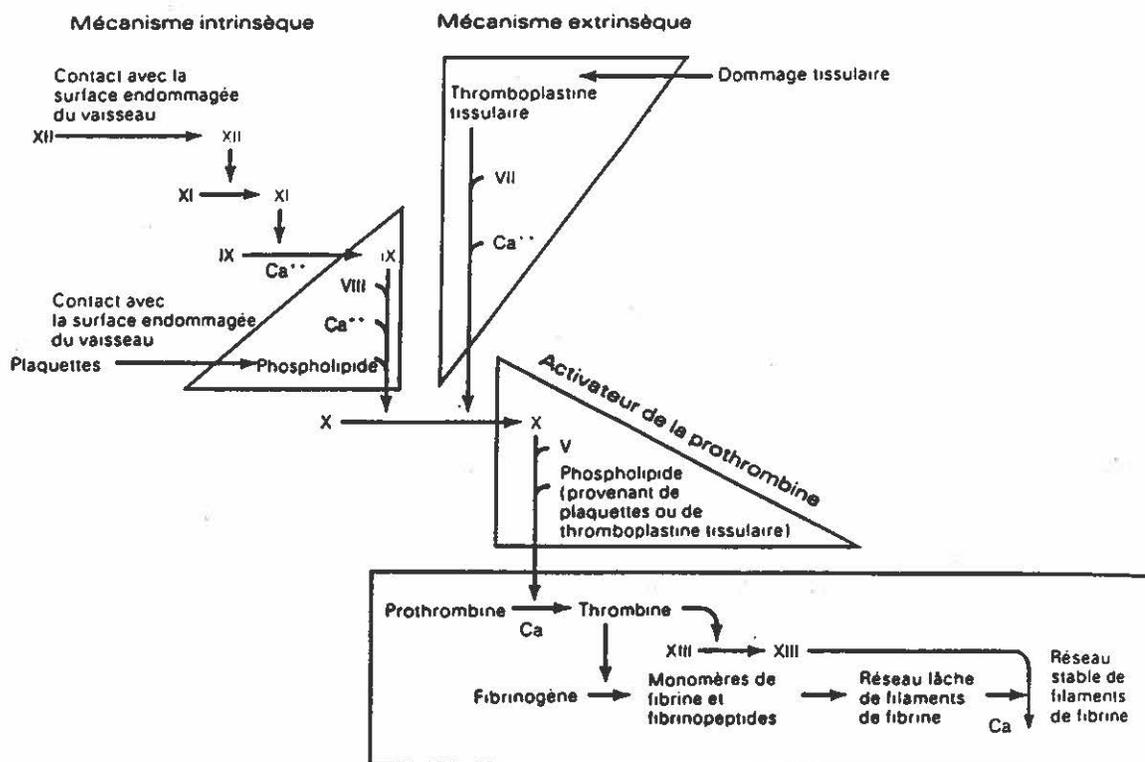


Figure 4. Coagulation. Étapes de la formation d'un caillot de fibrine suite à l'activation de la voie intrinsèque ou extrinsèque. (Source: Anatomie et physiologie par A.P. Spence et E.B. Mason, Édition du renouveau pédagogique, 1983)

La formation de caillots de fibrine peut provenir non seulement de l'hémostase normal mais également d'une réaction d'hypersensibilité retardée ou encore d'une réponse inflammatoire non-spécifique. La viscosité sanguine, dépendant en grande partie de l'hématocrite, est également un facteur pouvant entraîner une activation de la voie intrinsèque de la coagulation (Figure 5). En effet, une augmentation de la viscosité peut entraîner certaines modifications locales conduisant à une aggrégation de globules rouges, suivi d'une diminution du débit, entraînant la migration des plaquettes vers la paroi et la formation de microthrombi, obstruant les petits vaisseaux sanguins.

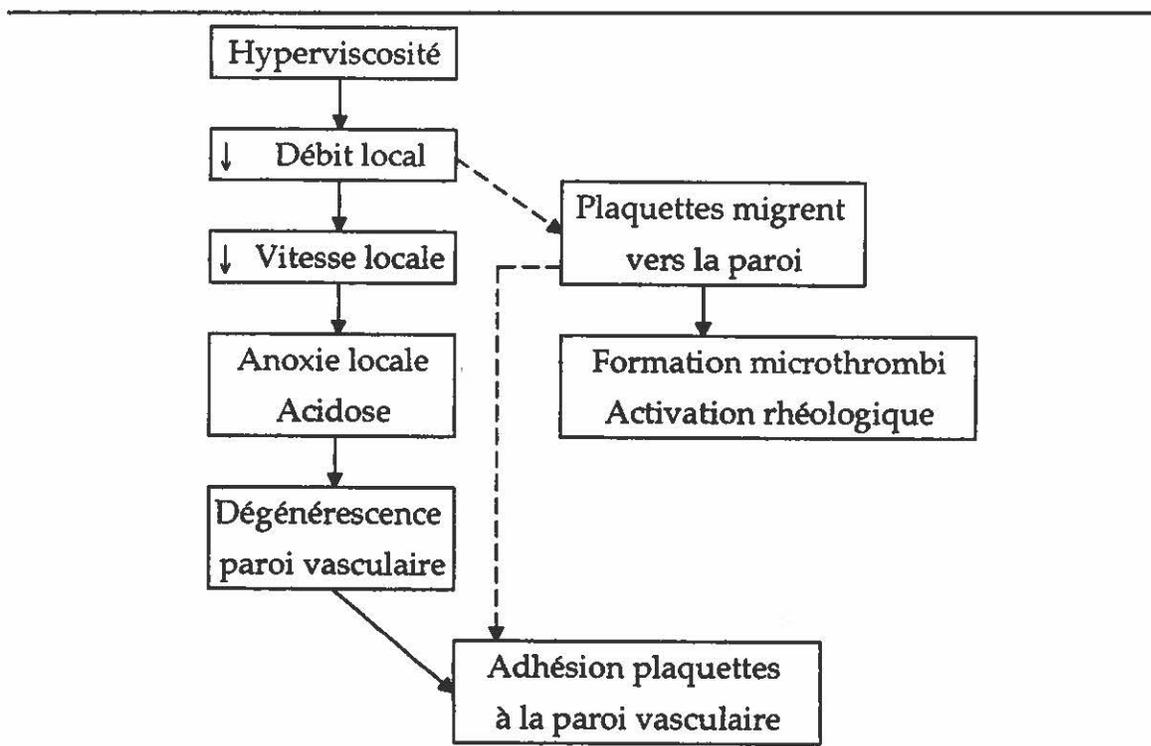


Figure 5. Viscosité et coagulation. Une augmentation de la viscosité peut conduire à la migration des plaquettes vers la paroi vasculaire et entraîner la formation de microthrombi.

L'administration d'EPO n'est donc pas sans danger puisque l'augmentation de l'hématocrite qui en résulte peut conduire à une augmentation de la viscosité [28] qui, en plus d'entraîner une augmentation des risques thrombotiques, peut entraîner une diminution du débit sanguin vers les organes vitaux. De plus, un exercice physique intense amplifie ces risques puisqu'il entraîne également une augmentation de l'hématocrite provoquée par une redistribution des liquides corporels vers les tissus et une déshydratation dû à la sudation.

Plusieurs études, effectuées chez des sujets sains et des sujets hémodialysés, ont voulu de déterminer l'effet de l'EPO sur le système de la coagulation. Bien que certaines présentent des résultats contradictoires, l'ensemble indique que l'EPO ne semble pas affecter les concentrations plasmatiques des enzymes du système de la coagulation (Tableau 1). Les molécules ne présentant à l'effort aucune variation de leur concentration pourraient être, éventuellement, utilisées comme sonde d'où l'intérêt de présenter, parallèlement à l'effet de l'EPO, les effets d'un exercice aigu sur la concentration des enzymes fibrinolytiques.

Hémostase	Effet de l'EPO	Effet de l'exercice aigu
Temps de saignement	↓ [28,29]	
Temps de prothrombine	↑ [36] Aucune variation [32,39]	↓ [41] Aucune variation [41]
Temps de thromboplastine activé	↑ [36] ↓ [39] Aucune variation [32]	↓ [41] Aucune variation [41]
Facteur XII	Aucune variation [34]	Aucune variation [41]
Antithrombine III	↑ [37] ↓ [29] Aucune variation [39]	↑ [68]
Thrombine/ Antithrombine III	↑ [35] Aucune variation [32]	↑ [68]
Facteur de von Willebrand	↓ [37] Aucune variation [28,39]	↑ [41]
Fibrinogène	↑ [28,35] Aucune variation [28,32,39]	Aucune variation [41,42]
Viscosité du sang	↑ [28]	↑
Viscosité du plasma	↑ [39] Aucune variation [28]	↑

- ↑ : accroissement - ↓ : diminution

Tableau 1. Effet de l'érythropoïétine et de l'exercice physique intense sur la concentration plasmatique des molécules de la coagulation. Les chiffres entre parenthèses réfèrent à la liste de références données à la section Bibliographie.

1.4.2 Fibrinolyse

La fibrinolyse est un processus où l'activation d'une cascade enzymatique conduit à la formation de plasmine, une enzyme protéolytique dégradant, entre autres, la fibrine insoluble. Les principales molécules

impliquées dans la fibrinolyse sont le plasminogène, les activateurs du plasminogène (t-PA (activateurs tissulaire du plasminogène), u-PA (urokinase)) et les inhibiteurs des activateurs (PAI, α 2-antiplasmine) (Figure 6). L'activation de ce mécanisme survient dès la formation du caillot de fibrine pour en prévenir l'expansion démesurée. Ainsi, quand la coagulation commence, se met également en branle un mécanisme qui servira à la dissolution du caillot.

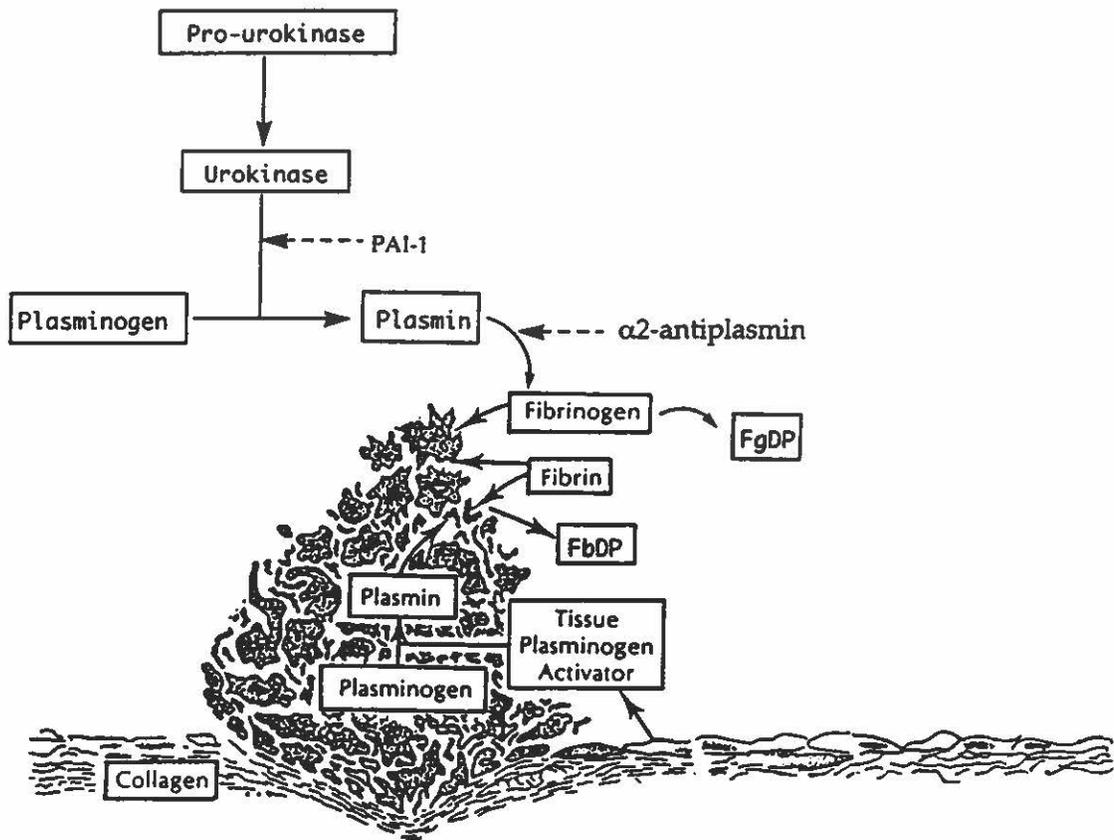


Figure 6. Fibrinolyse. Activateurs (urokinase, activateur-tissulaire du plasminogène) et inhibiteurs (PAI-1, α 2-antiplasmine) de la fibrinolyse. (Source: Mechanisms in blood coagulation, fibrinolysis and the complement system, Torben Halkier, Cambridge University Press, 1991)

Le plasminogène, une glycoprotéine monocaténaire d'un poids moléculaire d'environ 90 kDa, est synthétisé principalement par les hépatocytes. Le plasminogène primaire contenant un acide glutamique à l'extrémité amino-terminale (glu-plasminogène) comporte des sites de liaison (résidus lysines) pour la fibrine et l' α 2-antiplasmine. La conversion du glu-plasminogène en glu-plasmine se produit suite à la scission du lien Arg₅₆₀-Val₅₆₁ sous l'action des activateurs du plasminogène conduisant à la formation d'une molécule bicaténaire, liée par deux ponts disulfures. La scission du lien Arg₅₆₀-Val₅₆₁ s'accompagne d'un changement de conformation entraînant l'exposition du site actif (His₆₀₂, Asp₆₄₅ et Ser₇₄₀). La glu-plasmine formée convertit le glu-plasminogène en lys-plasminogène (hydrolyse du lien Lys₇₆-Lys₇₇) ainsi que la glu-plasmine en lys-plasmine (Figure 7).

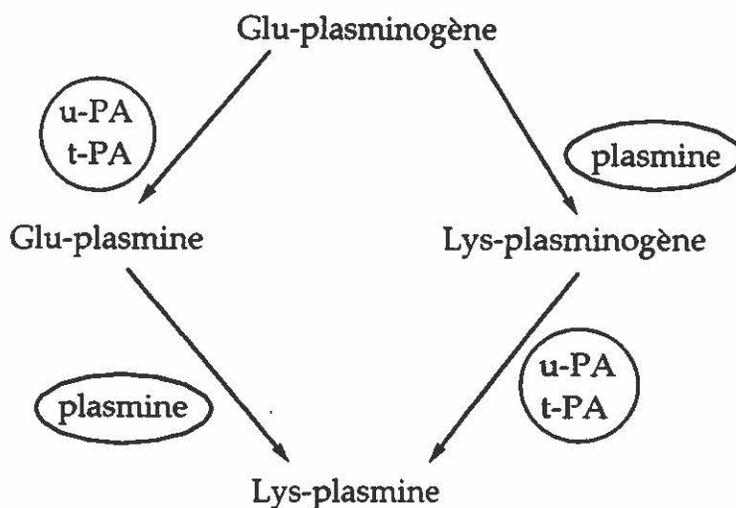


Figure 7. Activation du glu-plasminogène. u-PA: urokinase; t-PA: activateur-tissulaire du plasminogène

Le lys-plasminogène diffère du glu-plasminogène en trois points: un temps de demi-vie plus court, une affinité plus grande pour la fibrine et une conversion en plasmine plus rapide.

La plasmine liée à la fibrine dégrade cette dernière pour former les produits de dégradation de la fibrine (FbDP). Cependant, en absence de fibrine, la plasmine peut également dégrader le fibrinogène (fibrinogénolyse) et former les produits de dégradation du fibrinogène (FgDP) (Figure 8). Dans des conditions physiologiques, la formation de FgDP est extrêmement rare car toute plasmine s'échappant du caillot est rapidement captée par des inhibiteurs. L'ensemble des produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine constitue les produits de dégradation totaux (TDP).

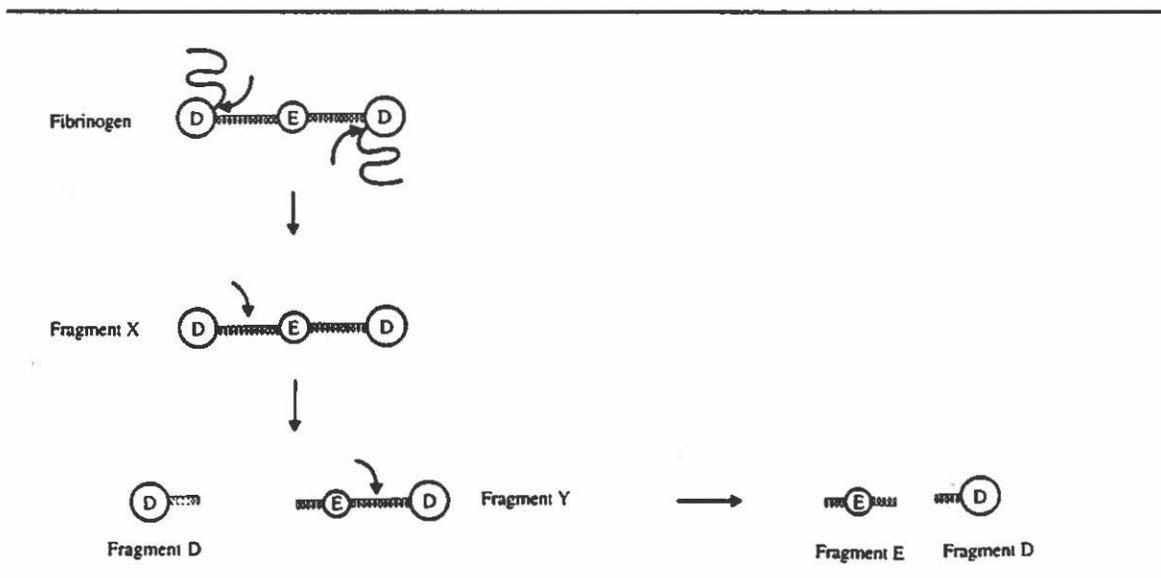


Figure 8. a) Fibrinogénolyse par la plasmine. Les flèches indiquent les sites de protéolyse sous l'action de la plasmine. (Source: Mechanisms in blood coagulation, fibrinolysis and the complement system, Torben Halkier, Cambridge University Press, 1991)

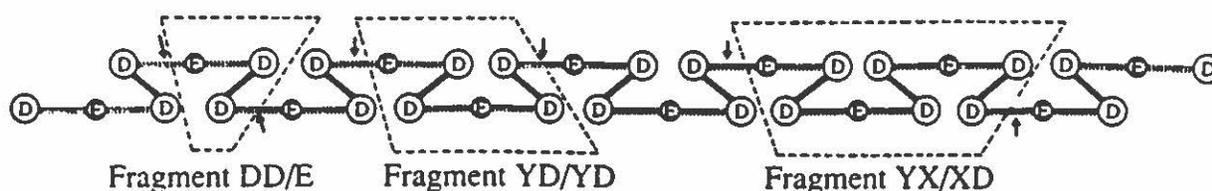


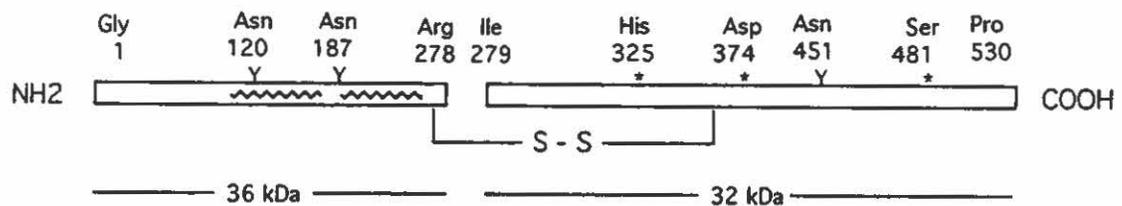
Figure 8. b) Fibrinolyse par la plasmine. Les flèches indiquent les sites de protéolyse sous l'action de la plasmine. (Source: Mechanisms in blood coagulation, fibrinolysis and the complement system, Torben Halkier, Cambridge University Press, 1991)

Les différents fragments de TDP produits lors de la dégradation d'un caillot de fibrine possèdent des poids moléculaires de 50 à 440 kDa (Tableau 2).

Produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine (TDP)	Poids moléculaire approximatif (kDa)
E	50
Y	150
X	250
DD (D-DIMER)	195
DDE	245
YY	290
DYYD	490
DXD	440

Tableau 2. Poids moléculaire des TDP

On distingue deux types d'activateurs du plasminogène, l'activateur tissulaire et l'urokinase. L'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), synthétisé et emmagasiné par les cellules endothéliales sous une forme active, est une glycoprotéine monocaténaire de 68 kDa (Figure 9). Le t-PA peut subir une protéolyse limitée de la liaison Arg₂₇₈-Ile₂₇₉ par la plasmine, le facteur Xa, les kallibréines plasmatique et tissulaire, avec formation du t-PA bicaténaire, lui aussi actif enzymatiquement. La libération du t-PA dans la circulation sanguine survient lors d'un exercice physique intense, d'un bris des cellules endothéliales ou encore lors d'une formation de fibrine.



* : acides aminés participant au site actif
 Y : site d'attachement des glucides

Figure 9. Structure de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA). (Source: Fibrinolyse et thrombolyse, J-P. Caen, G. Tobolem et C. Soria, Masson, 1986)

L'urokinase (u-PA), deuxième principal activateur du plasminogène, est synthétisée par plusieurs types cellulaires sous forme d'un zymogène (pro-uPA) d'un poids moléculaire de 54 kDa. La conversion de la pro-uPA en u-

PA active se produit lorsque le lien Lys₁₅₈-Ile₁₅₉ est scindé par protéolyse limitée. Cette protéolyse peut être produite par la kallicréine plasmatique [45], la plasmine, le facteur XIIIa, la trypsine et l'enzyme HUTSP-1 (human T-cell associated serine protease-1) [46]. La pro-uPA peut aussi être scindée de façon à produire une u-PA inactive. Les molécules responsables de cette inactivation sont la thrombine [45] (protéolyse du lien Arg₁₅₆-Phe₁₅₇) et l'élastase, une enzyme relarguée par les granulocytes (protéolyse du lien Ile₁₅₉-Ile₁₆₀) [47] (Figure 10). L'u-PA inactive ne peut être activée par les facteurs habituels et, par conséquent, ne peut convertir le plasminogène en plasmine. La pro-uPA ne peut activer le plasminogène en plasmine; toutefois, en présence du fragment E2 (provenant de la dégradation de la fibrine) la pro-uPA acquiert une activité semblable à celle de l'u-PA, ceci étant dû à un changement conformationnel du plasminogène suite à la liaison du fragment E2 [48].

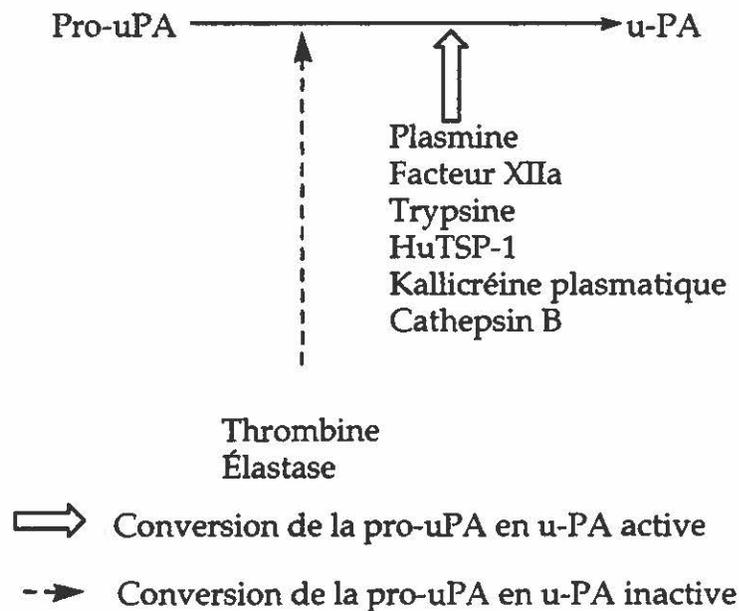
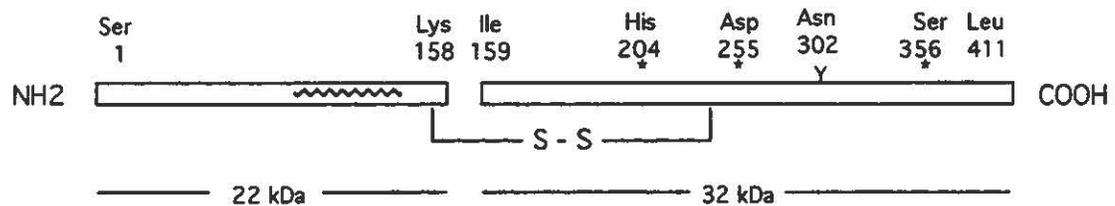


Figure 10. Conversion de la pro-uPA

Il existe deux formes moléculaires différentes d'u-PA: une de poids moléculaire élevé (HMW-uPA) de 54 kDa (Figure 11) et une autre de faible poids moléculaire (LMW-uPA) de 33 kDa, les deux formes provoquant la rupture de la liaison Arg₅₆₀-Val₅₆₁ sur la molécule de plasminogène, produisant ainsi la plasmine.

L'u-PA peut agir sous forme libre dans le plasma ou encore liée à son récepteur cellulaire présent sur un grand nombre de cellules, dont les monocytes, les macrophages et les fibroblastes [49,50,51]. L'u-PA selon son état (libre ou lié) aura des effets biologiques différents: l'u-PA libre exerce un rôle majeur dans l'activation de la fibrinolyse alors que l'u-PA liée à son récepteur est associée à la dégradation des constituants de la matrice extra-cellulaire, permettant ainsi la migration cellulaire [51].



* : acides aminés participant au site actif
Y : site d'attachement des glucides

Figure 11. Structure de l'u-PA. (Source: Fibrinolyse et thrombolyse, J-P. Caen, G. Tobolem et C. Soria, Masson, 1986)

Selon les types cellulaires, la synthèse de l'u-PA est induite par diverses molécules. À titre d'exemple, les cellules épithéliales sous l'action de la thrombine [52], et les cellules endothéliales sous l'action du TNF (tumor necrosis factor) et des interleukines 1 et 6 [53], augmenteront leur taux de synthèse d'urokinase.

L'activité fibrinolytique du sang provient d'une fraction plasmatique mais également d'une fraction cellulaire. Ainsi, certaines cellules, dont les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, ont la capacité de dégrader la fibrine soit par l'intermédiaire d'enzymes protéolytiques [54] (neutrophiles), ou soit en internalisant le fibrinogène et la fibrine par l'intermédiaire de l'intégrine MAC-1 [57] (monocytes). De plus, les monocytes possèdent des récepteurs de l'u-PA [50,51] et synthétisent l'u-PA [56], le PAI-1 et le PAI-2 [55].

Il existe deux types principaux d'inhibiteurs contrôlant l'activation du système fibrinolytique: les inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAI) et les inhibiteurs de la plasmine (α 2-antiplasmine). Ces inhibiteurs régissent l'activation de la plasmine, prévenant ainsi une formation démesurée de cette dernière, laquelle pourrait dégrader le fibrinogène et compromettre ainsi une coagulation normale et entraîner des hémorragies. Le PAI-1, synthétisé par les cellules endothéliales, réagit aussi bien avec le t-PA que l'u-PA pour former des complexes inactifs. Les inhibiteurs de la fibrinolyse ne sont pas seulement présents dans le plasma mais également dans certaines cellules; ainsi, les neutrophiles possèdent un facteur, le "defensin", inhibant la liaison du t-PA à la fibrine [58].

Considérant les risques de thrombose associés à l'utilisation de l'EPO exogène, plusieurs études effectuées chez des sujets sains et des sujets

hémodialysés recevant cette hormone ont voulu démontrer son effet sur la synthèse des molécules fibrinolytiques. En dépit de certains résultats contradictoires, l'EPO semble affecter la fibrinolyse plasmatique. Il est intéressant de remarquer que, selon les études, les TDP plasmatiques augmentent [35] ou ne varient pas [28,32] suite à une administration d'EPO. Les molécules ne présentant à l'effort aucune variation de leur concentration pourraient être, éventuellement, utilisées comme sonde (Tableau 3) d'où l'intérêt de présenter, parallèlement à l'effet de l'EPO, les effets d'un exercice aigu sur la concentration des enzymes fibrinolytiques.

Fibrinolyse plasmatique	Effet de l'EPO	Effet de l'exercice aigu
Temps de lyse des euglobulines	↓ [30] ↑ [33] Aucune variation [28]	?
Plasmine/ α2-antiplasmine	Aucune variation [32,34]	↑ [41]
t-PA	↓ [33] ↑ [30,31,38] Aucune variation [34,43]	↑ [40,41,42,43,44]
PAI	↓ [30,31,38] ↑ [33,34] Aucune variation [29,39]	↓ [41,42,43] Aucune variation [40]
D-Dimer	↑ [35] Aucune variation [28,32]	↑ [40,44]

- ↑ : accroissement

- ↓ : diminution

Tableau 3. Effet de l'érythropoïétine et de l'exercice physique intense sur la concentration plasmatique des molécules fibrinolytiques. Les chiffres entre parenthèses réfèrent à la liste de références données à la section Bibliographie.

1.5 Fibrinolyse rénale

La fibrinolyse, en plus d'assurer le maintien de la fluidité vasculaire, assure une bonne fluidité dans toutes les structures du système urinaire, principalement au niveau du néphron. Ce dernier, composé d'un glomérule et d'un long tubule divisé en différents segments selon leurs fonctions, filtre le sang au rythme d'un litre par minute, éliminant ainsi les déchets métaboliques et autres molécules inutiles à l'organisme (Figure 12).

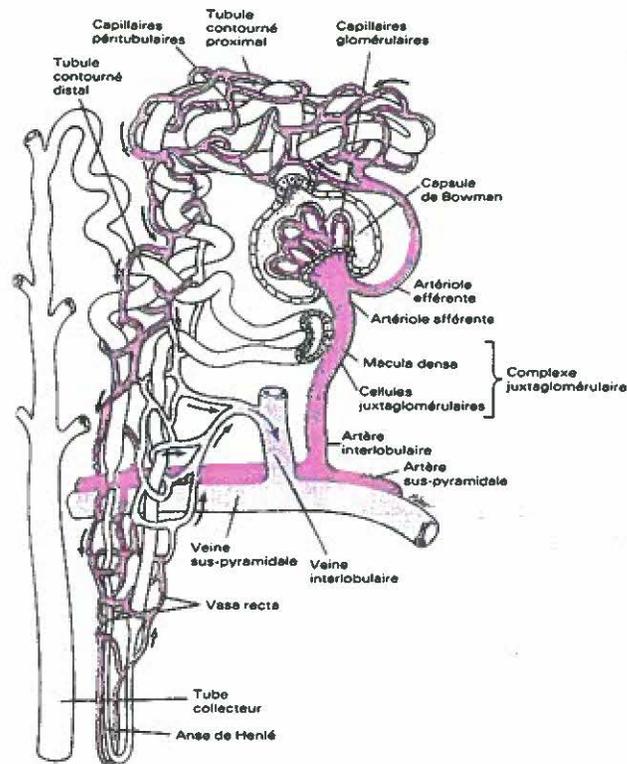


Figure 12. a) Néphron. Représentation schématique des relations entre le néphron et ses vaisseaux sanguins. (Source: Anatomie et physiologie, A.P. Spence et E.B. Mason, Édition du renouveau pédagogique, 1983)

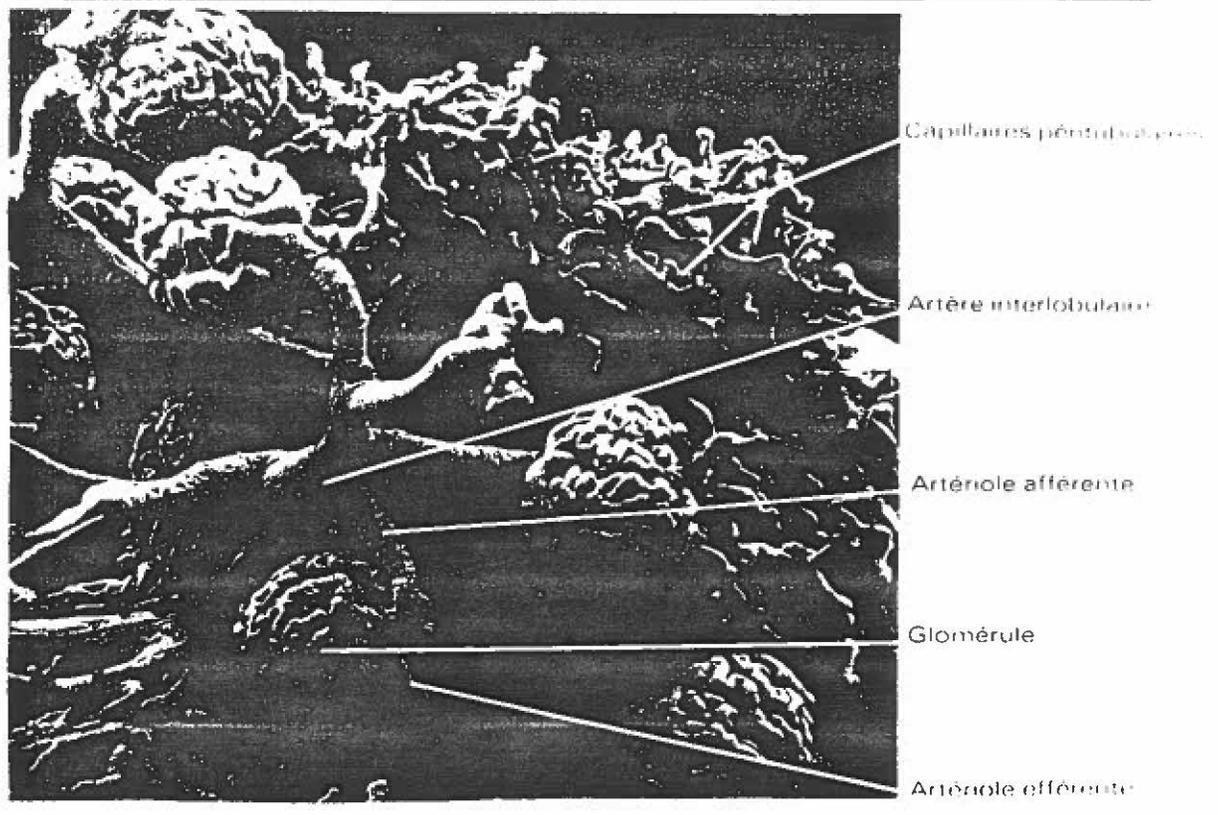


Figure 12. b) Micrographie du glomérule. Microphotographie au microscope électronique à balayage des vaisseaux sanguins attenants aux glomérules. (Source: Anatomie et physiologie par A.P. Spence et E.B. Mason, Édition du renouveau pédagogique, 1983)

La filtration glomérulaire découle de la structure particulière des capillaires glomérulaires, occasionnant une perméabilité importante et, par conséquent, le passage de certains constituants sanguins dans l'urine. La paroi des capillaires glomérulaires se compose d'une couche de cellules endothéliales bordant l'intérieur du vaisseau sanguin, d'une lame basale et d'une couche de cellules épithéliales exposées vers la capsule de Bowman (Figure 13). Ces différentes structures présentent des ouvertures permettant le passage des molécules en fonction de leurs tailles. Les cellules endothéliales possèdent des pores d'une ouverture de 160 \AA , tandis que les cellules

épithéliales présentent des orifices permettant le passage de molécules de tailles inférieures à 70 \AA , ce qui correspond à un poids moléculaire d'environ 70 kDa. Les seules molécules pouvant être filtrées normalement dans l'urine sont donc celles ayant un poids moléculaire inférieur à 70 kDa, ce qui exclut, bien entendu, les cellules sanguines ainsi que la majorité des protéines plasmatiques.

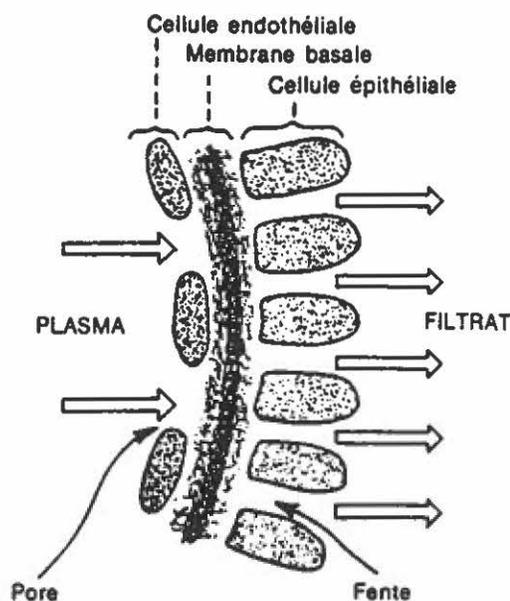


Figure 13. Structure des capillaires glomérulaires. (Source: Traité de physiologie médicale par Arthur C. Guyton, Doin éditeur-Paris, 1989)

Toutefois, la taille des molécules n'est pas le seul facteur influençant la filtration glomérulaire: la charge et la concentration sont également impliquées. Ainsi, une protéine d'un poids moléculaire de 70 kDa sera peu filtrée dans des conditions normales, mais si la concentration plasmatique de

cette molécule augmente, son taux de filtration augmentera proportionnellement.

La synthèse des enzymes fibrinolytiques par les différentes cellules du système urinaire assure le maintien de la fluidité en prévenant la formation d'agrégats dans les structures fines du rein, assurant ainsi le bon fonctionnement de cet organe. Les activateurs du plasminogène, t-PA et u-PA, ainsi qu'un inhibiteur, le PAI-1, sont synthétisés par les cellules endothéliales et épithéliales des glomérules [59,60,61]. L'u-PA est également synthétisée par les cellules tubulaires [59,60]. Le rapport élevé (24) de u-PA/PAI-1 dans le glomérule entraîne une condition profibrinolytique défavorisant la formation de microthrombi [61].

La synthèse des composantes du système fibrinolytique par les cellules rénales est modifiée par certaines molécules. Ainsi, la thrombine [52], l'IL-1, l'IL-6 et le TNF [53] augmentent le taux de synthèse de l'u-PA, alors que le TGF β -1 augmente le taux de synthèse du PAI-1 et diminue celui de l'u-PA et du t-PA [62].

1.6 Érythropoïétine et TDP urinaires

Les produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine (TDP) ne sont présents dans l'urine de sujets sains qu'en très faibles quantités. En effet, chez des sujets sains, l'intégrité de la fonction rénale limite d'une part la filtration rénale des TDP plasmatiques, en raison de leur poids moléculaire élevés et, d'autre part, la formation de TDP intra-glomérulaires en raison d'une coagulation normale [63], de sorte que les TDP urinaires ne peuvent

être filtrés en grande quantité dans l'urine de sujets sains. Le dosage de ces molécules est par conséquent de plus en plus utilisé pour l'évaluation des atteintes glomérulaires dans certaines pathologies rénales. Ainsi, un taux de TDP urinaires élevé peut indiquer soit une détérioration de la paroi des capillaires glomérulaires (accompagnée d'un taux élevé de protéines urinaires) ou un débalancement de l'hémostase rénale entraînant une production intra-glomérulaire de TDP (accompagnée d'un taux normal de protéines urinaires). D'autres conditions comme, par exemple, une augmentation de la concentration plasmatique des TDP ou une augmentation de la perméabilité glomérulaire, pourraient, éventuellement, entraîner un taux élevé de TDP urinaires, sans toutefois indiquer une pathologie rénale.

En effet, la filtration rénale des molécules plasmatiques dépend en partie de leurs tailles et en partie de leurs concentrations. À des concentrations physiologiques, les TDP plasmatiques ne sont filtrés qu'en quantités infimes dans l'urine; toutefois, une augmentation de la concentration plasmatique peut entraîner un taux de filtration plus élevé. L'étude de Taylor et al. [35] ayant mis en évidence une augmentation des TDP plasmatiques lors d'un traitement à l'EPO, il est possible que dans ces conditions les TDP soient filtrés en quantité plus importante dans l'urine. La filtration rénale, sensible également à la perméabilité des capillaires glomérulaires, peut être modifiée sous l'action de certaines molécules, dont l'IL-1 et l'IGF-1, entraînant possiblement la filtration de molécules plasmatiques. Il est important de souligner que dans ces conditions le taux de protéines urinaires serait également élevé. Certaines études [64,65] ont souligné qu'un traitement à l'EPO n'affecte pas le taux de filtration glomérulaire. Cependant, la fraction filtrée semble augmenter en raison de la

diminution du débit sanguin consécutive à l'augmentation de l'hématocrite et de la viscosité [65].

Les TDP urinaires peuvent également provenir d'une production intra-rénale suite à un déséquilibre des systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse. Bien que certaines études soient contradictoires, il est possible que la synthèse intra-rénale des enzymes de la coagulation et/ou de la fibrinolyse soit modifiée en présence d'EPO exogène, conduisant ainsi à une production intra-rénale de TDP. L'action de l'EPO sur la synthèse des enzymes fibrinolytiques par les cellules rénales pourrait être directe ou indirecte suite à l'action de la thrombine [52], de l'IL-1, l'IL-6 ou encore du TNF [53].

L'augmentation des TDP urinaires observée en présence d'EPO exogène peut donc provenir soit d'une augmentation de la filtration rénale des TDP plasmatiques suite à une surcharge plasmatique ou à une modification de la filtration rénale, soit d'une production intra-rénale de TDP suite à un déséquilibre des systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse.

1.7 Objectifs

Les TDP urinaires ont deux origines possibles: intra-rénale et/ou intra-vasculaire. Dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous explorerons la filtration rénale des TDP plasmatiques afin de déterminer si les TDP urinaires retrouvés en présence d'EPO proviennent d'une filtration rénale des TDP plasmatiques. Nous explorerons également la fibrinolyse rénale afin de déterminer si l'EPO modifie l'équilibre coagulation/fibrinolyse conduisant à

une production intra-rénale de TDP et, par conséquent, à un taux élevé de TDP urinaires.

La filtration rénale des TDP plasmatiques sera étudiée chez différents groupes de sujets (humains et animaux) afin de vérifier l'effet:

- 1) d'une surcharge plasmatique en TDP (animaux sédentaires, animaux entraînés et sujets humains sous traitement fibrinolytique)
- 2) d'une augmentation de la perméabilité glomérulaire (IGF-1) (animaux sédentaires)
- 3) d'une augmentation dans la fraction filtrée sous traitement à l'EPO (animaux sédentaires et animaux entraînés)

La fibrinolyse rénale sera également étudiée chez différents groupes de sujets afin de déterminer si l'administration d'EPO entraîne un déséquilibre dans les systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse, conduisant à la formation de TDP intra-rénale. Cette étude sera effectuée chez un groupe d'athlètes de niveau international, un groupe d'athlètes traité à l'EPO et chez un groupe d'athlètes à l'occasion d'un séjour en altitude.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Étude de la filtration rénale

Pour étudier la filtration rénale des TDP plasmatiques nous avons utilisé des rats Sprague-Dawley mâles, auxquels nous avons administré des concentrations connues de TDP humains dans la circulation sanguine. Le dosage des TDP dans l'urine après un temps de 90 minutes (temps nécessaire à l'obtention d'au moins 700 μ l d'urine) a permis de vérifier si les TDP plasmatiques étaient filtrés dans l'urine. Les rats ont été divisés en plusieurs groupes afin d'étudier diverses conditions:

- 1) un groupe de rats sédentaires
- 2) un groupe de rats à l'exercice (nage de 90 minutes par jour, 5 jours/semaines, pendant 8 semaines)
- 3) un groupe de rats traités à l'EPO (injection d'un bolus de 1000 U/Kg 5 jours avant l'expérimentation)
- 4) un groupe de rats traités à l'IGF-1
- 5) un groupe de rats traités à la streptokinase

Des sujets humains, sous traitement fibrinolytique à la suite d'un infarctus, ont également été étudiés afin d'explorer la filtration rénale des TDP plasmatiques. Le dosage des TDP urinaires, 1 heure 30 et 24 heures après le début du traitement, a permis de vérifier les résultats obtenus chez le rat, le

traitement fibrinolytique (administration de streptokinase) entraînant un taux élevé de TDP plasmatiques.

2.1.1 Préparation des TDP

Les euglobulines, contenant le fibrinogène, le plasminogène ainsi que les activateurs du plasminogène, furent utilisées afin de préparer les produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine (TDP).

Le sang, prélevé sur acide citrique dextrose (Becton Dickinson, #4816), fut centrifugé 2 minutes à 1000 g (Sero-fuge) afin de recueillir 1 ml de plasma. Le plasma fut déposé dans 14 ml d'eau distillée froide (4°C) contenant 0,2 ml d'une solution d'acide acétique glacial 2% v/v (Fisher Scientifique), incubé de 3 à 5 minutes à 4°C et centrifugé 3 minutes à 2000 rpm. Le surnageant fut décanté et le culot d'euglobulines resuspendu dans 1 ml de tampon Véronal d'Owren (Fibriquik, Organon Teknika).

Pour obtenir des TDP (FbDP), 10 µl de thrombine (1.112 U/ml) (Sigma, # T-9000) furent ajoutés à 300 µl d'euglobulines et incubés pendant 15 minutes à 37°C. Lorsque le caillot de fibrine fut bien formé, nous ajoutâmes 20 µl de plasmine (0,5 mg/ml) (American Diagnostica inc., #421). Pour une digestion complète du caillot de fibrine, celui-ci fut incubé toute la nuit à 37°C.

2.1.2 Dosage des produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine

Le dosage des produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine fut effectué par technique ELISA. Différentes troupes d'un même fournisseur

(Organon Teknika) furent utilisées selon le type de produits de dégradation à doser. Les trousse Fibrinostika TDP, Fibrinostika FbDP et Fibrinostika FgDP furent utilisées pour doser respectivement les TDP, FbDP et FgDP. La procédure décrite ci-dessous convient aux différentes trousse.

Solutions

Tampon phosphate:	diluer 1/25 avec de l'eau distillée
Tampon peroxyde/substrat:	dissoudre le comprimé de peroxyde d'urée dans 10 ml d'eau, déposer 1 ml de la solution de peroxyde d'urée dans le flacon de tampon-substrat
Conjugué:	Ajouter 6 ml de tampon phosphate
Standard 900:	Ajouter 1,5 ml de tampon phosphate
Substrat TMB:	Ajouter 0,5 ml de tampon peroxyde/substrat et 0,1 ml de solution de TMB à 5 ml d'eau distillée

Les étalons furent préparés en effectuant une série de dilutions au 1/3 (1/3, 1/9, 1/27, 1/81) d'un échantillon étalon 900 avec le tampon phosphate. Un volume de 100 μ L d'étalon, de témoin négatif (tampon phosphate) ou d'échantillon fut déposé dans les barquettes Microelisa. Les barquettes furent recouvertes d'un feuillet adhésif et incubées 15 minutes à 37°C. Après la période d'incubation chaque cupule fut lavée à 4 reprises avec le tampon phosphate. Après le dernier lavage, 100 μ L de conjugué fut ajouté dans chaque cupule. Les barquettes furent recouvertes d'un nouveau feuillet adhésif et incubées 15 minutes à 37°C. Après la période d'incubation chaque cupule fut lavée à 4 reprises avec le tampon phosphate. Après le dernier lavage, 100 μ L de substrat TMB fut ajouté dans chaque cupule. Les barquettes furent incubées 10 minutes à 37°C sans être recouvertes. La réaction fut

arrêtée en ajoutant 100 μ L d'acide sulfurique 2N (Baker Analysed) et l'absorbance de la solution lue à 450 nm.

2.1.3 Canulation

Les animaux furent anesthésiés (Somnotol, pentobarbital de sodium, 50 mg/kg, MTC Pharmaceuticals) avant de procéder à une laparotomie. La veine iliaque commune fut dégagée afin d'y insérer un cathéter (polyethylene tubing PE-50, Intramedic, Becton Dickinson) par lequel furent injectés 200 μ l d'héparine (Hepalean, héparine sodique, 1000 U/ml, Organon Teknika), ainsi que 100 μ l de la préparation de TDP. Des prélèvements sanguins et urinaires furent effectués 10 et 90 minutes après l'administration des TDP humains.

2.1.4 Perfusion

Calibration de la pompe de perfusion

La pompe à perfusion (Harvard apparatus 22) fut calibrée avec des seringues de 5 ml pour permettre un débit de 2 ml/hre. Pour une période d'expérimentation de 90 min, 4 ml de perfusat furent préparés et transférés dans les seringues de 5 ml ayant servi à la calibration. Les seringues furent ajustées sur la pompe à perfusion et reliées aux cathéters.

Perfusion d'IGF-I

Un bolus de 150 μ g/Kg d'IGF-I (recombinant human insulin-like growth factor-I, GroPrep Pty Ltd) fut injecté 10 minutes après l'administration

de la solution de TDP. Par la suite, un soluté contenant de l'IGF-I en quantité assurant un taux de $8.3 \mu\text{g}/\text{Kg}\cdot\text{min}^{-1}$ fut perfusé à un débit de 2 ml/hre.

Perfusion de streptokinase

Un bolus de 3125 U/Kg de streptokinase (Streptase, Hoechst) et de 62,5 U/Kg d'héparine fut injecté 10 minutes après l'administration de la solution de TDP. Par la suite, un soluté contenant de la streptokinase ($1875 \text{ U}/\text{Kg}\cdot\text{hre}^{-1}$), de l'héparine ($12,5 \text{ U}/\text{Kg}\cdot\text{hre}^{-1}$) et de l'aspirine (2 mg/Kg) fut perfusé à un débit de 2 ml/hre.

2.2 Étude de la fibrinolyse rénale

L'effet de l'EPO endogène et exogène sur la fibrinolyse rénale, fut étudié en mesurant les TDP, l'u-PA, le t-PA et le PAI-1 urinaires chez des athlètes de niveau international, des athlètes traités à l'EPO (5 injections de 150 U/kg au jours 0, 2, 4, 7 et 10) et chez des athlètes séjournant en altitude. De plus, la mise au point d'un protocole de culture *in vitro* de cellules rénales permettra, éventuellement, de vérifier les résultats obtenus chez ces sujets.

2.2.1 Dosage de l'urokinase

Le dosage de l'urokinase (u-PA) fut effectué par une méthode analytique de type ELISA reconnaissant la pro-uPA, l'u-PA, le complexe u-PA/inhibiteur ainsi que l'u-PA liée à son récepteur (IMUBIND® uPA, American Diagnostica inc., #894).

Solutions

Étalons: reconstituer les étalons avec 1 ml d'eau distillée
sauf l'étalon 0 qui est reconstitué avec 2 ml d'eau
distillée

Anticorps de détection: ajouter 5 ml d'eau distillée

Tampon de dilution pour le conjugué : Ajouter 55 ml d'eau distillée au flacon de diluant
du conjugué

Tampon de lavage: Dissoudre le contenu d'un sachet de PBS dans 900
ml d'eau distillée, ajouter 4 ml d'une solution 25%
de Triton X-100, compléter à 1 litre

Tampon de dilution pour les échantillons: Dissoudre 1 g de BSA dans 100 ml de tampon de
lavage

Un volume de 100 μ L de tampon phosphate (blanc), d'étalons ou d'échantillons fut déposé dans les barquettes. Les barquettes furent recouvertes et incubées toute la nuit à 4°C dans une chambre humide. Les échantillons d'urine furent dilués 1/50 et 1/100 dans le tampon de dilution. Après la période d'incubation, chaque cupule fut lavée 4 fois avec le tampon de lavage. Après le dernier lavage, 100 μ L d'anticorps de détection fut ajouté à chaque cupule. Les barquettes furent recouvertes et incubées 1 heure à la température ambiante. Après la période d'incubation, chaque cupule fut lavée 4 fois avec le tampon de lavage. Après le dernier lavage, 100 μ L de conjugué dilué (10 μ L de conjugué dans 11 ml de tampon de dilution pour le conjugué) fut ajouté. Les barquettes furent recouvertes et incubées 1 heure à

la température ambiante. Après la période d'incubation, chaque cupule fut lavée 4 fois avec le tampon de lavage. Après le dernier lavage, 100 μ L de substrat furent ajoutés. Les barquettes furent recouvertes et incubées 20 minutes à la température ambiante. La réaction fut arrêtée en ajoutant 50 μ L d'acide sulfurique 1N (Baker) et l'absorbance de la solution lue à 450 nm.

2.2.2 Dosage du t-PA

Le dosage du t-PA a été effectué par une méthode ELISA reconnaissant le t-PA libre. Les complexes t-PA/inhibiteurs n'étant pas reconnus, cette trousse mesure uniquement le t-PA actif (IMUBIND® free tPA, American Diagnostika inc., #161).

Solution

Conjugué: Ajouter 0,4 ml de chromogène à 10 ml de tampon-substrat

Un volume de 20 μ l de conjugué fut déposé dans chaque cupule, ainsi que 100 μ l d'étalons ou d'échantillons. Les barquettes furent agitées doucement et incubées 60 minutes à la température ambiante. Après la période d'incubation, chaque cupule fut lavée 4 fois avec de l'eau distillée. Un volume de 100 μ l de substrat fut déposé dans chaque cupule, les barquettes recouvertes et incubées 10 minutes à la température ambiante. La réaction fut arrêtée en ajoutant 100 μ l d'acide sulfurique 1N. Après une période d'attente de 5 minutes, la lecture de l'absorbance de la solution fut effectuée à 450 nm.

2.2.3 Dosage du PAI-1

Le dosage du PAI-1 a été effectué par une méthode ELISA reconnaissant le PAI-1 libre ainsi que les complexes t-PA/PAI-1 et u-PA/PAI-1 (IMUBIND® Plasma PAI-1, American Diagnostika inc., #822-1S).

Solutions

Étalon: reconstituer avec 0,5 ml d'eau distillée les étalons "40" et "0"

Courbe d'étalonnage: effectuer les dilutions suivantes:

Étalon "40" (μ l)	Étalon "0" (μ l)	PAI-1 (ng/ml)
0	100	0
25	75	10
50	50	20
100	0	40

Tampon PET: dissoudre le contenu du sachet dans 1L d'eau distillée

Conjugué: reconstituer avec 7 ml de tampon PET

Substrat: dissoudre le comprimé dans 3 ml d'eau distillée; après dissolution complète du comprimé, ajouter 21 ml d'eau pour un volume final de 24 ml

Substrat/
peroxyde: Ajouter 10 μ l de peroxyde d'hydrogène 30% à 24 ml de substrat

Les barquettes furent lavées une fois avec du tampon PET. Un volume de 50 μ l de tampon PET fut déposé dans chaque cupule ainsi que 20 μ l de tampon PET (blanc), d'étalons ou d'échantillons. Les barquettes furent incubées 60 minutes à température ambiante avec agitation constante. Par la suite, un volume de 50 μ l de conjugué fut ajouté (ne pas vider les cupules). Les barquettes furent incubées 60 minutes à température ambiante avec agitation constante. Chaque cupule fut lavée 4 fois avec le tampon PET et après le dernier lavage, 200 μ l de substrat/peroxyde fut déposé dans chaque cupule. Les barquettes furent incubées 12 minutes à température ambiante avec agitation constante. La réaction fut arrêtée en ajoutant 50 μ l d'acide sulfurique 9N (Baker) et l'absorbance de la solution lue à 492 nm.

2.2.4 Culture de cellules épithéliales glomérulaires

La mise au point d'une technique d'isolation des cellules épithéliales glomérulaires, cellules synthétisant les enzymes fibrinolytiques, et leur culture en présence ou non d'EPO, permettra, éventuellement, d'étudier l'effet de cette hormone sur la synthèse des enzymes fibrinolytiques.

Les principales solutions nécessaires à la culture cellulaire furent préparées ainsi:

Solutions

- Antibiotiques:** Préparer une solution de PBS 1X pH 7,4 contenant 5 mg/ml de streptomycine et 3 mg/ml de pénicilline pour obtenir une concentration finale dans le RPMI 1X de 38 U/ml et 50 U/ml respectivement. Filtrer sur un filtre millipore 0,22 μ m afin de stériliser. Conserver à 4°C.
- HEPES 1M:** Dissoudre dans du PBS pH 7.4 et filtrer sur un filtre millipore 0,22 μ m. Conserver à 4°C.
- Milieu de culture:** RPMI 1640 sans bicarbonate de sodium avec l-glutamine (Sigma, #R6504)
- RPMI 2X incomplet:** Dissoudre le contenu d'un sachet dans 300 ml d'eau distillée, ajouter 2,2 g de NaHCO₃, agiter 30 minutes. Ajouter graduellement 4,2 ml de HCl 1M, agiter 30 minutes. Stériliser sur filtre millipore 0,22 μ m. Ajouter 20 ml d'HEPES 1M stérile pour une concentration finale de 20 mM dans le RPMI 1X. Ajouter 20 ml d'antibiotiques stériles, compléter à 500 ml avec de l'eau distillée stérile. Conserver à 4°C.
- RPMI 1X incomplet:** Diluer 1/2 le RPMI 2X incomplet avec de l'eau distillée stérile. Conserver à 4°C.
- RPMI 1X complet:** Diluer 1/2 le RPMI 2X incomplet avec de l'eau distillée stérile et du sérum de veau foetal (concentration finale de 20%). Conserver à 4°C.
- Bleu de Trypan:** Dissoudre 0,4% de bleu de trypan dans du PBS à pH 7.4 stérile. Conserver à température ambiante.

Collagénase:	Préparer une solution de 750 U/ml dans du RPMI 1X incomplet.
Solution trypsine-EDTA:	Dissoudre 0,12 g de trypsine et 0,025 g d'EDTA dans 100 ml de PBS pH 7.4, filtrer sur filtre millipore 0,22 μm . Conserver à 4°C.

Méthode:

Isolation des cellules épithéliales glomérulaires

Le rein fut décapsulé et le cortex séparé de la médulla. Le cortex fut rincé 3 fois avec du RPMI incomplet, coupé en petits fragments et pressé, à l'aide d'une spatule, sur un filtre en nylon de 210 μm (Small parts, #CMN-210). Les tissus retenus sur le filtre furent rincés abondamment afin de recueillir le maximum de glomérules. La suspension fut filtrée successivement sur 100 μm et 45 μm , les glomérules étant retenus sur le filtre de 45 μm (Small parts, #CMN-100, CMN-45) (Figure 14). Les glomérules recueillis furent resuspendus dans 2 ml de solution de collagénase 750 U/ml, agités et incubés environ 30 minutes à 37°C, 5% CO₂. Après la période d'incubation, 2 ml de RPMI 1X complet furent ajoutés à la suspension de glomérules afin d'inhiber la collagénase. Finalement, la suspension de glomérules fut filtrée sur 25 μm (Small parts, #CMN-25) afin de retenir les glomérules non-digérés, le filtrat contenant les cellules épithéliales glomérulaires.

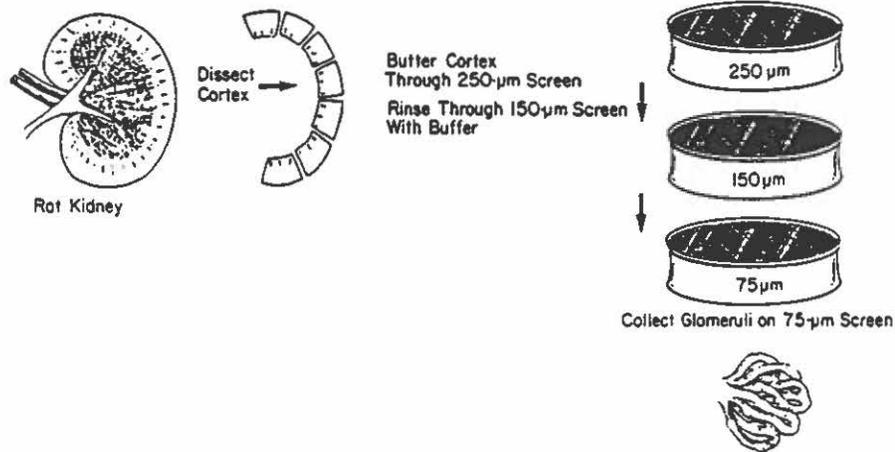


Figure 14. Purification des cellules épithéliales glomérulaires

Les cellules épithéliales glomérulaires furent déposées dans des pétris stériles de 35 mm enduits de fibronectine (Sigma, #F-5022) à un compte de 10^5 cellules/ml et incubées à 37°C , 5% CO_2 jusqu'à confluence (le maximum de croissance étant observé au 6^{ème} jour). Le milieu de culture fut changé à tous les 3 jours.

Les cellules épithéliales fixées au pétri sont petites, polyédriques et jointives. Lorsque les cellules eurent atteint la confluence, elles furent détachées du pétri et réparties dans plusieurs pétris afin de permettre aux cellules de croître puisque la confluence inhibe la croissance des cellules.

Passage des cellules

Lorsque les cellules eurent atteint la confluence, le milieu de culture fut jeté. Le pétri fut rincé successivement avec du PBS stérile et de la solution trypsine-EDTA. Le pétri fut ensuite incubé 5 minutes à 37°C , 5% CO_2 . Les cellules furent détachées et resuspendues dans 2 ml de RPMI 1X complet. Le

compte de cellules ajusté à 10^5 cellules/ml fut réparti en plusieurs pétris (1,5 ml / pétri) afin de poursuivre la culture.

Effet de l'EPO sur l'activité fibrinolytique des cellules épithéliales glomérulaires

Au 3^{ième} passage, les cellules furent resuspendues dans une plaque de 12 puits (1 ml/puit) et incubées jusqu'à confluence. Les cellules adhérentes furent lavées 3 fois avec du RPMI 1X complet et incubées 24 heures à 37°C, 5% CO₂ avec l'EPO ou le véhicule dans 1 ml de RPMI 1X complet. Après la période d'incubation, le surnageant fut recueilli et les enzymes fibrinolytiques dosées.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

La présentation des résultats se divise en trois volets, soit l'analyse des TDP urinaires, l'analyse de la filtration rénale et l'analyse de la fibrinolyse rénale. Le premier volet indique les valeurs des TDP urinaires chez des athlètes de niveau international, permettant ainsi de déterminer la norme à l'effort et de mettre en relief certaines valeurs anormales. Le deuxième volet permet de déterminer une possible provenance plasmatique des TDP urinaires, alors que le troisième volet explore la fibrinolyse rénale comme mécanisme de formation des TDP urinaires en présence d'EPO.

3.1 Étude des TDP urinaires

Nous avons mesuré les TDP urinaires chez des athlètes de niveau international provenant de diverses disciplines d'endurance telles le marathon, le squash, l'athlétisme et le cross-country. Ces analyses ont permis, dans un premier temps, d'établir des valeurs de référence pour les TDP urinaires chez des sujets après effort, et ce pour chaque discipline (Figure 15; colonnes hachurées). Ces analyses ont également permis d'identifier 14 athlètes présentant des valeurs de TDP urinaires anormales (Figure 15; colonnes claires). Un prélèvement urinaire hors compétition chez ces mêmes sujets démontre un retour à la norme pour les valeurs de TDP urinaires (Figure 15; colonnes noircies) [67].

Afin de s'assurer que cette variation n'était pas dû à une déficience de la fonction rénale, ces résultats ont été présentés en valeurs corrigées, les paramètres de correction étant les protéines urinaires, la créatinine urinaire ainsi que la densité de l'urine. Le profil est comparable que les valeurs de TDP urinaires soient corrigées ou non.

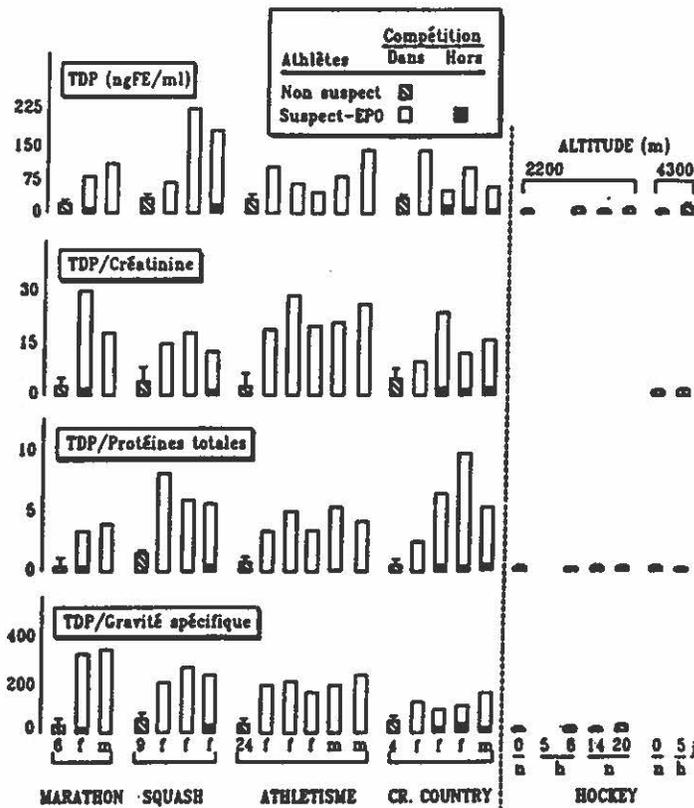


Figure 15. TDP urinaires chez des athlètes de niveau international et chez des sujets séjournant en altitude. Les chiffres inscrit sous les colonnes hachurées indiquent le nombre d'athlètes non-suspect utilisé pour établir la norme. Les lettres f et m quant à elles indiquent le sexe (f=femelle, m=mâle) des athlètes suspectés d'abus d'EPO représentés individuellement par les colonnes claires.

Nous avons également mesuré les TDP urinaires chez des athlètes suite à un entraînement en moyenne (2200 m) et haute altitude (4300 m). Les résultats obtenus dans cette étude, indiquent qu'un entraînement à ces altitudes n'entraîne aucune variation des TDP urinaires (Figure 15).

3.2 Étude de la filtration rénale

Une étude effectuée chez le rat, telle que décrite à la section 2.1, a permis dans un premier temps de déterminer si les TDP plasmatiques traversent la paroi des capillaires glomérulaires pour se retrouver dans l'urine. L'administration de TDP humains dans la circulation sanguine de rats, et la recherche de ces TDP dans l'urine après un délai de 90 minutes, a permis d'étudier la filtration rénale des TDP plasmatiques. Les tableaux 4 à 8 présentent les concentrations des TDP plasmatiques administrées au temps 0 (valeurs initiales) ainsi que les concentrations de TDP plasmatiques et urinaires 90 minutes après l'administration des TDP humains. Puisque l'anticorps utilisé pour mesurer les TDP ne reconnaît que l'antigène d'origine humaine, nous n'avons pas inclus les valeurs des TDP urinaires initiales dans les différents tableaux, celles-ci étant toujours nulles. Dans chacun des tableaux, on observe une chute significative ($p < 0,001$) des TDP plasmatiques après une période de 90 minutes, alors qu'aucune variation significative n'est observée dans les TDP urinaires.

Les résultats présentés dans le tableau 4 indiquent qu'en dépit d'une surcharge importante en TDP plasmatiques (1186 ± 308 ng/ml), ceux-ci ne sont filtrés qu'en quantité infime dans l'urine de 2 des 5 rats sédentaires.

<i>Rats sédentaires</i>	Concentration de TDP (ng/ml)		
	PLASMA		URINE
	Initiale	90 minutes	90 minutes
1	1377,6	976,3	9,3
2	804,0	352,1	11,1
3	1450,3	756,7	0,0
4	1397,1	822,3	0,0
5	899,2	503,3	0,0
Moyenne	1186 ± 308	682 ± 251	-

Tableau 4. Concentration des TDP humains dans le plasma et l'urine de rats sédentaires.

Les résultats présentés dans les tableaux 5 et 6, indiquent des valeurs indétectables de TDP urinaires chez des rats ayant subi un exercice physique intense (Tableau 5) ou traités à l'EPO (1000 U/kg) (Tableau 6), et ce malgré la surcharge plasmatique en TDP.

<i>Rats entraînés</i>	Concentration de TDP (ng/ml)		
	PLASMA		URINE
	Initiale	90 minutes	90 minutes
1	787,9	497,5	0,0
2	333,6	197,0	0,0
MOY	560,8 ± 321,2	347,3 ± 212,5	-

Tableau 5. Concentration de TDP humains dans le plasma et l'urine de rats entraînés.

<i>Rats EPO</i>	Concentration de TDP (ng/ml)		
	PLASMA		URINE
	Initiale	90 minutes	90 minutes
1	14386,4	1370,0	0,0
2	17364,8	2234,4	0,0
3	14541,2	1221,4	0,0
MOY	15430,8 ± 1678	1608,6 ± 547	-

Tableau 6. Concentration des TDP humains dans le plasma et l'urine de rats traités à l'EPO 1000 U/kg.

Une modification de la perméabilité des capillaires glomérulaires entraîne possiblement une modification de la filtration rénale et, par conséquent, de la taille des protéines plasmatiques pouvant être filtrées dans l'urine. Nous avons donc administré à des rats sédentaires de l'IGF-I, hormone reconnue pour entraîner une hyperfiltration tant chez le rat que chez l'humain [67]. Les résultats du tableau 7 indiquent que malgré la surcharge plasmatique de 7676 ± 916 ng/ml l'IGF-1 n'entraîne aucune augmentation dans la filtration rénale des TDP.

<i>Rats IGF-I</i>	Concentration de TDP (ng/ml)			
	PLASMA		URINE	
	Initiale	90 minutes	45 minutes	90 minutes
1	7300,0	1672,9	0,0	0,0
2	8720,0	1251,9	0,0	0,5
3	7008,0	860,7	0,0	0,0
MOY	7676 ± 916	1262 ± 406	-	-

Tableau 7. Concentration des TDP humains dans le plasma et l'urine de rats sédentaires traités à l'IGF-I.

L'ensemble des résultats obtenus chez le rat semble indiquer que les TDP plasmatiques, même en très grande quantité (20 fois supérieur à la valeur maximale) ne sont pas filtrés dans l'urine. Toutefois, avant d'extrapoler ces résultats aux humains, certaines vérifications s'imposent. L'utilisation de sujets humains sous traitement fibrinolytique, traitement entraînant une production importante de TDP plasmatiques, se compare au modèle décrit précédemment. La mesure des TDP plasmatiques 60 et 120 minutes après le début du traitement, tout comme celle des TDP urinaires 90 minutes et 24 heures après le traitement, ont permis de déterminer si, chez l'humain, les TDP plasmatiques sont filtrés dans l'urine. Une étude préliminaire effectuée chez 3 sujets démontre la présence d'une concentration importante de TDP urinaires 90 minutes après le début du traitement fibrinolytique pour chacun des sujets (Tableau 8), ceux-ci étant composés majoritairement de FgDP (Tableau 9).

Sujets humains	Concentration des TDP (ng/ml)			
	PLASMA		URINE	
	1 hre	2 hres	1 hre 30	24 hres
1	335 580	263 000	180,8	0,6
2	-	258 890	2553,5	2,1
3	222 860	-	24,1	-

- absence de prélèvement

Tableau 8. Concentration des TDP dans le plasma et l'urine de sujets humains sous traitement fibrinolytique.

Sujets humains	Concentration urinaire au temps 1 hre 30 (ng/ml)		
	TDP	FbDP	FgDP
1	180,8	13,0	156
2	2553,5	117,6	5436
3	24,09	12,4	23,3

Tableau 9. Concentration en TDP, FbDP et FgDP dans les urines de sujets humains 1 hre 30 après le début du traitement fibrinolytique.

Considérant la différence entre les résultats obtenus chez les sujets humains et chez le rat, nous avons reproduit chez des rats le traitement fibrinolytique appliqué chez l'humain (traitement à la streptokinase) afin de déterminer si ce traitement modifie soit la filtration rénale ou encore la taille des TDP plasmatiques formés, entraînant ainsi la filtration des TDP dans l'urine.

Rats streptokinase	Concentration en produits de dégradation (ng/ml)				
	PLASMA		URINE 90 minutes		
	TDP initiale	TDP 90 minutes	TDP	FbDP	FgDP
1	301,1	34,4	0,0	-	-
2	-	90,1	0,0	-	-
3	536,1	60,0	3,6	-	-
4	1173,7	98,7	20,4	7,7	25,6
5	294,4	52,5	0,0	-	-
6	259,7	32,3	0,6	-	-
7	324,8	47,1	0,0	-	-
8	856,1	152,6	3,2	1,1	2,4
MOY	549,3 ± 340,7	59,3 ± 26,0	-	-	-

Tableau 10. Concentration en TDP, FbDP et FgDP humains chez des rats sous traitement fibrinolytique.

Les résultats présentés au tableau 10 démontrent que peu de TDP se retrouvent dans l'urine de rats traités à la streptokinase et, lorsque ceux-ci sont présent, ils sont composés principalement de FgDP.

3.3 Étude de la fibrinolyse rénale

Afin d'étudier la fibrinolyse rénale, nous avons mesuré le t-PA, l'u-PA et le PAI-1 urinaire chez différents sujets. Suite à certains problèmes techniques dans le dosage du PAI-1 et du t-PA, nous avons utilisé principalement l'u-PA comme indicateur de la fibrinolyse rénale. Le t-PA urinaire s'est avéré des plus instables, alors que le PAI-1 ne peut être mesuré dans l'urine en raison de diverses interférences incontournables. L'u-PA urinaire, quant à elle, est d'une grande stabilité comme le démontre une

étude effectuée sur des urines conservées à 4, 22 et 37°C pendant 6 jours (Figures 16, 17, 18).

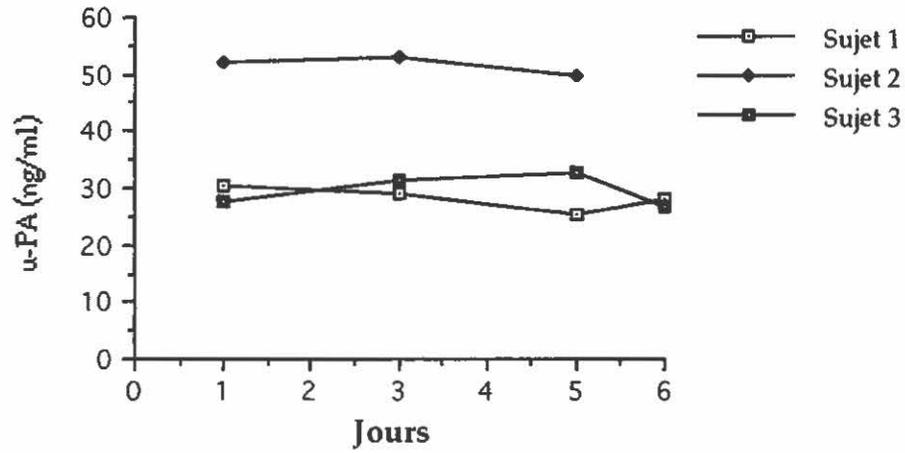


Figure 16. Stabilité de l'u-PA urinaire lors d'une conservation à 4°C.

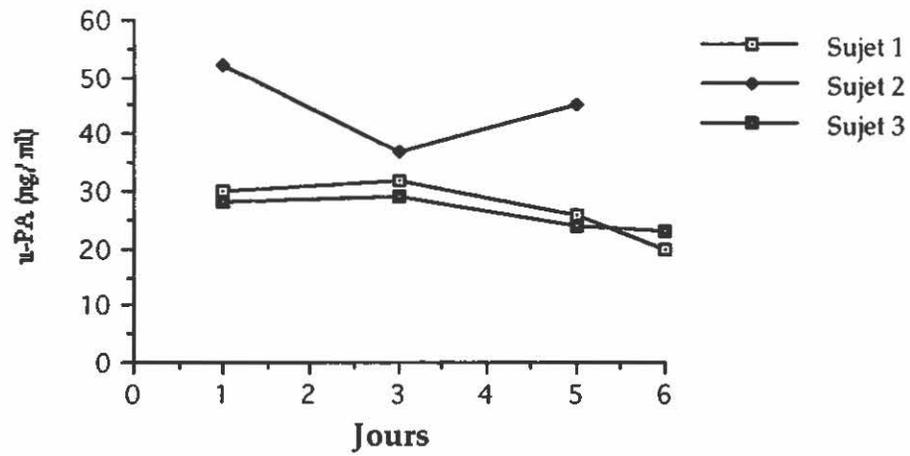


Figure 17. Stabilité de l'u-PA urinaire lors d'une conservation à 22°C.

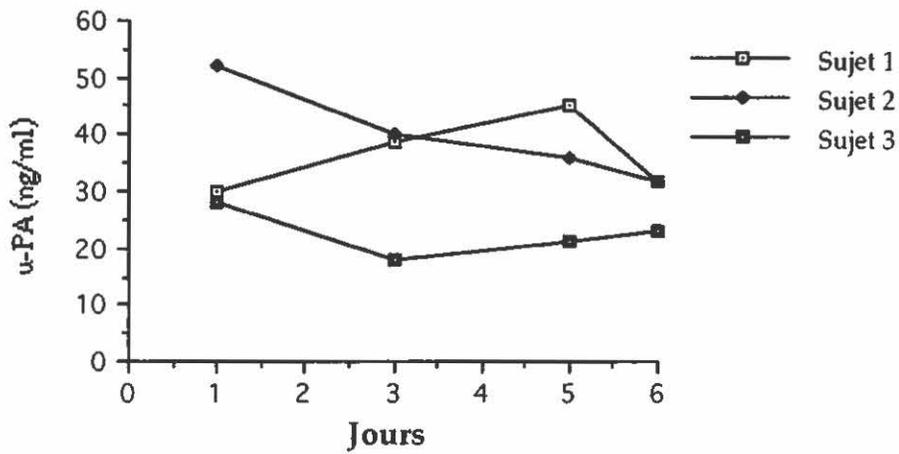


Figure 18. Stabilité de l'u-PA urinaire lors d'une conservation à 37°C.

L'étude de la fibrinolyse rénale chez des athlètes de niveau international nous a permis, dans un premier temps de déterminer la norme chez ce type de sujets (Tableau 11) pour les valeurs de TDP et d'u-PA urinaires. Cette étude nous a également permis de mettre en évidence 5 athlètes suspectés d'abus d'EPO en raison des valeurs de TDP urinaires anormalement élevées (Tableau 12).

Sujets	TDP (ng/ml)	u-PA (ng/ml)
1	6,0	1,0
2	7,8	?
3	3,1	15,1
4	2,7	3,7
5	3,1	5,9
6	3,8	11,7
7	3,8	0,4
8	3,4	1,5
9	3,4	3,0
10	1,1	1,0
11	0,0	12,3
12	5,9	7,2
13	4,3	1,2
14	2,5	2,6
15	3,3	15,7
16	4,6	2,0
17	7,2	0,0
18	11,4	6,8
19	2,7	11,1
20	3,9	13,1
21	3,5	3,8
22	3,3	8,7
23	1,5	7,2
MOY	4,0 ± 2,4	6,1 ± 5,0

Tableau 11. Concentration urinaire de TDP et d'u-PA chez des athlètes de niveau international en compétition.

L'analyse de l'u-PA dans l'urine d'athlètes suspectés d'abus d'EPO démontre des valeurs significativement élevées ($p=0,0077$) pendant la compétition ($22,8 \pm 10,1$ ng/ml) par rapport à la norme ($6,1 \pm 5,0$ ng/ml) (Tableau 12), alors qu'un dosage hors-compétition des TDP et de l'u-PA

urinaires de ces mêmes athlètes indique un retour à la norme ($5,1 \pm 3,1$ ng/ml et $4,9 \pm 4,6$ ng/ml).

Athlètes suspects	TDP (ng/ml)		u-PA (ng/ml)	
	compétition	hors compétition	compétition	hors compétition
1	96,1	3,7	30,0	4,2
2	48,8	1,3	31,5	2,8
3	60,7	5,6	?	1,8
4	79,6	5,1	9,9	2,6
5	173,3	9,7	19,9	12,9
MOY	91,7 ± 49,1	5,1 ± 3,1	22,8 ± 10,1	4,9 ± 4,6

Tableau 12. Concentration de TDP et d'u-PA urinaires chez des athlètes suspectés d'abus d'EPO mesurés en compétition et hors compétition.

Suite à ces résultats, nous avons mesuré les TDP et l'u-PA urinaires chez des sujets humains ayant reçu 5 injections d'EPO (150 U/kg au jours 0, 2, 4, 7 et 10). Les résultats semblent indiquer que l'EPO n'entraîne aucune variation significative de la synthèse d'u-PA par rapport au groupe témoin (Figure 19). Toutefois il est important de noter que l'hématocrite et les TDP urinaires chez ces mêmes sujets n'augmentent pas de façon significative suite au traitement à l'EPO (Figure 20).

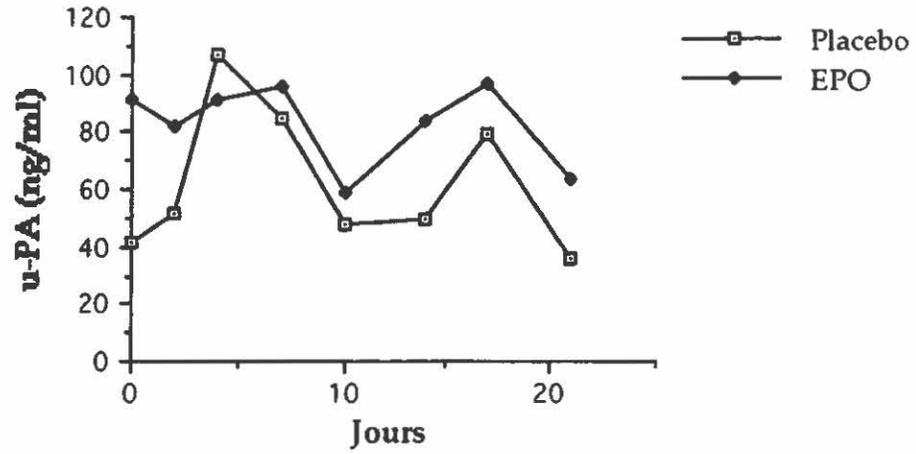


Figure 19. Variation de l'u-PA urinaire chez un groupe de sujets témoins et un groupe de sujets traités à l'EPO.

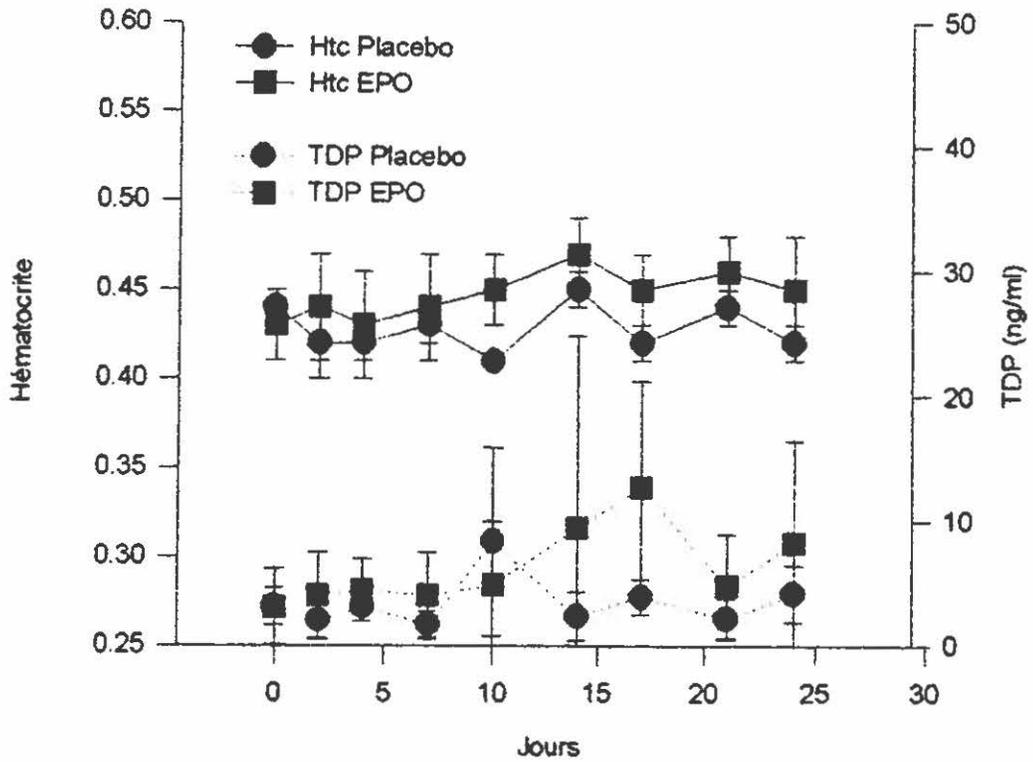


Figure 20. Hématocrite et TDP urinaires chez des sujets témoins et chez des sujets traités à l'EPO.

Nous avons étudié, dans un deuxième temps, l'effet de l'EPO endogène sur la synthèse d'u-PA rénale. Le dosage de cette enzyme fibrinolytique dans l'urine de sujets avant et après un séjour à haute altitude a révélé l'effet d'une augmentation d'EPO endogène sur la synthèse de l'u-PA. Les résultats obtenus indiquent, chez ces sujets, une chute significative ($p=0,0095$) de l'u-PA urinaire, suite à un séjour en haute altitude, alors que les TDP urinaires ne varient pas (Tableau 13).

Sujets	TDP (ng/ml)		u-PA (ng/ml)	
	Normoxie	Hypoxie	Normoxie	Hypoxie
1	0,0	4,0	8,3	5,1
2	3,6	4,6	42,2	16,3
3	2,9	2,8	20,5	6,9
4	7,8	17,2	27,6	3,9
5	0,0	2,9	31,8	14,4
6	4,0	2,6	30,0	0,3
7	2,6	0,0	61,4	3,1
MOY	3,0 ± 2,7	4,9 ± 5,6	31,7 ± 16,8	*7,1 ± 6,0

Tableau 13. Concentration urinaires des TDP et de l'u-PA chez des sujets avant (normoxie) et après (hypoxie) un séjour à une altitude de 4300 m.

Cette même mesure, réalisée chez des sujets lors du séjour à 2200 mètres, ne révèle aucune différence significative entre les jours 1 et les jours 3 et 4 (Tableau 14) en hypoxie pour l'u-PA urinaire.

Sujets	Concentration d'u-PA urinaire (ng/ml)		
	Jour 1	Jour 3	Jour 4
1	18,8	25,3	-
2	7,9	31,6	5,0
3	16,9	2,8	21,7
4	0,9	23,7	11,3
5	25,6	23,2	16,3
MOY	14,0 ± 9,7	21,3 ± 10,9	13,6 ± 7,1

Tableau 14. Concentration de l'u-PA urinaire chez des sujets lors d'un séjour à une altitude de 2200 mètres.

En raison de divers problèmes techniques, l'analyse de la fibrinolyse rénale en culture cellulaire n'a pu être menée à terme. Les principaux problèmes rencontrés étant la contamination bactérienne, l'isolation d'une quantité insuffisante de glomérules, ainsi qu'un faible détachement des cellules épithéliales glomérulaires lors de l'incubation à la collagénase.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 Discussion

Le dopage à l'EPO, d'une grande popularité chez les athlètes d'endurance, est pratiquement indétectable jusqu'à maintenant, en raison des caractéristiques particulières de cette hormone. Considérant le temps de demi-vie court (5 heures) et les effets cliniques tardifs (3-4 jours), la mesure de l'EPO ne peut être utilisée pour dépister ce type de dopage. De plus, la mesure de l'hématocrite ou du taux de réticulocytes ne peut être utilisée pour ces mêmes fins puisque ces deux paramètres varient tant sous l'influence d'une augmentation d'EPO endogène (entraînement en altitude) que sous l'effet d'une administration d'EPO .

Les travaux de notre équipe se sont donc orientés vers la recherche de marqueurs secondaires du dopage hormonal, au niveau urinaire, seul liquide biologique encore autorisé par le CIO. Puisque l'EPO en augmentant l'hématocrite peut affecter la viscosité sanguine [28] et, par conséquent, les systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse, notre équipe a analysé les principales molécules de ces deux systèmes en présence d'EPO exogène. Ces travaux, effectués chez des lapins [26] et des sujets hémodialysés [27] recevant de l'EPO, ont mis en évidence une augmentation des TDP urinaires (FbDP principalement) en présence de cette hormone. Cette augmentation des TDP urinaires en présence d'EPO exogène semble décelable sur une période d'environ 20 jours, du moins chez l'animal [26]. De plus, la mesure de ces

produits de dégradation chez des sujets avant et après un effort, révèle une grande stabilité des TDP urinaires suite à un exercice physique intense [66], ce qui est d'une importance considérable dans l'établissement d'une sonde puisque les prélèvements urinaires effectués lors de compétition d'importance sont toujours effectués après une compétition. Considérant les caractéristiques des TDP urinaires, la mesure de ces produits de dégradation pourrait éventuellement servir au dépistage d'utilisateurs illicites d'EPO. Pour espérer jouer ce nouveau rôle, ce marqueur ne doit cependant pas varier, ni à l'effort, ni lors d'un séjour en altitude.

Il est admis que certains athlètes d'endurance de niveau international ont recours au dopage à l'EPO pour améliorer leur performance physique. Par conséquent, la mesure des TDP urinaires chez ces athlètes devrait mettre en évidence un certain nombre d'athlètes ayant des valeurs anormales. Les résultats présentés à la section 3.1 identifient effectivement 14 athlètes d'endurance présentant des valeurs anormalement élevées de TDP urinaires au moment de compétitions d'importance. De plus, lors d'un prélèvement non-annoncé (hors-compétition), les valeurs de TDP urinaires de ces mêmes athlètes indiquent un retour à la normale. Certaines pathologies rénales étant caractérisées par un taux élevé de TDP urinaires, la fonction rénale de ces sujets devait nécessairement être vérifiée. Nous avons donc présenté les valeurs de TDP urinaires en valeurs normalisées, les paramètres de correction étant la densité urinaire, ainsi que les taux de protéines et de créatinine urinaires. Les valeurs de TDP normalisées présentent le même profil que les valeurs brutes, confirmant l'intégrité de la fonction rénales chez ces sujets. Plus particulièrement, le taux de protéines urinaires conforme à la norme met en évidence l'intégrité de la paroi des capillaires glomérulaires. Les

valeurs de TDP urinaires élevées ciblent ces athlètes comme de possibles utilisateurs d'EPO, toutes pathologies exclues.

L'entraînement en altitude étant pratique courante chez les athlètes car conduisant à une production accrue d'EPO endogène, nous avons étudié les TDP urinaires chez des sujets lors d'un séjour à 2200m et 4300 m. En effet, une variation des TDP urinaires suite à une augmentation d'EPO endogène invaliderait ce paramètre comme sonde pour le dépistage du dopage à l'EPO. Les résultats obtenus chez des athlètes s'entraînant à 2200 et 4300 mètres, indiquent que les TDP urinaires ne subissent aucune variation à ces altitudes. La mesure des TDP urinaires permettrait donc de différencier un dopage à l'EPO d'une augmentation d'EPO endogène et, éventuellement, pourrait être utilisée pour le dépistage du dopage à l'EPO. À première vue, il peut paraître surprenant que l'EPO endogène et exogène n'aient pas le même effet sur les TDP urinaires. Toutefois, il faut considérer que dans un cas de dopage, l'athlète utilise des doses massives d'EPO comparativement aux faibles augmentations d'EPO endogène suite à un entraînement en altitude, ce qui peut expliquer l'absence de variations des TDP urinaires dans cette dernière situation.

Suite à la mise en évidence d'un lien entre EPO exogène et TDP urinaires, ce projet de recherche, examine diverses hypothèses pouvant expliquer l'augmentation des TDP urinaires chez des sujets traités à l'EPO . Deux hypothèses principales ont été vérifiées, soit une modification de la filtration rénale et une modification de la fibrinolyse intra-rénale.

Le poids moléculaire des TDP étant de 50 kDa et plus, il est peu probable que les TDP plasmatiques traversent la paroi des capillaires glomérulaires

pour se retrouver dans l'urine. En effet, la structure des capillaires glomérulaires ne permet le passage sans restriction qu'à des molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 70 kDa. Les molécules dont le poids moléculaire est supérieur à ce seuil peuvent tout de même être filtrées dans l'urine, mais en quantité infime. Par exemple, 0,005% des molécules plasmatiques ayant un poids moléculaire de 70 kDa seront filtrées dans l'urine. Ainsi, chez des sujets sains, les TDP plasmatiques ne sont filtrés qu'en quantité infime [65].

Dans un cas de dopage à l'EPO, les TDP mesurés dans l'urine sont essentiellement des FbDP (195 à 440 kDa). Ces produits de dégradation, à moins d'une modification de la filtration rénale, ne devraient pas être de provenance plasmatique. Toutefois, lors d'une surcharge plasmatique, ceux-ci pourraient éventuellement être filtrés puisque la filtration rénale dépend non seulement de la taille des molécules, mais également de leur concentration. Suite à une administration d'EPO, les TDP plasmatiques augmentent [35] ou ne varient pas [28,32]. Si, effectivement, une augmentation des TDP plasmatiques survient, il est alors possible que ceux-ci soient filtrés dans l'urine.

L'étude de la filtration rénale des TDP plasmatiques, dont les résultats sont présentés à la section 3.2, confirme que chez des rats sains et sédentaires les TDP plasmatiques ne sont pas filtrés dans l'urine en présence de surcharges plasmatiques importantes. L'effort physique intense entraînant plusieurs changements physiologiques dont, entre autres, une modification du flux sanguin atteignant les reins, il est possible que la filtration rénale des TDP plasmatiques soit modifiée. Cependant, comme le démontre les résultats obtenus chez des rats entraînés (Tableau 5), l'effort physique intense

n'entraîne aucune modification dans la filtration des TDP urinaires. Ces résultats correspondent à l'étude effectuée chez les sujets humains où les TDP urinaires mesurés avant et après un exercice ne varient pas de façon significative [66]. Donc, l'augmentation des TDP plasmatiques observée chez certains sujets en présence d'EPO exogène ne semblent pas conduire à une filtration rénale plus importante des TDP plasmatiques et, par conséquent, à un taux plus élevé des TDP urinaires.

Une autre explication possible quant à l'origine des TDP urinaires en présence d'EPO exogène résiderait dans la modification de la filtration rénale, certaines études [64,65] ayant démontré que l'EPO entraîne une augmentation de la fraction filtrée [65]. En effet, en raison de changements rhéologiques provoqués par l'augmentation de l'hématocrite et de la viscosité sanguine, le débit sanguin atteignant les capillaires glomérulaires diminue, conduisant à une augmentation de la fraction filtrée, celle-ci contenant possiblement les TDP. Les résultats d'une expérimentation chez des rats traités à l'EPO (Tableau 6) indiquent que cette hormone n'entraîne aucune modification de la filtration rénale du moins en ce qui concerne les TDP. Suite à ces résultats, nous avons finalement vérifié si une augmentation de la perméabilité des capillaires glomérulaires entraîne une filtration rénale des TDP plasmatiques. En effet, l'EPO pourrait entraîner une augmentation des TDP urinaires par ce mécanisme puisque cette hormone stimule la synthèse d'IL-1. L'IL-1 est une cytokine entraînant une augmentation de la perméabilité des capillaires dont les capillaires glomérulaires, ce qui pourrait conduire au passage dans l'urine de molécules plasmatiques ayant un poids moléculaire supérieur à 70 kDa, dont entre autre les TDP. L'IGF-1, peptide reconnu pour favoriser une hyperfiltration rénale due à une augmentation de la perméabilité des

capillaires, n'affecte pas la filtration rénale des TDP plasmatiques comme le démontre l'expérimentation chez les rats traités à l'IGF-I (Tableau 7). L'action de l'IGF-1 chez ces sujets a été confirmée par une augmentation du volume urinaire résultant de l'hyperfiltration rénale.

L'analyse des résultats obtenus chez les rats semblent indiquer que les TDP plasmatiques ne sont pas filtrés dans l'urine quelles que soient les conditions. Toutefois, avant d'extrapoler ces résultats à l'humain, nous avons reproduit l'expérience chez des sujets humains sous traitement fibrinolytique, traitement entraînant une surcharge en TDP plasmatiques. Les résultats obtenus semblent, au premier regard, en contradiction avec ceux obtenus chez le rat; toutefois, certains paramètres doivent être pris en considération, entre autres, la surcharge plasmatique extrême et la composition des TDP. En effet, une surcharge de 350 000 ng/ml en TDP plasmatiques ne peut en aucun cas se retrouver chez des sujets sains où la valeur maximale est de 650 ng/ml. De plus, le traitement fibrinolytique (administration de streptokinase), en plus de dégrader la fibrine et le fibrinogène, dégrade plusieurs autres molécules plasmatiques, amplifiant ainsi la surcharge plasmatique. Dans ces conditions, il est donc possible que certaines protéines plasmatiques tout comme les TDP plasmatiques traversent la paroi des capillaires glomérulaires. La composition des TDP (majoritairement des FgDP) retrouvée chez ces sujets est un autre point important. Puisque les FgDP possèdent des poids moléculaires de 50 à 150 kDa, il est moins surprenant de les retrouver dans l'urine, comparativement aux FbDP. Cependant, il n'est pas exclu que la présence des TDP urinaires chez ces sujets proviennent non pas de la surcharge plasmatique extrême mais plutôt d'une dégradation plus complète de la fibrine et du fibrinogène

par la streptokinase, ou encore d'une action directe de cette enzyme sur la filtration rénale. Afin de vérifier ces deux dernières conditions, nous avons traité des rats à la streptokinase et nous avons également soumis la préparation de TDP à une digestion par la streptokinase. Les résultats obtenus chez ce groupe de rats n'indiquent aucune différence significative entre ce dernier groupe et les précédents quant à la filtration rénale des TDP. Toutefois, il est important de souligner que la surcharge plasmatique en TDP était largement inférieure (549 ± 340 ng/ml) à celle retrouvée chez les sujets humains (350 000 ng/ml). Les TDP urinaires retrouvés chez les sujets humains sous traitement fibrinolytique semblent donc provenir d'une filtration rénale des TDP plasmatiques due à la surcharge plasmatique extrême. Ainsi, ces résultats ne peuvent être retenus dans le cadre de cette étude où nous recherchons l'origine des TDP urinaires chez des sujets sains.

Il est, tout au long de ces études, surprenant de constater que la mesure des TDP, constituée de l'ensemble des FgDP et FbDP, ne correspond pas à l'addition mathématique des FgDP et FbDP lorsque mesurés séparément. Les différentes trousse ELISA utilisées pour le dosage des FgDP, FbDP et TDP proviennent d'un même fournisseur. Conséquemment, les plaques ELISA de chacune de ces trousse sont enduites d'un même anticorps, soit un anticorps reconnaissant les FgDP et les FbDP. La différence provient du deuxième anticorps, lequel dans la trousse FgDP est dirigé contre les FgDP, dans la trousse FbDP est dirigé contre les FbDP, et dans la trousse TDP est un mélange d'anticorps anti-FgDP et anti-FbDP. Il est possible que lors du dosage des TDP survienne une interférence issue d'un encombrement stérique ou un recouvrement des épitopes, occasionnant ainsi une quantification des TDP inférieure à la réalité.

En résumé, l'analyse des résultats obtenus lors de l'étude de la filtration rénale indique que les TDP plasmatiques ne sont filtrés qu'en quantités infimes chez des rats sédentaires, des rats à l'exercice, des rats traités à l'EPO ou encore chez des rats en condition d'hyperfiltration (IGF-I). Ces résultats semblent indiquer que les TDP urinaires chez des rats sains proviendraient non pas d'une filtration rénale des TDP plasmatiques mais plutôt d'une production intra-rénale de TDP qui seraient par la suite éliminés dans l'urine.

Nous avons donc poursuivi nos travaux en explorant, cette fois-ci, la possibilité d'une production intra-rénale de TDP. Compte-tenu du rôle important du rein dans le maintien de l'homéostasie corporelle, cet organe synthétise les principales enzymes fibrinolytiques, soit t-PA, u-PA et PAI-1, afin de prévenir la formation d'agrégats pouvant obstruer les glomérules ou les tubules.

L'augmentation de la viscosité sanguine en présence d'EPO exogène, peut entraîner une activation de la coagulation et causer un déséquilibre entre les systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse, pouvant ainsi conduire à la formation de microthrombi et, par conséquent, de TDP. Dans ces conditions, il est possible que la synthèse des enzymes fibrinolytiques soit modifiée afin de compenser la suractivation de la coagulation et rétablir l'équilibre entre les systèmes de la coagulation et de la fibrinolyse. Il est également possible que l'EPO exerce une action directe sur les cellules rénales, modifiant ainsi la synthèse des enzymes fibrinolytiques.

Afin de vérifier l'effet de l'EPO exogène sur la fibrinolyse rénale, nous avons mesuré les TDP urinaires et l'u-PA urinaire de différents sujets. La mesure de ces deux paramètres chez des athlètes de niveau international a

permis d'établir une valeur de référence chez ces sujets après une période d'exercices intenses, condition où les prélèvements urinaires sont effectués pour les contrôles anti-dopages. Par la suite, la comparaison de ces résultats avec ceux obtenus chez des athlètes suspectés d'abus d'EPO, c'est-à-dire des athlètes ayant des TDP urinaires anormalement élevés, indique une augmentation de l'u-PA urinaire. De plus, la variation de l'u-PA urinaire présente le même profil que les TDP urinaires, c'est-à-dire une valeur élevée lors de la compétition et un retour à la norme lors d'un prélèvement non-annoncé, ce qui semble établir une certaine corrélation entre ces deux paramètres. Toutefois, l'analyse statistique n'indique aucune corrélation significative, possiblement en raison du faible nombre de sujets disponibles pour ce genre d'étude. Suite à ces résultats, nous avons mesuré les TDP urinaires et l'u-PA urinaire chez des athlètes ayant reçu de l'EPO à raison de 5 injections de 150 U/kg et chez un groupe d'athlètes ayant reçu un placebo. Les résultats obtenus semblent indiquer qu'en présence d'EPO exogène l'u-PA urinaire ne varie pas de façon significative. Toutefois, considérant la faible réponse des sujets au traitement, l'interprétation de ces résultats doit être faite avec circonspection. En effet, l'hématocrite ainsi que les TDP urinaires n'augmentent pas significativement.

L'étude de l'u-PA urinaire chez des sujets lors d'un séjour en altitude ne devrait indiquer aucune augmentation puisque les TDP urinaires ne varie pas dans cette condition. Effectivement, l'étude de l'u-PA urinaire chez des sujets avant et pendant un séjour à 4300 m indique que ce paramètre diminue de façon significative alors que chez des sujets à 2200 m ce paramètre n'est pas affecté. Ces résultats n'ayant pu mettre en évidence l'effet d'une

augmentation d'EPO endogène sur la synthèse de l'u-PA, d'autres études seront donc nécessaires afin de confirmer l'une ou l'autre des tendances.

L'administration d'EPO semble donc entraîner une augmentation des TDP urinaires accompagnée d'une augmentation de l'u-PA urinaire. Par conséquent, l'augmentation des TDP urinaires observée en présence d'EPO exogène semble provenir d'une augmentation de l'activité fibrinolytique rénale.

4.2 Conclusion

Ce projet de maîtrise a permis de démontrer que l'augmentation des TDP urinaires observée en présence d'EPO exogène ne provient pas d'une filtration rénale des TDP plasmatiques, mais proviendrait plutôt d'une formation intra-rénale de TDP suite à une modification de la fibrinolyse rénale et plus particulièrement de l'u-PA.

L'étude de la fibrinolyse rénale sur des cultures de cellules rénales pourrait permettre d'explorer plus en profondeur l'effet de l'EPO exogène sur la synthèse des enzymes fibrinolytiques. Une autre façon de procéder serait l'utilisation de sondes dirigées contre l'ARN messager des enzymes fibrinolytiques sur des coupes de rein provenant de rats traités à l'EPO.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Smith D.A., Perry P.J., 1992, «The efficacy of ergogenic agents in athletic competition part II: other performance-enhancing agents», The Annals of Pharmacotherapy, vol 26, p. 653-659

- [2] Selby G.B., Eichner E.R., 1994, «Hematocrit and performance: The effect of endurance training on blood volume», Seminars in Hematology, vol 31, no 2 (April), p. 122-127

- [3] Adamson J.W., Vapnek D., 1991, «Recombinant erythropoietin to improve athletic performance», The New England Journal of Medicine, vol 324, no10, p. 698-699

- [4] Varet B., Casadevall N., Lacombe C., Nayeaux P., 1990, «Erythropoietin: physiology and clinical experience», Seminars in Hematology, vol 27, no 3, p. 25-31

- [5] Eckardt K.U., Koury S.t., Tan C.C., Schuster S.J., Kaissling B., Ratcliffe P.J., Kurtz A., 1992, «Distribution of erythropoietin producing cells in rat kidneys during hypoxic hypoxia», Kidney International, vol 43, p. 815-823

- [6] Roberts D., Smith D.J., 1994, «Erythropoietin: induction of synthesis to signal transduction», Journal of Molecular Endocrinology, vol 12, p.131-148

- [7] Eckardt K.U., 1994, «Erythropoietin: oxygen-dependent control of erythropoiesis and its failure in renal disease», Nephron, vol 67, p. 7-23
- [8] Porter D.L., Goldberg M.A., 1994, «Physiology of erythropoietin production», Seminars in Hematology, vol 31, no 2, p. 112-121
- [9] Lacombe C., DaSilva J.L., Bruneval P., Casadevall N., Camilleri J.P., Bariety J., Tambourin P., Varet B., 1991, «Erythropoietin: sites of synthesis and regulation of secretion», American Journal of Kidney, vol 18, p. 14-19
- [10] Kurtz A., Eckardt K.U., Tannabell L., 1988, «Regulation of erythropoietin production», Contribution to Nephrology, vol 66, p. 1-16
- [11] Berridge M.V., Fraser J.K., Carter J.M., 1988, «Effects of recombinant human erythropoietin on megacaryocytes and platelet production in the rat», Blood, vol 72, p. 970-977
- [12] Dessypris E.N., Gleaton J.H., Armstrong O.L., 1987, «Effects of human recombinant erythropoietin on human marrow megacaryocytes colony formation in vitro», British Journal of Haematology, vol 65, p. 265-269
- [13] Roodman G.D., Spivak J.L., Zanjani E.D., 1981, «Stimulation of erythroid colony formation in vitro by erythropoietin immobilized on agarose-bound lectins», Journal of Laboratory and Clinical Medicine, vol 98, p. 684-690

- [14] Miura O., Ihle J.N., 1993, «Subunit structure of the erythropoietin receptor analyzed by I¹²⁵-EPO cross-linking in cells expressing wild-type or mutant receptors», Blood, vol 81, p. 1739-1744
- [15] Youssoufian H., Longmore G., Neuman D., Yoshimura A. Lodish H., 1993, «Structure, function and activation of the erythropoietin receptor», Blood, vol 81, p. 2223-2236
- [16] D'Andrea A.D., Lodish H.F., Wong G.G., 1989, «Expression cloning of the murine erythropoietin receptor», Cell, vol 57, p. 277-285
- [17] Jones S.S., D'Andrea A.D., Haines L.L., Wong G.G., 1990, «Human erythropoietin receptor: cloning expression and biologic characterization», Blood, vol 76, p. 31-35
- [18] Kahn A., 1995, «L'interruption du signal de l'érythropoïétine nécessite l'action d'une phosphotyrosine protéine phosphatase», Médecine/Science, vol 11, p. 927-928
- [19] Magner J.C., 1991, «Enhancement of athletic performance with drugs», Sports Medicine, vol 12, no 4, p. 250-265
- [20] «Blood doping and erythropoietin», 1992, Drugs in sports, vol 1, no 1, p. 7-8
- [21] Spalding B.J., 1991, «Black-market biotechnology: athletes abuse EPO and hGH» Bio/Technology, vol 19, no 11, p. 1050; 1052-1053

- [22] Kim A., 1990, «A bad boost: An alternative to steroids, synthetic hormone or EPO» Sports Illustrated, vol 73, no 22, p. 29
- [23] Ramotar J.E., 1990, «Cyclists's deaths linked to erythropoietin», The Physician & Sports Medecine, vol 18, no 8, p. 48-50
- [24] Cowart V.S., 1989, «Erythropoietin: a dangerous new form of blood doping», The Physician & Sports Medecine, vol 17, no 8, p.114-118
- [25] Flaharty K.K., Grimm A.M., Vlasses P.H., 1989, «Epoctin: human recombinant erythropoietin», Clinical Pharmacology, vol 8, p. 769-779
- [26] Gareau R., Brisson G.R., Ayotte C., Dubé J., Caron C., 1992, «Erythropoietin doping in athletes: possible detection through measurement of von Willebrand factor and D-Dimer activity?», Thrombosis and Haemostasis, vol 68, p. 480-481
- [27] Gareau R., Gagnon M-G., Ayotte C., Chénard C., Brisson G.R., 1993, «rHuEpo increases urinary excretion of fibrin degradation products in haemodialyzed patients», Thrombosis and Haemostasis, vol 70, p. 373-374
- [28] Gordge M.P., Leaker B., Patel A., Oviasu E., Cameron J.S., Neild G.H., 1990, «Recombinant human erythropoietin shortens the uraemic bleeding time without causing intravascular haemostatic activation», Thrombosis Research, vol 57, p.171-182

- [29] Wirtz J.J.J., van Esser J.W.J., Hamulyak K., Leunissers K.M.L., van Hoof J.P., 1992, «The effects of recombinant human erythropoietin on hemostasis and fibrinolysis in hemodialyzed patients», Clinical Nephrology, vol 38, no 5, p. 277-282
- [30] Stenver D., Nielsen B., Jeppesen L.L., Nielsen J.D., Winther K., Haedersdal C., Mehtsen J., 1993, « Erythropoietin and fibrinolysis effects on platelet activity», The Lancet, vol 341, no 8843 (Feb 20), p. 495-496
- [31] Szewczuk S., Mazerska M., Malyszko J., Kalinowski M., Mysliwiec M., 1992, «Increase in fibrinolytic activity after erythropoietin therapy», Thrombosis and Haemostasis, vol 67, no 2, p.284
- [32] Kaizu K., Uriu K., Eto S., 1993, «Effects of recombinant human erythropoietin (EPOCH) on the coagulation and fibrinolytic systems and platelet function in pre-dialysis patients with chronic renal failure», Japanese Journal of Nephrology, vol 35, no 8, p. 989-997
- [33] Al-Momen A.K., Huraib So, 1992, «Low-dose danazol for vascular access and dialyser thrombosis in hemodialysis patients», Haemostasis, vol 22, no 1, p. 12-16
- [34] Aunsholt N.A., Ahlbom G., Steffensen G., Glud T., 1992, «Fibrinolytic capacity in hemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin», Nephron, vol 62, no 3, p. 284-288

- [35] Taylor J.E., Belch J.J., Mc Laren M., Hendersen I.S., Stewart W.K. 1993, «Effect of erythropoietin therapy and withdrawal on blood coagulation and fibrinolysis in hemodialysis patients» Kidney International, vol 44, no 1, p. 182-190
- [36] Lai K.N., Yin J.A., Li P.K.T., Yuen P.M.P., Lui S.F., 1992, «Effect of subcutaneous administration of recombinant erythropoietin on plasma protein C, protein S and antithrombin III levels in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis», International Journal of Artificial Organs, vol 15, no 5, p. 264-268
- [37] Arinsay T., Ozdemir O., 1992, «Recombinant human erythropoietin treatment may induce antithrombin-III depletion», Nephron, vol 62, p. 480-481
- [38] Ozsoylu S., Gürsel T., 1993, «von Willebrand factor and rise in ristocetin co-factor with erythropoietin», The Lancet, vol 341, no 8854 (may 8), p. 1221
- [39] Biesma D.H., Bronkhorst P.J.H., de Groot P.G., van de Wiel A., Kraaijenhagen R.J., Marx J.J.M., 1994, «The effect of recombinant human erythropoietin on hemostasis, fibrinolysis, and blood rheology in autologous blood donors», Journal of Laboratory and Clinical Medicine, vol 124, no 1, p. 42-47
- [40] Beisiegel B., Treese T., Hafner G., Meyer J., Darius H., 1992, «Increase in endogenous fibrinolysis and platelet activity during exercise in young volunteers», Agents-Actions-supplement, vol 37, p. 183-189

- [41] Streiff M., Bell W.R., 1994, «Exercise and hemostasis in humans», Seminars in Hematology, vol 31, no 2, p. 155-165
- [42] Rankinen T., Väisänen S., Penttilä I., Rauramaa R., 1995, «Acute dynamic exercise increase fibrinolytic activity», Thrombosis and Haemostasis, vol 73, no 2, p.281-286
- [43] Szymanski L.M., Pate R.R., Durstine J.L., 1994, «Effects of maximal exercise and venous occlusion on fibrinolytic activity in physically active and inactive men», Journal of Applied Physiology, vol 77, no 5, p. 2305-2310
- [44] Molz A.B., Heyduck B., Lill H., Spanuth E., Rocker L., 1993, «The effect of different exercise intensities on the fibrinolytic system», European Journal of Applied Physiology, vol 67, no 4. p. 298-304
- [45] Akitada I., Kazuo F., Suyama T., 1986, «The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin», The Journal of Biological Chemistry, vol 87, p. 962-970
- [46] Brunner G., Simon M.M., Kramer M.D., 1990, «Activation of pro-urokinase by human T cell-associated serine proteinase HuTSP-1», FEBS Letter, vol 261, p. 141-144
- [47] Schmitt M., Henschen K.A., Hollrieder A., Hafter R., Gulba D., Jänicke F., Graeff H., 1989, «Elastase released from human granulocytes stimulated with N-formyl-chemotactic peptide prevents activation of tumor cell pro-urokinase (pro-uPA)», FEBS Letter, vol 255, p. 83-88

- [48] Liu J.N., Gurewich V., 1992, «Fragment E-2 from fibrin substantially enhances pro-urokinase-induced glu-plasminogen activation. A kinetic study using the plasmin-resistant mutant pro-urokinase Ala-158-rpro-UK», Biochemistry, vol 31, p. 6311-6317
- [49] Blasi F., Vassalli J.D., Danø K., 1987, «Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors», The journal of Cell Biology, vol 104, p. p. 801-804
- [50] Falcone D.J., McCaffrey T.A., Haimovitz-Friedman A., Vergilio J.A., Nicholson A.C., 1993, «Macrophage and foam cell release of matrix-bound growth factors», The Journal of Biological Chemistry, vol 268, no 16, p. 11951-11958
- [51] Estreicher A., Mühlhauser J., Carpentier J.L., Orci L., Vassalli J.D., 1990, «The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes», The Journal of Cell Biology, vol 111, p. 783-792
- [52] Ci-Jiang H.E., Peraldi M.N., Adida C., Rebibou J.M., Meulders Q., Sraer J.D., Rondeau E., 1992, «Thrombin signal transduction mechanisms in human glomerular epithelial cells», Journal of Cellular Physiology, vol 150, p475-483
- [53] Victor W.M., van Hinsbergh, van der Berg E., Fiers W., Dooijewaard G., 1990, «Tumor necrosis factor induces the production of urokinase-type plasminogen activator by human endothelial cells», Blood, vol 75, no 10, p. 1991-1998

- [54] Moroz L.A., 1984, «Non-plasmin-mediated fibrinolysis», Seminars in Thrombosis and Haemostasis, vol 10, p. 80-86
- [55] Castellote J.C., Grau E., Linde M.A., Pujol-Moix N., Ruthllant L.I., 1990, «Detection of both type 1 and type 2 PAI in human monocytes», Thrombosis and Haemostasis, vol 63, p. 67-71
- [56] Vassali J.D., Dayer J.M., Wohlwend A., Belin D., 1984, «Concomitant secretion of pro-urokinase and of a plasminogen activator specific inhibitor by cultured human monocytes-macrophages», Journal of Experimental Medicine, vol 159, p. 1653-1668
- [57] Simon D.I., Ezratty A.M., Francis S.A., Renke H., Loscalzo J., 1993, «Fibrin(ogen) is internalized and degraded by activated human monocytoid cells via Mac-1 (CD11b/CD18): a nonplasmin fibrinolytic pathway», Blood, vol 82, no 8, p. 2414-2422
- [58] Higazi A.A.R., Barghouti I.I., Abu-Much R., 1995, «Identification of an inhibitor of tissue-type plasminogen activator-mediated fibrinolysis in human neutrophils», The Journal of Biological Chemistry, vol 270, no 16, p. 9472-9477
- [59] Sapino A.P., Huarte J., Vassali J.D., Belin D., 1991, «Sites of synthesis of urokinase and tissue-type plasminogen activators in the murine kidney», Journal of Clinical Investigation, vol 87, p. 962-970
- [60] Angles-Cano E., Rondeau E., Delarue F., Hagege J., Sultan Y., Sraer J.D., 1985, «Identification and cellular localisation of plasminogen activator from human glomeruli», Thrombosis and Haemostasis, vol 54, p. 688-692

- [61] Louise C.B., Obrig T.G., 1994, «Human renal microvascular endothelial cells as a potential target in the development of the hemolytic uremic syndrome as related to fibrinolysis factor expression, in vitro», Microvascular Research, vol 47, no 3, p. 377-387
- [62] Wilson H.M., Reid F.J., Brown P.A., Power D.A., Haites N.E., Booth N.A., 1993, «Effect of transforming growth factor-beta 1 on plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in renal glomerular cells», Experimental Nephrology, vol 1, no 6, p. 343-350
- [63] Shibata T., Magari Y., Perparim K., Sumie A., Ishii T., Tomo T., Sato J., Yasumori R., Nasu M., 1995, «Significance of urinary fibrin/fibrinogen degradation products in renal diseases measured by a highly sensitive ELISA», Nephron, vol 69, p. 54-58
- [64] Roth D., Smith R.D., Schulman G., Steinman T.I., Hatch F.E., Rudnick M.R., Sloand J.A., Freedman B.I., Williams W.W., Shadur C.A., 1994, «Effects of recombinant human erythropoietin on renal function in chronic renal failure predialysis patients», American Journal of Kidney Disease, vol 24, no 5, p. 777-784
- [65] Clyne N., Jogestrand T., 1992, «Effect of erythropoietin treatment on physical exercise capacity and on renal function in predialytic uremic patients», Nephron, vol 60, p. 390-396
- [66] Gareau R., Chénard C., Brisson G.R., Ayotte C., Gagnon M.G., Audran M., 1995, «Total fibrin and fibrinogen degradation products in urine: a possible probe to detect illicit users of the physical performance-enhancer erythropoietin», Hormone Research, vol 44, p. 189-192

- [67] Jaffa A.A., LeRoith D., Roberts C.T., Rust P.F., MMayfield D.K., 1994, «Insulin-like growth factor I produces renal hyperfiltration by a kinin-mediated mechanism», American Journal of Physiology, vol 266, p. F102-F107
- [68] Bartsch P., Haeberli A., Straub P.W., 1990, «Blood coagulation after long distance running: antithrombin III prevent fibrin formation», Thrombosis and Haemostasis, vol 63, no 3, p. 430-434

