

UNIVERSITE DE LIEGE  
Faculté de Médecine

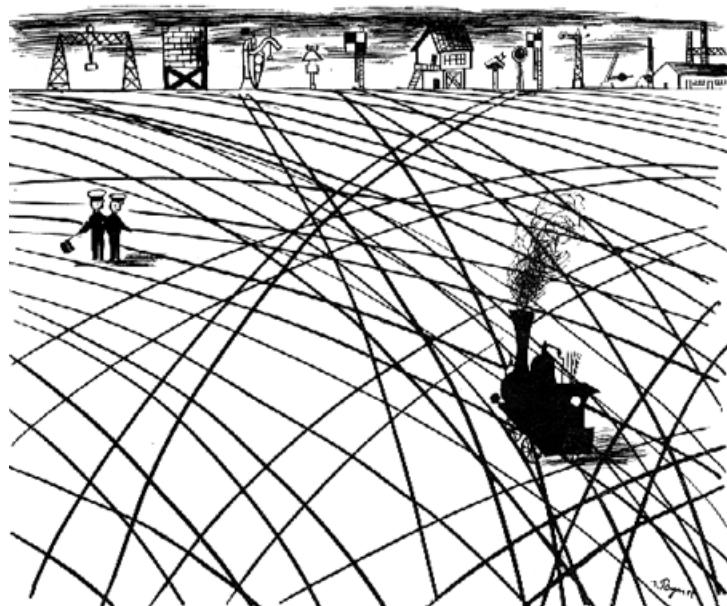
**INFLUENCE DE L'ACTIVITE ERYTHROPOÏETIQUE  
SUR LE METABOLISME ET LE MONITORING MARTIAL :  
UN ROLE POUR LES INDICES DES ERYTHROCYTES MATURES**

**Christophe BOVY**

Thèse de doctorat  
Présentée en vue d'obtenir  
le grade de Docteur en Sciences Médicales

Année Académique 2005-2006





A Yves Beguin qui m'a guidé dans les chemins du fer

## Table des matières

<b>Chapitre 1 : Introduction générale</b>	1
1. Les bénéfices du traitement par érythropoïétine	2
2. Résistance au traitement : Importance du bilan martial	3
3. Métabolisme du fer	5
a. Distribution et mouvement du fer dans l'organisme	5
b. Absorption digestive	7
c. Recyclage du fer hémique	8
d. Régulation de l'absorption et des mouvements de fer : rôle de l'hepcidine	8
e. Transport du fer	9
f. Stockage du fer	10
g. Déficit en fer, surcharge martiale et troubles de la distribution	10
4. Evaluation du statut martial	13
a. Ferritine sérique	13
b. Saturation de la transferrine	13
c. Contenu réticulocytaire en hémoglobine	14
d. Pourcentage de globules rouges hypochromes	15
e. Récepteurs solubles de la transferrine	15
f. Faiblesse des directives internationales dans l'évaluation des besoins en fer des patients IRC traités par rHuEPO	16
5. Objectifs du travail	18
<b>Chapitre 2 : Méthodologie générale</b>	19
1. Population	20
2. Analyses de laboratoire	20
a. Paramètres hématologiques	20
b. Autres paramètres biologiques	21
3. Statistiques	21

**Chapitre 3 : Effet de l'activité érythropoïétique sur le métabolisme du fer** 23

Augmentation de l'absorption du fer dans un programme d'autotransfusion soutenu par erythropoïétine	24
1. Introduction	24
2. Patients et méthodes	25
a. Patients	25
b. Protocole de l'étude	26
c. Analyses de laboratoire	26
d. Formules	27
e. Analyses statistiques	28
3. Résultats	28
a. Dons de sang	28
b. Erythropoïèse	28
c. Pertes sanguines et transfusions	31
d. Métabolisme du fer	33
4. Discussion	36

**Chapitre 4 : Facteurs déterminant le pourcentage de globules rouges chez les patients en dialyse chronique** 39

1. Introduction	40
2. Méthodes	41
a. Groupe contrôle	41
b. Patients	41
c. Paramètres étudiés	41
d. Statistiques	42
3. Résultats	43
a. Groupe contrôle	43
b. Corrélations entre paramètres	44
c. Prédiction de %HYPO par les autres variables étudiées : régressions multiples	44
4. Discussion	48

## **Chapitre 5 : Influence de l'activité érythropoïétique sur les paramètres du monitoring martial**

A. Une stimulation érythropoïétique intense invalide les marqueurs habituels du statut martial.	53
1. Introduction	53
2. Sujets et méthodes	53
a. Protocole de l'étude	53
b. Paramètres biologiques	54
c. Formules utilisées	54
d. Statistiques	54
3. Résultats	55
3. Discussion	58
B. Impact de l'activité érythropoïétique sur les paramètres globulaires chez les patients hémodialysés chroniques traités par érythropoïétine.	60
1. Introduction	60
2. Méthodes	60
3. Résultats	61
4. Discussion	64

## **Chapitre 6 : Un rôle possible pour les indices des érythrocytes matures**

A. Les indices des érythrocytes matures comme nouveaux paramètres de la disponibilité du fer	67
1. Introduction	67
2. Patients et méthodes	68
3. Résultats	69
a. Valeurs de référence	69
b. Effet de la réticulocytose de stress sur la mesure des paramètres de routine	69
c. Comparaison entre la population érythrocytaire mature et la population	

érythroïde globale dans d'autres conditions pathologiques	73
d. Corrélations entre %HYPO et la réticulocytose ou le fer sérique	74
4. Discussion	78
 B. Les paramètres des érythrocytes matures comme marqueurs du déficit martial fonctionnel : sensibilité et spécificité	81
1. Introduction	81
2. Méthodes	81
a. Patients	81
b. Protocole de l'étude	81
c. Analyses de laboratoire	82
d. Analyses statistiques	83
3. Résultats	83
4. Discussion	89
 <b>Chapitre 7 : Discussion et conclusions générales</b>	92
 <b>Bibliographie</b>	98
 <b>Annexes</b>	118

## Index alphabétique des abréviations utilisées

AIHA : Anémie hémolytique auto-immune

apoFRT : Apoferritine

apoTf : Apotransferrine

BV : Volume sanguin

CH : Contenu en hémoglobine

CHm : Contenu en hémoglobine des érythrocytes matures

CHr : Contenu réticulocytaire en hémoglobine

CHCM : Concentration moyenne en hémoglobine

CHCMm : Concentration moyenne en hémoglobine des érythrocytes matures

CHCMr : Concentration moyenne en hémoglobine des réticulocytes

EPO : Erythropoïétine

FRT : Ferritine

GH : Hémochromatose génétique

Hb : Hémoglobine

Hct : Hématocrite

%highCH : Pourcentage de globules rouges avec un contenu en hémoglobine élevé

%highCHm : Pourcentage de globules rouges matures avec un contenu en hémoglobine élevé

%highCHr : Pourcentage de réticulocytes avec un contenu en hémoglobine élevé

HVG : Hypertrophie ventriculaire gauche

%HYPER : Pourcentage de globules rouges hyperchromes

%HYPERm : Pourcentage de globules rouges matures hyperchromes

%HYPERr : Pourcentage de réticulocytes hyperchromes

%HYPO : Pourcentage de globules rouges hypochromes

%HYPOm : Pourcentage de globules rouges matures hypochromes

%HYPOr : Pourcentage de réticulocytes hypochromes

IDA : Anémie ferriprive

IRC : Insuffisance rénale chronique

%lowCH : Pourcentage de globules rouges avec un contenu en hémoglobine bas

%lowCHm : Pourcentage de globules rouges matures avec un contenu en hémoglobine bas

%lowCHr : Pourcentage de réticulocytes avec un contenu en hémoglobine bas

MA : Anémie mégaloblastique

MCV : Volume globulaire moyen

%macro : Pourcentage de macrocytes  
%macrom : Pourcentage de macrocytes matures  
%macror : Pourcentages de réticulocytes macrocytaires  
MCI : Fer circulant mobilisable  
%micro : Pourcentage de microcytes  
%microm : Pourcentage de microcytes matures  
%micror : Pourcentage de réticulocytes microcytaires  
PTH : Parathormone  
QOL : Quality of life  
RBC : Globules rouges  
RCM : Masse globulaire  
Rétic : Réticulocytes  
rHuEPO : Erythropoïétine humaine recombinante  
SeFe : Fer sérique  
SI : Fer de réserve  
sTfR : Récepteurs solubles de la transferrine  
Tf : Transferrine  
TfR : Récepteurs de la transferrine  
Thal : Thalassémie  
TI : Fer total  
TIBC : Capacité totale de fixation de la transferrine  
TSAT : Coéfficient de saturation de la transferrine

## Remerciements

Je voudrais remercier ici toutes les personnes qui m'ont aidé et supporté lors de la réalisation des différents travaux qui ont abouti à la rédaction de ce mémoire.

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur Rorive, qui a suscité et guider mes premiers pas dans le domaine de la néphrologie. Il m'a transmis le goût de la recherche. Son sens critique et son intérêt sans cesse renouvelé pour les résultats de nos travaux m'ont été d'un grand secours. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Krzesinski a mis à ma disposition les moyens nécessaire à la poursuite de la réalisation de ce travail. Il n'a pas ménagé son temps, prenant parfois sur ses heures de loisir, pour relire mes articles et me faire part de ces remarques. J'espère que cette collaboration durera longtemps encore.

Je voudrais saluer la disponibilité et la bonne volonté de tout le laboratoire d'hématologie. Je tiens à remercier plus particulièrement André Gothon, qui a toujours répondu présent pour mener à bien les différentes analyses réalisées dans le cadre de nos études, le Professeur Paulus, initiateur de ma première publication et qui m'a fortement encouragé à réaliser ce doctorat. Je m'en voudrait d'oublier Nicole Lairesse, à laquelle j'ai fait presté un nombre incalculable d'heures supplémentaires et probablement donné quelques cheveux blancs pour retrouver les données égarées dans les méandres de l'Advia. Que tout le personnel du laboratoire sache combien j'ai apprécié leur aide.

Je me dois également de remercier le service de chimie médicale, en particulier le Professeur Chapelle qui a accepté de réaliser gratuitement les mesures des paramètres du monitoring martial et m'a accordé toute sa confiance. Mes remerciements s'adressent également à Madame Yvette Fairon pour la détermination des récepteurs solubles de la transferrine.

Les études multi-centriques n'ont pu être menées à bien que grâce à la participation de mes confrères néphrologues et plus particulièrement les Docteurs Pascale Cambier, Xavier Warling, Martial Moonen et Michel Robin du Centre hospitalier Régional de la Citadelle ainsi que le Docteur MadameNicole Smelten du Centre Hospitalier du Bois de l'Abbaye et de Hesbaye.

Je tiens à remercier également le Professeur Adelin Albert, qui m'a aidé dans la conception des études statistiques et l'interprétation de leur résultats. Qu'il sache combien son aide m'a été précieuse. Je dois aussi adresser toute ma gratitude à Madame Annie Saint-Remy, dont les compétences en informatique et en statistiques m'ont été d'un précieux secours. Qu'elle trouve ici toute ma gratitude pour sa patience à m'initier et à compléter mes connaissances dans ces domaines

Je voudrais enfin et surtout remercier Monsieur le Professeur Yves Beguin. Ses connaissances du métabolisme du fer, son intelligence, son esprit critique et ses corrections efficaces ont été le moteur de l'entièreté de ce travail. Sans lui rien n'aurait été possible et je lui dédie ce travail.

**CHAPITRE 1 :**  
**INTRODUCTION GENERALE**

## **1. Les bénéfices du traitement par érythropoïétine**

Une anémie normochrome normocytaire est présente chez la majorité des patients insuffisants rénaux chroniques (IRC). <sup>1</sup> La cause principale de cette anémie est un déficit de production d'érythropoïétine (EPO) par le parenchyme rénal lésé. <sup>2</sup> D'autres facteurs peuvent contribuer à la pathogénie de l'anémie. Tout d'abord, le déficit martial, secondaire ou non à la perte de sang résultant des analyses de biologie clinique répétées, à la rétention de sang dans les membranes et les circuits de dialyse ou aux saignements digestifs, est fréquemment rencontré chez ce type de patients. Ensuite, la survie des érythrocytes est réduite dans l'IRC <sup>3</sup>, secondairement aux toxines urémiques altérant la qualité de la membrane cellulaire. Souvent, une inflammation chronique ou aiguë est présente. <sup>4</sup> L'urémie est, d'ailleurs, reconnue comme un état inflammatoire en tant que tel. Cette inflammation contribue également au développement de l'anémie, ralentissant la production réticulocytaire malgré la présence d'EPO. L'hyperparathyroïdie <sup>5</sup>, la toxicité de l'aluminium <sup>6</sup> et les déficits en folates ou vitamine B12 <sup>7</sup> sont également des causes possibles.

Non traitée, l'anémie de l'IRC est associée à de nombreuses complications suite à la diminution de fourniture et d'utilisation de l'oxygène au niveau des tissus. <sup>8-12</sup> Une augmentation compensatoire du débit cardiaque en est la première conséquence, conduisant à une hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) avec un remodelage dans le sens de la fibrose myocardique. <sup>13</sup> De l'angor et une décompensation cardiaque en sont les principales manifestations. <sup>14-19</sup> On assiste aussi à une fatigue musculaire, une diminution des fonctions cognitives <sup>20</sup> et une réponse immunitaire altérée <sup>21, 22</sup>. Cette anémie joue également un rôle dans les troubles de la croissance chez les enfants. <sup>23</sup> Toutes ces complications sont responsables d'une diminution de la qualité de vie (QOL) <sup>24</sup> et de la survie des patients IRC <sup>25, 26</sup>. L'augmentation du risque d'évènements et de décès cardio-vasculaires dans cette population a été bien démontrée. Elle est proportionnelle à l'importance de la diminution de la concentration en hémoglobine. Jusqu'au milieu des années 80, la correction de l'anémie reposait sur un schéma transfusionnel peu satisfaisant, générateur de complications infectieuses, de surcharge en fer et incapable de normaliser l'hémoglobine de façon durable.

L'EPO est une glycoprotéine riche en acide sialique. Elle est produite, chez l'adulte, par les cellules péritubulaires du cortex rénal. Le stimulus de la production d'EPO est l'hypoxie. Aux concentrations physiologiques, l'EPO stimule l'érythropoïèse en induisant une différenciation et une multiplication des progéniteurs érythroïdes CFU-E (Colony-Forming Units-Erythroid) et en inhibant leur apoptose spontanée. Lors de la destruction progressive du tissu rénal, la production

d'EPO est inadéquate par rapport aux taux d'Hb et à l'hypoxie relative qui en est la conséquence. Le traitement de l'anémie rénale a été révolutionné par la disponibilité, depuis 1986, de l'érythropoïétine humaine recombinante (rHuEPO). Depuis lors, de nombreuses études ont démontré les bénéfices de la correction de l'anémie de l'insuffisant rénal. Bien que les objectifs du traitement restent encore controversés, les directives internationales recommandent d'atteindre une Hb supérieure à 11 g/dL mais de ne pas dépasser 14 g/dL.<sup>27, 28</sup> D'un point de vue cardio-vasculaire, l'élévation de l'Hb d'une valeur inférieure à une valeur supérieure à 10 g/dL, permet déjà une amélioration des performances cardiaques avec régression de l'HVG.<sup>29-35</sup> La normalisation des taux d'Hb permet en outre de réduire l'augmentation du débit cardiaque observé à des taux d'Hb de 10-11 g/dL.<sup>36-38</sup> Des études rétrospectives et observationnelles ont montré une association entre le degré d'anémie et le taux d'hospitalisation.<sup>39-41</sup> La correction de l'anémie permet de réduire les hospitalisations chez les patients diabétiques sans antécédent cardio-vasculaire.<sup>42</sup> Une telle réduction a également été décrite chez des patients avec une insuffisance cardiaque sévère.<sup>43</sup> La capacité d'effort s'améliorait également en augmentant l'hématocrite de 30 à 35-40% (augmentation significative de la VO<sub>2</sub>).<sup>8-11, 20</sup>

L'amélioration de la qualité de vie n'est plus remise en question. Elle est, en effet, universellement reconnue lorsque l'anémie est corrigée. Cette amélioration est continue jusqu'à des taux d'Hb de 14 g/dL.<sup>36, 37, 42, 44-47</sup> La survie des patients semble aussi être améliorée par le traitement de l'anémie. Une association entre anémie et taux de mortalité est clairement démontrée.<sup>40-41, 48-50</sup> Deux larges études rétrospectives ont observé une amélioration de la survie en réponse au traitement par rHuEPO, pour le moins la première année de prise en charge en hémodialyse.<sup>13, 26</sup> Les bénéfices d'un tel traitement ne sont donc plus à démontrer.

## **2. Résistance au traitement : importance du bilan martial**

S'il ne fait plus de doute que l'administration de rHuEPO améliore le taux d'Hb, la dose nécessaire est extrêmement variable d'un patient à l'autre. De nombreuses causes peuvent être responsables d'une résistance au traitement par rHuEPO. On compte parmi celles-ci les pathologies inflammatoires aigües ou chroniques<sup>51-52</sup>, les pertes chroniques de sang, l'hyperparathyroïdie et l'ostéite fibreuse qui en résulte<sup>53-56</sup>, la toxicité de l'aluminium<sup>54, 57-58</sup>, les hémoglobinopathies (thalassémie et sphérocytose)<sup>59-62</sup>, les déficits en folates et vitamine B12<sup>7</sup>, le myélome et autres néoplasies<sup>63-64</sup>, la malnutrition<sup>65-66</sup>, l'hémolyse<sup>67</sup>, l'inadéquation de la dialyse, l'effet négatif de

drogues cytotoxiques<sup>64</sup> ou des inhibiteurs de l'enzyme de conversion<sup>68-69</sup> et l'érythroblastopénie<sup>70</sup>. Cependant, de toutes les causes de résistance, le déficit martial est de loin le plus habituel.

Le déficit martial est très fréquent dans l'IRC, en particulier au stade de l'hémodialyse, en raison notamment des analyses de laboratoire, des pertes de sang dans le circuit de dialyse et de pertes digestives. Ces pertes sanguines s'accompagnent de pertes de fer qui ne peuvent être compensées par une absorption intestinale souvent insuffisante.<sup>71-72</sup> Le traitement par rHuEPO augmente l'activité érythropoïétique et donc, en parallèle, la demande de fer. L'association de ces deux phénomènes rend difficile le maintien de réserves de fer optimales chez les patients hémodialysés traités par rHuEPO.

Contrairement à la population générale, dans laquelle les pertes quotidiennes de fer sont limitées à environ 1 mg, les pertes inhérentes au traitement et au suivi des patients en hémodialyse sont estimées à 3 mg par jour. Si les réserves normales de l'organisme sont de plus ou moins 800 à 1200 mg de fer et si l'hématocrite de départ est de 25% et la cible de 35%, la quantité de fer requise pendant les 3 premiers mois de traitement par rHuEPO pour atteindre cette cible est d'approximativement 1000 mg, dont 400 servent à compenser les pertes chroniques. Une fois l'objectif atteint, 400 à 500 mg seront nécessaires tous les trois mois pour maintenir le taux d'hématocrite dans les cibles thérapeutiques.

Bien qu'une étude sur un nombre limité de patients ait montré que l'absorption digestive de fer pouvait compenser les pertes<sup>73</sup>, cette dernière ne peut en aucun cas fournir la quantité importante de fer nécessaire à l'érythropoïèse, principalement dans la phase de correction de l'anémie. La plupart des études ont cependant constaté que l'absorption digestive était diminuée dans l'IRC.<sup>71-72</sup> De plus, la résorption intestinale est inversément corrélée avec les réserves de fer<sup>74</sup> et il est donc peu probable qu'une quantité accrue de fer puisse être absorbée si la ferritine a atteint la cible de 100 ng/mL ou la saturation de la transferrine celle de 20%. Nous décrirons, dans la partie sur le métabolisme du fer, le rôle central joué par l'hepcidine à cet égard. Bien que l'absorption soit également stimulée par l'activité érythropoïétique, l'étude démontrant ce phénomène utilisait des doses de rHuEPO largement supérieures à celles habituellement utilisées dans l'IRC.<sup>75</sup>

L'administration de fer par voie intraveineuse est donc, la plupart du temps, nécessaire chez ces patients. Ce traitement est connu pour améliorer la réponse à la rHuEPO.<sup>76-80</sup> L'administration fréquente de petites doses pourrait même être encore plus efficace que l'administration moins

fréquente de doses élevées.<sup>76, 80-83</sup> Ce traitement peut malheureusement être associé à des réactions anaphylactoïdes<sup>84</sup>, à des épisodes hypotensifs<sup>85</sup> ou à une hypersaturation de la transferrine responsable de l'apparition de fer libre<sup>85-86</sup>, un puissant pro-oxydant. Par ailleurs, les complications associées à la surcharge martiale chez les patients dialysés, fréquentes avant l'ère de la rHuEPO, ont été moins documentées. Certains rapports décrivent une augmentation de la fréquence et de la sévérité des épisodes infectieux avec l'administration parentérale de fer.<sup>87, 88</sup> Ceux-ci pourraient être liés à une diminution de la phagocytose et des fonctions granulocytaires, démontrée *in vitro*.<sup>89, 90-91</sup> Ces fonctions peuvent être restaurées par un traitement par desferoxamine ou par rHuEPO.<sup>91-92</sup> Bien que l'accumulation de fer chez les patients hémodialysés soit principalement localisée dans les cellules du système réticulo-endothélial<sup>93</sup>, on ne peut exclure des lésions secondaires des organes parenchymateux siège d'accumulation de fer, tels le cœur, le foie ou le pancréas.

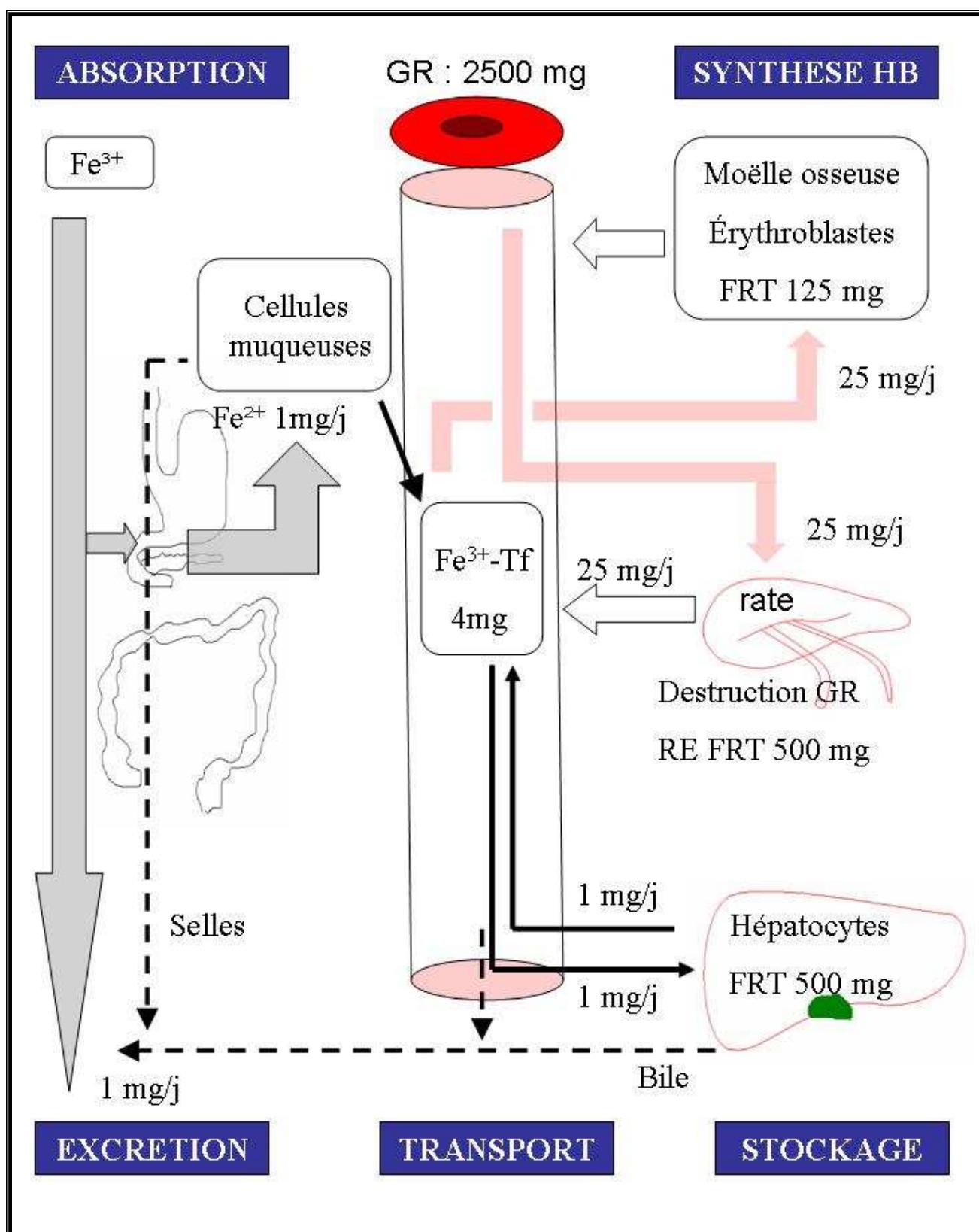
Pour toutes ces raisons, il est primordial de suivre le bilan martial de ces patients et de disposer de marqueurs sensibles et spécifiques du déficit en fer. Je reviendrai donc brièvement sur le métabolisme du fer et sur les principaux marqueurs utilisés dans son monitoring.

### **3. Métabolisme du fer**

#### **a. Distribution et mouvements du fer dans l'organisme**

Les 4 g de fer de l'organisme sont, en majeure partie, contenus dans les cellules de la lignée érythrocytaire (2500 mg). La myoglobine en contient environ 400 mg. Les réserves sous forme de ferritine (FRT) représentent 800 à 1200 mg et seulement 4 mg sont liés à la transferrine (Tf). Le fer de l'organisme circule pratiquement en circuit fermé. Sur les 4000 mg que contient le corps, la perte quotidienne normale est de plus ou moins 1 mg chez l'homme, contrebalancée par l'absorption digestive. Chez la femme pré-ménopausée, une perte de fer due aux menstruations, estimée en moyenne à 0.5 mg/j doit être prise en compte en plus des pertes digestives physiologiques. Dans les conditions normales, approximativement 20 à 25 mg de fer sont délivrés à la moelle érythropoïétique quotidiennement. Les macrophages recyclent une quantité équivalente de fer issu de la phagocytose des érythrocytes sénescents.

La distribution et les mouvements de fer dans l'organisme sont schématisés sur la figure 1.1.

**Figure 1.1 : Distribution et mouvements du fer dans l'organisme sain**

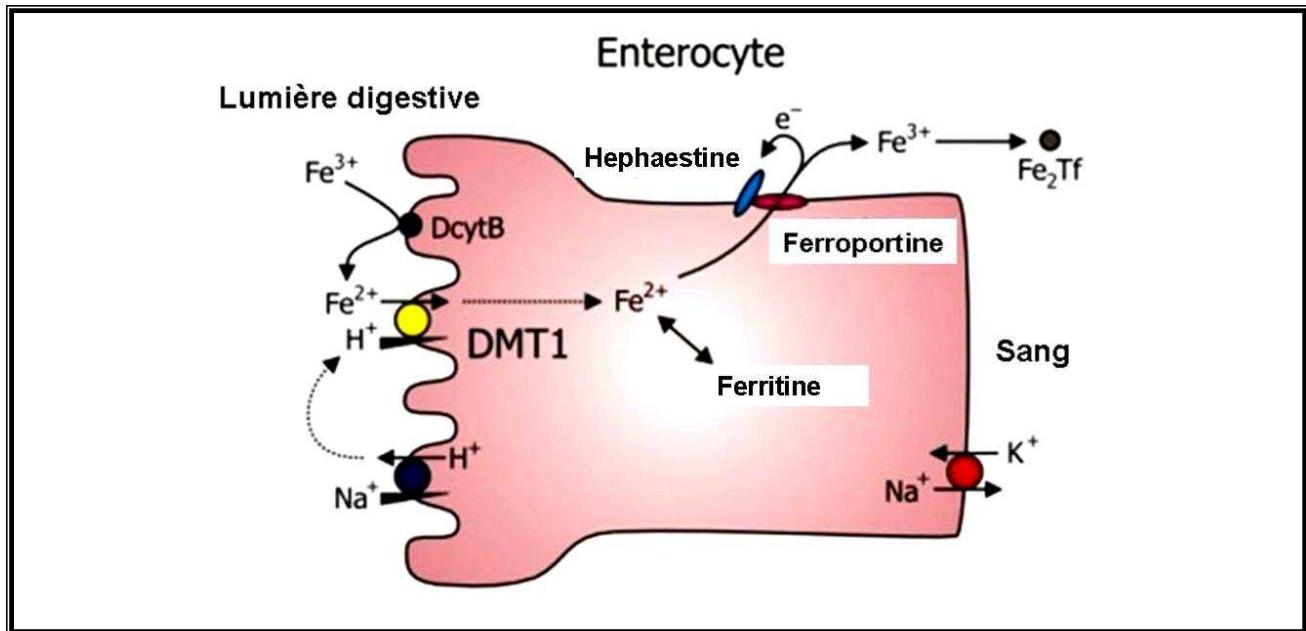
Le fer total de l'organisme (TI) peut être séparé en fer de réserve (SI) et fer globulaire (RBC I). La quantité de fer liée à la transferrine est négligeable par rapport à SI et RBC I. Le fer de réserve est estimé par la mesure de la ferritinémie. Le fer contenu dans les érythrocytes peut être calculé en sachant qu'1 gr d'Hb contient 3.4 mg de fer. Le fer mobilisable total (TMI) est la somme du fer de réserve et du fer circulant mobilisable (MCI). Ce dernier est considéré comme le fer contenu dans les érythrocytes présents en excès en circulation par rapport à un hématocrite de 34%. Les formules utilisées pour calculer ces différents paramètres seront exposées au chapitre 3.

### b. Absorption digestive

Le fer alimentaire est majoritairement sous la forme  $Fe^{3+}$  et doit être réduit en  $Fe^{2+}$  pour être absorbé (absorption de  $\pm 10\%$  de l'apport alimentaire chez un sujet non-ferrifirive). Cette réduction est le fait de la cytochrome b-like ferrireductase (Dcytb) située sur la membrane apicale des entérocytes.<sup>94</sup> Une fois réduit, le  $Fe^{2+}$  traverse la membrane apicale de la bordure en brosse au travers du transporteur DMT1 (divalent metal transporter-1).<sup>95-96</sup> L'expression de DMT1 et Dcytb est régulée par la concentration de fer dans l'entérocyte.<sup>97-98</sup>

Le fer entré dans le cytoplasme de l'entérocyte peut être incorporé dans la ferritine, il est alors définitivement perdu pour l'organisme lorsque l'entérocyte arrive au sommet de la villosité et desquame dans la lumière du tube digestif.<sup>99</sup> L'exportation de fer de l'entérocyte vers la circulation sanguine dépend de la ferroportine (iron-regulated transporter-1), principalement située sur la membrane baso-latérale de l'entérocyte.<sup>100-104</sup> Après passage de fer au travers de la ferroportine, la liaison du fer à la transferrine circulante nécessite l'oxydation du  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$  par une ferroxidase ceruloplasmine-like : l'hephaestine.<sup>105</sup>

Les mécanismes de l'absorption digestive de fer sont représentés sur la figure 1.2.

**Figure 1.2 : Mécanismes de l'absorption digestive****c. Recyclage du fer hémique**

Plus de 60% du fer de l'organisme se situent dans les érythrocytes. Le recyclage, par les macrophages, du fer hémique résultant de l'érythrophagocytose des érythrocytes sénescents, est donc primordial pour le maintien de l'homéostasie du fer.

Après dégradation de l'hémoglobine, le fer est libéré de l'hème sous l'effet de l'hème-oxygénase dans les phagosomes des macrophages.<sup>106-107</sup> Il semble que la sortie du fer des phagosomes vers le cytoplasme soit également dépendante de la DMT1<sup>108-110</sup>, alors que la remise en circulation dépend de la ferroportine<sup>111-112</sup>. Celle-ci est présente en quantité importante dans les macrophages tissulaires du foie, de la rate et de la moëlle osseuse.<sup>101-102, 104</sup>

**d. Régulation de l'absorption et des mouvements de fer : rôle de l'hepcidine**

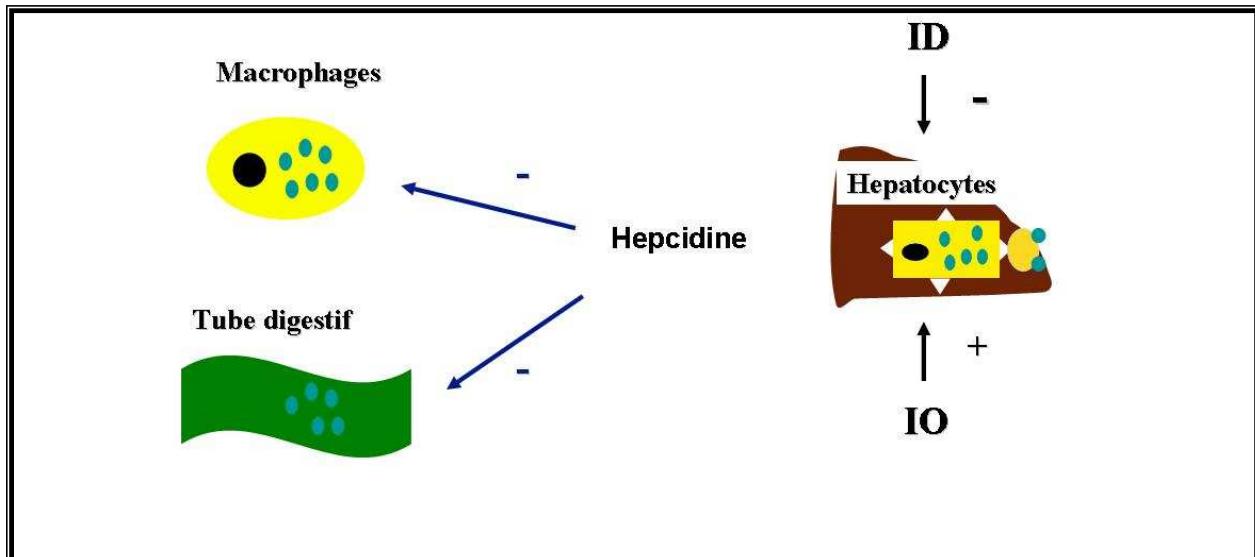
L'hepcidine est une hormone peptidique de 25 acides aminés. Elle est synthétisée par le foie, libérée dans la circulation sanguine et éliminée par voie rénale. L'hepcidine contrôle le contenu en fer de tout l'organisme.<sup>113-114</sup> Sa production est augmentée par la surcharge martiale<sup>113, 115-116</sup> et l'inflammation<sup>117-118</sup>, et diminuée par le déficit en fer<sup>111, 117, 119</sup> et la stimulation de l'activité érythropoïétique<sup>117</sup>. Elle régule négativement l'absorption digestive de fer et le relargage de fer issu de l'érythrophagocytose par les macrophages.<sup>120-121</sup> (Figure 1.3) Cette inhibition résulte de la

liaison de l'hepcidine à la ferroportine, entraînant son internalisation et sa dégradation lysosomiale.

122

**Figure 1.3 : Régulation de l'absorption digestive et du relargage de fer par les macrophages**

ID : déficit martiale ; IO : surcharge martiale



e. Transport du fer

Le fer est transporté, dans le plasma, lié à la transferrine (Tf) sous forme de  $\text{Fe}^{3+}$ .<sup>123</sup> La manière dont le fer exporté via la ferroportine se lie à la Tf n'est pas encore connu. La synthèse hépatique de l'apotransferrine est modulée par les réserves et les besoins en fer de l'organisme. Une molécule d'apotransferrine peut lier un maximum de 2  $\text{Fe}^{3+}$  avec une capacité de fixation de 1.41  $\mu\text{g}$  de fer par mg de transferrine. La capacité de fixation peut donc être calculée par la mesure de la transferrine. La mesure concomitante du fer sérique permet de calculer la saturation de la transferrine (TSAT). L'apotransferrine et les Tf mono- et diférrique sont toutes trois présentes en circulation. La distribution relative de ces trois formes dépend de la saturation de la Tf, les quantités de Tf monoférrique augmentant avec la diminution de la saturation de la Tf.

Le complexe Tf- $\text{Fe}^{3+}$  se lie aux récepteurs de la transferrine (TfR) au niveau des cellules cibles pour fournir le fer nécessaire. Il faut rappeler que 80% des TfR sont situés au niveau des cellules érythropoïétiques, à l'exception des érythrocytes matures qui en sont dépourvus. Ces cellules présentent le plus grand besoin en fer de l'organisme. L'affinité du récepteur pour la Tf dépend de la liaison de celle-ci avec  $\text{Fe}^{3+}$ , étant maximale lorsque 2  $\text{Fe}^{3+}$  sont fixés à la molécule de Tf.<sup>124-125</sup> Le complexe TfR-Tf- $\text{Fe}^{3+}$  est endocyté. Le passage du pH alcalin du sang au pH acide de

l'endosome libère le fer de la Tf et renforce la liaison TfR-Tf.<sup>125-127</sup> Ce complexe est alors recyclé au niveau de la membrane cellulaire.<sup>128</sup> La libération de fer des endosomes vers le cytoplasme cellulaire dépend de la DMT1. L'expression de TfR à la surface cellulaire est régulée par la disponibilité et les besoins en fer de la cellule.<sup>129-132</sup>

Une faible quantité des TfR se retrouve en circulation sous forme soluble (sTfR). La mesure de sTfR, en cas de métabolisme martial normal, est une mesure fiable de l'activité érythropoïétique.<sup>133-135</sup> Le déficit martial augmente également l'expression de TfR à la surface des cellules et la quantité de sTfR circulants.<sup>129-132</sup> Le dosage de sTfR permet donc également de dépister précocément le déficit martial.

#### f. Stockage du fer

Le fer est principalement stocké sous forme de ferritine (FRT) dans le foie, la rate et la moëlle hématopoïétique. Toutes les cellules sont capables de synthétiser l'apoferritine qui lie le Fe<sup>3+</sup> libéré par la Tf. Le foie est également capable de transformer le fer lié à l'haptoglobine ou l'hémopexine et le fer hémique, provenant de la dégradation de l'Hb, en FRT.<sup>136</sup> Le stockage de fer, dérivé de la sénescence érythrocytaire physiologique, est réalisé par la transformation de Fe<sup>2+</sup>- Hb en Fe<sup>3+</sup>- FRT dans les cellules du système réticulo-endothélial.<sup>106-107</sup> Environ 2500 ions de Fe<sup>3+</sup> peuvent être liés à l'apoFRT. La FRT tend à former des oligomères stables qui, présents en excès, se condensent sous forme semi-cristalline : l'hemosidérine.

#### g. Déficit en fer, surcharge martiale et troubles de la distribution

Les variations du statut martial régulent l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme et la distribution du fer. Cette régulation est dépendante du pool labile de fer intracellulaire. Sa quantité est infinitésimale. Il n'est pas détectable ou mesurable car sa nature biochimique exacte n'est pas encore élucidée. Le fer cytosolique du pool labile labile est capable de réguler l'expression post-transcriptionnelle des protéines par l'intermédiaire de boucles dans les régions non-transcrites de leurs gènes.<sup>137-138</sup> Ces régions sont appelées « iron-responsive elements » (IRE).<sup>139-142</sup> La liaison aux IRE de protéines cytosoliques sensibles au fer intracellulaire, les « iron regulatory proteins » (IRP), détermine la transcription du message. La présence des IRE dans la partie 5' du gène inhibe sa transcription alors que dans la partie 3', la liaison des IRP aux IRE stabilise le gène, inhibant sa fixation aux endonucléases.<sup>143-148</sup> Le gène de la ferritine contient un IRE dans sa partie

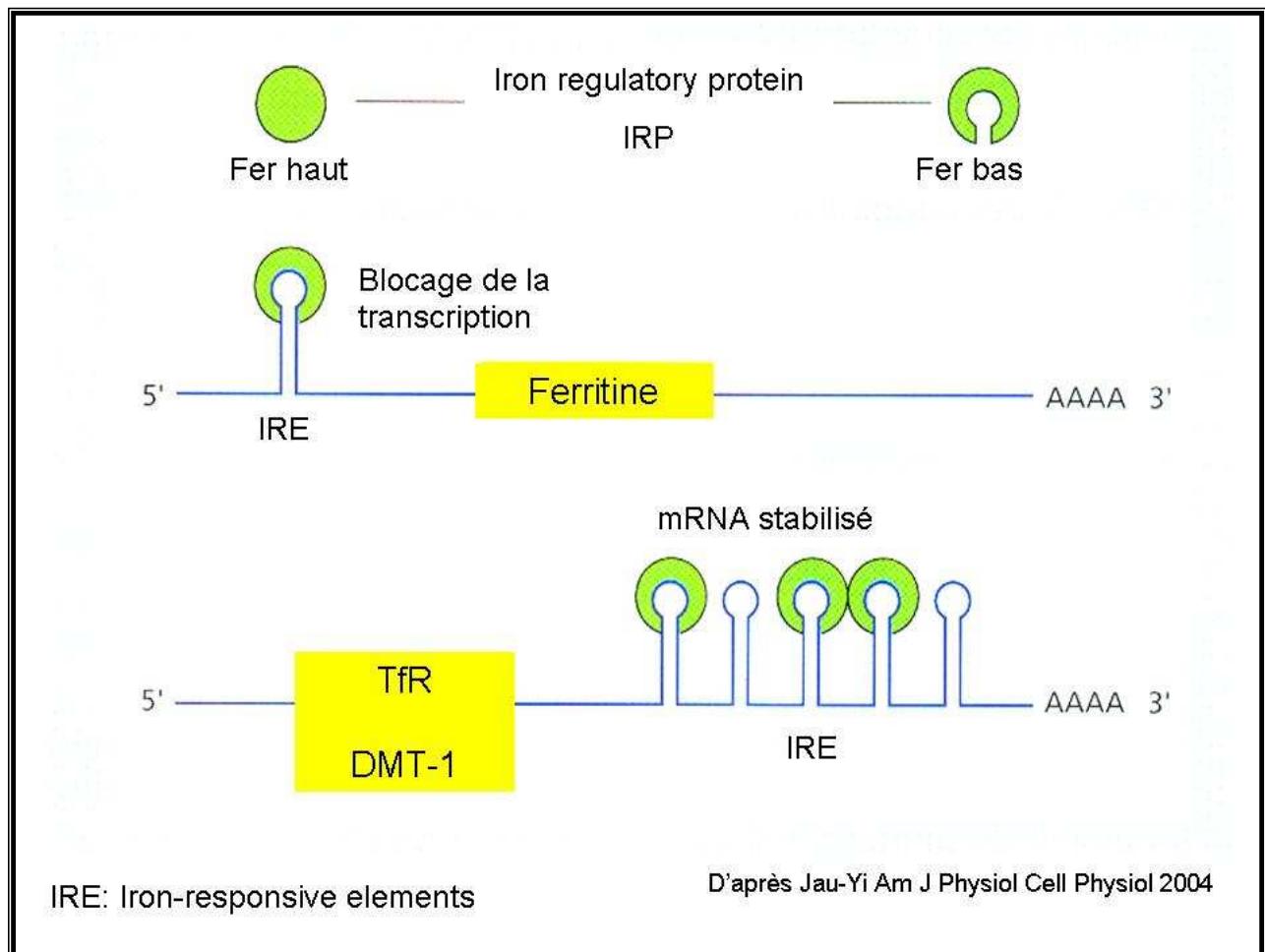
5' alors que celui du récepteur à la transferrine et celui de DMT-1 en contiennent dans leur partie 3'. Ce mécanisme explique comment ces protéines sont exprimées de manière différentielle dans les déficit et surcharge en fer. (Figure 1.3) Cependant, d'autres stimuli, comme certaines cytokines activent de manière indépendante du niveau de fer les promoteurs de du mRNA de la ferrtine.<sup>141</sup> De plus, la régulation de l'expression des TfR dans la lignée hématopoïétique est principalement transcriptionnelle et non post transcriptionnelle.<sup>149-156</sup> Les variations d'expression de ces protéines reflètent donc une série de signaux et pas seulement les variations du statut en fer.

Lors de pertes de fer ou d'insuffisance d'absorption, le premier stade du déficit martial est une diminution du fer de réserve (diminution de FRT). Ensuite, le transport de fer diminue (diminution de TSAT et du fer sérique) et l'apport de fer à la moëlle érythropoïétique devient déficient. Enfin, une anémie hypochrome microcytaire se développe. L'augmentation de l'expression de TfR, dans cette situation, entraîne une augmentation de son relargage en circulation et une augmentation mesurable de sTfR, qui n'est donc plus seulement un reflet de l'activité érythropoïétique mais constitue aussi un marqueur du déficit martial.<sup>129-136, 157</sup>

Dans les cas de surcharge martiale significative, la FRT est augmentée ainsi que le fer sérique et TSAT. La synthèse de Tf est également diminuée. Les taux de sTfR ne sont que très peu modifiés. L'expression de l'hepcidine est stimulée<sup>113, 115-116</sup> avec pour conséquence une diminution de l'absorption digestive (inhibition du passage en circulation du fer entré dans l'entérocyte) ainsi que du relargage de fer par les macrophages.<sup>120-121</sup> L'injection d'hepcidine marquée permet de démontrer son accumulation dans les organes riches en ferroportine : le foie, la rate et le duodénum. L'accumulation moindre, mise en évidence au niveau des hépatocytes par rapport aux autres organes, suggère une expression et/ou une activité moindre de la ferroportine dans les hépatocytes pouvant expliquer l'accumulation préférentielle de fer dans les cellules hépatiques.<sup>157</sup>

La distribution ou l'utilisation du fer peut être perturbée par certaines situations pathologiques. L'inflammation est le prototype de ce type de situations. Elle entraîne une réduction du fer de transport et une surcharge du fer de réserve. L'hepcidine est ici encore responsable de ce pattern, étant une protéine de la phase aiguë de l'inflammation.<sup>158</sup> Dans ces conditions, la FRT est augmentée et ne représente plus de manière fiable les réserves de l'organisme. Le fer sérique et TSAT sont diminués. Par contre, les taux de sTfR restent normaux.<sup>159-160</sup>

**Figure 1.3 : Mécanisme de régulation de l'expression post-transcriptionnelle des protéines impliquées dans le métabolisme du fer.**<sup>145</sup>



Le traitement par rHuEPO chez les patients dialysés est également une cause de mauvaise utilisation du fer. En effet, en dépit de réserves normales, la mobilisation du fer est insuffisante pour subvenir aux besoins de la moelle érythropoïétique stimulée. Une hypothèse séduisante pour expliquer ce déficit de mobilisation pourrait être une accumulation d'hepcidine dont l'élimination est rénale. Malheureusement, on ne dispose actuellement que de dosages urinaires d'hepcidine, ininterprétables chez ces patients dont la fonction rénale est altérée. La FRT est donc normale ou augmentée (en cas d'administration concomitante de fer) et TSAT est basse. La diminution du fer disponible pour la moelle érythropoïétique et l'augmentation de l'activité érythropoïétique entraînent une augmentation importante de sTfR. Cet état est caractéristique du déficit martial fonctionnel.

#### **4. Evaluation du statut martial**

Le monitoring martial est principalement basé sur la mesure de la ferritine et de la saturation de la transferrine. Leurs variations respectives donnent des indications sur la distribution et l'utilisation du fer.

##### **a. Ferritine sérique**

La ferritine est donc la principale molécule de stockage du fer. Elle se retrouve en circulation dans le sérum par sécrétion ou par passage trans-membranaire en cas de lésion tissulaire. Les faibles quantités de FRT présentes dans le sérum ne jouent pas de rôle de fourniture ou de stockage de fer, mais sont corrélées avec la ferritine tissulaire. Sa mesure est donc une mesure indirecte du fer de réserve. La fiabilité de cette technique a été validée par corrélation avec le fer contenu dans les aspirations médullaires.<sup>161</sup> Sa validité a été prouvée chez les patients non-urémiques<sup>162-164</sup> et urémiques non-traités par rHuEPO<sup>161, 165-169</sup>.

Par la même méthode, chez des patients urémiques traités par rHuEPO, les taux de FRT < 200 ng/mL avaient une spécifité de 100% mais une sensibilité de seulement 43% pour détecter un déficit martial.<sup>167</sup> Des taux de FRT > 300 ng/mL permettaient d'exclure un déficit martial mais les taux inférieurs n'étaient pas corrélés à la présence d'un déficit martial. De plus, la ferritine est une protéine de la phase aiguë et augmente donc en cas d'inflammation.<sup>170</sup> Dans cette situation, la ferritine ne représente plus l'état des réserves.

Pour toutes ces raisons, la ferritine ne peut être utilisée seule dans le monitoring du fer, en particulier chez les patients traités par rHuEPO.

##### **b. Saturation de la transferrine**

La saturation de la transferrine est calculée par rapport au fer sérique et à la capacité de fixation de la transferrine :  $TSAT = FeS \times 100 \text{ } (\mu\text{g/dL}) / TIBC \text{ } (\mu\text{g/dL})$ . Ce paramètre donne une évaluation de la capacité de fourniture de fer à la moelle érythropoïétique. Cependant, la concentration de fer sérique présente des variations circadiennes qui se répercutent donc sur TSAT.

Contrairement à la ferritine, la transferrine est une protéine négative de la phase aiguë. L'urémie ayant été démontrée comme un état inflammatoire en soi, la transferrine est diminuée de  $\pm 30\%$  dans l'insuffisance rénale chronique par rapport à une population de référence.<sup>171</sup> Les valeurs de TSAT de 20 à 30% dans l'IRC correspondent donc à des valeurs de 13 à 20% dans une population normale avec une diminution corollaire de la capacité de fourniture.<sup>172</sup> A l'opposé, la ferritine est augmentée dans l'IRC. Il n'est donc pas étonnant qu'un déficit martial fonctionnel puisse être présent même si la ferritine et la saturation de la transferrine semblent normales.

Ces deux paramètres étant influencés par l'urémie, on a cherché à évaluer les besoins en fer dans l'anémie rénale traitée par rHuEPO en mesurant la production d'hémoglobine par la moelle érythropoïétique. Deux paramètres biologiques sont utilisés dans ce but : la mesure du contenu réticulocytaire en hémoglobine et la mesure du pourcentage de globules rouges hypochromes.

#### c. Contenu réticulocytaire en hémoglobine (CHr)

La durée de vie des réticulocytes en circulation avant leur maturation en érythrocytes est de 24 à 48 heures. La mesure du contenu réticulocytaire en Hb pourrait fournir une évaluation du fer réellement disponible pour l'érythropoïèse.

Un CHr bas est fréquemment rencontré lors des traitements par rHuEPO chez le patient urémique. Il a été démontré qu'une supplémentation martiale intraveineuse entraînait une augmentation de CHr chez ces patients.<sup>173-174</sup> En 1997, Fishbane et al. ont décrit l'utilisation de ce paramètre dans le diagnostic du déficit martial chez ce type de patients. La réponse à l'administration de fer (augmentation de la réticulocytose de plus de 1%) pouvait être prédictive par le CHr avec une valeur seuil de 26 pg avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 80%. L'administration de fer (1000 mg de fer dextran en 2 heures) augmentait le CHr dans les 48 heures chez les patients répondeurs.<sup>175</sup> Dans une étude similaire, l'augmentation de CHr en réponse à l'administration de fer était inversement proportionnelle au CHr de départ et le seuil de 28 pg donnait une sensibilité de 78% et une spécificité de 71% dans la préiction de la réponse au fer.<sup>176</sup>

Cependant, lors d'une étude observationnelle, dans laquelle les patients recevaient un traitement par rHuEPO associé ou non à une supplémentation martiale, CHr ne variait pas ou variait de manière paradoxale chez 31% des patients suivis alors que le pourcentage de globules rouges hypochromes semblait plus fiable.<sup>177</sup>

**d. Pourcentage de globules rouges hypochromes (%HYPO)**

La mesure des globules rouges hypochromes (GR avec une concentration en Hb < 28 g/dL) permet également de dépister un déficit martial. Ce paramètre permet de détecter les GR hypochromes à leur sortie de la moëlle, contrairement à la mesure de MCHC (concentration moyenne en Hb) qui nécessite la présence d'un nombre important de GR hypochromes pour influencer les valeurs obtenues sur l'ensemble de la population de globules rouges normochromes. %HYPO est décrit pour la première fois comme marqueur de déficit martial fonctionnel chez les patients hémodialysés traités par rHuEPO en 1992. Les auteurs ont montré une augmentation de %HYPO en réponse au traitement par rHuEPO et une diminution consécutive à l'administration intraveineuse de fer.<sup>178</sup> Ces données ont été confirmées par la suite.<sup>179</sup> Braun et al. ont démontré une amélioration de la réponse à rHuEPO secondaire à l'administration de fer inversement proportionnelle à %HYPO. Dans cette étude, %HYPO était le paramètre le plus sensible de la prédiction de la réponse au traitement martial chez les patients présentant une inflammation appréciée par un taux de CRP élevé. Les patients avec un %HYPO > 6% étaient les plus à même de bénéficier d'une supplémentation martiale.<sup>180</sup> La supériorité des indices globulaires (CHr et %HYPO), par rapport à FRT et TSAT, dans les syndromes inflammatoires a été confirmée par Thomas.<sup>181</sup>

**e. Récepteurs solubles de la transferrine (sTfR)**

Les récepteurs de la transferrine sont exprimés à la surface des cellules qui présentent un besoin de fer pour leur métabolisme. Ils se retrouvent donc principalement à la surface des cellules érythropoïétiques. Le recyclage des récepteurs permet leur libération en circulation sous forme soluble où ils deviennent mesurables. Les récepteurs solubles sont corrélés à l'expression cellulaire. Quand le métabolisme du fer est normal, sTfR représente une estimation fiable de l'activité érythropoïétique.<sup>133-135</sup> Par exemple, il est augmenté dans l'anémie hémolytique et diminué dans l'anémie aplastique.<sup>182</sup> Ce paramètre permet aussi de dépister un déficit martial fonctionnel avant qu'il ne devienne absolu.<sup>134</sup> Son taux augmente très précocement lors du développement de la carence d'apport de fer à la moëlle érythropoïétique.<sup>160</sup>

Son augmentation est significativement supérieure dans l'anémie ferriprive par rapport à l'anémie des maladies chroniques et inflammatoires au cours desquelles l'activité érythropoïétique est faible.<sup>183</sup> Chez les patients insuffisants rénaux recevant de la rHuEPO, on peut observer une augmentation des taux de sTfR principalement causée par la stimulation érythropoïétique mais qui pourrait aussi

suggérer le développement d'un déficit martial fonctionnel.<sup>184-185</sup> La stimulation érythropoïétique et le déficit martial sont donc tous deux responsables d'une élévation de sTfR. Dans une étude prospective chez les patients dialysés traités par rHuEPO, Chiang et al<sup>186</sup> ont cependant montré que sTfR ne permettait pas de diagnostiquer le déficit martial. Après une charge intraveineuse en fer, sTfR augmentait au lieu de diminuer, en réponse à l'amélioration de la disponibilité du fer, et cette augmentation était proportionnelle à l'élévation des taux d'Hb, d'Hct et de la réticulocytose. Toutefois, un taux de sTfR bas permettait de prédire la réponse au traitement par rHuEPO.<sup>184</sup> Son intérêt dans le dépistage du déficit martial fonctionnel du patient traité par rHuEPO n'est donc pas établi. De plus, la disponibilité et le coût de ce test le rendent moins attrayant pour la clinique quotidienne que les paramètres globulaires et réticulocytaires.

**f. Faiblesse des directives internationales dans l'évaluation des besoins en fer des patients IRC traités par rHuEPO**

Les directives internationales<sup>27-28</sup>, qu'elles soient européennes ou américaines, conseillent d'administrer du fer par voie intraveineuse de manière à atteindre une cible de ferritine de 100 ng/mL et une saturation de transferrine de 20%. Etant donné la disponibilité plus grande des compteurs cellulaires en Europe, les directives européennes privilégient à présent %HYPO sur TSAT avec une cible inférieure à 10%. Une cible de CHr supérieure à 29 pg est aussi acceptée en remplacement de TSAT en Europe.<sup>27</sup>

Comme nous l'avons déjà discuté, il n'est pas exceptionnel d'observer un déficit martial fonctionnel même lorsque ces cibles sont atteintes. Cela a été démontré notamment par Besarab et al. dans une étude contrôlée randomisée, comparant les doses de rHuEPO nécessaires pour maintenir une Hb entre 9.5 et 12 g/dL, avec une substitution martiale prescrite pour maintenir, pendant 6 mois, une TSAT de 20-30% dans le groupe contrôle et de 30-50% dans le groupe traité. L'augmentation de TSAT de 20-30% à 30-50% permettait de réduire de 40% les doses d'érythropoïétine.<sup>187</sup> Les besoins en fer étaient nettement accrus dans le groupe traitement et les valeurs de ferritine s'élevaient bien au-dessus des cibles prescrites (658 ng/mL). Dans une autre étude, une réduction de 25% des besoins en rHuEPO a pu être obtenue par l'administration chronique de fer IV chez des patients dont les cibles étaient pourtant atteintes.<sup>188</sup> Richardson et al. ont pris comme cible de la substitution martiale une normalisation de %HYPO (< 2.5%) et ont montré une réduction de 50% de la dose de rHuEPO.<sup>189</sup>

Il semble donc que les cibles recommandées par les directives internationales soient inadéquates. Leur sensibilité n'est pas acceptable tant en clinique que d'un point de vue pharmaco-économique. De manière à établir la puissance diagnostique et les seuils des différents paramètres du monitoring martial, Tessitore et al. <sup>190</sup> ont réalisé une étude de sensibilité-spécificité de ces paramètres en prenant, comme critère diagnostique, l'augmentation des taux d'Hb de plus de 15% sur une période de 8 semaines de thérapie martiale. Le tableau 1 montre les résultats de cette étude.

La meilleure efficacité était donc démontrée pour l'association de %HYPO > 6% et CHr < 29 pg. Le paramètre le plus efficace, utilisé seul, était %HYPO > 6% avec une efficacité superposable à son association avec CHr. L'efficacité des cibles internationales était beaucoup moindre. %HYPO semble donc être le marqueur le plus sensible et le plus spécifique du déficit martial fonctionnel.

**Tableau 1.1 : Efficacité, sensibilité et spécificité des différents paramètres du monitoring martial d'après Tessitore et al. <sup>190</sup>**

	Efficacité (%)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
%HYPO > 6% ou CHr < 29 pg	90.4	86.3	93.2
%HYPO > 6%	89.6	82.4	94.6
%HYPO > 6% ou FRT < 50 ng/mL	86.4	82.4	89.2
%HYPO > 8%	84.8	64.7	98.6
%HYPO > 6% ou TSAT < 19%	83.2	96.1	74.3
%HYPO > 4%	81.6	86.3	78.4
%HYPO > 6% ou sTfR > 1.5 mg/L	77.4	85.7	73.2
CHr < 29 pg	78.4	56.9	40.8
%HYPO > 10%	77.6	45.1	32.7
sTfR > 1.5 mg/L ou TSAT < 19%	74.1	90.5	79.7
sTfR > 1.5 mg/L	74.2	80.9	64.3
CHr < 30 pg	74.4	68.6	46.9
CHr < 28%	72.8	37.2	24.6
TSAT < 19%	70.4	58.8	34.8
FRT < 100 ng/mL ou TSAT < 20%	64.0	68.6	35.6
TFR < 50 ng/mL	64.0	19.6	9.5
CHr < 26 pg	63.2	9.8	6
FRT < 100 ng/mL	60.8	35.3	11.9

## **5. Objectifs du travail**

Le traitement de l'anémie de l'insuffisant rénal chronique est coûteux et l'administration intraveineuse de fer permet de réduire considérablement les doses requises d'érythropoïétine recombinante humaine (rHuEPO). La supplémentation martiale n'est cependant pas dépourvue de risques et d'effets secondaires. Dans ce contexte, l'utilisation de la ferritine et de la saturation de la transferrine dans le monitoring du besoin en fer est souvent décevante. En effet, il n'est pas rare de voir des patients avec un taux de ferritine élevé mais une saturation de la transferrine basse. L'arrivée de la mesure du pourcentage de globules rouges hypochromes (%HYPO) a suscité notre intérêt non seulement clinique mais également scientifique. La démarche qui a guidé ce travail est la suivante.

Nous avons, tout d'abord, étudié les besoins en fer et le métabolisme martial lors d'une stimulation érythropoïétique intense dans un groupe de patients entrant dans un programme d'autotransfusion supporté par rHuEPO. (chapitre 3) Ensuite, nous nous sommes intéressés aux paramètres cliniques et biologiques qui influencent %HYPO. (chapitre 4)

Au chapitre 5, nous avons voulu évaluer l'impact clinique de l'activité érythropoïétique sur la détermination de %HYPO, celle-ci pouvant induire un biais dans la mesure de cet indice. Nous avons donc d'abord étudié une population dans laquelle l'activité érythropoïétique était intense, comme celle de patients traités par de hautes doses de rHuEPO dans le cadre d'un programme d'autotransfusion. Nous avons ensuite examiné ce phénomène dans une population de patients dialysés pendant la phase de correction de l'anémie par l'instauration d'un traitement par rHuEPO.

Le biais engendré par l'activité érythropoïétique sur la détermination de %HYPO est un inconvénient pour sa spécificité dans le dépistage du déficit martial. Dans le chapitre 6, nous introduisons la notion de paramètres des érythrocytes matures, capables de minimiser l'effet de l'activité érythropoïétique sur la mesure des paramètres globulaires par la séparation entre réticulocytes et érythrocytes matures. Nous en définissons le valeurs de référence, validons leur interprétation dans diverses pathologies hématologiques et, enfin, déterminons leur sensibilité et spécificité dans la prédition de la réponse à une supplémentation martiale intraveineuse, véritable définition du déficit martial fonctionnel.

**CHAPITRE 2 :**  
**METHODOLOGIE GENERALE**

Dans cette partie, nous exposerons les données méthodologiques générales communes aux différentes études exposées dans ce mémoire. Les méthodes spécifiques au recueil ou à l'analyse de certaines données seront explicitées dans les chapitres relatifs à ces données.

## **1. Population**

Les populations étudiées dans les différentes études sont très variables. Elles ont été sélectionnées de manière à correspondre aux critères répondant aux besoins spécifiques de l'hypothèse de chaque étude. Pour cette raison, les populations seront détaillées dans chaque étude séparément.

## **2. Analyses de laboratoire**

### **a. Paramètres hématologiques**

Les paramètres hématologiques ont été mesurés à l'aide de compteurs cellulaires Bayer Diagnostics (Tarrytown, NY, USA) de différentes générations selon la période à laquelle chaque étude a été réalisée et l'appareillage disponible au laboratoire. Les compteurs cellulaires utilisés ont été le Technicon H\*2 et l'Advia 120. L'Advia 120 est un compteur cellulaire de dernière génération. Nous allons détailler, ici, ses méthodes de mesure des paramètres globulaires et réticulocytaires. Contrairement à l'Advia, le Technicon H\*2 n'était pas encore capable de mesurer les paramètres réticulocytaires. Les méthodes de mesure de ce dernier sont toutefois superposables mais réduites par rapport à la technique que nous exposons ici.

Pour mesurer les paramètres globulaires, les cellules, tout d'abord, sont rendues sphériques par incubation dans une solution saline légèrement hypotonique. Les réticulocytes sont marqués à l'aide d'oxazine 750, colorant l'ARN, absent des érythrocytes matures. Un détecteur permet la détermination, pour chaque cellule individuellement, de l'absorption d'oxazine. Selon la positivité de celle-ci, les cellules sont identifiées comme des réticulocytes ou comme des érythrocytes matures. La lumière diffractée par la cellule traversant un faisceau laser, peut être mesurée à l'aide de 2 détecteurs. La diffraction à petit angle permet de déterminer le volume et à grand angle, la concentration en Hb de chaque cellule. La multiplication du volume et de la concentration en hémoglobine permet de calculer le contenu en Hb (CH) de chaque cellule. De ces paramètres, le compteur cellulaire dérive le pourcentage de cellules microcytaires (%micro : volume < 60 fL), macrocytaires (%macro : volume > 120 fL), hypochromes (%HYPO : concentration en Hb < 28

pg/mL), hyperchromes (%hyper : concentration en Hb > 41 pg/mL), le pourcentage de cellules avec un CH bas (%lowCH : CH < 27 pg) et avec un CH élevé (%highCH : CH > 31pg). Les réticulocytes sont identifiés par le taux d'absorption d'oxazine. Les cellules négatives pour l'oxazine sont identifiées comme des érythrocytes matures. Les paramètres de routine sont mesurés sur l'ensemble de la population érythroïde : érythrocytes et réticulocytes, sans distinction. Ces méthodes sont représentées sur la figure 2.1.

### b. Autres paramètres biologiques

La ferritine sérique a été mesurée par électrochimiluminescence ; la transferrine, dans le plasma, par méthode immunoturbidimétrique ; le fer sérique, dans le plasma, par la méthode à la ferrozine et la protéine C-réactive (CRP), dans le plasma, par méthode immunoturbidimétrique sur analyseur MODULAR ANALYTICS E170 de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Le coefficient de saturation de la transferrine et la capacité totale de fixation de la transferrine sont obtenus par calcul. Les récepteurs solubles de la transferrine ont été mesurés par ELISA (Quantikine<sup>TM</sup> IVD<sup>TM</sup>, R&D Systems, Minneapolis, USA). L'érythropoïétine était mesurée par radioimmunoessai (Diasorin, Stillwater, MN, USA).

### 3. Statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  écart-types (m  $\pm$  SD). Dans les figures, les moyennes sont affectées de leur erreur type (SEM).

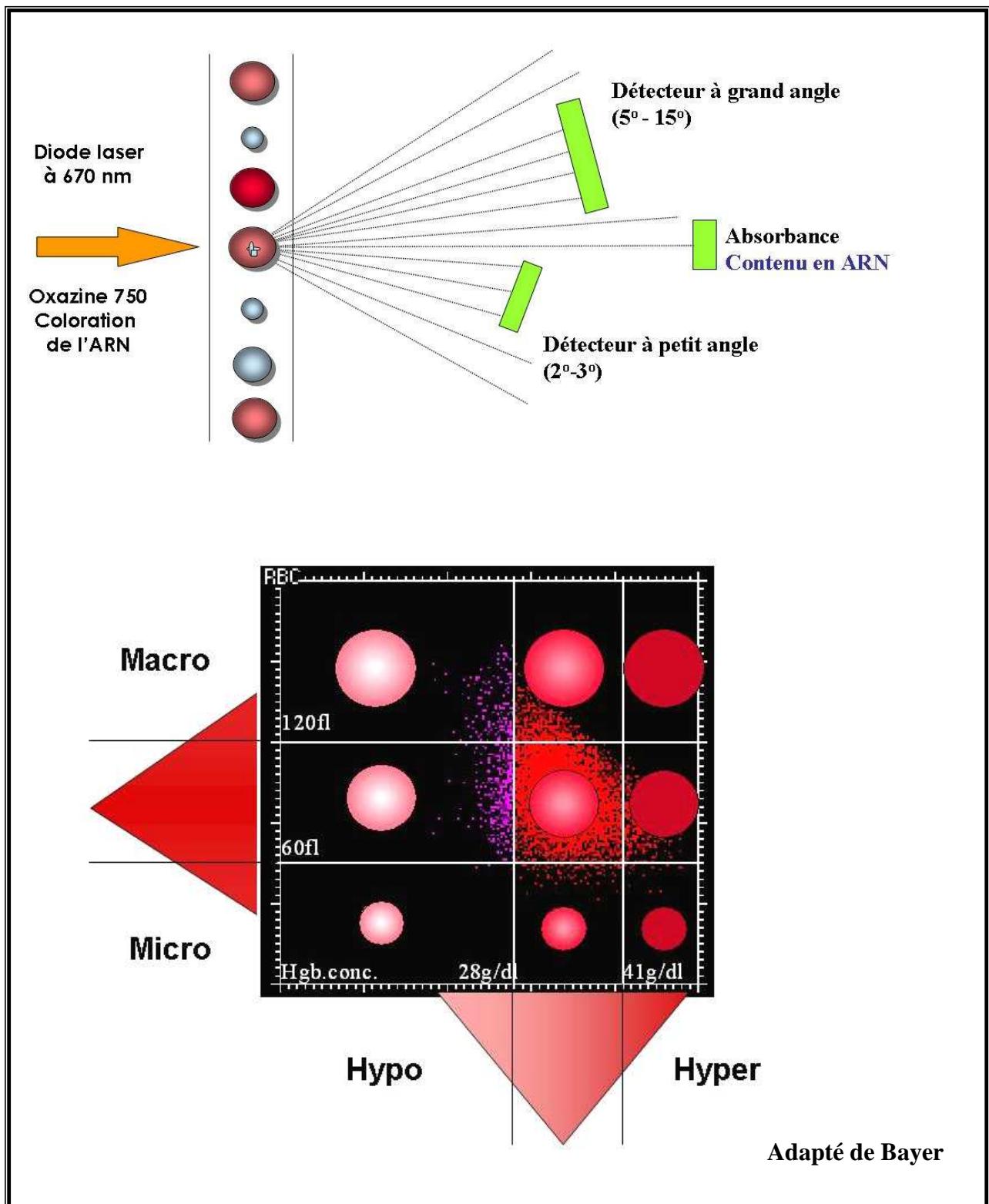
Pour comparer deux moyennes, nous avons eu recours au test t de Student pour échantillons appariés ou non appariés selon les cas.

La normalité de la distribution des données a été jugée par le test de Kolmogorov-Smirnov. Dans certains cas, les données ont été normalisées par une transformation logarithmique.

L'association entre deux variables quantitatives a été mesurée par le coefficient de corrélation classique ou par le coefficient de corrélation de Spearman lorsque les variables ne suivaient pas une distribution normale. La relation entre une variable quantitative et un ensemble de covariables a été étudiée à l'aide de la méthode de régression multiple.

Les résultats ont été considérés comme significatifs au niveau d'incertitude de 5% (p < 0.05).

Des méthodes statistiques appropriées ont été nécessaires pour rencontrer des objectifs plus spécifiques du mémoire ; celles-ci seront détaillées dans leurs parties respectives.

**Figure 2.1 : Méthodes de mesure du compteur cellulaire « Advia 120 ».**

**CHAPITRE 3 :**  
**EFFET DE L'ACTIVITÉ ÉRYTHROPOÏÉTIQUE SUR LE**  
**MÉTABOLISME DU FER**

**AUGMENTATION DE L'ABSORPTION DU FER DANS UN PROGRAMME  
D'AUTOTRANSFUSION SOUTENU PAR ERYTHROPOIETINE.**

Increased iron absorption during autologous blood donation supported by recombinant human erythropoietin therapy.

C Bovy, E Baudoux, JP Salmon, Y Beguin

Accepté pour publication dans « Transfusion »

### **1. Introduction**

La chirurgie, surtout orthopédique et cardiaque, est souvent responsable de pertes sanguines substantielles et entraîne donc un besoin fréquent et parfois important de transfusions de concentrés globulaires. Les transfusions allogéniques comportent des risques de complications telles que la transmission de maladies virales, les réactions transfusionnelles, l'alloimmunisation ou l'immunosuppression.<sup>191</sup> L'inclusion de ces patients dans des programmes de don de sang autologue et d'autotransfusion représente une alternative aux transfusions allogéniques.<sup>192-193</sup> Dans de tels programmes, une unité de sang peut être prélevée toutes les 72 heures pour autant que l'hématocrite reste supérieur à 33 %. Les principales limitations à la prédonation des quantités de sang requises sont la limitation de l'érythropoïèse par la disponibilité du fer<sup>194-195</sup> et la réponse inadaptée de la production d'érythropoïétine endogène aux phlébotomies répétées<sup>196</sup>. Alors que la production basale d'érythrocytes, en réponse à l'anémie induite par ces phlébotomies répétitives, est doublée<sup>197</sup>, la biodisponibilité du fer devient le facteur limitant d'une érythropoïèse efficace. Par contre, chez les patients souffrant d'hémochromatose, cette restriction de l'érythropoïèse par le fer n'existe pas et on peut observer des augmentations de la production de globules rouges jusqu'à 7 fois la production basale.<sup>198</sup> Cette situation peut également être rencontrée chez les patients recevant des suppléments intraveineux de fer (3.5 à 4.5 fois la production basale d'érythrocytes).<sup>199</sup>

Des études antérieures ont montré que le fer corporel total, circulant et de réserve était inférieur chez les patients qui étaient incapables de donner la quantité de sang nécessaire par rapport aux patients chez qui le volume de sang souhaité a été atteint, et ce, malgré une supplémentation martiale orale de 375 mg de sulfate de fer 3 fois par jour.<sup>197</sup> Ces données suggèrent que l'absorption digestive de fer pourrait être insuffisante pour rencontrer les besoins de l'érythropoïèse augmentée. Toutefois, une étude contrôlée randomisée, comparant l'efficacité de 100 mg de Fe<sup>+</sup> 3 fois par jour per os et de 200 mg de Fe<sup>+</sup> intraveineux, n'a pas montré d'amélioration du taux de succès du programme de donation avec aucun des régimes de supplémentation appliqués.<sup>200</sup>

Il existe une relation linéaire entre le degré d'anémie et le logarithme du taux d'EPO endogène.<sup>201</sup> Toutefois, si le taux d'Hb reste supérieur à 10.5 g/dL, les taux d'EPO endogène ne s'élèvent pas au-dessus des valeurs de référence et la pente de la corrélation linéaire entre Hb et EPO est beaucoup plus faible.<sup>202</sup> Ceci peut aboutir à une anémie non compensée en réponse aux phlébotomies répétées.<sup>203</sup> Il en découle que le contenu en globules rouges de chaque unité autologue prélevée est 20% inférieur à celui des unités allogéniques.<sup>203</sup>

L'utilisation de l'érythropoïétine recombinante a donc été introduite pour améliorer la réussite de ces programmes de dons autologues. Une méta-analyse, examinant l'effet de la rHuEPO sur la capacité des patients à donner des unités de sang autologue, a conclu que le risque relatif de transfusion allogénique était de 0.42 (CI 0.28-0.62) pour la chirurgie orthopédique et de 0.25 (CI 0.08-0.82) pour la chirurgie cardiaque chez les patients traités par rHuEPO.<sup>204</sup> Dans une étude prospective, randomisée, en double aveugle, Goodnough et al<sup>205</sup> ont montré que les patients qui recevaient 600UI/kg de rHuEPO 2 fois par semaine pendant 21 jours de donation (6 unités prélevées) étaient capables de donner un nombre plus important d'unités et un volume de globules rouges plus important que le groupe recevant le placebo. Les valeurs d'érythropoïétine et la réponse réticulocytaire étaient significativement plus élevées dans le groupe rHuEPO que dans le groupe placebo dès la 3<sup>ème</sup> visite. Toutefois, le succès restait dépendant du fer circulant mobilisable de départ. Alors que le rôle de la rHuEPO est aussi d'augmenter la mobilisation du fer par l'érythropoïèse,<sup>205</sup> la source de ce fer, qu'elle soit du fer de réserve ou du fer absorbé par voie digestive, reste indéterminée.

Nous avons donc mené une étude pour juger de l'intérêt de la supplémentation martiale orale pour supporter l'érythropoïèse stimulée par rHuEPO dans un programme d'autotransfusion. Le but de l'étude était d'identifier la source de fer utile à la production d'érythrocytes sous rHuEPO et d'estimer la quantité de fer absorbée par voie digestive pendant cette période de stimulation de l'érythropoïèse.

## **2. Patients et méthodes**

### **a. Patients**

Trente-deux patients programmés pour une chirurgie orthopédique (23 prothèses totales de hanche et 8 prothèses totales de genou) ou cardiaque (1 remplacement valvulaire aortique) ont été inclus

dans l'étude. Ils ont été randomisés en 3 groupes. Le groupe 1 recevait le placebo (N = 10). Dans le groupe 2, les patients étaient traités par 300 UI/kg de rHuEPO à la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ième</sup> et 3<sup>ième</sup> visites pour dons de sang autologue (jour 0, 4, 7) (N = 11). Les patients du groupe 3 recevaient 600 UI /kg de rHuEPO selon le même schéma que le groupe 2 (N = 11).

Tous les patients inclus dans cette étude faisaient partie d'une cohorte de patients inclus dans une étude multicentrique destinée à évaluer l'efficacité et la sécurité de l'érythropoïétine alpha dans les programmes de dons de sang autologue. Cette étude est une sous-analyse concernant le métabolisme du fer dans cette stimulation. Tous les patients de notre centre inclus dans l'étude multicentrique ont été inclus dans cette étude.

Les caractéristiques de la population sont reprises dans le tableau 3.1. Les 3 groupes sont superposables en tous points à l'exception des taux de réticulocytes qui étaient significativement plus élevés dans les groupes 2 et 3 par rapport au groupe placebo et des taux d'EPO qui étaient significativement plus élevés dans le groupe 3 par rapport au groupe placebo. Les valeurs de réticulocytes et d'EPO restaient, cependant, dans les valeurs normales dans les 3 groupes.

#### **b. Protocole de l'étude**

Les visites étaient prévues aux jours 0, 4, 7, 11 et 14. A chaque visite, une unité de globules rouges (450 mL) était prélevée pour autant que l'Hct soit supérieur à 33%, avec un maximum de 5 unités par patient. Le placebo ou la rHuEPO était administré par voie sous-cutanée aux jours 0, 4, 7. Tous les patients recevaient 200 mg de Fe<sup>+</sup> sous la forme de sulfate de fer per os et 5 mg de folate per os du jour 0 jusqu'à la sortie de l'hôpital. La chirurgie était programmée au jour 21. Les paramètres biologiques ont été suivis à chaque visite, le soir du jour de l'intervention, au jour +3 après l'intervention et le jour de la sortie de l'hôpital.

#### **c. Laboratoire**

Tous les paramètres globulaires ont été mesurés par le compteur cellulaire Technicon H\*2 (Bayer, Tarrytown, NY, USA). La mesure des autres paramètres a été décrite dans la méthodologie générale.

**Tableau 3.1: Caractéristiques basales des patients**

	Groupe 1 (placebo)	Groupe 2 (300 UI/kg)	Groupe 3 (600 UI/kg)
<b>N</b>	10	11	11
<b>Age (année)</b>	56 ± 14	63 ± 6	61 ± 13
<b>Sexe (M/F)</b>	3/7	6/5	3/8
<b>Poids (kg)</b>	69 ± 12	67 ± 9	69 ± 10
<b>Volume sanguin (mL)</b>	4,121 ± 730	4,272 ± 523	4,169 ± 617
<b>RCM (mL)</b>	1,611 ± 344	1,591 ± 254	1,600 ± 290
<b>Hb (gr/dL)</b>	14.1 ± 1.0	14.1 ± 1.1	13.9 ± 1.1
<b>Hct (%)</b>	42.3 ± 2.8	43.0 ± 3.0	42.2 ± 3.8
<b>RBC (10<sup>6</sup>/μL)</b>	4.60 ± 0.38	4.59 ± 0.30	4.48 ± 0.43
<b>Retic (%)</b>	1.0 ± 0.3	<b>1.7 ± 0.7<sup>*</sup></b>	<b>1.1 ± 0.3<sup>†</sup></b>
<b>Retic (10<sup>3</sup>/μL)</b>	44.4 ± 13.2	<b>74.8 ± 28.2<sup>*</sup></b>	<b>49.0 ± 14.8<sup>†</sup></b>
<b>EPO (mU/mL)</b>	12.9 ± 4.4	17.5 ± 8.2	<b>20.1 ± 8.6<sup>*</sup></b>
<b>sTfR (ng/mL)</b>	4,140 ± 1,270	3,640 ± 300	3,800 ± 1010
<b>Ferritine (ng/mL)</b>	108 ± 91	178 ± 113	104 ± 59
<b>SeFe (μmol/mL)</b>	15.9 ± 6.1	17.2 ± 5.6	17.6 ± 6.1
<b>TIBC (μg/mL)</b>	3.44 ± 0.58	3.04 ± 0.50	3.22 ± 0.44
<b>TSAT (%)</b>	27 ± 12	32 ± 11	30 ± 10
<b>Plaquettes (10<sup>3</sup>/μL)</b>	234 ± 51	248 ± 78	221 ± 61
<b>Durée des dons de sang (j)</b>	20 ± 2	20 ± 2	20 ± 1

SeFe = fer sérique; TIBC = capacité de fixation de la transferrine; TSAT = coefficient de saturation de la transferrine.

\*: p<0.05, comparé au groupe 1.

†: p < 0.05, comparé au groupe 2.

#### d. Formules

Volume sanguin (Blood Volume : BV; mL) = poids (kg) x 60 (mL/kg).

Masse érythrocytaire (Red cell mass : RCM; mL) = BV x (Hct x 0.92)/100.

Volume de globules rouges donné (Don RBC (red blood cells); mL) = volume de sang donné (mL) x Hct du jour (%).

Production de globules rouges (RBC prod; mL) = (RCM 2 – RCM 1) + Don RBC

Hb donnée (gr) = volume de sang donné (mL) x Hb (gr/dL) du jour/100.

Fer donné (Don I (iron); mg) = Hb donnée (gr) x 3.4 mg/gr Hb.

Fer de réserve (Storage iron : SI; mg) = 400 + (ln ferritine – ln 12).<sup>206</sup>

Fer circulant mobilisable (Mobilizable circulating iron : MCI; mg) = BV x ((Hct-34)/100).<sup>205, 207</sup>

Fer mobilisable total (Total mobilizable iron : TMI; mg) = SI + MCI.

Fer globulaire (RBC I; mg) = (BV x Hb (g/dL) x 3.4 x 0.92)/100.

Fer total (Total iron: TI; mg): SI + RBC I + Don I.

Fer absorbé (Absorbed iron : Abs I; mg) = TI pré-op – TI basal.

#### e. Analyses statistiques

Toutes les analyses statisitiques ont été faites à l'aide de GraphPad Prism 4 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Les analyses utilisées ont été décrites dans la méthodologie générale.

### 3. Résultats

#### a. Dons de sang

Une différence, dépendante de la dose de rHuEPO, du nombre d'unités données a été observée entre les groupes. La cible de 5 unités par patient a été obtenue chez 72% des patients du groupe 1, 82% des patients du groupe 2 et 91% des patients du groupe 3. Le nombre d'unités collectées par patient dans les groupes 1, 2 et 3 étaient  $3.6 \pm 0.8$ ,  $4.1 \pm 0.5$  et  $4.6 \pm 0.5$ , respectivement. En comparaison avec le groupe 1, la différence était significative pour le groupe 3 ( $p < 0.01$ ) et à la limite de la signification pour le groupe 2 ( $p = 0.058$ ). Le volume de globules rouges par unité était meilleur dans le groupe 3 comparé avec le groupe 2 (NS) et avec le groupe 1 ( $p < 0.05$ ) (Figure 3.1). De plus, le volume total de globules rouges donnés dans le groupe 3 était de 50% supérieur à celui du groupe 1 (Tableau 3.2).

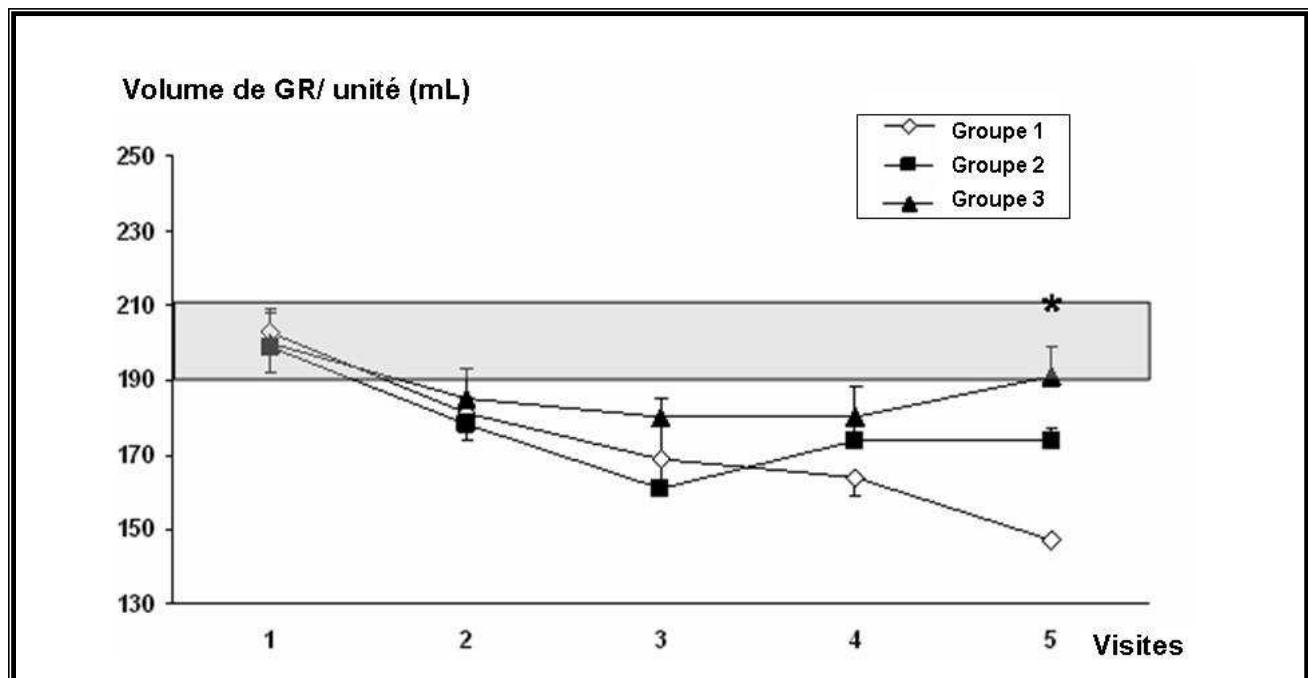
#### b. Erythropoïèse

A l'état basal, les taux d'EPO endogène du groupe 3 étaient significativement plus élevés que ceux du groupe placebo mais restaient dans les valeurs normales. La réticulocytose, à l'état basal, était plus élevée dans le groupe 2 que dans les 2 autres groupes mais restait également dans les valeurs normales. La production cumulative d'érythrocytes était augmentée par le traitement par rHuEPO de manière dose-dépendante (figure 3.2). Cette différence devenait significative dès la 3<sup>ème</sup> visite (jour 7).

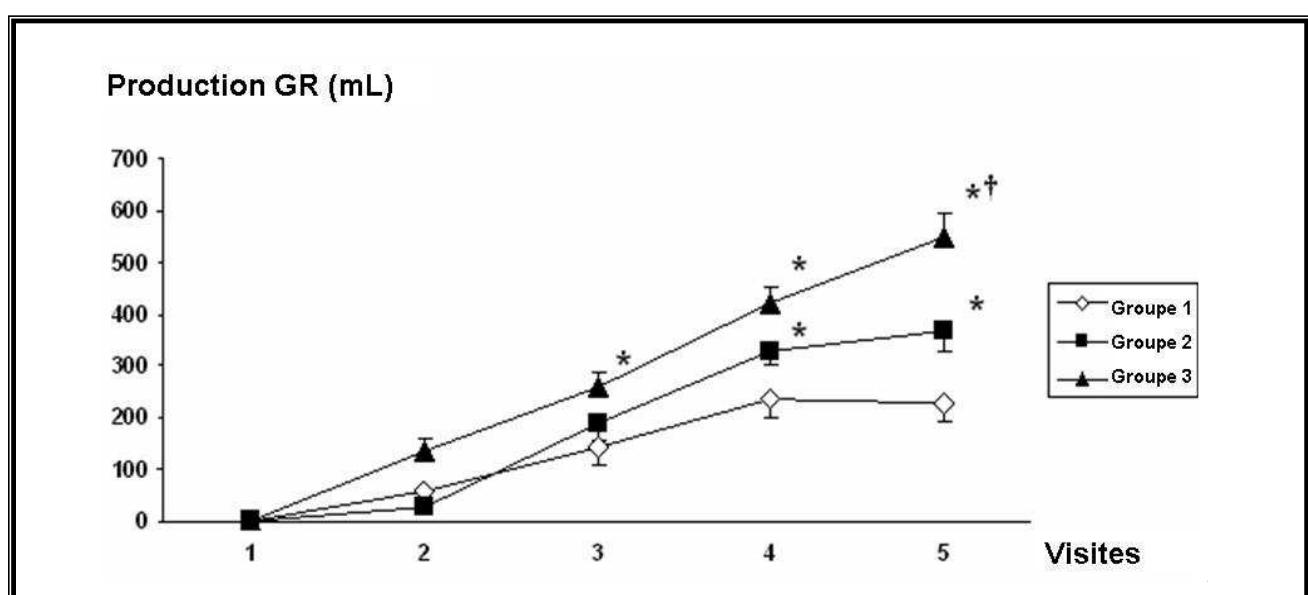
**Figure 3.1 : Volume de globules rouges par unité collectée lors de chaque visite successive**

La zone grisée représente les valeurs normales pour des unités de sang allogénique.

\* :  $p < 0.05$  en comparaison avec le groupe 1.

**Figure 3.2 : Production cumulative de globules rouges au cours des visites pour don de sang**

\* :  $p < 0.05$  en comparaison avec le groupe 1 ; † :  $p < 0.05$  en comparaison avec le groupe 2.



**Table 3.2: Caractéristiques des dons de sang**

	<b>Groupe 1</b> (placebo)	<b>Groupe 2</b> (300 UI/kg)	<b>Groupe 3</b> (600 UI/kg)
Patients donnant 1U	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Patients donnant 2U	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)
Patients donnant 3U	3 (30%)	1 (9%)	0 (0%)
Patients donnant 4U	5 (50%)	8 (73%)	5 (45%)
Patients donnant 5U	1 (10%)	2 (18%)	6 (55%)
RBC vol donné/patient (mL) : Jour 0	203 ± 34	199 ± 29	200 ± 31
RBC vol donné/patient (mL) : Jour 4	162 ± 61	178 ± 25	185 ± 25
RBC vol donné/patient (mL) : Jour 7	124 ± 89	161 ± 56	150 ± 76
RBC vol donné/patient (mL) : Jour 11	131 ± 70	158 ± 56	168 ± 61
RBC vol donné/patient (mL) : Jour 14	30 ± 63	<b>47 ± 81<sup>‡</sup></b>	<b>147 ± 77*</b>
RBC vol donné/patient (mL) : total	650 ± 191	743 ± 147	<b>850 ± 159*</b>
RBC vol total donné par groupe (mL)	6,496	8,173	9,354
BV donné/patient (mL)	1,667 ± 454	1,882 ± 316	<b>2,110 ± 272*</b>
Hb donnée/patient (gr)	212.8 ± 64.3	243.1 ± 52.7	<b>274.2 ± 51.3*</b>
Nombre total d'unités données par groupe	36	45	50
% de la cible (= 5 x N patients)	72.0	81.8	90.9
N unités/patient	3.60 ± 0.84	4.09 ± 0.54	<b>4.55 ± 0.52<sup>†</sup></b>

\*: p&lt;0.05; †: p&lt;0.01: comparé avec groupe 1

‡ : p &lt; 0.05 : comparé avec le groupe 3

La production totale d'Hb était également significativement différente (groupe 1 :  $105.1 \pm 44.5$  gr, groupe 2:  $151.7 \pm 41.1$  gr, groupe 3:  $191.5 \pm 44.4$  gr Hb;  $p = 0.02$  (groupe 2 vs groupe 1),  $p < 0.001$  (groupe 3 vs groupe 1),  $p = 0.009$  (groupe 3 vs groupe 2)). Comme en témoignent les taux de sTfR, l'activité érythropoïétique ne s'est pas modifiée de façon significative au cours de l'étude dans le groupe 1 mais était stimulée de manière très importante chez les patients recevant de la rHuEPO (74% d'augmentation dans le groupe 2 et 117% d'augmentation dans le groupe 3) (figure 3.3). Après interruption de la thérapeutique par rHuEPO, l'activité érythropoïétique est retournée progressivement, avant la chirurgie, à son niveau basal. A ce moment, l'activité érythropoïétique était équivalente dans les 3 groupes. Les réticulocytes augmentent jusqu'à un pic à la 4<sup>ème</sup> visite chez les patients recevant de la rHuEPO ( $p < 0.001$  pour les groupes 2 et 3 vs groupe 1). Le pic des taux sériques d'EPO se situait à la visite 3 dans le groupe 3 , 4 jours plus tôt que le pic de réticulocytose et était significativement plus élevé que dans le groupe 1 ( $p < 0.01$ ) ou dans le groupe 2 ( $p < 0.05$ ).

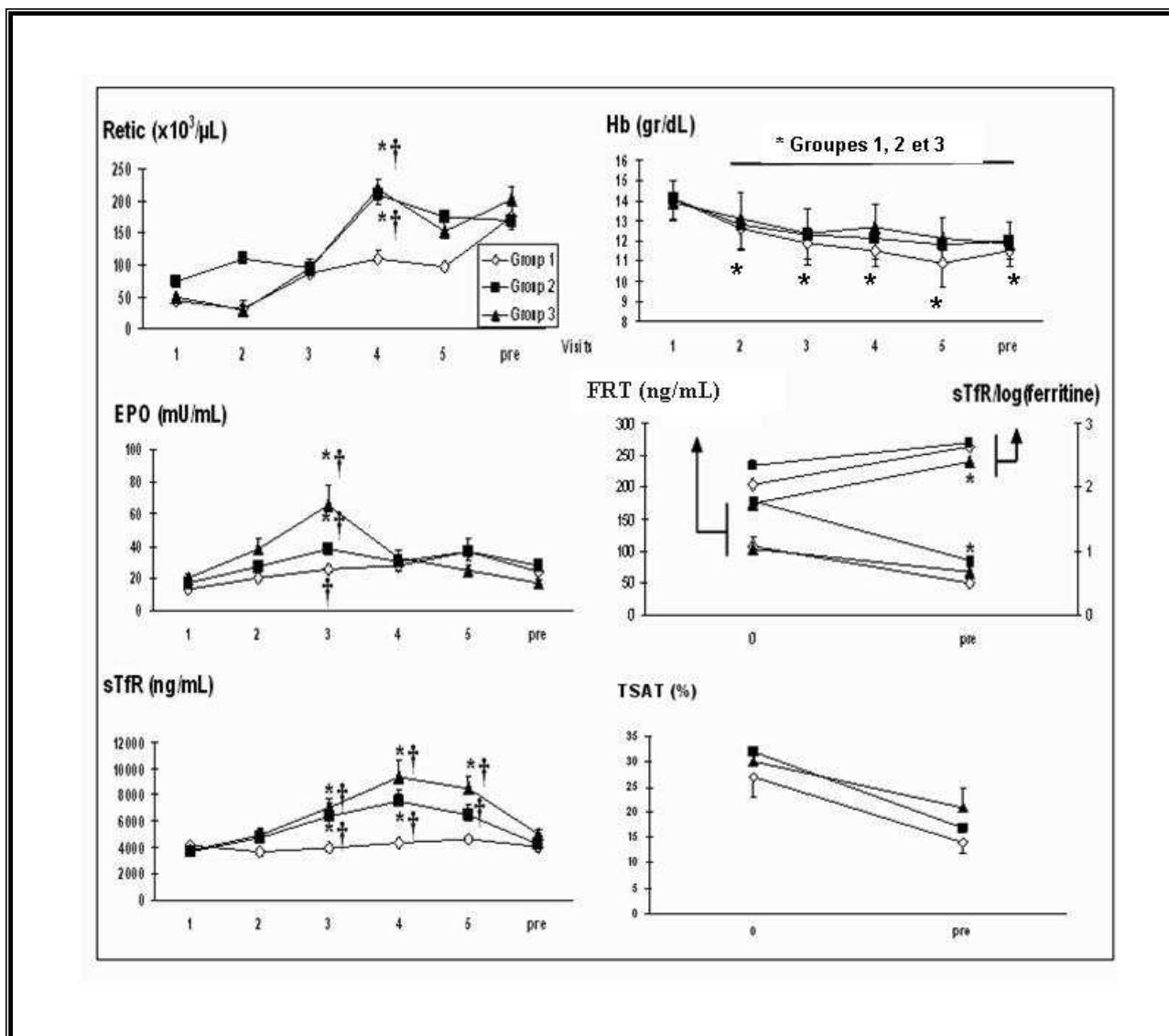
Malgré la différence des quantités de sang données sous rHuEPO, et en raison des différences de production de globules rouges et d'Hb, les taux d'Hb (groupe 1:  $11.5 \pm 0.8$ ; groupe 2:  $12.0 \pm 0.9$ ; groupe 3:  $11.9 \pm 1.0$  g/dL; NS) et l'Hct étaient similaires dans les 3 groupes, avant la chirurgie. (figure 3.3)

#### c. Pertes sanguines et transfusions

Les pertes sanguines pendant la chirurgie étaient similaires dans les 3 groupes (groupe 1:  $1,784 \pm 902$ ; groupe 2:  $1,427 \pm 921$ ; groupe 3:  $1,414 \pm 595$  mL; NS). Tous les patients ont nécessité des transfusions pendant ou après la chirurgie. Il n'y avait pas de différence en ce qui concerne le nombre total d'unités transfusées (groupe 1:  $4.0 \pm 1.6$ ; groupe 2:  $3.5 \pm 0.8$ ; groupe 3:  $3.8 \pm 1.6$ ; NS). Toutefois, en raison de la différence du nombre d'unités collectées, des transfusions allogéniques ont été nécessaires chez 1 patient du groupe 3 (5% des patients traités par rHuEPO) et 4 du groupe 1 (40% des patients traités par placebo) ( $p < 0.01$ ).

**Figure 3.3 : Evolution des réticulocytes (retic), de l'hémoglobine (Hb), des taux sériques d'EPO (EPO), de la ferritine, des récepteurs solubles de la transferrine (sTfR), de sTfR/log(ferritine) et de la saturation de la transferrine (TSAT) pendant la période précédant la chirurgie.**

On note une stimulation de l'activité érythropoïétique tout au long de l'étude, comme en témoigne les taux de sTfR. \* :  $p < 0.05$  par rapport à la visite 1; † :  $p < 0.05$  par rapport au groupe 1.



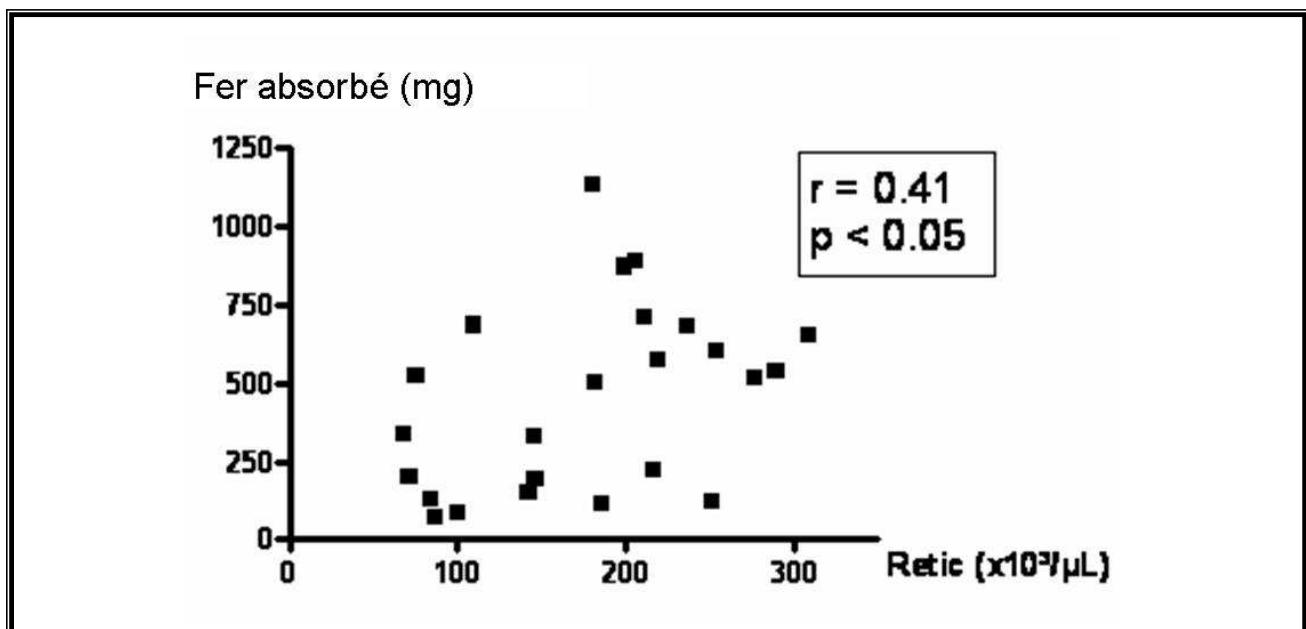
#### d. Métabolisme du fer

Les données concernant le métabolisme du fer sont résumées dans le tableau 3.3. La ferritine, le fer sérique et la saturation de la transferrine ont diminué significativement pendant la période de dons de sang. En conséquence, les réserves de fer calculées ont également été réduites. Le fer circulant mobilisable a également diminué pendant la période de phlébotomies, alors que le fer total augmentait de l'état basal jusqu'à la chirurgie étant donné que ce paramètre intègre le fer corporel total et le fer contenu dans les unités de sang prélevées.

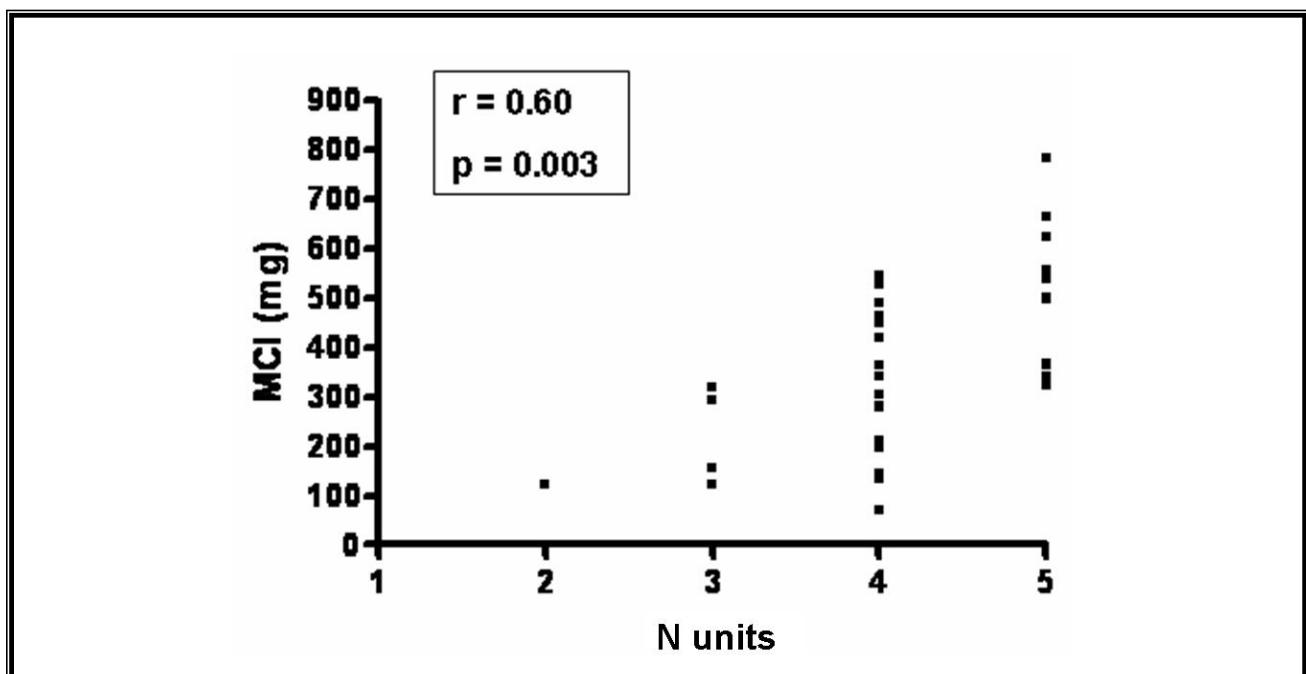
La différence entre le fer total avant chirurgie et à l'état basal permet de calculer l'absorption de fer pendant cette période. Comme montré dans le tableau 3.3, l'absorption de fer est dépendante de la dose de rHuEPO administrée. On observe une petite augmentation de l'absorption de fer dans le groupe placebo ( $47 \pm 198$  mg) mais des augmentations beaucoup plus importantes dans le groupe 2 ( $325 \pm 341$  mg) et dans le groupe 3 ( $593 \pm 286$  mg). L'absorption du fer était corrélée avec le pic de la réticulocytose au jour 11 ( $r = 0.41$  ;  $p < 0.05$ ) (figure 3.4), avec TSAT basal ( $r = 0.35$  ;  $p = 0.08$ ) et avec le pic de sTfR au jour 11 ( $r = 0.33$  ;  $p = 0.09$ ) mais ni avec le pic d'EPO au jour 7 ( $r = 0.19$  ; NS), ni avec FRT basale ( $r = 0.16$  ; NS), ni avec le fer sérique basal ( $r = 0.30$  ; NS), ni avec sTfR/logFRT basal ou avant chirurgie ( $r = -0.06$  et  $r = -0.07$ , respectivement ; NS). Le nombre d'unités collectées était corrélé avec MCI ( $r = 0.60$  ;  $p < 0.01$ ) (figure 3.5) et, dans une moindre mesure, avec l'Hct basal ( $r = 0.35$  ;  $p < 0.05$ ) mais ni avec le fer de réserve, ni avec le fer total.

**Figure 3.4 : Corrélation entre la quantité de fer absorbé par voie orale pendant la période précédant la chirurgie et le pic de réticulocytes au jour 11.**

Retic : nombre de réticulocytes.



**Figure 3.5 : Relation entre le fer circulant mobilisable (MCI) et le nombre d'unités collectées.**



**Table 3:** Paramètres du fer à l'état basal et à la fin de la période de dons de sang

Groupes	Valeurs basales			Pré-chirurgie		
	1	2	3	1	2	3
<b>Ferritine (ng/mL)</b>	108 ± 91	178 ± 113	104 ± 59	50 ± 40	86 ± 63	68 ± 32
<b>SeFe (μmol/L)</b>	15.9 ± 6.1	17.2 ± 5.6	17.6 ± 6.1	7.7 ± 2.7	9.1 ± 2.3	11.5 ± 8.2
<b>TSAT (%)</b>	27 ± 12	32 ± 11	30 ± 10	14 ± 5	17 ± 4	21 ± 13
<b>MCI (mg)</b>	377 ± 192	390 ± 191	347 ± 185	10 ± 122	79 ± 138	66 ± 161
<b>SI (mg)</b>	745 ± 351	1,010 ± 245	775 ± 339	438 ± 362	714 ± 252	652 ± 190
<b>TMI (mg)</b>	1,122 ± 412	1,400 ± 255	1,122 ± 359	440 ± 413	808 ± 359	718 ± 243
<b>TI (mg)</b>	2,574 ± 569	2,906 ± 334	2,594 ± 497	2,700 ± 662	3,247 ± 559	3,187 ± 538
<b>Fer donné (mg)</b>	-	-	-	724 ± 219	826 ± 179	<b>932 ± 174*</b>
<b>Fer circulant donné (mg)</b>	-	-	-	359 ± 254	579 ± 366	<b>809 ± 351†</b>
<b>Fer de réserve donné (mg)</b>	-	-	-	363 ± 147	280 ± 247	<b>123 ± 269*</b>
<b>Fer absorbé (mg)</b>	-	-	-	47 ± 198	<b>325 ± 341*</b>	<b>593 ± 286‡</b>

TSAT = coefficient de saturation de la transferrine; SeFe = fer sérique

\*: p&lt;0.05; †: p&lt;0.01: comparé avec le groupe 1

‡: p&lt;0.05: comparé avec le groupe 2.

#### 4. Discussion

Alors que les transfusions sanguines sont difficilement évitables lors de procédures chirurgicales invasives, les programmes d'autotransfusion permettent de réduire le recours aux transfusions allogéniques. De ce fait, les risques associés à ces transfusions, tels que la transmission de maladies infectieuses et l'immunisation, peuvent être limités. Le traitement par rHuEPO permet d'améliorer les dons de sang autologues en augmentant le nombre d'unités qui peuvent être prélevées.<sup>205, 208-209</sup> Ce traitement entraîne une stimulation de la production érythrocytaire au-delà de la réponse qui pourrait être attendue par la sécrétion endogène d'EPO en réponse aux phlébotomies. Cette production de globules rouges sous rHuEPO peut atteindre l'équivalent de 5 unités pendant la période de donation alors que dans le groupe placebo, la production n'est que de 3 unités.<sup>210-211</sup>

En plus de confirmer l'amélioration du taux de succès de l'autodonation supportée par rHuEPO, notre étude a montré que, par une accélération et une augmentation de la production érythrocytaire, le volume de globules rouges contenus dans une unité de sang restait plus stable tout au long des phlébotomies répétées sous rHuEPO que sous placebo. De ce fait, le volume de globules rouges des unités autologues dans le groupe recevant 600 UI/kg restait pratiquement équivalent à celui des unités allogéniques. En conséquence, non seulement la quantité mais également la qualité des unités prélevées étaient améliorées par le traitement par rHuEPO.

Dans notre étude, le meilleur prédicteur du nombre d'unités qui peuvent être collectées était le fer circulant mobilisable (MCI). Goodnough et al.<sup>205</sup> ont également montré une corrélation significative entre le nombre d'unités collectées et le MCI. Toutefois, dans leur étude, l'hématocrite basal était le meilleur prédicteur du nombre d'unités collectées. Une corrélation existe, dans notre étude, entre l'Hct basal et le nombre d'unités données mais le MCI restait le meilleur prédicteur. Cette observation est vraie pour les groupes traités par rHuEPO mais également dans le groupe placebo. Ceci signifie que, lors de phlébotomies répétées, l'érythropoïèse étant stimulée ou non par de l'érythropoïétine exogène, la mobilisation du fer de réserve est inefficace ou trop lente pour rencontrer les besoins de la production érythrocytaire. L'implication directe de cette observation est qu'une source extérieure de fer, qu'elle soit orale ou intraveineuse, est absolument nécessaire lors des traitements par rHuEPO. De nombreuses études chez les patients insuffisants rénaux chroniques ont bien démontré l'importance de la supplémentation martiale dans les traitements au long cours de l'anémie rénale traitée par rHuEPO.<sup>27-28</sup> De plus, dans notre étude, les patients incapables de donner plus de 3 unités pendant la période de donation étaient ceux qui présentaient les valeurs

basales les plus basses de MCI, fer total et fer de réserve. Ceci pourrait suggérer qu'une supplémentation martiale précoce pourrait être utile pendant une thérapie par rHuEPO chez les patients en déficit martial.

Malgré les preuves indirectes de besoins exogènes en fer lors de la stimulation érythropoïétique, l'utilité de la supplémentation martiale dans les programmes d'autotransfusion stimulés par rHuEPO reste controversée .<sup>194, 200, 212-214</sup> Par l'estimation des pools de fer des différents compartiments de l'organisme (voir formules) et des unités de sang prélevées, nous avons pu estimer les quantités totales de fer absorbées oralement pendant la période qui précède la chirurgie. Malgré la consommation d'une certaine quantité de fer de réserve, comme en témoigne la diminution des taux de ferritine avant la chirurgie, l'érythropoïèse, stimulée par rHuEPO, dépendait largement d'un apport externe. Il est possible que l'estimation du fer de réserve à partir des taux de ferritine soit un peu sous-évaluée pendant le traitement par rHuEPO en raison de l'expansion de la moelle érythroïde qui réduit le pool labile de fer dans les macrophages et entraîne, de ce fait, une diminution des taux de ferritine même si les réserves restent constantes.<sup>196</sup> Toutefois, ce n'était plus le cas au moment de la chirurgie car l'activité érythropoïétique était virtuellement retournée à la normale.

Nous avons pu démontrer un augmentation extrêmement importante de l'absorption orale de fer sous rHuEPO en comparaison avec le groupe placebo. Dans le groupe 2, l'absorption était multipliée par 15.5 par rapport à une population normale et par 7 par rapport au groupe placebo. Dans le groupe 3, elle était multipliée par 28.2 et par 12.8, respectivement. L'absorption de fer était donc dépendante de la dose de rHuEPO administrée. En utilisant une technique d'absorption de fer marqué et d'incorporation au globules rouges, Skikne et al. <sup>75</sup> avaient démontré une augmentation de l'absorption de fer non-hémique de 3.5 à 9 fois suite à l'administration de rHuEPO à des sujets sains. Nous avons démontré que ceci reste vrai lors de stimulations érythropoïétiques importantes pendant une période plus longue. En conséquence, notre étude suggère que la stimulation érythropoïétique par rHuEPO pourrait être un stimulant plus important de l'absorption du fer que la régulation du fer de réserve. Cette énorme absorption de fer n'était possible que grâce à la supplémentation martiale par voie orale et n'aurait pu se produire avec les apports alimentaires moyens. Le déficit martial induit par rHuEPO n'était pas le facteur principal entraînant l'augmentation de l'absorption du fer car les taux de ferritine restaient dans les valeurs normales. Nous ne pouvons cependant pas exclure que le déficit martial fonctionnel contribue à la stimulation de l'absorption de fer étant donné que la corrélation entre celle-ci et TSAT était à la limite de la

signification. Il a également été démontré que l'hepcidine, qui inhibe l'absorption de fer et son relargage par les macrophages, est produite en quantité réduite quand l'érythropoïèse est stimulée ce qui pourrait faire le lien entre EPO et absorption de fer.<sup>120-121</sup>

En conclusion, le traitement par rHuEPO est sûr et efficace, permettant une amélioration du programme de collecte d'unités autologues de sang. En plus de son effet bien démontré sur le nombre d'unités de sang qui peuvent être récoltées, nous avons démontré une meilleure qualité de ces unités sous rHuEPO. Il semble que le fer circulant mobilisable soit le meilleur prédicteur du nombre d'unités prélevées, reflétant un relargage inapproprié du fer de réserve et mettant en évidence l'importance d'un apport exogène de fer. L'utilité des suppléments oraux de fer a été démontrée étant donné que son absorption est augmentée de manière très importante par la stimulation érythropoïétique induite par l'administration de rHuEPO.

**CHAPITRE 4 :**  
**FACTEURS DÉTERMINANT LE POURCENTAGE DE**  
**GLOBULES ROUGES HYPOCHROMES CHEZ LES PATIENTS**  
**EN DIALYSE CHRONIQUE**

Factors determining the percentage of hypochromic red blood cells in hemodialysis patients

C. Bovy, C. Tsobo, L. Crapanzano, G. Rorive, Y. Beguin, A. Albert et J.M. Paulus.

Kidney International 1999,56(3):1113-1119.

## 1. Introduction

L'érythropoïèse stimulée par le traitement par rHuEPO augmente de manière significative les besoins en fer et peut donc conduire à un déficit martial, première cause de résistance à la rHuEPO. Des paramètres sensibles et spécifiques du déficit martial fonctionnel sont donc nécessaires pour assurer un monitoring martial et une supplémentation en fer efficace. La ferritine et la saturation de la transferrine étaient habituellement utilisés dans ce but et le sont toujours aux USA (DOQI)<sup>28</sup>.

La ferritine sérique reflète de manière adéquate les réserves de fer pour autant que le métabolisme du fer soit en équilibre. Toutefois, les valeurs de ferritine varient indépendamment des réserves de fer dans des conditions de déficit en acide folique ou vitamine B12, dans les états inflammatoires et les maladies infectieuses, ainsi que dans les pathologies néoplasiques.<sup>216</sup> De plus, le déficit martial fonctionnel peut être présent malgré des réserves en fer adéquates, secondairement à un défaut de mobilisation.

La saturation de la transferrine est un paramètre plus sensible de la biodisponibilité du fer. Cependant, celui-ci est fortement modifié par les variations importantes du fer sérique, ce qui est le cas dans le traitement par rHuEPO en raison de l'augmentation de la capture par la moelle érythropoïétique et l'injection intraveineuse de fer.<sup>217</sup>

Le pourcentage de globules rouges hypochromes a été suggéré comme étant un marqueur sensible et précoce du déficit martial fonctionnel<sup>180, 218-222</sup>. Différentes études ont montré une augmentation de %HYPO dans le décours d'un traitement par rHuEPO.<sup>218, 220</sup> Cette augmentation pouvait être évitée de manière significative par l'administration de fer.<sup>218, 220-221</sup>

Le contexte clinique des patients dialysés traités par rHuEPO est complexe, incluant des fluctuations parfois importantes de l'hémoglobine, du métabolisme du fer, de l'activité érythropoïétique et du syndrome inflammatoire, secondaires à l'évolution de la pathologie et du traitement. L'influence de ces paramètres biologiques sur le pourcentage de globules rouges hypochromes n'avait pas encore été investigué. Le but de cette étude était de déterminer quantitativement l'influence de tels paramètres sur %HYPO.

## 2. Méthodes

### a. Groupe contrôle

Les valeurs de référence pour le pourcentage de globules rouges hypochromes ont été mesurées chez 537 donneurs de sang sains. Les échantillons ont été prélevés directement après le don de sang. Chez 32 de ces donneurs, un échantillon a également été prélevé avant don de sang pour comparaison entre les valeurs hématologiques avant et après don de sang.

### b. Patients

Soixante-quatre patients hémodialysés chroniques ont été inclus dans l'étude. Les caractéristiques de ces patients sont exposées dans le tableau 4.1. Les patients présentant une néoplasie et ceux ayant eu une chute brutale du taux d'hémoglobine dans les 3 mois précédent le début de l'étude ont été exclus des analyses. Cinquante-six patients étaient traités par érythropoïétine recombinante humaine par voie intraveineuse trois fois par semaine, avec une cible d'hémoglobine de 11 g/dL. Ces patients ont été étudiés pendant la phase de maintenance de leur traitement par rHuEPO avec des dosages stables et des taux d'hémoglobine stables. Des suppléments intraveineux de fer ont été administrés sous la forme de fer sucrose (Venofer<sup>®</sup>, Vifor, St. Gallen, Suisse) à la dose de 100 à 600 mg/mois pour maintenir une ferritinémie > 300 ng/mL et une saturation de la transferrine > 20%.

### c. Paramètres étudiés

Les paramètres cliniques suivants ont été étudiés : âge, sexe, poids, dose d'érythropoïétine administrée et dose de dialyse (Kt/V). Le Kt/V est une mesure de l'extraction d'urée au cours d'une séance de dialyse où K représente le coefficient de perméabilité, t est la durée de la dialyse et V est le volume de distribution . Il se calcule comme suit :  $(0.23 * (1 - (\text{urée après dialyse} / \text{urée avant dialyse}))) - 0.284$ . (formule de Basile)<sup>223</sup>

Les paramètres biologiques suivants ont été étudiés : FRT, SeFe, TSAT, sTfR, CRP et les paramètres hématologiques mesurés à l'aide du compteur cellulaire H\*2 (Bayer, Tarrytown, NY, USA).

**Tableau 4.1 : Caractéristiques des patients**

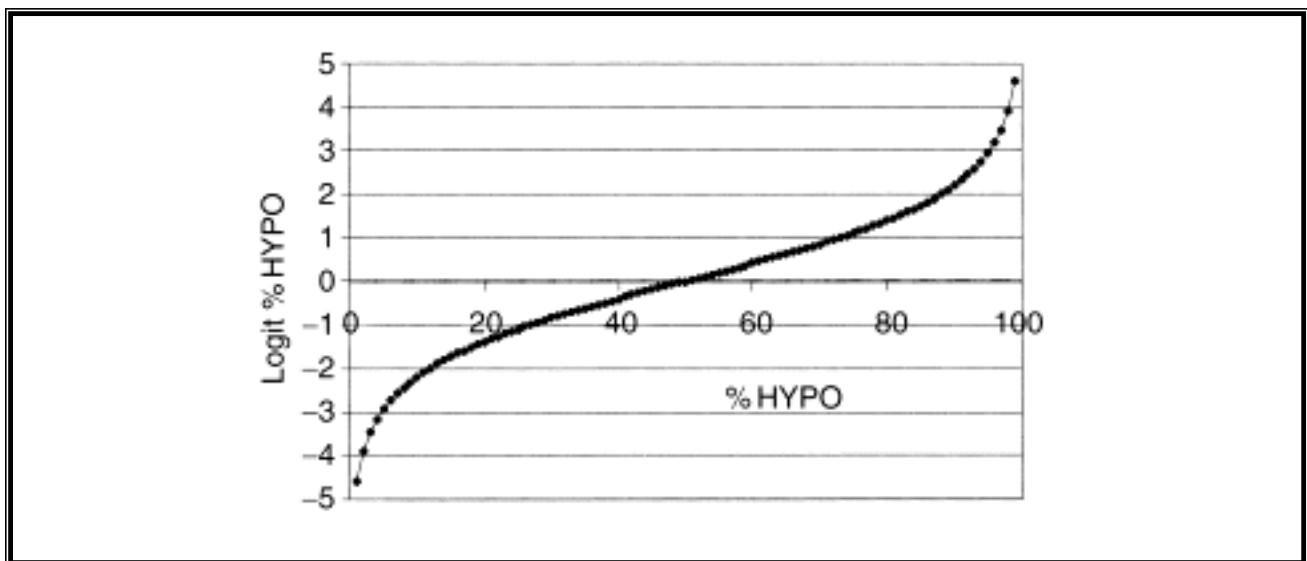
Variables	
N patients (hommes/femmes)	64 (37/27)
Age (années)	55 ± 15
Durée de la dialyse (mois)	75.4 ± 75.6
N traité par rHuEPO	56
Dose de rHuEPO (UI/kg/semaine)	187 ± 142
Hb (g/dl)	11.3 ± 1.1
N (%) avec Hb < 10 g/dl	8 (12%)
N avec supplémentation martiale	53
Ferritine (ng/ml)	267 ± 179
N (%) avec ferritine < 200 ng/ml	28 (44%)
CRP (mg/L)	12.5 ± 21.1
N (%) avec CRP > 6 mg/L	27 (42%)
%HYPO	5.3 ± 7.5
N (%) avec %HYPO > 3.7%	24 (37%)

#### d. Statistiques

L'influence du statut martial et du statut inflammatoire a été analysée par analyse de variance (ANOVA). Les valeurs de FRT, sTfR, CRP, poids, PTH et dose de rHuEPO ne suivant pas une distribution normale, elles ont subi une transformation logarithmique avant d'être insérées dans les analyses de corrélation et de régression. Pour la CRP et la dose de rHuEPO, la constante 1 a été ajoutée avant la transformation logarithmique pour éviter les valeurs nulles.

Dans les régressions multiples, portant sur la variable %HYPO, celle-ci a subi une transformation logit afin d'entrer dans les conditions d'applicabilité de la méthode. Par définition, logit (%HYPO) =  $\ln (\%HYPO/(100 - \%HYPO))$ . Ainsi, à partir de la régression multiple de logit (%HYPO) sur les autres paramètres ( $\text{logit}(\%HYPO) = C_0 + C_1X_1 + \dots + C_pX_p$ ), il est possible d'obtenir une estimation de logit(%HYPO) et dès lors de %HYPO en se reportant à la figure 4.1.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant SigmaStat et SigmaPlot (SPSS Sciences, Erkrath, Allemagne).

**Figure 4.1 : Relation entre %HYPO et logit%HYPO**

### 3. Résultats

#### a. Groupe contrôle

Les valeurs de référence, déterminées comme les 99% centraux de la distribution des prélèvements réalisés chez 537 donneurs de sang sains, étaient comprises entre 0.0 et 3.7 % de globules rouges hypochromes. Les comparaisons entre les paramètres hématologiques des prélèvements avant et après don de sang chez 32 des donneurs n'ont montré aucune différence significative, y compris chez les patients ayant un taux élevé de %HYPO. (Tableau 4.2)

**Tableau 4.2 : Comparaison des paramètres hématologiques avant et après don de sang**

Variables	Avant don de sang	Après don de sang
%HYPO (%)	$5.61 \pm 6.65$	$5.40 \pm 7.23$
Hb (g/dl)	$13.8 \pm 1.4$	$13.8 \pm 1.3$
RBC ( $\times 10^9/L$ )	$4.79 \pm 0.46$	$4.77 \pm 0.43$
Hématocrite (%)	$41.6 \pm 3.7$	$41.5 \pm 3.2$
MCV (fl)	$87.1 \pm 3.2$	$87.0 \pm 3.6$
Réticulocytes ( $\times 10^6/L$ )	$130 \pm 34$	$129 \pm 34$

Aucune différence significative au seuil de 5% n'a pu être observée.

### b. Corrélations entre paramètres

Du fait du nombre important de paramètres mesurés présentant une certaine analogie, ceux-ci ont été regroupés en 4 classes pour évaluer le statut martial (SeFe, TSAT, FRT, sTfR), l'inflammation (CRP), l'activité érythropoïétique (réticulocytose et sTfR) et la dose de rHuEPO administrée. Les valeurs de ces paramètres ont été entrées dans une analyse de corrélation exposée dans le tableau 4.3 et la figure 4.2.

Cette analyse montre que :

- (a) les paramètres du monitoring martial sont significativement intercorrélés;
- (b) sTfR, TSAT et SeFe sont hautement significativement prédicteurs ( $p < 0.001$ ) et FRT significativement prédicteur ( $p < 0.05$ ) de %HYPO;
- (c) %HYPO est également corrélé significativement à la réticulocytose ( $p < 0.01$ ), à la dose de rHuEPO ( $p < 0.01$ ) et à la CRP ( $p < 0.05$ ).

Une observation intéressante est que des valeurs de %HYPO  $> 3.7\%$  (percentile 99.5 de la population de référence) sont observées chez des patients présentant toute la gamme de valeurs de FRT jusqu'à 1000 ng/mL (figure 4.2). A l'opposé, tous les patients ayant une saturation de la transferrine  $> 30\%$  ou SeFe  $> 12 \mu\text{mol/L}$  avaient un %HYPO  $< 3.7\%$ .

Des analyses complémentaires ont été réalisées afin de dissocier l'influence du statut martial et de l'inflammation sur le %HYPO. A cet effet, les patients ont été classés en 4 catégories selon TSAT ( $> 30\%$  ou  $< 30\%$ ) et la présence (CRP  $> 6 \text{ mg/L}$ ) ou l'absence (CRP  $< 6 \text{ mg/l}$ ) de syndrome inflammatoire. Les sujets sans syndrome inflammatoire et avec un TSAT  $> 30\%$  avaient le %HYPO le plus bas ( $0.8 \pm 0.6$ , N = 9), alors que ceux qui présentaient un syndrome inflammatoire et une TSAT  $< 30\%$  avaient les plus hautes valeurs de %HYPO ( $7.2 \pm 8.4$ , N = 20). Les patients sans syndrome inflammatoire et avec une TSAT  $< 30\%$  (N = 23) et les patients avec un syndrome inflammatoire et une TSAT  $> 30\%$  (N = 4) avaient un %HYPO intermédiaire ( $2.5 \pm 1.4$  et  $5.2 \pm 6.0$ , respectivement) (Tableau 4.4). Par une analyse de variance, %HYPO a été démontré comme influencé par chacun des paramètres TSAT ( $p = 0.003$ ) et CRP ( $p = 0.03$ ).

c. Prédiction de %HYPO par les autres variables étudiées : régressions multiples

L'influence des différentes variables étudiées sur %HYPO (âge, sexe, poids, CRP, FRT, Tf, TSAT, sTfR, urée, PTH, Kt/V, dose de rHuEPO et réticulocytose) a été déterminée par des régressions multiples pas à pas. Seules les équations dans lesquelles tous les coefficients diffèrent de 0 au coefficient de certitude de 5% ont été retenues. Etant donné que les intercorrélations entre les paramètres du fer (multicollinéarité) tendent à réduire l'efficacité des régressions s'ils sont entrés simultanément dans l'équation de régression, %HYPO a été corrélé à un set alternatif de 9 variables dans lesquelles seulement un des paramètres du fer (TSAT, FRT ou sTfR) était inclus. L'équation la plus significative (figure 4.3) était :

Logit %HYPO = - 11.76 + 4.87 log sTfR + 0.40 log (EPO + 1) + 0.75 log (CRP + 1) ( $r = 0.69$  ;  $p < 0.001$ ).

Les autres équations, moins significatives, confirment que %HYPO est principalement influencé par les paramètres du fer (sTfR, TSAT, SeFe ou FRT), par la CRP et par la dose de rHuEPO administrée. La stratification des patients selon la présence ou l'absence de syndrome inflammatoire ne modifie pas le degré de signification des paramètres du fer dans la prédiction de %HYPO.

Pour essayer de déterminer pourquoi sTfR avait un niveau de corrélation avec %HYPO supérieur aux autres paramètres, l'équation suivante a pu être dérivée :  $\log sTfR = - 0.34 - 0.79 TSAT + 0.40 \log \text{rétic}$  ( $r = 0.59$ ). Le fait que sTfR soit indépendamment influencé par le statut martial et l'activité érythropoïétique peut expliquer que sTfR soit le meilleur prédicteur simple de %HYPO.

**Tableau 4.3 : Matrice de corrélations des variables étudiées**

	Tf	SeFe	TSAT	FRT	sTfR	CRP	Retic	EPO	%HYPO
<b>Tf</b>		0.10	<b>-0.34</b>	<b>-0.37</b>	<b>0.36</b>	-0.11	<b>0.37</b>	0.25	0.11
<b>SeFe</b>	0.10		<b>0.89</b>	0.22	<b>-0.34</b>	<b>-0.40</b>	-0.11	-0.03	<b>-0.46</b>
<b>TSAT</b>	<b>-0.34</b>	<b>0.89</b>		<b>0.36</b>	<b>-0.46</b>	<b>-0.34</b>	-0.22	-0.16	<b>-0.48</b>
<b>FRT</b>	<b>-0.37</b>	0.22	<b>0.36</b>		<b>-0.43</b>	0.07	-0.11	-0.14	-0.28*
<b>sTfR</b>	<b>0.36</b>	<b>-0.34</b>	<b>-0.46</b>	<b>-0.43</b>		-0.06	<b>0.46</b>	0.31*	<b>0.60</b>
<b>CRP</b>	-0.11	<b>-0.40</b>	<b>-0.34</b>	0.07	-0.06		0.03	-0.02	0.29*
<b>Retic</b>	<b>0.37</b>	-0.11	-0.22	-0.11	<b>0.46</b>	0.03		<b>0.34</b>	<b>0.41</b>
<b>EPO</b>	0.25	-0.03	-0.16	-0.14	0.31*	-0.02	<b>0.34</b>		<b>0.38</b>
<b>%HYPO</b>	0.11	<b>-0.46</b>	<b>-0.48</b>	-0.28*	<b>0.60</b>	0.29*	<b>0.41</b>	<b>0.38</b>	

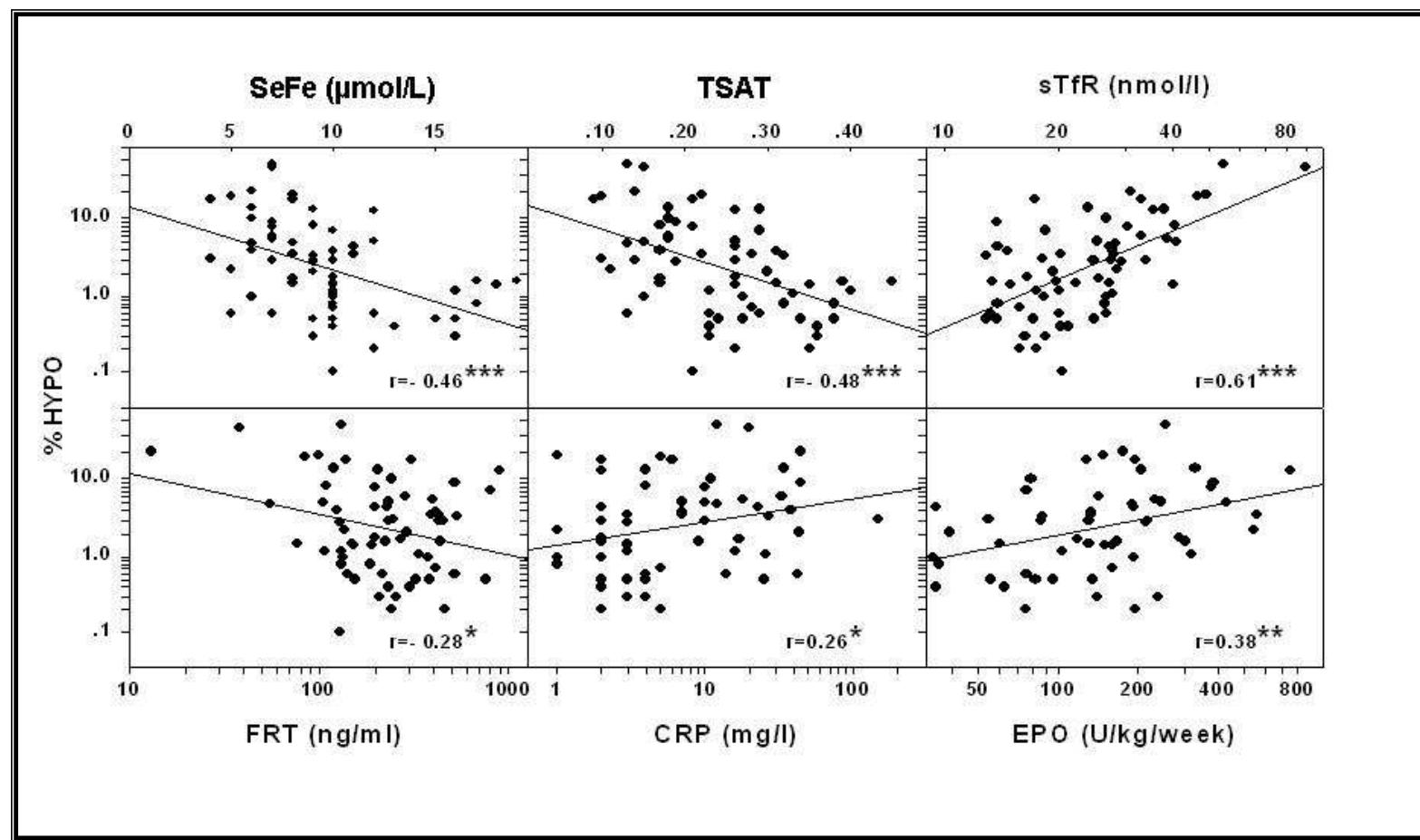
\* p<0.05, caractères gras p<0.01, caractères gras et soulignés p<0.001.

La zone grisée met en évidence les intercorrélations entre les différents paramètres du bilan martial.

**Figure 4.2 : Corrélations entre %HYPO et les paramètres du monitoring martial [fer sérique (SeFe), saturation de la transferrine (TSAT), récepteurs solubles de la transferrine (sTfR) et ferritine (FRT)], CRP et dose de rHuEPO administrée (EPO)**

sTfR, FRT, CRP et EPO sont exprimés sur l'axe des abscisses de façon logarithmique pour normaliser ces facteurs. %HYPO est exprimé sur l'axe des ordonnées à l'échelle logarithmique.

\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001

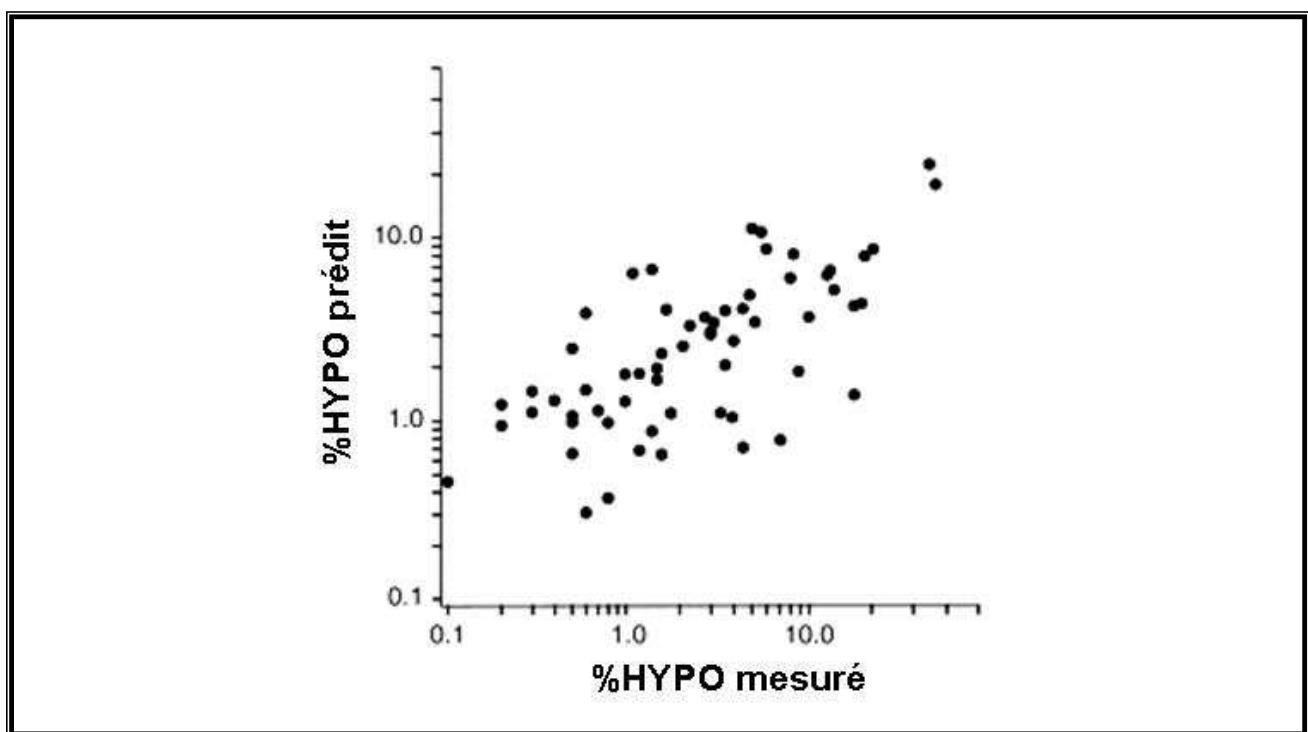


**Tableau 4.4 : Valeurs de %HYPO en fonction de la saturation de la transferrine (TSAT) et du statut inflammatoire (CRP).**

	CRP < 6 mg/L	CRP > 6 mg/L
TSAT > 30%	0.8 ± 0.6 (n = 9)	5.2 ± 6.0 (n = 4)
TSAT < 30%	2.5 ± 1.4 (n = 23)	7.2 ± 8.4 (n = 20)

**Figure 4.3 : Relation entre %HYPO mesuré et %HYPO calculé selon l'équation :**

$$\text{Logit \%HYPO} = -11.76 + 4.87 \log \text{sTfR} + 0.40 \log (\text{EPO} + 1) + 0.75 \log (\text{CRP} + 1)$$



#### 4. Discussion

Il a déjà été démontré à maintes reprises que la mesure des réserves de fer, par le dosage de la ferritine, est insuffisante pour juger de l'état ferriprive fonctionnel engendré par le traitement par rHuEPO et dès lors guider le clinicien dans la prescription de suppléments de fer. Les données de notre étude confirment l'influence des paramètres du monitoring martial sur le pourcentage de globules rouges hypochromes et établissent, pour la première fois, l'influence de l'inflammation sur

ce paramètre. L'influence de la dose de rHuEPO reflète l'augmentation des besoins en fer et donc le déficit fonctionnel en fer lié à l'importance de l'activité érythropoïétique.<sup>180, 218, 227</sup>

L'inflammation est connue pour entraîner un déficit martial fonctionnel en bloquant la libération de fer par le système réticulo-endothélial.<sup>224</sup> Il n'est donc pas surprenant de trouver une corrélation positive entre la CRP et %HYPO. L'interleukine 1 (IL-1) stimule la synthèse intracellulaire de ferritine par un mécanisme translationnel indépendant du statut martial, avec comme résultat le « trapping » intracellulaire de fer et une biodisponibilité du fer diminuée pour l'érythropoïèse.<sup>225</sup> De plus, IL-1 et TNF- $\alpha$  induisent la sécrétion hépatique de ferritine sérique, une molécule glycosylée, pauvre en fer, avec une séquence d'acides aminés différente de la ferritine intracellulaire [24] qui joue un rôle négligeable dans les échanges de fer.

Une corrélation négative entre la ferritine et %HYPO a été démontrée.<sup>180, 220</sup> Cette relation a été confirmée dans cette étude. Cette observation a justifié la recommandation selon laquelle il faut maintenir les patients sous suppléments martiaux pour atteindre une ferritine de 300 ng/mL. Toutefois, la figure 2 démontre que des valeurs élevées de %HYPO peuvent être retrouvées en présence de taux de ferritine compris entre 12 et 900 ng/mL. Ceci est en accord avec les publications démontrant que des réserves importantes de fer peuvent être associées à une disponibilité faible et à un déficit martial fonctionnel.<sup>72, 218, 227-230</sup> Malgré le fait que des réserves en fer suffisantes sont requises, le taux de ferritine ne nous renseigne pas sur le fer disponible pour les érythroblastes. Cette confusion entre l'importance des réserves de fer et sa biodisponibilité peut expliquer pourquoi les directives en matière de taux de ferritine cible varient entre 100 et 300 ng/mL.<sup>169, 217</sup> Une autre étude montre, d'ailleurs, que le taux de ferritine cible varie selon la dose et la fréquence de la supplémentation martiale intraveineuse.<sup>231</sup>

Notre étude confirme la corrélation qui existe entre %HYPO et la saturation de la transferrine ou le fer sérique. Tous les patients qui avaient une saturation supérieure à 30% ou un fer sérique supérieur à 12  $\mu$ mol/L avaient également un %HYPO inférieur à 3.7% (limite supérieure de la normale). Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que TSAT et SeFe ne restent des paramètres fiables que lorsque le métabolisme du fer est en équilibre. Cette condition n'est pas souvent rencontrée lors d'un traitement par rHuEPO chez les patients dialysés car la stimulation érythropoïétique, les pertes de sang et la thérapie martiale entraînent des fluctuations importantes de SeFe et donc, de TSAT. Pour cette raison, %HYPO pourrait représenter un index plus stable de la biodisponibilité du fer que ces deux paramètres.

Dans nos analyses, sTfR était le meilleur prédicteur de %HYPO. Le haut degré de corrélation positive entre ces deux facteurs ne surprend pas étant donné que sTfR est un paramètre représentant de manière fiable et le déficit martial fonctionnel et l'activité érythropoïétique.<sup>132, 232</sup> Ceci est bien illustré par l'équation de régression liant sTfR, d'une part à TSAT, d'autre part à la réticulocytose. Malgré la similarité entre sTfR et %HYPO dans leur signification clinique, la détermination en routine de %HYPO est à préférer à celle de sTfR, plus coûteuse et plus difficile. Toutefois, l'influence de l'activité érythropoïétique est un désavantage pour la spécificité de %HYPO dans la détection du déficit martial.

Dans de nombreuses études, la valeur de %HYPO de 10% a été utilisée comme seuil du déficit martial fonctionnel.<sup>180, 218, 222</sup> La sensibilité de cette valeur était seulement de 43% dans la prédiction de la réponse réticulocytaire à un supplément martial intraveineux chez les patients hémodialysés.<sup>175</sup> Il semble, toutefois, que cette valeur ne soit pas appropriée pour détecter un déficit martial fonctionnel étant donné que 99,5% de 537 donneurs de sang sains avaient une valeur de %HYPO inférieure à 3.7%. Le fait que la limite supérieure de référence pour %HYPO doive être plus basse est confirmé par l'observation d'une réduction de 8.5% des doses de rHuEPO nécessaires chez des patients hémodialysés avec un %HYPO inférieur à 5% recevant une supplémentation intraveineuse en fer.<sup>180</sup>

Le contenu réticulocytaire en hémoglobine (CHr) a également été décrit comme un paramètre fiable du monitoring martial. CHr augmente significativement dans les 2 jours qui suivent l'administration intraveineuse de fer chez des patients hémodialysés, démontrant ainsi que CHr est un paramètre plus précoce que %HYPO dans la détection du déficit martial fonctionnel.<sup>175</sup> Cependant, ces fluctuations rapides de CHr en rapport avec les fluctuations du niveau de disponibilité du fer peuvent représenter un désavantage chez des patients chez lesquels le traitement par rHuEPO et par fer amplifie ces fluctuations. Ceci suggère que %HYPO serait un meilleur index chronique des besoins de fer. CHr et %HYPO pourraient être utilisés dans le monitoring martial comme la glycémie et l'hémoglobine glyquée le sont dans le suivi du diabète.

En conclusion, %HYPO est un paramètre utile et bon marché qui intègre l'état des réserves de fer et de sa libération, ainsi que l'état inflammatoire mais également l'activité érythropoïétique. Notre étude fournit des arguments supplémentaires aux protocoles utilisant %HYPO, avec la ferritine et la CRP, dans le monitoring martial des patients hémodialysés traités par rHuEPO. La résistance à l'érythropoïétine a été définie par le National Kidney Foundation (DOQI) comme l'impossibilité

d'atteindre l'hémoglobine cible endéans 4 à 6 mois suivant l'administration de 450 UI/kg/sem d'érythropoïétine recombinante par la voie intraveineuse ou 300 UI/kg/sem par la voie sous-cutanée ou l'impossibilité de maintenir l'hémoglobine cible avec ces doses.<sup>28</sup> Toutefois, nous pensons que les patients qui nécessitent des doses supérieures à 150 UI/kg/sem devraient faire l'objet d'une recherche de déficit martial fonctionnel, et en sa présence, un traitement supplétif devrait être prescrit. Des valeurs de %HYPO inférieures à 3.7% excluent une résistance à rHuEPO secondaire à un déficit martial, qu'il soit absolu ou fonctionnel. Des valeurs de %HYPO supérieures à 3.7% sont indicatives d'un état inflammatoire ou d'un déficit martial qui doivent être recherchés. %HYPO est également un outil utile dans la détection du déficit martial dans la thalassémie<sup>233-237</sup>, l'anémie hémolytique<sup>238</sup> et dans la population générale<sup>239-241</sup>.

L'influence sur %HYPO de l'activité érythropoïétique, comme en témoignent les corrélations significatives entre %HYPO, d'une part, et sTfR ou la réticulocytose, d'autre part, peuvent cependant être à l'origine de biais dans la détermination de %HYPO chez les patients dialysés. En effet, le traitement par rHuEPO entraîne une stimulation érythropoïétique, présente simultanément au déficit martial. Dans le chapitre 5, nous avons voulu évaluer l'importance clinique de l'effet de la stimulation érythropoïétique sur la mesure de %HYPO dans des conditions dans lesquelles le déficit martial est absent. Cette influence a été étudiée chez les sujets sains, lors d'une stimulation érythropoïétique intense dans un programme d'autotransfusion, et chez le patients hémodialysés traités par rHuEPO dans la phase d'induction du traitement.

**CHAPITRE 5 :**  
**INFLUENCE DE L'ACTIVITE ERYTHROPOIETIQUE SUR LES**  
**PARAMETRES DU MONITORING MARTIAL**

## **A. UNE STIMULATION ERYTHROPOIETIQUE INTENSE INVALIDE LES MARQUEURS HABITUELS DU STATUT MARTIAL**

### **1. Introduction**

Le monitoring martial est en général basé sur le suivi des taux de ferritine et le pourcentage de globules rouges hypochromes.<sup>27</sup> Nous avons montré précédemment que %HYPO est aussi influencé positivement par l'activité érythropoïétique.<sup>242</sup> De plus, malgré la valeur prédictive de %HYPO dans le déficit martial, le taux de FRT pour obtenir la cible recommandée de %HYPO<sup>27</sup> devrait être beaucoup plus haute que les valeurs de référence.<sup>190</sup> Nous avons également montré que quel que soit le taux de ferritine, %HYPO pouvait être élevé.<sup>242</sup>

Nous avons voulu, de ce fait, évaluer le métabolisme et le monitoring du fer lors d'une stimulation érythropoïétique intense chez 8 sujets sains, donneurs familiaux de cellules souches hématopoïétiques de sang périphérique (PBSCT), entrant dans un programme intensif de phlébotomies supporté par rHuEPO dans le but de fournir des unités de globules rouges pour leur receveur respectif.<sup>243</sup> En effet, nous voulions vérifier la valeur de %HYPO lors d'une stimulation érythropoïétique particulièrement intense.

### **2. Sujets et méthodes**

#### **a. Protocole de l'étude**

Les sujets inclus dans ce travail étaient enrôlés dans une étude visant à évaluer la faisabilité d'une collecte de 12 unités de sang sur 6 semaines en utilisant un traitement par rHuEPO et fer intraveineux chez des donneurs de cellules souches hématopoïétiques de sang périphérique. Notre travail est une sous-étude concernant le monitoring du métabolisme martial chez ces donneurs. Les critères d'inclusion étaient : donneur apparenté éligible pour une collecte de cellules souches par leucaphérèse, sujet de plus de 18 ans et disponibilité pour un programme de don de sang autologue intensif. Tous les sujets ont donné leur consentement éclairé. Le protocole a été approuvé par le Comité d'Ethique de l'Université de Liège.

Tous les sujets (n = 8) ont été traités par 600 UI/kg de rHuEPO (Eprex, Janssen-Cilag, Beerse, Belgium) par voie sous-cutanée, deux fois par semaine pendant 3 semaines avant et 3 semaines

après la greffe, sauf pendant la période d'administration de facteur de croissance leucocytaire G-CSF pendant laquelle la dose de rHuEPO était quotidienne pendant 5 jours. Tous les sujets ont également reçu 200 mg de fer sucrose (Venofer, Vifor, St Gallen, Switzerland) deux fois par semaine pendant 3 semaines avant et 3 semaines après PBSCT. Les unités de globules rouges ont été prélevées à chacune des 12 visites pour autant que le taux d'hématocrite reste supérieur à 33%. Ces unités étaient destinées à être transfusées au receveur après la greffe; elles étaient à ce moment devenues « autologues » par rapport au patient greffé.

#### b. Paramètres biologiques

Les paramètres biologiques ont été évalués à chaque visite. Les paramètres globulaires ont été mesurés à l'aide du compteur cellulaire H\*2 (Bayer diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Les paramètres suivants du statut martial ont également été mesurés : FRT, TSAT, SeFe.

#### c. Formules utilisées

$$\text{Fer de réserve (mg)} = 400 + (\ln \text{ferritin} - \ln 12)^{162}$$

Nouveaux RBC (Nb de nouveaux globules rouges produits depuis la dernière visite;  $\times 10^9$ ) = RBC – RBC résiduels (post-phlébotomie) de la dernière visite.

Nouveaux HYPO (Nb de nouveaux globules rouges hypochromes produits depuis la dernière visite;  $\times 10^9$ ) = HYPO – HYPO résiduels (post-phlébotomie) de la dernière visite.

Le calcul des globules rouges et des globules rouges hypochromes résiduels est basé sur la masse érythroïde totale de laquelle est soustraite la quantité de globules rouges donnée :

RBC résiduels = (RBC du jour ( $\times 10^9/\text{mL}$ ) x BV (mL)) – (RBC du jour ( $\times 10^9/\text{mL}$ ) x volume de sang donné(mL))

HYPO résiduels = (RBC du jour ( $\times 10^9/\text{mL}$ ) x %HYPO (%)) x BV (mL)) – (RBC du jour ( $\times 10^9/\text{mL}$ ) x %HYPO (%) x volume de sang donné(mL))

Hb donnée (gr) = Volume donné (mL) x Hb (gr/dL)/100

Fer donné (mg) = Hb donnée x 3.4 (mg/gr Hb)

#### d. Statistiques

Les analyses statistiques ont été détaillées dans la méthodologie générale. Toutes les statistiques ont été réalisées avec le programme Graph Pad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA).

### 3. Résultats

La cible de 12 unités prélevées par sujet a été atteinte chez 4 des 8 patients, 1 donneur a fourni 11 unités, 2 donneurs ont fourni 10 unités et 1 donneur a fourni 7 unités. Chez ce dernier, le programme a été interrompu en raison de la dégradation de l'état de santé du receveur.

La figure 5.A.1 montre l'importance de la stimulation érythropoïétique. Le pic de la réticulocytose est atteint au jour 10, avec une multiplication par 5 de la valeur basale. De même, sTfR augmente très rapidement de manière significative et continue d'augmenter pendant toute la période de collecte. Cette importante activité érythropoïétique permet une relative stabilité des taux d'Hb et d'Hct qui, après une diminution significative, restent stables et permettent le prélèvement des unités de sang à chaque visite chez une majorité des patients.

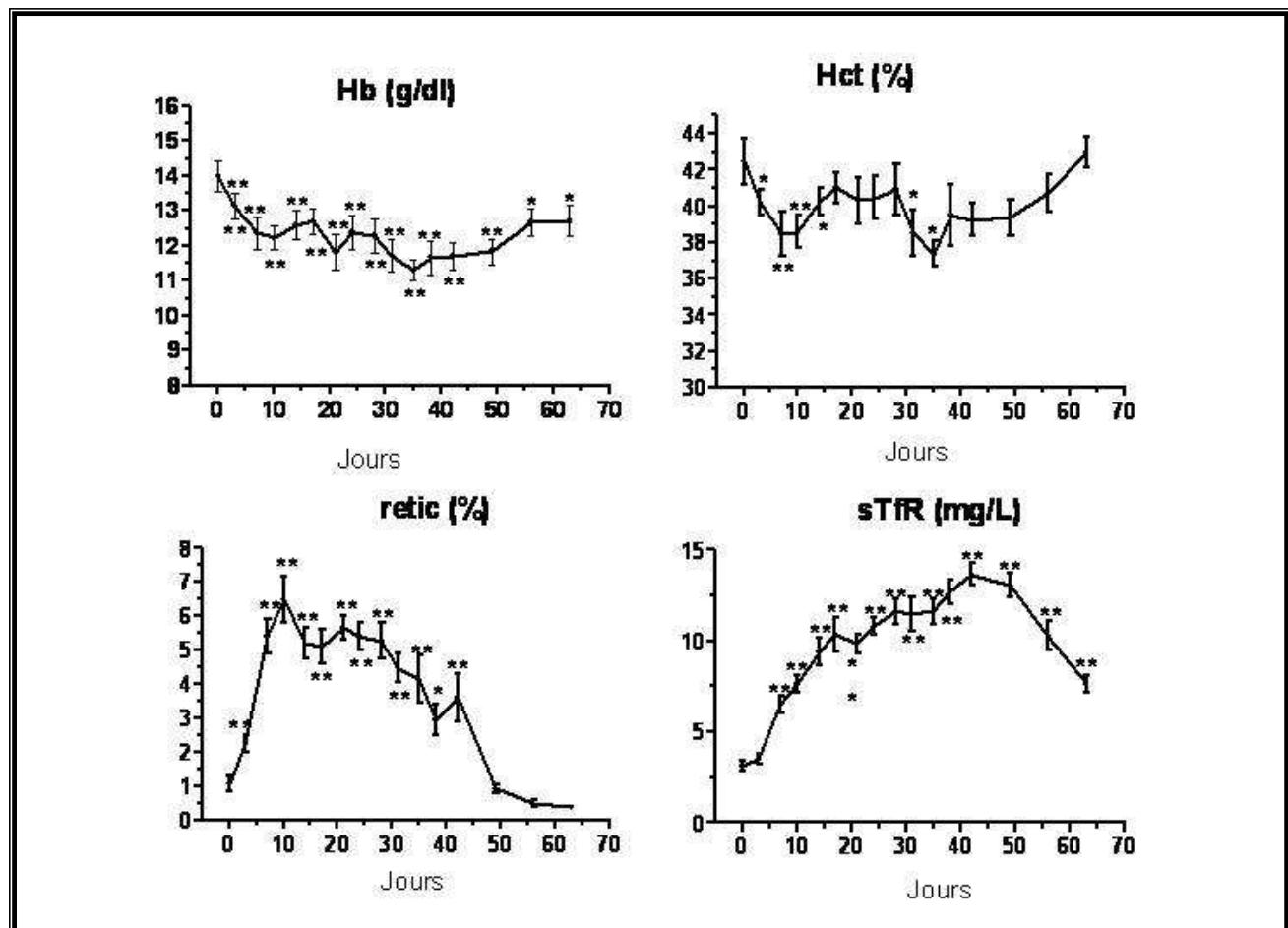
La figure 5.A.2 montre l'évolution des paramètres martiaux et globulaires. Les quantités de fer injectées sont tout à fait superposables aux quantités prélevées dans les unités de sang collectées ( $2,111 \pm 277$  et  $2,188 \pm 433$  mg, respectivement, à la fin de l'étude). Ceci permet de garder le fer corporel en équilibre tout au long de l'étude.

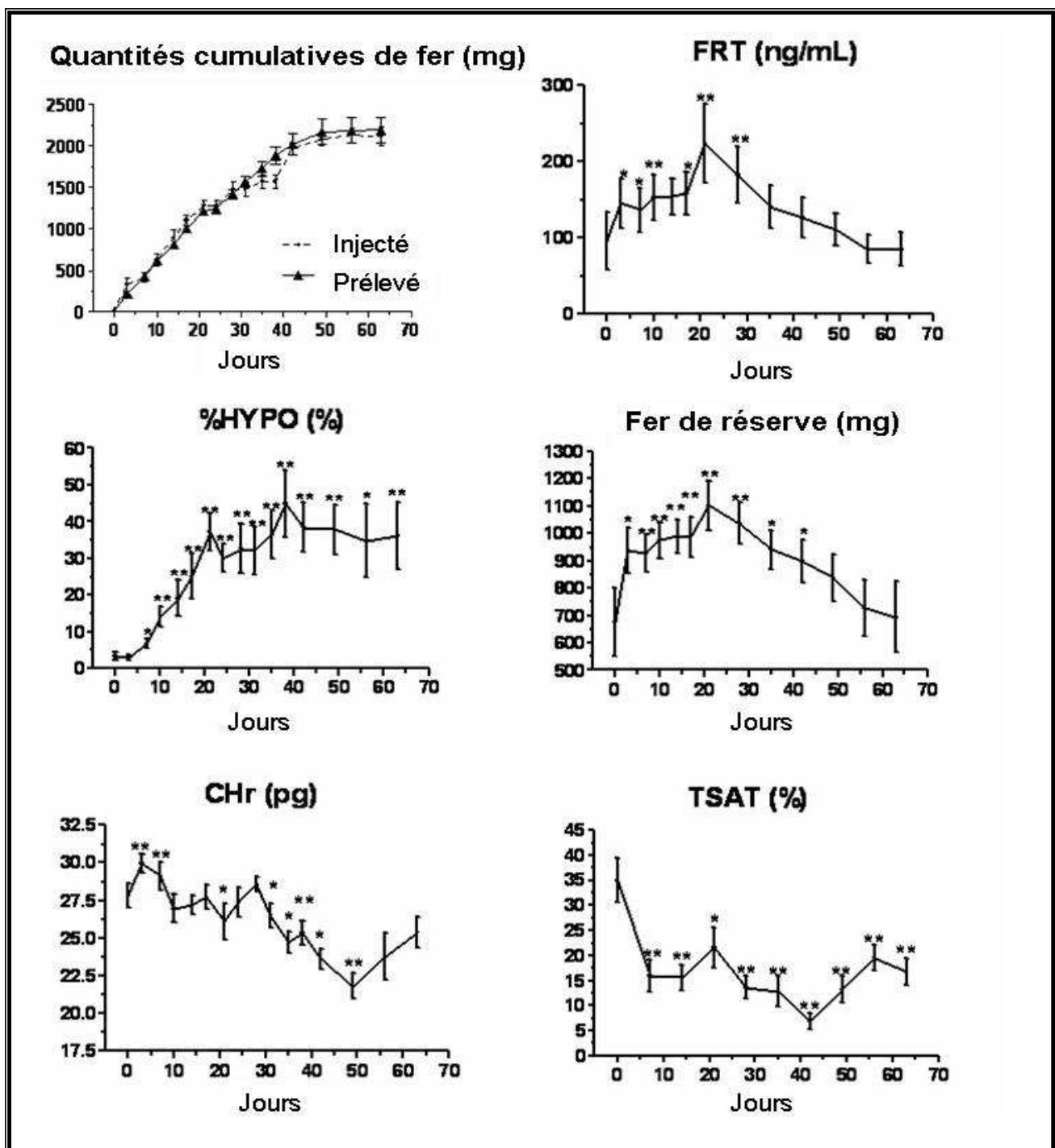
Malgré l'équivalence entre le fer prélevé et le fer administré, les taux de FRT augmentent rapidement jusqu'à un pic au jour 21 ( $224 \pm 146$  vs  $97 \pm 106$  ng/mL,  $p < 0.001$ ) avant de retourner aux valeurs basales. Le fer de réserve, qui en est dérivé, suit bien sûr la même évolution ( $1,101 \pm 256$  mg au jour 21 vs  $677 \pm 355$  mg à l'état basal,  $p < 0.001$ ).

TSAT diminue au jour 7 ( $16 \pm 9$  vs  $35 \pm 13$  %,  $p < 0.001$ ) et reste basse jusqu'à la fin de l'étude. CHr commence à diminuer seulement du jour 31 ( $26.5 \pm 2.1$  vs  $27.8 \pm 2.1$  pg,  $p < 0.05$ ) au jour 48 ( $21.8 \pm 2.1$  pg,  $p < 0.01$ ) puis retourne aux valeurs basales. %HYPO augmente, cependant, rapidement jusqu'au jour 35, à des valeurs extrêmement élevées ( $36.4 \pm 17.6$  vs  $3.3 \pm 3.5$  %,  $p < 0.001$ ) puis se stabilise alors que le CHr commence seulement à diminuer de manière significative. L'activité érythropoïétique a été évaluée par le calcul de la production érythrocytaire d'une visite à l'autre. Pour que les valeurs soient plus significatives, la production de 3 visites successives a été cumulée et ce résultat a été corrélé à la production calculée de nouveaux globules rouges hypochromes sur les 3 mêmes visites successives. Cette corrélation estime l'influence relative de l'activité érythropoïétique sur la production d'érythrocytes hypochromes. Elle est positive et significative ( $r = 0.58$ ,  $p < 0.01$ ) (figure 5.A.3).

**Figure 5.A.1 : Evolution de Hb, Hct, Retic et sTfR pendant la période de suivi**

\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  en comparaison aux valeurs basales

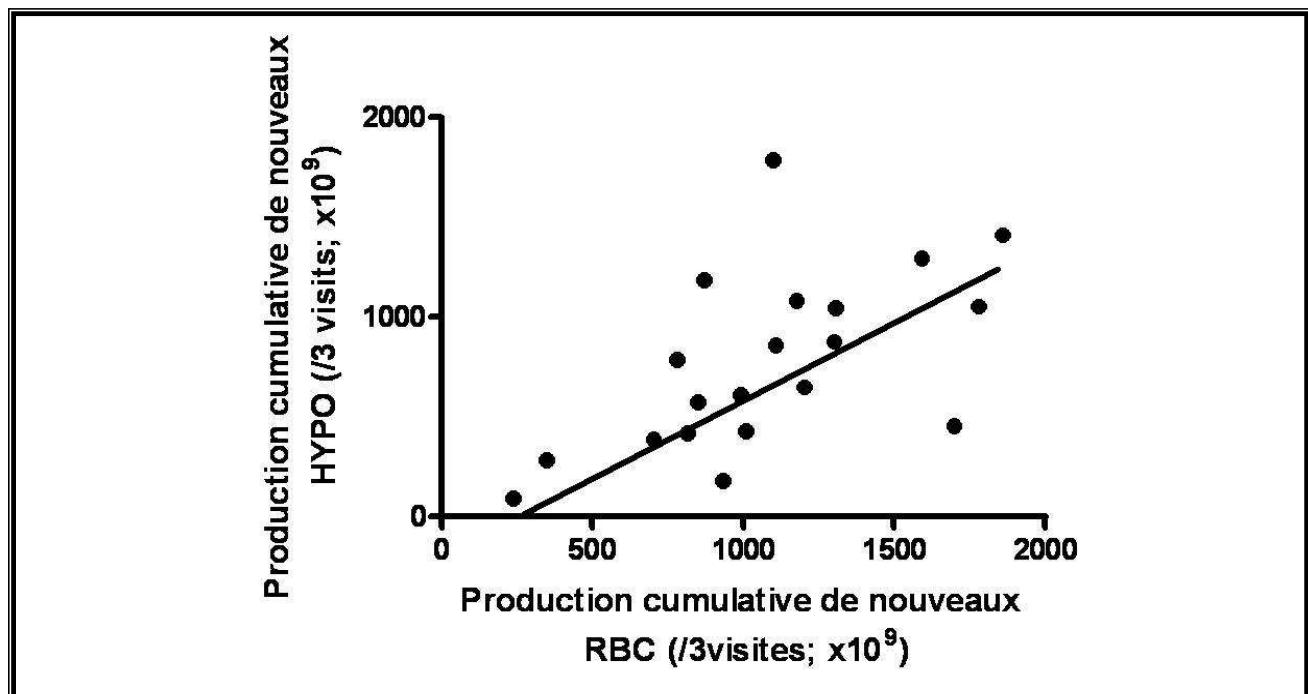


**Figure 5.A.2 : Evolution des paramètres du fer tout au long de la période de suivi**\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  en comparaison aux valeurs basales

**Figure 5.A.3 : Corrélation entre la production de globules rouges hypochromes sur 3 visites et la production totale de globules rouges sur les 3 mêmes visites tout au long de l'étude**

Chaque point représente un patient évalué sur 3 visites.

Cette corrélation est positive et significative ( $r = 0.58$ ,  $p < 0.01$ ).



#### 4. Discussion

Le taux de ferritine et le pourcentage de globules rouges hypochromes sont généralement utilisés pour évaluer respectivement le fer de réserve et la disponibilité du fer pendant le traitement par rHuEPO.<sup>27</sup> Toutefois, dans les cas d'activité érythropoïétique intense, malgré une supplémentation martiale adéquate, TSAT diminue pratiquement directement après le début des phlébotomies et du traitement par rHuEPO représentant le déficit martial fonctionnel. %HYPO, quant à lui, augmente rapidement à des niveaux très élevés. Cette augmentation apparaît bien avant et est beaucoup plus importante que la chute de CChr. Elle ne peut donc pas être expliquée uniquement par un déficit martial fonctionnel. La stimulation érythropoïétique produit donc une population érythrocytaire plus jeune avec un volume cellulaire plus important et une moindre concentration en Hb, expliquant en partie l'énorme production de globules rouges hypochromes.<sup>244</sup> La corrélation entre la production des érythrocytes hypochromes et la production totale de globules rouges confirme cette hypothèse. Après la période de collecte et d'administration de rHuEPO (jour 42), la réticulocytose diminue, représentant la diminution de l'activité érythropoïétique à ce moment. La durée de vie des

érythrocytes et donc, des globules rouges hypochromes également, explique qu'à partir de ce moment, %HYPO reste stable.

Dans cette étude, le fer corporel restait en équilibre, comme le montre la corrélation parfaite entre le fer injecté et le fer prélevé. Cependant, les taux de ferritine et, donc, l'évaluation du fer de réserve, ont presque triplé durant les 3 premières semaines de suivi. De ce fait, l'évaluation des réserves en fer, basée sur la mesure de ferritine, ne semble plus être valide dans ces conditions. FRT semble être, ici, le reflet des variations du pool labile de fer plutôt que celui du fer de réserve.

En conclusion, cette étude démontre que, pendant une stimulation érythropoïétique intense, %HYPO est influencé par l'activité érythropoïétique encore plus que par le déficit martial. Par ailleurs, la ferritine sérique est alors un marqueur peu fiable des réserves de fer étant donné qu'elle représente le pool labile de fer qui est augmenté par l'administration intraveineuse de fer. L'utilisation de ces paramètres, qui est habituellement recommandée lors des traitements par rHuEPO, devrait être réévaluée dans les schémas qui induisent une stimulation érythropoïétique très intense.

**B. IMPACT DE L'ACTIVITE ERYTHROPOIETIQUE SUR LES PARAMETRES GLOBULAIRES CHEZ LES PATIENTS HEMODIALYSES CHRONIQUES TRAITES PAR ERYTHROPOIETINE**

Impact of erythropoietic activity on red cell parameters in chronic renal failure patients.

C Bovy, A Gothot, J-M Krzesinski, Y Beguin  
Haematologica, 2004,89:748-749

### **1. Introduction**

Le pourcentage de globules rouges hypochromes est un paramètre fiable du monitoring martial durant le traitement par érythropoïétine chez les patients dialysés. Il a été démontré que ce paramètre est le plus sensible et le plus spécifique pour la prédition de la réponse à des suppléments intraveineux de fer, lorsque l'on utilise un seuil de 6%. <sup>190</sup> Cette limite est nettement supérieure aux valeurs de référence dans une population normale. Toutefois, nous avons démontré que %HYPO est aussi positivement influencé par l'activité érythropoïétique, représentée par la réticulocytose. <sup>242</sup> Nous avons également démontré que la stimulation érythropoïétique intense invalide les paramètres habituels du monitoring martial. La stimulation de l'activité érythropoïétique entraîne une réponse réticulocytaire et un renouvellement de la population globulaire par des erythrocytes plus jeunes. Ces deux phénomènes augmentent artificiellement %HYPO. <sup>245</sup> Nous avons donc voulu évaluer de plus près l'influence de la stimulation érythropoïétique sur les paramètres érythrocytaires, mesurés dans la population totale de globules rouges, d'une part, et de réticulocytes, d'autre part, dans le cas des patients hémodialysés traités par rHuEPO et recevant une supplémentation martiale adéquate.

### **2. Méthodes**

Pour mettre en évidence l'effet de l'activité érythropoïétique sur les paramètres globulaires, nous avons étudié l'évolution du volume globulaire et réticulocytaire (MCV, MCVr), de leur contenu en hémoglobine (CH, CHr), de leur concentration en hémoglobine (CHCM, CHCMr) et de %HYPO à l'initiation d'un traitement par rHuEPO chez 6 patients hémodialysés chroniques, sans syndrome inflammatoire et sans transfusion. Le traitement par érythropoïétine a été débuté par la voie intraveineuse à la dose de 200 UI/kg/sem en trois doses par semaine administrées à la fin de chaque séance de dialyse. Pour éviter qu'un déficit martial n'influence également les paramètres globulaires, 100 mg de fer sucre (Venofer®, Vifor, St Gallen, Suisse) ont été administrés une fois

par semaine dès le début du traitement par rHuEPO (1100 mg au total). Cette quantité de fer est supérieure à la quantité nécessaire pour corriger les taux d'Hb (3.4 mg de fer x 4500 mL de volume sanguin/ 100 par gr d'Hb) et pour compenser les pertes (3 mg par jour 77 jours).

Les paramètres suivants ont été suivis toutes les semaines pendant les 11 semaines suivant l'introduction de l'érythropoïétine : FRT, TSAT, sTfR et les paramètres hématologiques. Ces derniers ont été déterminés par le compteur cellulaire Advia 120 (Bayer Diagnostic, Tarrytown, NY, USA).

### **3. Résultats**

Le tableau 5.B.1 montre la comparaison des paramètres mesurés au départ et à la fin de la période d'observation. Les taux d'hémoglobine augmentent significativement et de manière satisfaisante chez tous les patients ( $12.1 \pm 0.6$  vs  $8.3 \pm 1.2$  g/dL). Les récepteurs solubles de la transferrine (sTfR) augmentent de manière significative ( $6.4 \pm 2.2$  vs  $3.4 \pm 1.5$  mg/L ;  $p = 0.003$ ). Malgré la supplémentation martiale, la ferritine s'abaisse de 50% mais de manière non significative ( $112.0 \pm 30.1$  vs  $214.2 \pm 130.5$  ng/mL ; NS) alors que la saturation de la transferrine diminue seulement de 18% à 15% (NS). Malgré cette diminution (non significative), des paramètres classiques du monitoring martial, le contenu réticulocytaire en hémoglobine est constant tout au long de la période d'observation et reste dans les valeurs normales. %HYPO, quant à lui, augmente significativement à la fin du suivi ( $7.2 \pm 4.1$  vs  $1.7 \pm 0.8$  % ;  $p < 0.05$ ). On observe simultanément à cette augmentation de %HYPO, une augmentation ( $p < 0.001$ ) du volume cellulaire (MCV) avec un contenu en hémoglobine stable (CH). La même évolution est observée pour les paramètres réticulocytaires, à savoir CHr stable, tendance non significative à l'augmentation de volume (MCVr) et diminution de la concentration en hémoglobine (CHCMr) ( $p < 0.05$ ).

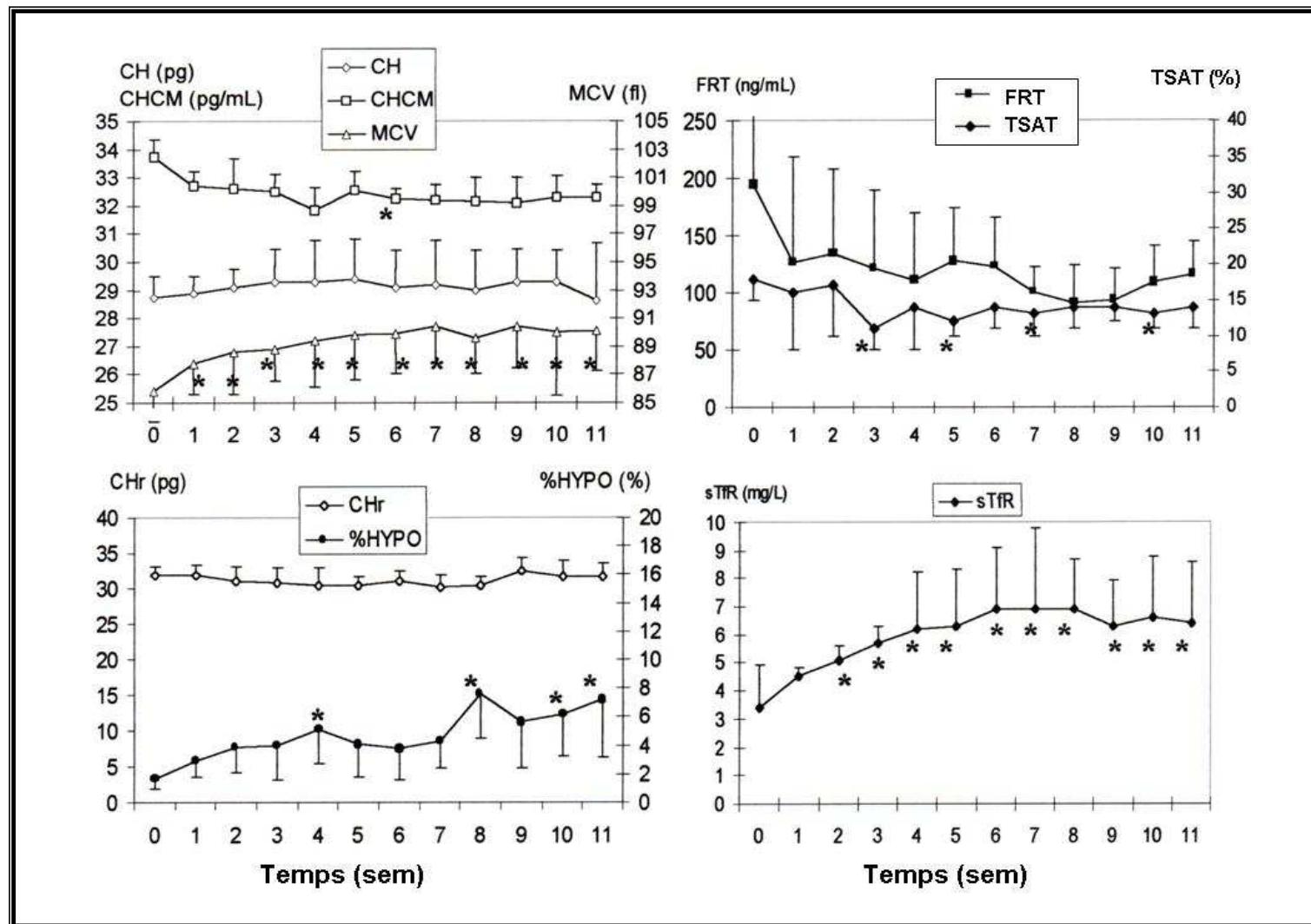
La figure 5.B.1 montre l'évolution des paramètres globulaires et du monitoring martial pendant la période d'observation. Les variations de MCV et de CHCM se produisent principalement pendant les 4 premières semaines de traitement, avec une stabilisation par la suite.

**Tableau 5.B.1 : Comparaison des paramètres mesurés au départ et à la semaine 11.**

Paramètres	Avant rHuEPO	Semaine 11	p
<b>Hb (g/dL)</b>	8.3 ± 1.2	12.1 ± 0.6	0.009
<b>MCV (fL)</b>	85.7 ± 2.4	90.9 ± 2.5	< 0.001
<b>CH (pg)</b>	28.7 ± 0.8	28.6 ± 1.8	0.89
<b>CHCM (pg/mL)</b>	33.7 ± 0.6	32.3 ± 0.5	0.14
<b>%HYPO (%)</b>	1.7 ± 0.8	7.2 ± 4.1	0.02
<b>Retic (x1000/µL)</b>	49.3 ± 18.1	69.0 ± 32.6	0.49
<b>MCVr (fl)</b>	107.8 ± 2.5	112.3 ± 6.1	0.13
<b>CHr (pg)</b>	32.4 ± 0.7	31.8 ± 2.1	0.56
<b>CHCMr (pg/mL)</b>	30.0 ± 1.0	28.5 ± 1.5	0.03
<b>FRT (ng/mL)</b>	214.2 ± 130.5	112.0 ± 30.1	0.13
<b>TSAT (%)</b>	18 ± 3	15 ± 3	0.20
<b>sTfR (mg/L)</b>	3.4 ± 1.5	6.6 ± 2.2	0.003

**Figure 5.B.1 :** Evolution du volume globulaire (MCV), du contenu en hémoglobine (CH), de la concentration en hémoglobine (CHCM), du pourcentage de globules rouges hypochromes (%HYPO), du contenu réticulocytaire en hémoglobine (CHr), de la ferritine (FRT), de la saturation de la transferrine (TSAT) et des récepteurs solubles de la transferrine (sTfR) pendant la période d'observation

\*:  $p < 0.05$  par rapport aux valeurs de départ.



#### 4. Discussion

Le monitoring martial reste un défi pour le néphrologue. Des marqueurs sensibles et spécifiques du déficit martial fonctionnel sont absolument nécessaires pour apporter au patient le meilleur rapport risque-bénéfice dans le traitement de l'anémie rénale. Le pourcentage de globules rouges hypochromes semble être un paramètre fiable dans cette optique.<sup>190</sup> Toutefois, ce paramètre est, à la fois, influencé par la réticulocytose<sup>242, 245</sup> et par un rajeunissement de la population érythrocytaire.<sup>245</sup> Bien que la ferritine et la saturation de la transferrine diminuent sous traitement par érythropoïétine, leur sensibilité et leur spécificité est très faible lorsqu'il s'agit de prédire la réponse à une supplémentation martiale.<sup>190</sup> Il existe d'ailleurs des discordances importantes entre les taux de ferritine et la saturation de la transferrine sous rHuEPO. Dans notre étude, sTfR augmente progressivement, mais ce paramètre est connu pour être beaucoup plus influencé par l'activité érythropoïétique que par le déficit martial.<sup>246</sup> L'administration simultanée de rHuEPO et de fer permet de maintenir CHr constant et dans les valeurs de référence. Malgré cela, on a observé une augmentation en dehors des valeurs normales de %HYPO. Cette augmentation ne peut être expliquée, dans ce cas, par un déficit martial, étant donné la normalité et la stabilité de CH et de CHr tout au long de la période d'observation.

L'explication de l'élévation de %HYPO nous semble résider dans la diminution progressive de la concentration globulaire en hémoglobine, résultant d'une augmentation du volume cellulaire relative à un renouvellement et rajeunissement de la population érythrocytaire, y compris les réticulocytes. Ce phénomène était d'autant plus important dans les 4 premières semaines de traitement du fait que le pic de réticulocytose apparaît une semaine après l'initiation du traitement par rHuEPO et que le rapport entre les érythrocytes jeunes et vieux diminue ensuite avec la correction progressive de l'anémie. La poursuite de l'augmentation de %HYPO à la fin de la période d'observation avec une saturation de la transferrine inférieure à 20% pourrait indiquer une contribution du déficit martial fonctionnel à ce moment du suivi.

On peut donc conclure de cette étude que l'activité érythropoïétique, induite par le traitement par rHuEPO, entraîne un renouvellement de la population érythrocytaire, y compris les réticulocytes, qui fausse la détermination de la concentration cellulaire en hémoglobine, et donc le pourcentage de globules rouges hypochromes. Ce biais est secondaire à l'augmentation du volume cellulaire dans la population érythrocytaire rajeunie.

La détermination des paramètres globulaires sur les érythrocytes matures, en excluant les réticulocytes de l'analyse, pourrait permettre une plus grande spécificité dans la détection du déficit martial fonctionnel chez des patients qui présentent la plupart du temps simultanément une stimulation de l'activité érythropoïétique et un déficit martial.

**CHAPITRE 6 :**  
**UN ROLE POSSIBLE POUR LES INDICES DES**  
**ERYTHROCYTES MATURES**

## **A. LES INDICES DES ERYTHROCYTES MATURES COMME NOUVEAUX PARAMETRES DE LA DISPONIBILITE DU FER**

Mature erythrocyte indices : New markers of iron availability

C. Bovy, A. Gothot, J.M. Krzesinski, Y. Beguin.

Haematologica 2005;90(4):546-548.

### **1. Introduction**

Nous savons que la réponse à la rHuEPO des patients souffrant d'anémie rénale<sup>24, 247-249</sup> est principalement limitée par le déficit martial. Le déficit martial absolu est aisé à détecter mais le déficit martial fonctionnel, défini comme une réponse à une supplémentation martiale en l'absence de déficit absolu, reste un défi quotidien pour la communauté néphrologique. Il est d'autant plus important de pouvoir prédire la réponse à un traitement martial que l'administration intraveineuse de fer, si elle est inappropriée, peut entraîner des complications aiguës ou chroniques telles que le choc anaphylactique<sup>250-251</sup>, l'augmentation de la fréquence ou de la sévérité des infections<sup>252-253</sup> ou des dommages liés au stress oxydatif<sup>86, 254-255</sup>.

Le pourcentage de globules rouges hypochromes (%HYPO) est considéré comme le paramètre le plus sensible et le plus spécifique du déficit martial fonctionnel.<sup>190</sup> Toutefois, nous avons montré que ce paramètre est influencé non seulement par la disponibilité du fer, mais également par l'activité érythropoïétique.<sup>242, 244</sup> Habituellement, le traitement par rHuEPO entraîne à la fois une augmentation de l'activité érythropoïétique et un déficit martial fonctionnel, tous deux responsables d'une augmentation de %HYPO.

Un marqueur idéal du déficit martial fonctionnel devrait être indépendant de l'activité érythropoïétique. L'influence de ce facteur pourrait être atténuée par la mesure des paramètres des globules rouges matures, excluant ainsi l'effet confondant des réticulocytes. Ceci est possible grâce à la technologie de l'Advia 120.

Le but de notre étude est d'évaluer l'intérêt des paramètres des globules rouges matures comme marqueurs du déficit martial fonctionnel indépendamment de l'activité érythropoïétique. Nous avons, dans un premier temps, déterminé les valeurs de référence de ces paramètres. Ensuite, nous avons comparé la fiabilité de ces paramètres avec les paramètres de routine, mesurés sur la population érythroïde globale, en cas d'activité érythropoïétique intense, comme dans l'anémie

hémolytique auto-immune (AIHA). Enfin, nous avons vérifié la fiabilité des paramètres des erythrocytes matures dans d'autres situations pathologiques. Nous avons donc étudié l'anémie ferriprive (IDA; déficit martial et faible activité érythropoïétique) et l'hémochromatose génétique (GH; surcharge martiale et augmentation relative de l'activité érythropoïétique). La thalassémie mineure (Thal) et l'anémie mégaloblastique (MA) ont été étudiées pour les variations de volume cellulaire qui les caractérisent et qui sont indépendantes du bilan martial.

## **2. Patients et méthodes**

### Patients

Cinquante-sept (27 femmes et 30 hommes) membres de l'équipe infirmière ou médicale de l'hôpital universitaire de Liège ont été inclus dans le groupe de référence. Tous les sujets étaient en bonne santé, avaient un sang complet normal et un bilan martial normal (FRT, TSAT, SeFe), et aucun ne présentait de syndrome inflammatoire (CRP).

De manière à étudier l'impact de la réticulocytose sur les paramètres globulaires, 14 patients présentant une anémie hémolytique autoimmune (AIHA) ont été étudiés au moment du pic de réticulocytose. L'effet du statut martial a été étudié chez 20 patients avec une anémie ferriprive (IDA) avant toute transfusion et toute supplémentation martiale, et chez 20 patients souffrant d'hémochromatose génétique (GH). Pour évaluer l'influence du volume globulaire, 6 patients présentant une anémie mégaloblastique secondaire à une maladie de Biermer (MA) et 11 patients présentant une thalassémie mineure (Thal) ont été inclus dans les analyses.

### Analyses biologiques

Les méthodes de mesure des paramètres biologiques sont décrites dans le chapitre « méthodologie générale ». Rappelons ici que les paramètres hématologiques ont été mesurés à l'aide de l'Advia 120 qui permet la séparation des erythrocytes matures des réticulocytes et la mesure sur chacune de ces populations des concentration en Hb et du volume cellulaire, ainsi que tous les paramètres qui peuvent en être dérivés.

### Statistiques

Les analyses statistiques ont été décrites dans le chapitre « méthodologie générale ».

### 3. Résultats

#### a. Valeurs de référence

Les résultats des hommes et des femmes ont été traités ensemble car il n'y avait pas de différences significatives entre les deux sexes, à l'exception de l'hémoglobine, de l'hématocrite et du nombre de globules rouges. Le tableau 6.A.1 montre la moyenne, l'écart-type et la distribution normale des paramètres de routine (sur la population érythroïde globale), des paramètres réticulocytaires et de ceux des érythrocytes matures, dans la population de 57 sujets sains. Les valeurs de référence des cellules matures étaient très semblables à celles des paramètres de la population érythrocytaire globale étant donné l'influence négligeable du faible nombre de réticulocytes ( $1.0 \pm 0.3\%$  de réticulocytes).

En comparaison avec la population érythrocytaire mature, les réticulocytes avaient un volume cellulaire  $20.1 \pm 2.9\%$  plus grand, un contenu en Hb  $8.7 \pm 2.3\%$  plus élevé mais une concentration en Hb  $9.6 \pm 1.5\%$  plus faible. Ceci explique le pourcentage plus important de macrocytes et de cellules hypochromes.

#### b. Effet de la réticulocytose de stress sur la mesure des paramètres de routine.

Les patients souffrant d'une AIHA étaient caractérisés par une réticulocytose très importante (11.6%). Le tableau 6.A.2 montre les paramètres mesurés chez ces patients avec AIHA. Les paramètres mesurés sur la population érythroïde globale montrent l'existence d'une anémie macrocytaire avec un grand pourcentage de globules rouges hypochromes (8.1%). Paradoxalement, CH et CHCM étaient élevés et 60% des cellules avaient un CH haut. Dans la population réticulocytaire, 41.6% des cellules étaient considérées comme hypochromes et CHCMr était bas. Toutefois, les réticulocytes étaient macrocytaires et CHr était élevé. Seuls 3.7% des réticulocytes avaient un CHr bas. Dans la population érythrocytaire mature, en comparaison avec la population érythroïde globale et la population réticulocytaire, MCVm était augmenté dans une moindre mesure, CHCMm était augmenté de manière plus importante et %HYPOm ne s'élevait que discrètement (3.4%). La figure 6.A.1 montre la représentation graphique de la population érythrocytaire mature et réticulocytaire d'un sujet sain et d'un patient représentatif du groupe avec AIHA. Chez le patient avec AIHA, le graphique V/HC de la population globale présente une extension vers le haut et la gauche, ces cellules anormales étant dès lors considérées comme

**Tableau 6.A.1:** Valeurs de référence chez 57 sujets sains pour les paramètres de la population érythroïde globale, réticulocytaire et érythrocytaire mature. Les valeurs de p sont données pour les comparaisons entre les indices réticulocytaires et érythrocytaires matures.

	Population globale		Réticulocytes		Erythrocytes matures	
	<b>m ± sd</b>	<b>distribution</b>	<b>m ± sd</b>	<b>distribution</b>	<b>m ± sd</b>	<b>distribution</b>
<b>MCV (fL)</b>	87.0 ± 4.3	80.9 - 96.5	106.6 ± 3.3*	100.3 - 113.4	88.8 ± 4.1	82.9 - 97.9
<b>CH (pg)</b>	29.1 ± 1.6	26.1 - 32.3	32.5 ± 0.3*	29.8 - 35.0	29.9 ± 1.5	27.2 - 33.1
<b>CHCM (pg/mL)</b>	33.5 ± 0.9	31.7 - 35.4	30.6 ± 0.9*	28.7 - 32.0	33.8 ± 0.8	32.3 - 35.5
<b>%MICRO (%)</b>	0.4 ± 0.5	0.2 - 2.1	0.1 ± 0.3*	0.0 - 0.6	0.4 ± 0.3	0.1 - 1.1
<b>%MACRO (%)</b>	0.7 ± 1.4	0.1 - 3.5	6.6 ± 6.4*	0.6 - 21.6	0.6 ± 1.3	0.0 - 3.1
<b>%HYPO (%)</b>	0.9 ± 0.9	0.1 - 3.3	15.7 ± 9.0*	5.1 - 35.0	1.1 ± 0.9	0.2 - 3.4
<b>%HYPER (%)</b>	0.8 ± 0.7	1.0 - 1.7	0.1 ± 0.2*	0.0 - 0.4	1.3 ± 1.1	0.3 - 2.0
<b>%lowCH (%)</b>	23.9 ± 10.6	6.7 - 39.5	7.6 ± 4.9*	2.3 - 14.7	24.1 ± 10.6	6.8 - 39.7
<b>%highCH (%)</b>	29.6 ± 12.5	13.1 - 56.4	55.9 ± 13.3*	35.0 - 76.7	29.3 ± 12.5	12.9 - 56.2

\*: p < 0.001.

**Tableau 6.A.2: Comparaisons entre les sujets sains et les patients avec AIHA pour les paramètres de routine, réticulocytaires et erythrocytaires matures**

	Population globale		Réticulocytes		Erythrocytes matures	
	Sujets normaux (n = 57)	AIHA (n = 14)	Sujets normaux (n = 57)	AIHA (n = 14)	Sujets normaux (n = 57)	AIHA (n = 14)
<b>MCV (fL)</b>	87.0 ± 4.3	99.3 ± 7.2°	106.6 ± 3.3*	125.6 ± 12.6°	88.8 ± 4.1	95.5 ± 5.9°
<b>CH (pg)</b>	29.1 ± 1.6	33.8 ± 3.2°	32.5 ± 0.3*	36.4 ± 2.8°	29.9 ± 1.5	33.5 ± 3.3°
<b>CHCM (pg/mL)</b>	33.5 ± 0.9	34.7 ± 2.5*	30.6 ± 0.9*	29.2 ± 2.1°	33.8 ± 0.8	35.4 ± 2.6°
<b>%MICRO (%)</b>	0.4 ± 0.5	0.9 ± 0.8	0.1 ± 0.3*	0.1 ± 0.2	0.4 ± 0.3	1.0 ± 0.8°
<b>%MACRO (%)</b>	0.7 ± 1.4	13.1 ± 9.6°	6.6 ± 6.4*	53.8 ± 27.2°	0.6 ± 1.3	7.4 ± 6.4°
<b>%HYPO (%)</b>	0.9 ± 0.9	8.1 ± 5.5°	15.7 ± 9.0*	41.6 ± 22.8°	1.1 ± 0.9	3.4 ± 2.4°
<b>%HYPER (%)</b>	0.8 ± 0.7	11.1 ± 11.1°	0.1 ± 0.2*	0.4 ± 0.4°	1.3 ± 1.1	12.2 ± 12.3°
<b>%lowCH (%)</b>	23.9 ± 10.6	11.1 ± 10.1°	7.6 ± 4.9*	3.7 ± 2.8*	24.1 ± 10.6	11.9 ± 10.7°
<b>%highCH (%)</b>	29.6 ± 12.5	60.1 ± 24.1°	55.9 ± 13.3*	78.4 ± 16.0°	29.3 ± 12.5	58.0 ± 25.0°
<b>FRT (ng/mL)</b>	89.7 ± 73.6	644.6 ± 438.2°				
<b>SeFe (μmol/L)</b>	18.9 ± 4.3	21.8 ± 10.5				
<b>RBC (10<sup>9</sup>/μL)</b>	5.03 ± 0.43	2.53 ± 0.62°				
<b>Hb (g/dL)</b>	14.4 ± 1.0	8.6 ± 2.4°				
<b>Retic Hb (mg)</b>	16.8 ± 4.4	102.6 ± 43.2°				
<b>Hct (%)</b>	43.6 ± 2.9	25.4 ± 6.0°				
<b>Retic (10<sup>6</sup>/μL)</b>	51.7 ± 13.4	280.4 ± 111.0°				
<b>Retic (%)</b>	1.0 ± 0.3	11.6 ± 4.6°				
<b>Retic prod index</b>	1.0 ± 0.3	3.4 ± 1.5°				

\*: p &lt; 0.01; °: p &lt; 0.001.

Index de production réticulocyttaire (Retic prod index) = (%retic \* (Hct patient / Hct reference)) / index de maturation. L'index de maturation est considéré comme constant et = 2.

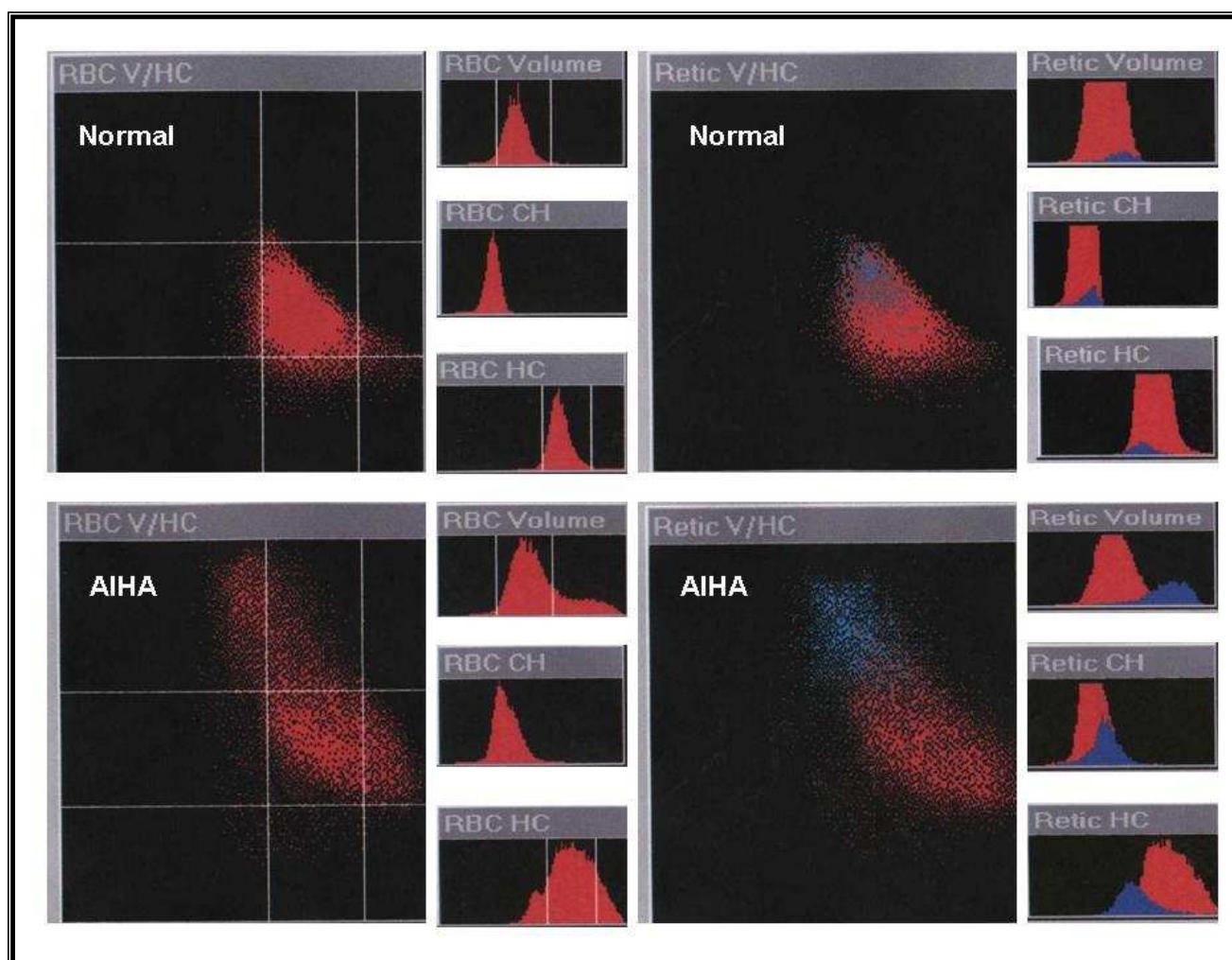
macrocytaires et hypochromes. Le graphique V/HC de la population réticulocytaire montre que ces cellules hypochromes sont des réticulocytes. Les histogrammes de distribution démontrent que, en comparaison avec le sujet sain, les réticulocytes du patient avec AIHA, considérés comme hypochromes, ont un contenu en Hb augmenté et un volume cellulaire accru.

**Figure 6.A.1: Comparaison d'un sujet sain (Normal) et d'un patient représentatif avec AIHA**

Dans les graphiques V/HC, la concentration en Hb est représentée sur l'axe des abscisses et le volume cellulaire sur l'axe des ordonnées. Les traits blancs représentent les limites de référence.

Sur la partie de gauche de la figure, la population érythroïde globale est représentée. On peut observer une extension vers le haut et la gauche dans l'AIHA. Sur la partie droite, l'identification des réticulocytes (en bleu) montre que les cellules hypochromes sont des réticulocytes.

Les histogrammes de répartition des volumes cellulaires, contenu en Hb (CH) et concentration en Hb (HC) sont également présentés pour la population érythrocytaire globale, sur la partie gauche, et pour les populations réticulocytaire (en bleu) et érythrocytaire mature (en rouge) séparément, sur la partie droite de la figure. Dans l'AIHA, on observe une nette déviation vers la droite (grand volume) des réticulocytes, avec un contenu en Hb haut mais une déviation vers la gauche de la concentration en Hb (basse).



c. Comparaison entre la population érythrocytaire mature et la population érythroïde globale dans d'autres conditions pathologiques.

Les paramètres mesurés sur la population érythrocytaire mature sont semblables aux paramètres de routine étant donné le faible pourcentage de réticulocytes dans les autres conditions pathologiques (IDA, GH, Thal et MA). Le tableau 6.A.3 montre les paramètres mesurés dans ces différentes pathologies en comparaison avec les sujets sains.

Dans l'anémie ferriprive, caractéristique d'un état de déficit martial avec une activité érythropoïétique faible, les globules rouges matures étaient microcytaires avec un contenu et une concentration en Hb bas. %HYPOm était élevé (41.6%), %lowCHm était également accru (85.0%). La population réticulocytaire présentait les mêmes caractéristiques.

Les patients souffrant d'hémochromatose génétique, présentant une surcharge martiale avec une activité érythropoïétique légèrement accrue, étaient caractérisés par une augmentation modérée de CHm, CHCMm et %highCHm ; %HYPOm et %lowCHm étaient diminués. La population réticulocytaire présentait les mêmes caractéristiques.

L'anémie mégaloblastique représente une érythropoïèse inefficace avec une relative surcharge martiale. L'anémie des patients atteints de maladie de Biermer était classiquement macrocytaire, également pour les paramètres des érythrocytes matures, avec une augmentation significative de MCVm et %macrom. La surcharge martiale relative entraînait une élévation de CHm et %highCHm. Toutefois, CHCMm était normal, secondairement à l'augmentation à la fois de MCVm et de CHm, avec une petite augmentation de %HYPOm et de %HYPERm. Les observations sur la population réticulocytaire étaient superposables.

Dans la thalassémie, en l'absence de déficit martial, en raison de l'anomalie de l'hémoglobine, les érythrocytes sont microcytaires et hypochromes. Comme on pouvait s'y attendre, la population érythroïde mature était également microcytaire et hypochrome (MVCm bas et %microm élevé, diminution du CHm et augmentation de %lowCHm, CHCMm bas et %HYPOm élevé). Le ratio MICRO/HYPO permet de poser le diagnostic différentiel entre anémie ferriprive et thalassémie. Celui-ci était toujours supérieur à 0.9 dans la thalassémie mineure et toujours inférieur à 0.9 dans l'anémie ferriprive tant pour les paramètres de la population érythroïde globale que pour la population érythrocytaire mature. Les réticulocytes avaient les mêmes caractéristiques. Toutefois, le

rapport MICROr/HYPOr était inversé (0.03) et similaire à celui observé dans l'IDA. Il est, en effet, exceptionnel de rencontrer des réticulocytes dont le volume est inférieur à 60 fL, même dans la thalassémie.

La figure 6.A.2 montre les graphiques V/HC et les histogrammes de distribution du volume cellulaire, du contenu en Hb et de la concentration en Hb dans l'IDA, GH, MA et Thal. Ces graphiques illustrent l'absence d'influence de la population réticulocytaire dans la détermination des paramètres de routine dans ces différentes pathologies.

d. Corrélations entre %HYPO et la réticulocytose ou le fer sérique.

Nous avons examiné la relation entre %HYPO d'une part, les réticulocytes et le fer sérique d'autre part, dans la population de référence, l'IDA et l'AIHA. Dans l'AIHA, %HYPO était positivement influencé par la réticulocytose (figure 6.A.3a). De plus, alors que %HYPO était élevé chez les patients qui avaient un SeFe bas, aucune corrélation significative n'a pu être démontrée entre ces deux paramètres dans aucune des populations étudiées (figure 6.A.3c). Inversément, %HYPOm n'était pas influencé par la réticulocytose même dans l'AIHA (figure 6.A.3b). Cependant, %HYPOm était corrélé de manière significative avec SeFe dans la population de référence et l'AIHA mais pas dans l'IDA (figure 6.A.3d).

**Tableau 6.A.3: Indices cellulaires dans l'IDA, GH, Thal et MA (m  $\pm$  sd). Les valeurs de p sont données pour les comparaisons avec les sujets sains**

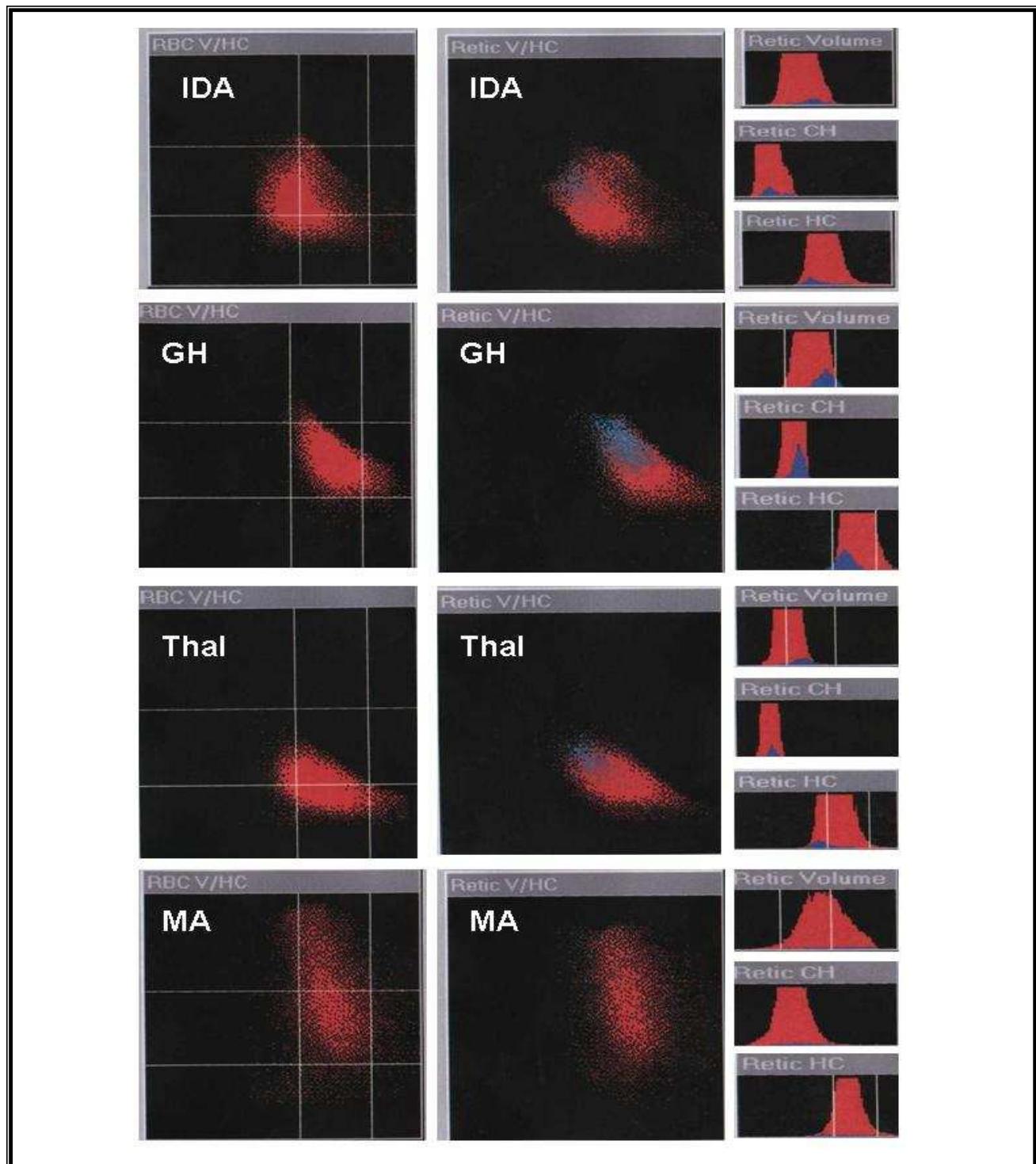
	Normal (n=57)	IDA (n=20)	GH (n=21)	Thal (n=11)	MA (n=6)
<b>Population totale</b>					
RBC ( $10^9/\mu\text{L}$ )	5.03 $\pm$ 0.43	4.12 $\pm$ 0.73°	4.73 $\pm$ 0.46*	5.94 $\pm$ 0.93°	2.28 $\pm$ 0.72°
Hb (g/dL)	14.4 $\pm$ 1.0	8.6 $\pm$ 1.5°	15.4 $\pm$ 1.1°	12.2 $\pm$ 1.6°	8.3 $\pm$ 2.0°
Hct (%)	43.6 $\pm$ 2.9	29.0 $\pm$ 4.7°	44.3 $\pm$ 2.7	38.9 $\pm$ 4.6°	25.3 $\pm$ 6.6°
Réticulocytes ( $10^6/\mu\text{L}$ )	51.7 $\pm$ 13.4	78.5 $\pm$ 37.5°	94.2 $\pm$ 39.1°	88.4 $\pm$ 60.1°	25.7 $\pm$ 19.6°
Réticulocytes (%)	1.0 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.9°	1.9 $\pm$ 0.8°	1.6 $\pm$ 1.2°	1.1 $\pm$ 0.8
Retic prod index	1.0 $\pm$ 0.3	0.65 $\pm$ 0.25°	0.99 $\pm$ 0.41	0.69 $\pm$ 0.48°	0.33 $\pm$ 0.25°
MCV (fL)	87.0 $\pm$ 4.3	73.7 $\pm$ 7.2°	93.2 $\pm$ 6.9°	67.2 $\pm$ 4.3°	113.1 $\pm$ 9.7°
CH (pg)	29.1 $\pm$ 1.6	21.3 $\pm$ 2.9°	32.9 $\pm$ 1.9°	21.3 $\pm$ 1.8°	37.4 $\pm$ 4.4°
CHCM (pg/mL)	33.5 $\pm$ 0.9	29.0 $\pm$ 1.8°	35.6 $\pm$ 1.4°	32.0 $\pm$ 1.4°	33.2 $\pm$ 1.2
%MICRO	0.7 $\pm$ 0.5	18.2 $\pm$ 13.3°	0.4 $\pm$ 0.2°	26.1 $\pm$ 11.6°	1.0 $\pm$ 0.6
%MACRO	0.7 $\pm$ 1.4	0.1 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 6.7*	0.0 $\pm$ 0.0	31.5 $\pm$ 18.3°
%HYPO	0.9 $\pm$ 0.9	41.9 $\pm$ 19.5°	0.4 $\pm$ 0.5*	10.5 $\pm$ 7.0°	3.0 $\pm$ 1.9°
MICRO/hYPO	NA	0.45 $\pm$ 0.30	NA	3.75 $\pm$ 3.09	NA
%HYPER	0.8 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 4.0°	1.0 $\pm$ 1.8	3.3 $\pm$ 3.2°
%low CH	23.9 $\pm$ 10.6	84.8 $\pm$ 14.0°	6.7 $\pm$ 4.8°	95.2 $\pm$ 6.6°	6.8 $\pm$ 4.0°
%high CH	29.6 $\pm$ 12.5	2.8 $\pm$ 4.9°	58.1 $\pm$ 15.8°	0.1 $\pm$ 0.0°	72.0 $\pm$ 14.1°
<b>Réticulocytes</b>					
Retic Hb (mg)	16.8 $\pm$ 4.4	18.6 $\pm$ 9.4	32.4 $\pm$ 12.8°	20.9 $\pm$ 14.5	9.9 $\pm$ 7.4°
MCVr (fL)	106.6 $\pm$ 3.3	95.4 $\pm$ 7.7°	109.2 $\pm$ 7.6*	86.3 $\pm$ 6.0°	136.6 $\pm$ 13.3°
CHr (pg)	32.5 $\pm$ 0.3	23.6 $\pm$ 2.9°	34.8 $\pm$ 1.9°	23.6 $\pm$ 2.1°	40.8 $\pm$ 5.9°
CHCMr (pg/mL)	30.6 $\pm$ 0.9	24.7 $\pm$ 1.4°	32.0 $\pm$ 1.4°	27.5 $\pm$ 1.3°	29.7 $\pm$ 2.0
%MICROr	0.1 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 1.6°	14.2 $\pm$ 19.1	1.7 $\pm$ 1.5°	0.2 $\pm$ 0.3
%MACROr	6.6 $\pm$ 6.4	2.5 $\pm$ 3.9°	7.8 $\pm$ 7.1°	0.1 $\pm$ 0.2°	70.5 $\pm$ 17.0°
%HYPOr	15.7 $\pm$ 9.0	84.9 $\pm$ 7.4°	1.0 $\pm$ 3.1°	61.0 $\pm$ 17.5°	39.7 $\pm$ 18.9°
MICROr/HYPOr	NA	0.02 $\pm$ 0.02	NA	0.03 $\pm$ 0.03	NA
%HYPERr	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.5°	0.2 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 2.1°
%low CHr	7.6 $\pm$ 4.9	73.8 $\pm$ 18.0°	2.0 $\pm$ 1.5°	84.7 $\pm$ 19.2°	5.2 $\pm$ 2.8
%high CHr	55.9 $\pm$ 13.3	3.6 $\pm$ 3.8°	77.3 $\pm$ 11.5°	0.7 $\pm$ 1.6°	81.0 $\pm$ 10.5°
<b>Erythrocytes matures</b>					
MCVm (fL)	88.8 $\pm$ 4.1	73.6 $\pm$ 6.8°	92.9 $\pm$ 6.9°	66.9 $\pm$ 4.2°	111.0 $\pm$ 8.9°
CHm (pg)	29.9 $\pm$ 1.5	21.7 $\pm$ 3.4°	32.9 $\pm$ 1.9°	21.3 $\pm$ 1.8°	37.5 $\pm$ 4.4°
CHCMm (pg/mL)	33.8 $\pm$ 0.8	29.1 $\pm$ 1.8°	35.6 $\pm$ 1.4°	32.0 $\pm$ 1.3°	33.9 $\pm$ 1.5
%MICROm	0.4 $\pm$ 0.3	17.7 $\pm$ 12.7°	0.3 $\pm$ 0.2	26.5 $\pm$ 11.7°	1.0 $\pm$ 0.6°
%MACROm	0.6 $\pm$ 1.3	0.1 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 6.5*	0.0 $\pm$ 0.0	31.1 $\pm$ 18.4°
MICROm/HYPOm	NA	0.45 $\pm$ 0.31	NA	4.38 $\pm$ 3.98	NA
%HYPOm	1.1 $\pm$ 0.9	41.6 $\pm$ 20.1°	0.2 $\pm$ 0.4°	9.7 $\pm$ 6.9°	2.5 $\pm$ 1.8°
%HYPERm	1.3 $\pm$ 1.1	0.4 $\pm$ 0.8°	4.3 $\pm$ 4.0°	1.0 $\pm$ 1.7	3.2 $\pm$ 3.2°
%low CHm	24.1 $\pm$ 10.6	85.0 $\pm$ 14.0°	6.8 $\pm$ 4.9°	95.3 $\pm$ 6.4°	6.9 $\pm$ 4.0°
%high CHm	29.3 $\pm$ 12.5	2.7 $\pm$ 4.9°	57.7 $\pm$ 15.9°	0.7 $\pm$ 1.6°	71.9 $\pm$ 14.1°
Ferritine (ng/mL)	89.7 $\pm$ 73.6	25.6 $\pm$ 39.4°	771.2 $\pm$ 610.4°	143.4 $\pm$ 169.9	241.0 $\pm$ 99.5°
SeFe ( $\mu\text{mol/L}$ )	18.9 $\pm$ 4.3	5.6 $\pm$ 5.9°	29.8 $\pm$ 8.1°	15.6 $\pm$ 6.7	17.3 $\pm$ 10.8

\*: p < 0.05; †: p < 0.01; °: p < 0.001

**Figure 6.A.2 : Représentation graphique des paramètres globulaires chez un patient représentatif de l'anémie ferriprive (IDA), de l'hémochromatose génétique (GH), de la thalassémie (Thal) et de l'anémie mégaloblastique (MA)**

La partie de gauche montre les paramètres mesurés sur la population érythroïde globale, la partie de droite différencie les réticulocytes (en bleu) des érythrocytes matures (en rouge). Le faible pourcentage de réticulocytes n'influence pas l'interprétation graphique dans ces différentes pathologies. Les réticulocytes sont dans la partie supérieure gauche du graphique V/HC.

Toutefois, dans la GH, en comparaison de l'AIHA, les réticulocytes ne sont pas hypochromes en raison de la surcharge martiale.



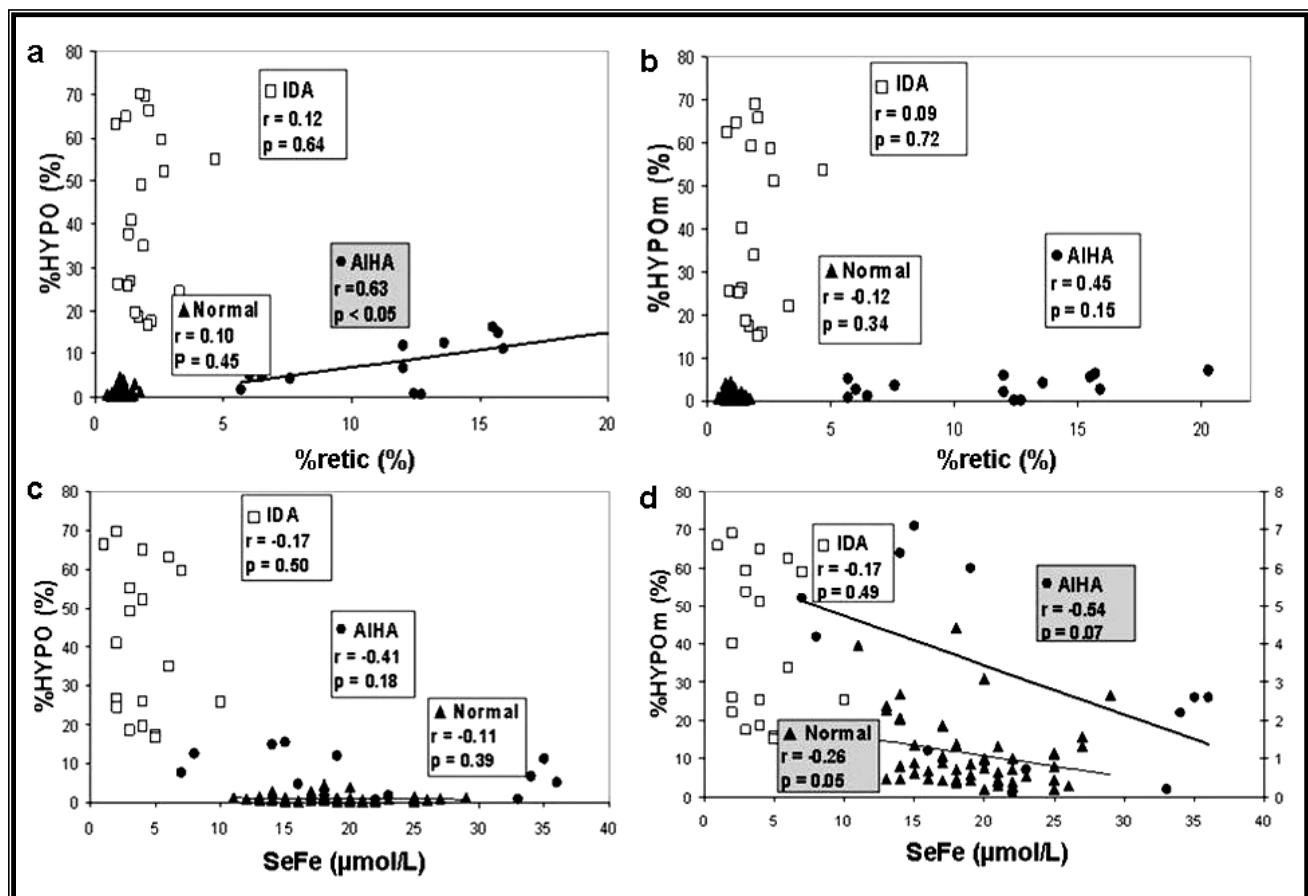
**Figure 6.A.3 : Corrélations entre %HYPO et %HYPOm dans la population de référence, l'AIHA et l'IDA**

A : Corrélations de %HYPO et du pourcentage de réticulocytes. Une corrélation positive significative est observée en cas de réticulocytose élevée (AIHA).

B : Corrélations de %HYPOm et du pourcentage de réticulocytes. %HYPOm n'est corrélé à la réticulocytose dans aucune des situations étudiées.

C : Corrélations de %HYPO avec le fer sérique (SeFe). Dans aucune des situations, %HYPO n'est corrélé avec SeFe.

D : Corrélations de %HYPOm avec SeFe. %HYPOm est négativement corrélé à SeFe dans l'AIHA et dans la population de référence. Cette corrélation n'est pas significative dans l'IDA vraisemblablement en raison du faible range des valeurs de SeFe dans cette maladie.



#### 4. Discussion

Beaucoup de paramètres biologiques, tels que la ferritine, la saturation de la transferrine ou le fer sérique, sont utilisés pour évaluer la biodisponibilité du fer. Toutefois, ces paramètres ne sont pas suffisamment sensibles et spécifiques pour la prédiction de la réponse à des suppléments intraveineux de fer chez les patients hémodialysés traités par rHuEPO.<sup>190</sup> Dans ce domaine, le pourcentage de globules rouges hypochromes est utilisé avec un intérêt croissant par les néphrologues. Ce paramètre a été démontré comme le plus efficace dans la prédiction de la réponse à une charge martiale.<sup>190</sup> Cependant, il a été prouvé que %HYPO était non seulement dépendant de la disponibilité du fer mais également de l'activité érythropoïétique.<sup>242, 244</sup> Les seuils habituellement utilisés pour détecter un déficit martial fonctionnel à l'aide de %HYPO varient généralement entre 6 et 10%, ce qui est beaucoup plus élevé que les valeurs normales.<sup>27, 190</sup> Avec des seuils aussi élevés, la spécificité est bonne mais on observe un manque de sensibilité. Ceci peut être expliqué par la corrélation qui existe entre %HYPO et l'activité érythropoïétique.

Un marqueur idéal du déficit martial fonctionnel devrait être indépendant de cette activité érythropoïétique. De nouveaux paramètres sont devenus disponibles grâce à la technique développée par le compteur cellulaire Advia 120, qui mesure simultanément le volume cellulaire et la concentration en Hb pour chaque cellule individuelle dans la population érythroïde globale, mais aussi sur les réticulocytes et les globules rouges matures séparément. Dans cette étude, nous avons déterminé les valeurs de référence des paramètres mesurés dans ces 3 populations cellulaires différentes. Les valeurs mesurées étaient un peu différentes de celles rapportées par D'Onofrio et al. dans un groupe de patients similaires<sup>256</sup>, peut-être en raison de différence de calibration des appareils de mesure. Dans notre étude, les réticulocytes étaient 20% plus grands que les globules rouges matures avec un contenu en Hb 8.7% plus important mais une concentration en Hb 9.6% plus basse. D'Onofrio et al. avaient trouvé un MCV 24% plus grand, un CH similaire et une concentration en Hb 16.7% plus basse dans les réticulocytes. Le plus grand volume cellulaire et la concentration en Hb plus basse des réticulocytes étaient donc retrouvés dans les deux études. L'observation d'un contenu en Hb 2.5 pg plus important dans les réticulocytes, suggérant une perte d'Hb pendant la maturation réticulocytaire, a déjà été rapportée antérieurement.<sup>257</sup>

De telles différences entre les réticulocytes et les érythrocytes matures expliquent l'influence de la réticulocytose sur la détermination des paramètres de la population érythroïde globale. Chez les patients souffrant d'AIHA, la réticulocytose élevée entraîne artificiellement une diminution du

CHCM et une augmentation de %HYPO des paramètres de routine. Dans ce cas, les paramètres des erythrocytes matures sont beaucoup plus fiables pour la détermination du volume cellulaire et de la disponibilité du fer. Alors que les paramètres de routine suggéraient un déficit martial (diminution du CHCM et augmentation de %HYPO), les globules rouges matures avaient une concentration en Hb augmentée et un %HYPO presque normal. L'utilisation des paramètres erythrocytaires matures pourrait donc permettre d'exclure les biais causés par une stimulation érythropoïétique intense. Ceci est particulièrement important dans le cas de l'anémie rénale traitée par rHuEPO, et en particulier lors de l'initiation du traitement, quand la réticulocytose est souvent élevée alors que le nombre de globules rouges matures est faible en comparaison de la phase de maintenance du traitement. Nous avons également démontré que %HYPO était directement corrélé à la réticulocytose en cas d'augmentation de l'activité érythropoïétique. Cette corrélation n'existe pas avec %HYPOm. De plus, alors que %HYPO n'est pas corrélé avec le fer sérique ou la saturation de la transferrine, %HYPOm l'est, et ce, malgré la normalité des paramètres du fer dans la population de référence et dans l'AIHA. Cette corrélation n'est pas statistiquement significative dans l'IDA en raison de la faible dispersion des valeurs de SeFe dans cette population.

Après avoir démontré que les indices des erythrocytes matures permettaient d'éviter les biais dus à la stimulation érythropoïétique, nous avons établi la fiabilité de ces paramètres dans d'autres situations pathologiques et en particulier dans le monitoring martial. Nous avons montré que CHm et CHCMm et les paramètres qui en sont dérivés étaient significativement diminués dans l'anémie ferriprive et augmentés dans l'hémochromatose génétique.

En raison des biais liés aux variations de volume cellulaire dans la détermination de la concentration en Hb dans l'AIHA, nous avons étudié deux pathologies dans lesquelles le volume cellulaire est soit élevé soit diminué, sans relation avec le statut martial. Dans la thalassémie mineure, la microcytose (MCVm bas) était associée avec une importante diminution du CHm. Inversément, la macrocytose de l'anémie mégaloblastique était associée à une augmentation de CHm. Cependant, dans ces deux pathologies, le CHCMm était normal. %HYPO était normal dans la MA mais augmenté dans la thalassémie. Ce phénomène est bien connu et la distinction avec l'anémie ferriprive peut être faite grâce au rapport MICRO/HYPO qui est largement supérieur à 0.9 dans la thalassémie et inférieur à 0.9 dans l'IDA. L'effet du volume cellulaire sur CHm suggère que les paramètres dérivés de la concentration en Hb pourraient être plus fiables que ceux dépendant du contenu en Hb en ce qui concerne le monitoring martial. L'analyse des paramètres erythrocytaires

matures dans la thalassémie mineure et l'anémie mégaloblastique a démontré que les paramètres de routine étaient fiables, étant donné la faible influence de la réticulocytose.

%HYPO n'était pas corrélé avec SeFe mais bien avec la réticulocytose, alors que %HYPOM était indépendant de l'activité érythropoïétique mais corrélé avec SeFe. Cela fait de %HYPOM un bon candidat comme marqueur du monitoring martial chez les patients hémodialysés traités par rHuEPO, chez qui le déficit martial fonctionnel et l'augmentation de l'activité érythropoïétique sont rencontrés simultanément. Ceci est encore plus vrai à l'initiation du traitement que dans la phase de maintenance, car la stimulation érythropoïétique est plus intense à ce moment.

Pour valider l'intérêt clinique des paramètres des érythrocytes matures, la détermination de leur sensibilité et spécificité dans la prédiction de la réponse à une supplémentation martiale intraveineuse doit être évaluée. C'est le but de l'étude que nous avons réalisée et que nous présentons dans la partie suivante.

## **B. LES PARAMETRES DES ERYTHROCYTES MATURES COMME MARQUEURS DU DEFICIT MARTIAL FONCTIONNEL : SENSIBILITE ET SPECIFICITE**

Mature erythrocyte parameters as new markers of functional iron deficiency in hemodialysis :  
Sensitivity and specificity

C Bovy, A Gothot, P Delanaye, JM Krzesinski, Y Beguin.  
Soumis dans « Nephrology Dialysis Transplantation »

### **1. Introduction**

Le déficit martial est la première cause de résistance à l'érythropoïétine. Le pourcentage de globules rouges hypochromes a été démontré comme le meilleur prédicteur de la réponse à l'administration intraveineuse de fer.<sup>190</sup> Dans les chapitres précédents, nous avons cependant démontré que ce paramètre était influencé par l'activité érythropoïétique ce qui le rend moins fiable dans le monitoring martial lorsque l'érythropoïèse est intense.<sup>242, 244</sup> De manière à éviter les biais de l'influence de l'activité érythropoïétique, nous avons étudié les paramètres des érythrocytes matures dans différentes pathologies et montré qu'ils présentaient l'avantage d'être influencés par le statut martial et pas ou peu par l'activité érythropoïétique.<sup>258</sup>

Dans cette dernière étude, nous avons donc voulu valider ces paramètres dans le cadre de leur utilisation clinique. Nous avons, dès lors, déterminé la sensibilité et la spécificité de ces paramètres pour prédire la réponse à une supplémentation intraveineuse en fer chez des patients hémodialysés traités par rHuEPO et nous les avons comparé aux paramètres habituellement utilisés en routine, c'est-à-dire tels que mesurés sur la population érythrocytaire globale.

### **2. Méthodes**

#### **a. Patients**

Trente-deux patients souffrant d'insuffisance rénale terminale traités par hémodialyse chronique ont été inclus dans l'étude. Le sex-ratio était de 13 femmes pour 19 hommes. L'âge moyen était de  $65 \pm 18$  ans. L'origine de l'insuffisance rénale était une néphropathie diabétique pour 7, hypertensive pour 7, une glomérulopathie pour 7, une néphropathie tubulo-interstitielle pour 6 et une autre cause pour 5. Tous les patients étaient traités par hémodialyse 3 fois par semaine pour une durée de 3.5 à 4 heures par séance. Ils étaient tous traités par rHuEPO depuis au moins 3 mois et étaient dans la

phase de maintenance de ce traitement avec une dose stable depuis au moins 4 semaines. Avant l'inclusion dans l'étude, l'administration de fer par voie intraveineuse se faisait de manière à satisfaire aux recommandations de l'European Best Practice Guidelines (EBPG; FRT > 100 ng/mL et %HYPO < 10%). [20] Les critères d'exclusion étaient la polykystose autosomale dominante, les néoplasies, les hémoglobinopathies, la présence d'un saignement actif aigu ou chronique, une transfusion sanguine dans les 3 mois précédent le début de l'étude, une hyperparathyroïdie (PTH > 500 ng/mL), un déficit en vitamine B12 ou en folate, un syndrome inflammatoire chronique ou aigu (CRP > 30 mg/l).

b. Protocole de l'étude

Les patients ont été sélectionnés sur la base des critères d'inclusion et d'exclusion. La période de screening a duré 4 semaines pendant lesquelles ni la dose de rHuEPO ni la dose de fer intraveineux n'a été modifiée. Les patients chez qui le taux d'hémoglobine variait de plus de 1 g/dL pendant cette période de 4 semaines ont été exclus de l'étude.

Les patients inclus entraient alors dans une période de 4 semaines sans administration de fer. A la fin de cette période, les paramètres hématologiques et les paramètres habituels du monitoring martial ont été mesurés : Hb, Hct, retic, %HYPO, CChr, CHm, %HYPOm, %lowCHm, FRT, TSAT et sTfR. Les patients chez qui le taux d'Hb augmentait de plus de 1 g/dL pendant la période de privation de fer étaient exclus de l'étude ; une réponse pendant la période de charge en fer ne pouvant plus être interprétée comme le signe d'un déficit martial .

Pendant la seconde partie de l'étude, une charge en fer était administrée à tous les patients. Elle était donnée à la dose de 100 mg de fer sucrose (Venofer®, Vifor, St. Gallen, Suisse) à chaque séance de dialyse pendant 4 semaines, soit une dose totale de 1200 mg, supérieure aux besoins réels dans la période de maintenance du traitement par rHuEPO. Les paramètres hématologiques ont été suivis chaque semaine pendant l'entièreté de l'étude. La dose de rHuEPO a été maintenue constante pendant toute la durée de l'étude.

Les patients ont été classés en répondeurs (R ; présumés déficients en fer) et non-répondeurs (NR ; présumés sans déficit martial) selon l'observation ou non d'une augmentation de leurs taux d'Hb de 1 g/dL pendant la période de 4 semaines de charge en fer.

Le protocole a été approuvé par le Comité d’Ethique de l’Université de Liège. Un consentement éclairé a été obtenu pour tous les patients inclus dans l’étude.

**c. Analyses de laboratoire**

Tous les paramètres globulaires ont été mesurés à l’aide de l’Advia 120 (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). Les autres techniques de laboratoires ont été décrites dans la méthodologie générale. Les paramètres biologiques suivants ont été étudiés : FRT, TSAT, sTfR.

**d. Analyses statistiques**

En plus des analyses statistiques décrites dans la méthodologie générale, des analyses spécifiques ont été réalisées. Les analyses de type « ROC curves » ont été réalisées en utilisant MedCalc (Mariakerke, Belgique). Les coefficients Kappa pour la sensibilité ( $\kappa_{\text{sens}}$ ), la spécificité ( $\kappa_{\text{spec}}$ ) et l’efficacité ( $\kappa_{\text{eff}}$ ) ont été calculés pour calibrer les résultats à la prévalence et au niveau du test. Les coefficients Kappa ont été calculés comme suit :  $(\kappa_{\text{sens}}) = (\text{SE} - Q)/Q'$ ;  $(\kappa_{\text{spec}}) = (\text{SP} - Q')/Q$  and  $(\kappa_{\text{eff}}) = (\text{EFF} - PQ - P'Q')/(1 - PQ - P'Q')$ , où P est la prévalence du déficit martial dans la population étudiée,  $P' = 1 - P$ , Q est le niveau du test (pourcentage de faux positif) et  $Q' = 1 - Q$ . SE est la sensibilité, SP est la spécificité et EFF est l’efficacité du test.

**3. Résultats**

Parmi les 32 patients, 12 (37.5%) ont été définis comme répondeurs (déficients en fer). Chez les répondeurs, Hb, FRT, TSAT, CHr et CHm étaient significativement plus bas et %HYPO, %HYPOm et %low CHm significativement plus élevés que chez les non-répondeurs. Le tableau 6.B.1 montre les paramètres hématologiques et du monitoring martial à l’état basal, avant la charge en fer, dans les deux groupes.

Après la charge en fer, le niveau de l’Hb est resté constant chez les NR ( $12.9 \pm 0.8$  vs  $12.9 \pm 0.7$  g/dL) mais a augmenté de manière significative chez les R de  $11.7 \pm 0.9$  à  $12.9 \pm 1.1$  g/dL, devenant similaire à celui des NR. La dose de rHuEPO n’était pas significativement différente mais il y avait une tendance à une dose plus élevée chez les R que chez les NR ( $189 \pm 129$  vs  $118 \pm 75$  UI/kg/sem; NS).

**Table 6.B.1: Paramètres mesurés à la fin de la période de privation martiale avant la charge en fer**

	NR	R	p
<b>Hb (g/dL)</b>	12.9 ± 0.7	11.7 ± 0.9	< 0.001
<b>Hct (%)</b>	39.7 ± 2.1	37.8 ± 3.3	0.06
<b>Retic (%)</b>	1.6 ± 0.4	2.1 ± 0.5	< 0.01
<b>CHr (pg)</b>	33.4 ± 1.3	31.2 ± 2.3	< 0.01
<b>CHm (pg)</b>	31.9 ± 1.2	30.0 ± 2.3	< 0.01
<b>%LowCHm (%)</b>	11.3 ± 4.5	26.4 ± 16.1	< 0.001
<b>%HYPO (%)</b>	4.5 ± 2.5	4.1 ± 6.5	< 0.001
<b>%HYPOm (%)</b>	3.9 ± 2.4	12.9 ± 6.5	< 0.001
<b>FRT (ng/mL)</b>	446 ± 146	248 ± 162	< 0.01
<b>TSAT (%)</b>	25.6 ± 6.6	16.2 ± 3.5	< 0.001
<b>Dose de rHuEPO (UI/kg/sem)</b>	118 ± 75	189 ± 129	NS

La figure 6.B.1 résume l'évolution des paramètres étudiés pendant la période de suivi de 8 semaines. Chez les R, le taux de FRT, déjà plus bas au départ que chez les NR au début de l'étude, diminuait encore significativement après la période sans fer (248 ± 162 vs 417 ± 249 ng/mL; p < 0.01). Simultanément, TSAT a diminué de manière significative de 18.8 ± 3.7 à 16.2 ± 3.5 %; p < 0.05. Pendant cette période, %HYPO, %HYPOm, CHr et CHm sont restés constants. Seul %lowCHm s'est accru significativement (26.4 ± 16.1 vs 23.6 ± 14.1 %; p < 0.03). Dans le même groupe de patients, après la charge en fer, FRT et TSAT ont augmenté de manière significative (773 ± 381 vs 248 ± 162 ng/mL, p < 0.001; et 23.9 ± 6.8 vs 16.2 ± 3.5 %, p < 0.001, respectivement). CHr s'est accru de manière significative de 31.2 ± 2.3 à 34.1 ± 2.0 (p < 0.05), alors que %HYPO (8.6 ± 6.2 vs 14.1 ± 6.5 %; p < 0.001) et %HYPOm (8.6 ± 5.9 vs 12.9 ± 6.5 %; p < 0.001) ont diminué significativement. %lowCHm, qui s'était accru pendant la période sans fer (26.4 ± 16.1 vs 23.6 ± 14.1%; p < 0.05), a diminué de manière significative pendant la charge en fer (18.0 ± 11.6 vs 26.4 ± 16.1 %; p < 0.05). Son niveau, à la fin de l'étude était donc plus bas qu'à son début malgré son augmentation pendant la première partie de l'étude.

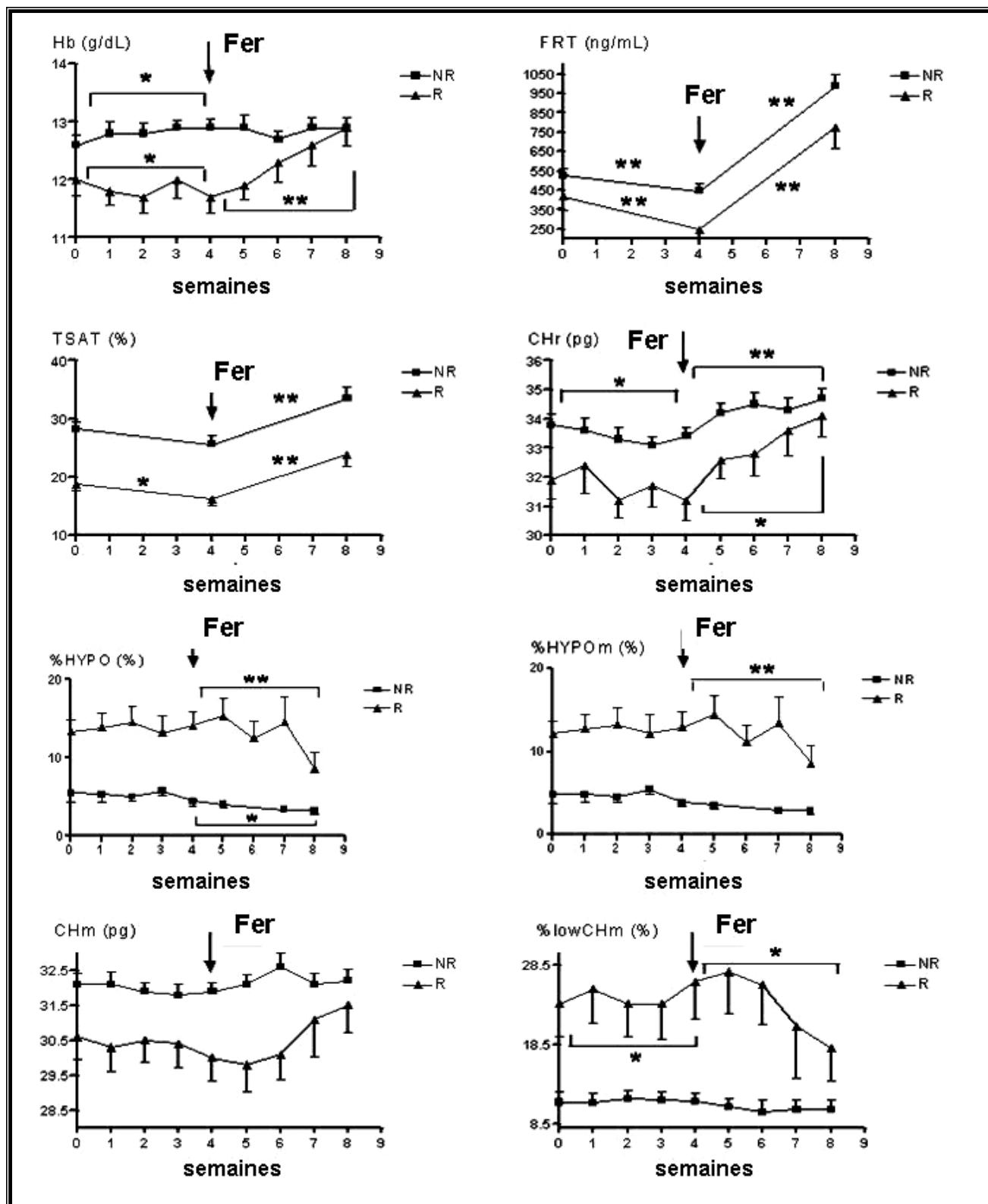
Chez les patients sans déficit martial, pendant la période de privation en fer, TSAT, %HYPO, %HYPOm, CHm et %lowCHm restaient constants. Les seuls paramètres présentant une différence significative étaient FRT (446 ± 146 vs 524 ± 148 ng /mL; p < 0.001) ainsi que CHr (31.9 ± 2.3 vs 33.4 ± 1.3 pg; p < 0.05) qui diminuaient. Après la charge en fer, FRT (987 ± 250 vs 446 ± 146, p <

0.001), TSAT ( $33.5 \pm 8.0$  vs  $25.6 \pm 6.6$ ,  $p < 0.001$ ) et CHr ( $34.7 \pm 1.5$  vs  $33.4 \pm 1.3$ ,  $p < 0.001$ ) augmentaient significativement, %HYPO diminuait significativement ( $3.3 \pm 1.8$  vs  $4.5 \pm 2.5$ ,  $p < 0.05$ ), alors que CHm, %HYPOm et %lowCHm restaient constants.

Les résultats des analyses de type « ROC curves » sont présentés à la figure 6.B.2. Tous les paramètres étudiés avaient une aire sous la courbe supérieure à 0.5. Le pouvoir de discrimination pour prédire le déficit fonctionnel en fer était classé dans l'ordre suivant : sTfR (AUC: 0.989; SE: 0.034), %HYPO (AUC: 0.937; SE: 0.051), %HYPOm (AUC: 0.935; SE: 0.052), TSAT (AUC: 0.896; SE: 0.060), FRT (AUC: 0.834; SE: 0.076), CHm (AUC: 0.808; SE: 0.076), %lowCHm (AUC: 0.792; SE: 0.088) et CHr (AUC: 0.752; SE: 0.086). Toutefois, il n'y avait pas de différence significative entre aucun de ces paramètres.

Les meilleurs seuils, pour la prédiction de la réponse à la charge martiale, calculés selon les analyses des « ROC curves », étaient sTfR  $> 6.6$  mg/L, %HYPO  $> 7.3\%$ , %HYPOm  $> 6.8\%$ , TSAT  $< 21\%$ , FRT  $< 400$  ng/mL, CHm  $< 32.4$  pg, %lowCHm  $> 19\%$  et CHr  $< 30$  pg.

Nous avons calculé la sensibilité, la spécificité et l'efficacité de ces différents paramètres pour différents seuils, ainsi que leurs combinaisons comme cela a été proposé dans les directives européennes et américaines. [20-21] Ces résultats sont présentés dans le tableau 5.B.2, classés par ordre décroissant de meilleure efficacité calibrée ( $\kappa_{eff}$ ). %HYPOm  $> 6\%$  était le meilleur prédicteur de la réponse à la charge martiale. A ce seuil, %HYPOm permettait de classer correctement en répondeurs et non-répondeurs 87.5% des cas. L'efficacité des cibles proposées par les EPG [20] (FRT  $> 100$  ng/mL et %HYPO  $< 6\%$ ) était similaire, avec une classification correcte de 85.7% des cas. Les cibles recommandées par les directives américaines [21] (FRT  $> 100$  ng/mL et TSAT  $> 20\%$ ) étaient un peu moins efficaces avec une classification correcte de 78.6% des cas.

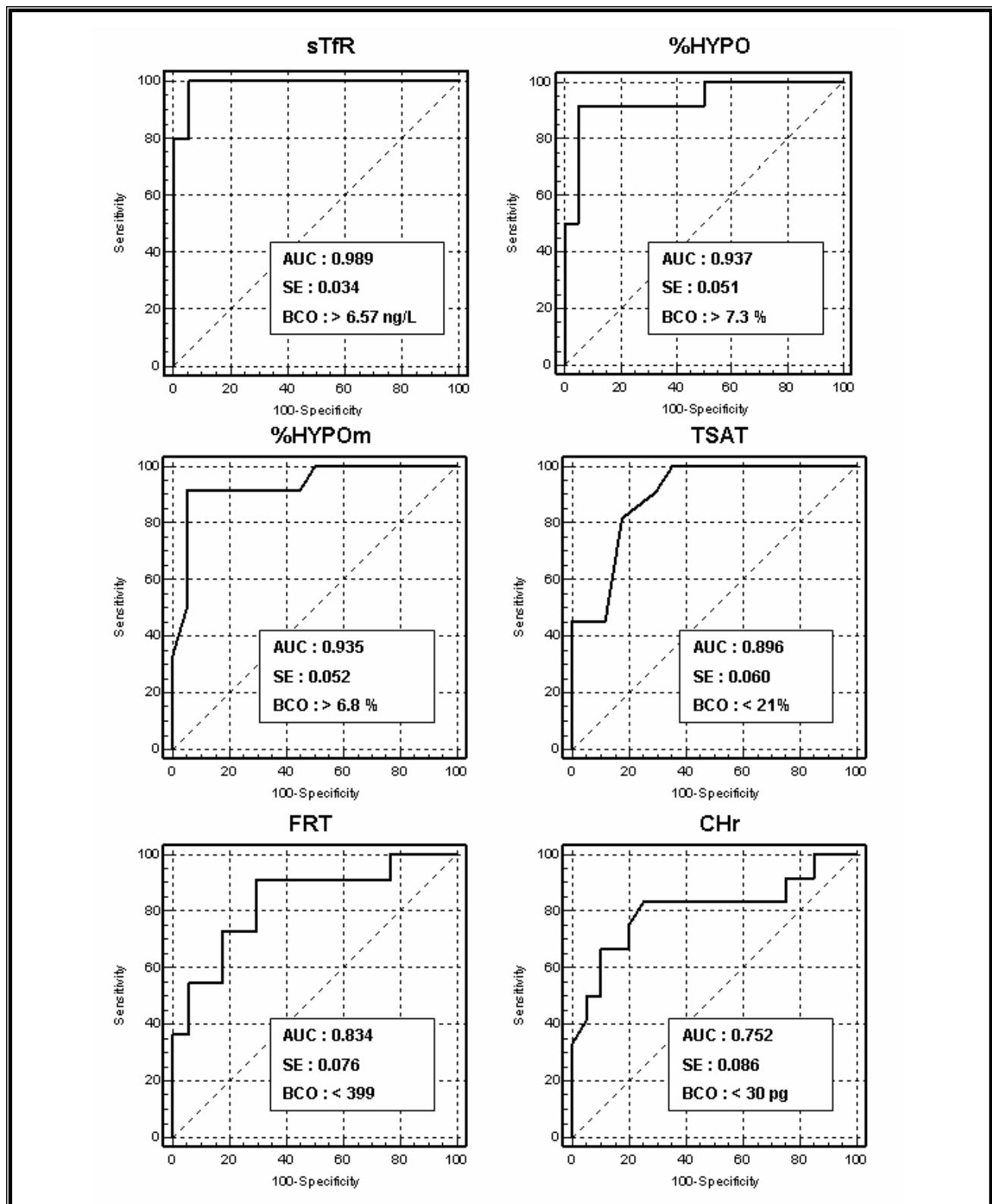
**Figure 6.B.1 : Evolution des différents paramètres étudiés au cours du temps**\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$ 

**Figure 6.B.2 : Résultats des ROC curves**

AUC (area under the curve) : Aire sous la courbe.

SE (standard error) : Déviation standard.

BCO (Best cut-off) : meilleur seuil.



**Table 6.B.2 : Sensibilité, spécificité et efficacité des paramètres étudiés à différents seuils. Les valeurs seuils ont été choisies à partir des analyses de type « ROC curves » ainsi que par rapport aux recommandations internationales actuelles. Les paramètres sont classés en fonction de  $\kappa_{eff}$ .**

Paramètres	Sensibilité (%)	$\kappa_{sens}(\%)$	Spécificité (%)	$\kappa_{spec}(\%)$	Efficacité (%)	$\kappa_{eff}(\%)$
<b>%HYPOm &gt; 6%</b>	91.7	85.2	85.0	65.7	87.5	74.2
<b>FRT &lt; 100 ng/mL ou %HYPOm &gt; 6%</b>	90.9	84.3	85.0	64.2	87.1	72.9
<b>FRT &lt; 100 ng/mL ou %HYPO &gt; 10%</b>	72.7	59.8	94.1	81.6	85.7	69.0
<b>%HYPO &gt; 10%</b>	66.7	53.7	95.0	82.2	84.4	65.0
<b>FRT &lt; 400 ng/mL</b>	90.9	81.8	76.5	53.0	82.1	64.2
<b>%lowCHm &gt; 20%</b>	58.3	46.6	100.0	100.0	84.4	63.7
<b>%HYPO &gt; 6%</b>	91.7	83.4	75.0	50.0	81.3	62.6
<b>TSAT &lt; 20%</b>	90.9	80.4	70.6	45.1	78.6	57.8
<b>FRT &lt; 100 ng/mL ou TSAT &lt; 20%</b>	90.9	80.4	70.6	45.1	78.6	57.8
<b>CHm &lt; 30 pg</b>	50.0	38.5	100.0	100.0	81.3	55.7
<b>%HYPOm &gt; 10%</b>	50.0	36.0	95.0	77.1	78.1	49.0
<b>%HYPO &gt; 4%</b>	100.0	100.0	50.0	27.3	68.8	42.9
<b>%HYPOm &gt; 4%</b>	91.7	77.9	55.0	28.0	68.8	41.3
<b>%lowCHm &gt; 15%</b>	66.7	43.9	75.0	38.5	71.8	40.8
<b>CHm &lt; 29 pg</b>	33.3	23.8	100.0	100.0	75.0	38.5
<b>CHr &lt; 30 pg</b>	33.3	23.8	100.0	100.0	75.0	38.5
<b>FRT &lt; 100 ng/mL</b>	27.3	18.6	100.0	100.0	71.4	31.2
<b>CHm &lt; 31 pg</b>	66.7	37.3	65.0	25.3	65.5	30.1
<b>CHr &lt; 29 pg</b>	25.0	17.2	100.0	100.0	71.8	29.2
<b>%lowCHm &gt; 10%</b>	91.7	70.5	40.0	16.5	59.4	26.8
<b>TSAT &lt; 30%</b>	100.0	100.0	29.4	14.1	57.1	24.6

#### 4. Discussion

La stimulation de l'érythropoïèse par rHuEPO entraîne souvent une chute rapide de FRT, TSAT, CHr et une augmentation de %HYPO<sup>244, 259-260</sup>, un tableau hautement suggestif d'un déficit martial fonctionnel. L'alimentation est la source de 1 à 2 mg de fer élément par jour. Cette source est largement insuffisante pour rencontrer les besoins d'une moëlle érythropoïétique stimulée. De plus, l'absorption digestive de fer est altérée chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique terminale.<sup>76</sup> Les suppléments intraveineux de fer ont prouvé leur efficacité chez ce type de patients traités par rHuEPO 81 et sont prescrits à large échelle.

Les recommandations internationales actuelles<sup>27-28</sup> semblent insuffisantes pour assurer l'évaluation du statut martial. En effet, dans une étude antérieure<sup>189</sup>, la supplémentation martiale avait été augmentée dans une population non-sélectionnée de patients hémodialysés chez qui les cibles des recommandations internationales étaient atteintes, avec pour conséquence une amélioration de la réponse à la rHuEPO en prenant comme cible une normalisation de %HYPO (< 2.5%). Cette approche de la thérapie martiale était efficace en ce qui concerne le rapport coût-bénéfice. Les taux de ferritine nécessaires pour normaliser %HYPO étaient beaucoup plus élevés que ceux prescrits par les recommandations actuelles. Malheureusement, une telle pratique pourrait entraîner un degré de surcharge martial significatif.

Dans une étude similaire à la nôtre, Tessitore et al.<sup>190</sup> ont montré que le meilleur prédicteur simple de la réponse à une charge martiale était %HYPO avec une valeur-seuil de 6%, ce qui est nettement inférieur aux valeurs recommandées par les directives européennes<sup>27</sup> de 10%. De plus, la sensibilité et la spécificité de TSAT et de FRT étaient beaucoup moins dans leur étude. Malgré la valeur diagnostique bien établie de %HYPO, nous avons démontré antérieurement<sup>242, 244, 252</sup> que l'activité érythropoïétique exerce une influence positive sur %HYPO et que celui-ci pouvait s'accroître uniquement en raison d'un rajeunissement de la population érythroïde secondairement à la stimulation érythropoïétique.<sup>244</sup>

Dans notre étude visant à optimaliser le traitement par rHuEPO et fer, les analyses de type « ROC curve » montrent la valeur diagnostique de plusieurs des paramètres examinés pour la détection du déficit martial fonctionnel. Dans ces analyses, sTfR avait la plus grande aire sous

la courbe, directement suivi de %HYPO et de %HYPOm. Toutefois, la sensibilité, spécificité et efficacité de ce paramètre n'ont pu être calculées car seuls les résultats de 5 patients répondeurs étaient disponibles. De plus, malgré la valeur discriminative de sTfR, la technique de mesure n'est pas disponible partout et le coût de cette technique est largement supérieur à celui de la mesure de paramètres globulaires qui est compris dans la détermination du sang complet.

En ordre décroissant d'aire sous la courbe, TSAT arrive après l'hypochromie (%HYPO et %HYPOm) avec une bonne sensibilité (90.9%) mais une spécificité assez faible (70.6%). La spécificité de la ferritine inférieure à 100 ng/mL était parfaite. Cependant, sa sensibilité était inacceptable d'un point de vue clinique. En effet, à ce seuil, seuls 25% des patients ferriprivés fonctionnels avaient pu être identifiés. Le meilleur seuil pour FRT, calculé sur base des analyses de ROC curves, était de 400 ng/mL. A ce seuil, les sensibilité, spécificité et efficacité de FRT étaient similaires à celles de %HYPO > 6%.

Les paramètres basés sur le contenu en Hb des érythrocytes matures, CHm et %lowCHm, auraient pu présenter un intérêt puisque, excluant l'effet de la réticulocytose, ils excluent en plus l'effet des variations du volume cellulaire associées au rajeunissement de la population érythrocytaire secondaire à la stimulation érythropoïétique. Toutefois, leur sensibilité, leur spécificité et leur efficacité étaient inférieures à celles de %HYPOm.

En dépit de leur aire sous la courbe similaire, %HYPO et %HYPOm présentaient de petites différences en terme de sensibilité et spécificité pour le but recherché. Ces différences n'étaient cependant pas statistiquement significatives. La meilleure efficacité a été trouvée pour %HYPOm > 6%. A ce seuil, 87.5% des patients étaient correctement classifiés en déficit martial ou non selon la définition établie. De ce fait, %HYPOm améliore modérément la détection du déficit martial fonctionnel par rapport à la combinaison de FRT < 100 ng/mL et %HYPO > 10%<sup>27</sup> ou de la combinaison FRT < 100 ng/mL et TSAT < 20%.<sup>28</sup> Cependant, ces différences n'atteignent pas le seuil de signification statistique.

Dans cette étude, en dépit de la stabilité des paramètres dans la phase de maintenance du traitement par rHuEPO, plus ou moins un tiers des patients ont amélioré leur taux d'Hb avec la charge martiale. Cette observation souligne le fait que le déficit martial fonctionnel est insuffisamment diagnostiqué. Le diagnostic correct du déficit martial fonctionnel pourrait

entraîner des réductions de doses de rHuEPO et, donc des économies dans le traitement de l'anémie rénale. Les paramètres des érythrocytes matures, et en particulier %HYPOm, semblent être au moins aussi efficaces que %HYPO dans le monitoring du fer. Etant donné que cette étude a été réalisée en état de stabilité parfaite du traitement de l'anémie, l'activité érythropoïétique était faible, comme en témoignent les taux de réticulocytes. La phase d'induction du traitement par rHuEPO représente une stimulation érythropoïétique plus intense avec un rapport jeunes érythrocytes / vieux érythrocytes plus élevé. Cela pourrait amplifier la supériorité de l'efficacité de %HYPOm en comparaison avec %HYPO pour le monitoring martial. Cela reste toutefois à démontrer.

**CHAPITRE 7 :**  
**DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES**

Le traitement de l'anémie par érythropoïétine humaine recombinante est efficace et entraîne une amélioration de la survie et de la qualité de vie et une diminution du risque de complications cardio-vasculaires chez les patients insuffisants rénaux chroniques et dialysés.<sup>28-50</sup> L'efficacité de ce traitement dépend toutefois principalement d'une fourniture adéquate de fer à la moelle érythropoïétique.<sup>197</sup>

Chez les sujets sains, chez qui les besoins en fer sont moindres que dans l'insuffisance rénale, la nécessité d'une supplémentation martiale a été démontrée dans la stimulation érythropoïétique. Lors de stimulations érythropoïétiques importantes, comme celles créées par le don de sang autologue dans les programmes d'autotransfusion supporté par rHuEPO, la disponibilité du fer peut également limiter l'érythropoïèse. En l'absence de supplémentation martiale, le succès de tels programmes est conditionné par la quantité de fer circulant mobilisable de départ mais ne dépend que peu du fer de réserve dont la mobilisation est trop lente.<sup>205</sup> Cela démontre l'importance d'un apport extérieur de fer chez les sujets normaux engagés dans un programme d'autotransfusion. Nos travaux montrent que, malgré une utilisation d'une partie du fer de réserve, les collectes de sang étaient dépendantes d'une absorption digestive de fer qui augmentait de façon considérable. Nous avons démontré que l'activité érythropoïétique était un stimulant de l'absorption digestive de fer au moins aussi puissant que la déplétion des réserves.

L'absorption digestive de fer chez les patients hémodialysés et IRC est souvent diminuée et il a été démontré qu'elle est insuffisante pour rencontrer les besoins associés à un traitement par rHuEPO.<sup>71-72</sup> De plus la tolérance digestive est mauvaise et la compliance est donc médiocre. L'administration intraveineuse de fer est, de ce fait, nécessaire<sup>76-80</sup>, mais non dépourvu de risques. Le dépistage du déficit martial fonctionnel est donc indispensable mais les paramètres classiques utilisés dans ce but peuvent se révéler sub-optimaux.

La ferritine sérique, utilisée pour l'estimation du fer de réserve, est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation. Elle peut donc surévaluer les réserves de fer dans l'urémie, considérée comme un état inflammatoire. Dans une population de sujets sains, nous avons montré que l'activité érythropoïétique et l'administration intraveineuse de fer pouvaient également fausser l'évaluation des réserves de fer. L'activité érythropoïétique diminue le pool labile de fer contenu dans les macrophages et la diminution de la production de ferritine qui s'ensuit peut donner une sous-estimation des réserves en fer. Lors d'une stimulation

érythropoïétique intense, dans un état d'équilibre martial entre entrées et sorties, nous avons observé une augmentation de la FRT et donc une surestimation de l'évaluation du fer de réserve qui en est dérivée. Alors que dans ces conditions, la FRT devrait rester stable ou diminuer suite à la mobilisation du fer pour l'érythropoïèse stimulée, l'administration de fer intraveineux semble entraîner une augmentation de ce pool labile de fer intracellulaire, avec une stimulation de la production de ferritine qui ne représente alors plus de façon précise les stocks de fer de l'organisme.

Le pourcentage de globules rouges hypochromes est considéré comme le meilleur prédicteur simple de la réponse à une charge martiale chez les patients hémodialysés traités par rHuEPO, témoignant de sa valeur diagnostique dans le déficit martial.<sup>190</sup> Ce paramètre serait également le meilleur prédicteur en présence d'un syndrome inflammatoire.<sup>160</sup> Nous avons pu démontrer, pour la première fois, que la présence d'une CRP augmentée influence positivement %HYPO. Dans cette étude, établissant les facteurs modulant %HYPO, ce paramètre était, comme attendu, influencé par les paramètres du monitoring martial, principalement le fer sérique et la saturation de la transferrine, mais moins la ferritine, pour les raisons déjà exposées. Des valeurs pathologiques de %HYPO étaient d'ailleurs retrouvées pour toutes les valeurs de ferritine jusqu'à 900 ng/mL. %HYPO était également corrélé à la dose de rHuEPO, reflétant le déficit martial induit par la stimulation érythropoïétique mais également la stimulation érythropoïétique en tant que telle. Le meilleur prédicteur simple de %HYPO était le taux de récepteurs solubles de la transferrine. Ce paramètre, connu pour être plus influencé par l'activité érythropoïétique que par le déficit martial, était lui-même corrélé, dans cette étude, à la fois à TSAT et à la réticulocytose. %HYPO semblait donc positivement influencé par l'activité érythropoïétique. Cette observation représente un désavantage pour le monitoring des besoins en fer des patients traités par rHuEPO chez qui le déficit martial fonctionnel cohabite avec l'augmentation de l'activité érythropoïétique.

Chez les patients donneurs de cellules souches, chez qui la stimulation érythropoïétique a été poussée à l'extrême par de hautes doses de rHuEPO et des phlébotomies répétées, %HYPO s'élevait de manière très importante jusqu'à des valeurs de 40%. Cette élévation était présente malgré une supplémentation martiale adéquate, comme en témoignent les courbes superposables de fer prélevé et de fer injecté. De plus, l'augmentation de %HYPO débutait plus précocément que la chute de C<sub>HR</sub>. Il ne peut être exclu que le déficit martial participe à ce phénomène mais nous avons démontré que le rôle de la stimulation érythropoïétique était

plus important. Nous avons établi une corrélation entre la production érythrocytaire et l'apparition de nouveaux globules rouges hypochromes, confirmant cette hypothèse.

L'activité érythropoïétique induite par le traitement de l'anémie rénale est, cependant, nettement moins importante que dans la situation précédente. Dans la population de patients dialysés, nous avons montré une augmentation moindre de %HYPO en réponse à l'introduction de rHuEPO malgré une supplémentation martiale adéquate (CHr constant). Cette augmentation était due à l'apparition d'une population érythrocytaire plus jeune avec un volume cellulaire plus grand et un contenu en hémoglobine normal, résultant en une diminution artificielle de la concentration en hémoglobine.

Grâce à la technologie des nouveaux compteurs cellulaires, les indices cellulaires peuvent être déterminés séparément dans les populations réticulocytaires et érythrocytaires matures. L'étude des paramètres des érythrocytes matures semblait pouvoir répondre aux biais causés par l'activité érythropoïétique. Nous en avons donc déterminé les valeurs de référence. La comparaison entre les indices réticulocytaires et ceux des globules rouges matures montrent que les réticulocytes sont 20% plus grands avec une concentration en hémoglobine 10% inférieure aux érythrocytes matures. Ces différences expliquent les biais qui peuvent être rencontrés dans l'interprétation des paramètres de routine. Par l'étude de diverses pathologies hématologiques, nous avons pu valider l'interprétation de ces paramètres. Dans l'anémie hémolytique autoimmune, dans laquelle l'activité érythropoïétique est importante sans déficit martiale, l'interprétation des paramètres de routine menait à penser à un statut ferriprive alors que les paramètres des érythrocytes matures montraient une anémie plutôt macrocytaire et hyperchrome. Dans l'anémie ferriprive %HYPO et %HYPOm augmentaient de façon superposable en raison de la faible réticulocytose. De manière générale, toutes les pathologies étudiées, dans lesquelles la réticulocytose est normale ou basse, présentent les mêmes caractéristiques pour les indices des érythrocytes matures que pour les paramètres déterminés sur la population érythroïde globale. L'étude de corrélations a également montré que %HYPO était corrélé avec la réticulocytose mais pas avec le fer sérique, alors que %HYPOm était corrélé avec le fer sérique mais pas avec la réticulocytose. Ce paramètre rencontrait donc le but que nous recherchions.

La détermination de la sensibilité et de la spécificité des indices globulaires matures dans la prédition de la réponse à une charge martiale plaide en faveur de l'utilisation de %HYPOm

dans ce but. Le fait que les patients inclus dans cette étude soient dans la phase de maintenance du traitement par rHuEPO fait que les différences entre les paramètres de routine et les paramètres des érythrocytes matures sont peu importantes et non significatives. Une étude dans la phase d'induction du traitement par rHuEPO pourrait augmenter la différence entre ces paramètres. Une telle étude est toutefois difficile à réaliser car les critères de réponse à la charge martiale devraient être établis différemment. Pour confirmer l'intérêt de ces paramètres dans le monitoring martial des patients dialysés traités par rHuEPO, une étude pharmaco-économique comparant les coûts du traitement par rHuEPO et des doses de fer administrées soit en fonction des directives internationales soit en fonction de %HYPOm pourrait être réalisée. Cependant, un nombre important de patients devraient être inclus pour que les résultats soient significatifs.

En conclusion, ce travail confirme la nécessité, même dans une population considérée comme saine, d'un apport extérieur de fer lors de la stimulation érythropoïétique par érythropoïétine humaine recombinante, étant donné la mobilisation trop lente du fer de réserve. Dans cette situation, l'absorption digestive de fer est régulable et l'activité érythropoïétique semble être un stimulateur au moins aussi puissant que la déplétion martiale pour l'absorption intestinale de fer. La ferritine, habituellement utilisée dans le monitoring des réserves de fer, est un paramètre médiocre dans l'anémie rénale traitée par rHuEPO. En effet, en plus de l'effet bien connu de l'inflammation sur ce marqueur, nous avons montré que l'administration intraveineuse de fer entraîne une production de ferritine sérique inadéquate, probablement en réponse à l'augmentation du pool labile de fer. Ce phénomène semble plus important que l'effet de la diminution de ce pool labile en réponse à la stimulation érythropoïétique. La mesure de la ferritine surestime donc le fer de réserve dans l'anémie rénale traitée par rHuEPO et fer intraveineux. Le pourcentage de globules rouges hypochromes est un paramètre sensible et spécifique du déficit martial fonctionnel. Toutefois, nous avons démontré l'influence de l'inflammation et de l'activité érythropoïétique sur ce paramètre, pouvant biaiser son interprétation, pour le moins dans la phase de correction de l'anémie, quand une réticulocytose élevée cohabite avec un nombre d'érythrocytes matures faible. Les paramètres des érythrocytes matures ont été démontrés comme plus fiables pour l'interprétation des données dans diverses pathologies hématologiques. Ils présentent l'avantage d'exclure, au moins en grande partie, les biais entraînés par une réticulocytose élevée. La sensibilité et la spécificité de %HYPOm dans la prédiction de la réponse à une supplémentation martiale étaient supérieures à celles des autres paramètres habituellement

utilisés, mais cette différence n'était pas significative en raison de la stabilité des patients étudiés. Son intérêt en clinique quotidienne reste à démontrer.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Eschbach JW, Adamson JW. Anemia of end-stage-renal disease (ESRD). *Kidney Int* 1985;28:1-5.
2. Eschbach JW. The anemia of chronic renal failure: Pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin. *Kidney Int* 1989;35:134-148.
3. Eschbach JW, Funk DD, Adamson J et al. Erythropoiesis in patients with renal failure undergoing chronic hemodialysis. *N Engl J Med* 1967;276:653-658.
4. Adamson JW, Eschbach JW. Management of the anaemia of chronic renal failure with recombinant erythropoietin. *Q J Med New Series* 1989;73:1093-1101.
5. Potasman I, Better OS. The role of secondary hyperparathyroidism in the anemia of chronic renal failure. *Nephron* 1983;33:229-231.
6. Kaiser L, Schwartz KA. Aluminium-induced anemia. *Am J Kidney Dis* 1985;6:348-352.
7. Hampers CL, Streiff R, Nathan DG et al. Megaloblastic erythropoiesis in uremia and in patients on long-term hemodialysis. *N Engl J Med* 1967;276:551-554.
8. Horina JH, Schwaberger G, Brussee H et al. Increased red cell 2,3-diphosphoglycerate levels in haemodialysis patients treated with erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8:1219-1222.
9. Robertson HT, Haley NR, Guthrie M et al. Recombinant erythropoietin improves exercise capacity in anemic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1990;15:325-332.
10. Braumann KM, Nonnast-Daniel B, Boning D et al. Improved physical performance after treatment of renal anemia with recombinant human erythropoietin. *Nephron* 1991;58:129-134.
11. Teehan B, Sigler MH, Brown JM et al. Hematologic and physiologic studies during correction of anemia with recombinant human erythropoietin in predialysis patients. *Transplant Proc* 1989;212:63-66.
12. Mayer G, Thum J, Cada EM et al. Working capacity is increased following recombinant human erythropoietin treatment. *Kidney Int* 1988;34:525-528.
13. Foley RN, Parfrey PS, Morgan J et al. Effect of haemoglobin levels in haemodialysis patients with asymptomatic cardiomyopathy. *Kidney Int* 2000;58:1325-1335.
14. Wizemann V, Kaufmann J, Kramer W. Effect of erythropoietin on ischemia tolerance in anemic hemodialysis patients with left-ventricular hypertrophy. *Nephron* 1993;64: 202-206.
15. Harnett JD, Foley RN, Kent GM et al. Congestive heart failure in hemodialysis patients: Prevalence, incidence, prognosis and risk factors. *Kidney Int* 1995;47:884-890.
16. Wizemann V, Kaufmann J, Kramer W. Effect of erythropoietin on ischemia tolerance in anemic hemodialysis patients with confirmed coronary artery disease. *Nephron* 1992;62:161-165.
17. Canella G, La Canna G, Sandrini M et al. Renormalization of high cardiac output and of left-ventricular size following long-term recombinant human erythropoietin treatment of anemic dialyzed uremic patients. *Clin Nephrol* 1990;34:272-278.

18. Macdougall IC, Lewis NP, Saunders MJ et al. Long-term cardio-respiratory effects of amelioration of renal anaemia by erythropoietin. *Lancet* 1990;335:489-493.
19. Pascual J, Teruel JL, Moya JL et al. Regression of left-ventricular hypertrophy after partial correction of anemia with erythropoietin in patients on hemodialysis: a prospective study. *Clin Nephrol* 1991;35:280-287.
20. Wolcott DL, Marsh JT, La Rue A et al. Recombinant human erythropoietin may improve quality of life and cognitive function in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1989;14:478-485.
21. Gafter U, Kalechman Y, Orlin JB et al. Anemia of uremia is associated with reduced in vitro cytokine secretion: Immunopotentiating activity of red blood cells. *Kidney Int* 1994;45:224-231.
22. Vanholder R, Van Biesen W, Ringoir S et al. Contributing factors to the inhibition of phagocytosis in hemodialyzed patients. *Kidney Int* 1993;44:208-214.
23. Scigalla P, Bonzel KE, Bulla M et al. Therapy of renal anemia with recombinant human erythropoietin in children with end-stage renal disease. *Contrib Nephrol* 1989;76:227-241.
24. Evans RW, Rader B, Manninen DL et al. Cooperative Multicenter EPO Clinical Trial Group: The quality of life of hemodialysis recipients treated with recombinant human erythropoietin. *JAMA* 1990;263:825-830.
25. Xue JL, St Peter WL, Ebben JP et al. Anemia treatment in the pre-ESRD period and associated mortality in elderly patients. *Am J Kidney Dis* 2002;40:1153-1161.
26. Levin A, Thompson CR, Ethier et al. Left ventricular mass index increase in early renal disease : Impact of decline hemoglobin. *Am J Kidney Dis* 1999;34:125-134.
27. Locatelli F, Aljama P, Barany P, et al. Revised European best practice directives for the management of anaemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19 (Suppl 2): ii1-47.
28. NKF-K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Anemia of Chronic Kidney Disease: update 2000. *Am J Kidney Dis* 2001;37 (Suppl 1):s182-s238.
29. Silverberg J, Racine N, Barre P et al. Regression of left-ventricular hypertrophy in dialysis patients following correction of anemia with recombinant human erythropoietin. *Can J Cardiol* 1990;6:1-4.
30. Low-Friedrich I, Grutzmacher P, Marz W et al. Long-term echocardiographic examination in chronic hemodialysis patients substituted with recombinant human erythropoietin. *Blood Purif* 1990;8:272-278.
31. Hayashi T, Suzuki A, Shoji T et al. Cardiovascular effects of normalizing the hematocrit level during erythropoietin therapy in predialysis patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 2000;35:250-256.

32. Fellner SK, Lang RM, Neumann et al. Cardiovascular consequences of correction of the anemia of renal failure with erythropoietin. *Kidney Int* 1993;44:1309-1315.
33. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD et al. The impact of anemia on cardiomyopathy, morbidity, and mortality in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 1996;28:53-61.
34. Portoles J, Torralbo A, Martin P et al. Regression of left ventricular hypertrophy after partial correction of anemia with erythropoietin in patients on hemodialysis: a prospective study. *Clin Nephrol* 1991;35:280-287.
35. London GM, Pannier B, Guerin AP et al. Alterations of left ventricular hypertrophy in and survival of patients receiving hemodialysis : follow-up of an interventional study. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2759-2767.
36. Keown PA. Quality of life in end-stage renal disease patients during recombinant erythropoietin therapy. The Canadian erythropoietin study. *Contrib Nephrol* 1991;88:81-86.
37. McMahon LP, Mason K, Skinner SL et al. Effects of haemoglobin normalization on quality of life and cardiovascular parameters in end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1425-1430.
38. McMahon LP. Advances in anemia management: current evidence. *Nephrology* 2002;7:257-261.
39. Xia H, Ebben J, Ma JZ et al. Hematocrit levels and hospitalization risks in hemodialysis patients . *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1309-1316.
40. Locatelli F, Conte F, Marcelli D. The impact of haematocrit levels and erythropoietin treatment on overall and cardiovascular mortality and morbidity – the experience of the Lombardy dialysis registry. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:1642-1644.
41. Locatelli F, Pisoni RL, Combe C et al. Anaemia in five European countries and associated morbidity and mortality among haemodialysis patients : results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:121-132.
42. Moreno F, Sane-Guajardo D, Lopez-Gomez JM et al. Increasing the hematocrit has a beneficial effect on quality of life and is safe in selected hemodialysis patients. Spanish Cooperative Renal Patients Quality of Life Study Group of the Spanish Society of Nephrology. *J AM Soc Nephrol* 2000;11:335-342.
43. Silverberg DS, Wexler D, Blum M et al. The effect of correction of anaemia in diabetics and non-diabetics with severe resistant congestive heart failure and chronic renal failure by subcutaneous erythropoietin and intravenous iron. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:141-146.
44. Furuland H, Linde T, Ahlmen J et al. A randomized controlled trial of haemoglobin normalization with epoietin alfa in pre-dialysis and dialysis patients. *Nephrol dial Transplant* 2003;28:353-361.

45. Eschbach JW, Glenny R, Robertson T et al. Normalizing the hematocrit (HCT) in hemodialysis patients (HDP) with EPO improves quality of life (Q/L) and is safe [abstract]. *J AM Soc Nephrol* 1993;4:425.
46. Suzuki M, Tsutsui M, Yokohama A et al. Normalization of hemetocrit with recombinant human erythropoietin in chronic hemodialysis patients does not fully improve their exercise tolerance abilities. *Artif Organs* 1995;19:1258-1261.
47. Pickett JL, Theberge DC, Brown WS et al. Normalizing hematocrit in dialysis patients improves brain function. *Am J Kidney Dis* 1993;33:1122-1130.
48. Silverberg JS, Barre PE, Prichard SS et al. Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease. *Kidney Int* 1989;36:286-290.
49. Ma JZ, Ebben J, Xia H et al. Hematocrit level and associated mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:610-619.
50. Collins AJ. Influence of target hemoglobin in dialysis patients on morbidity and mortality. *Kidney Int* 2002;61 (Suppl 80):S44-S48.
51. Krantz SB. Pathogenesis and treatment of the anemia of chronic disease. *Am J Med Sci* 1994;307:353-359.
52. Pereira BJ. Balance between pro-inflammatory cytokines and their specific inhibitors in patients on dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:27-32.
53. Rao DS, Shih MS, Mohini R. Effect of serum parathyroid hormone and bone marrow fibrosis on the response to erythropoietin in uremia. *N Engl J Med* 1993;328:171-175.
54. Grützmacher P, Ehmer B, Limbach J et al. Treatment with recombinant human erythropoietin in patients with aluminium overload and hyperparathyroidism. *Blood Purif* 1990;8:279-284.
55. Muirhead N, Hodzman AB, Hollomby DJ et al. The role of aluminium and parathyroid hormone in erythropoietin resistance in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1991;6:342-345.
56. Goicoechea M, Gomez-Campdera F, Polo JR et al. Secondary hyperparathyroidism as a cause of resistance to treatment with erythropoietin: effect of parathyroidectomy. *Clin nephrol* 1996;45:420-421.
57. Rosenlof K, Fyhrquist F, Tenhunen R. Erythropoietin, aluminium, and anemia in patients on hemodialysis. *Lancet* 1990;335:247-249.
58. Grützmacher P, Ehmer B, Messinger D et al. Effect of aluminium overload on the bone marrow response to recombinant erythropoietin. *Contrib Nephrol* 1989;76:315-321.
59. Tomson CR, Edmunds ME, Chambers K et al. Effects of recombinant human erythropoietin on erythropoiesis in homozygous sickle-cell anemia and renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1992;7:817-821.

60. Steinberg MH. Erythropoietin for anemia of renal failure in sickle-cell disease. *N Engl J Med* 1991;324:1369-1370.
61. Roger SD, Macdougall IC, Thuraisingham RC et al. Erythropoietin in anemia of renal failure in sickle cell disease. *N Engl J Med* 1991;325:1175-1176.
62. Cheng IK, Lu HB, Wei DC et al. Influence of thalassemia on the response to recombinant human erythropoietin in dialysis patients. *Am J Nephrol* 1993;13:142-148.
63. Macdougall IC, Coles GA, Williams JD. Inhibition of a response to r-HuEPO in the presence of infection or malignancy. *Erythropoiesis* 1992;3:29-30.
64. Abels RI. Use of recombinant human erythropoietin in the treatment of anemia in patients who have cancer. *Semin Oncol* 1992;19:29-35.
65. Madour F, Bridges K, Brugnara NL et al. A population study of the interplay between iron, nutrition, and inflammation in erythropoiesis in hemodialysis patients [abstract]. *J AM Soc Nephrol* 1996;7:1456.
66. Siimes MA, Ronnholm KAR, Antikainen M et al. Factors limiting the erythropoietin response in rapidly growing infants with congenital nephrosis on a peritoneal dialysis regimen after nephrectomy. *J Pediatr* 1992;120:44-48.
67. Evers J. Cardiac hemolysis and anemia refractory to erythropoietin: on anemia in dialysis patients. *Nephron* 1995;71:108.
68. Hess E, Sperschneider H, Stein G. Do ACE inhibitors influence the dose of human recombinant erythropoietin in dialysis patients? *Nephrol Dial Transplant* 1997;11:749-751.
69. Dhondt AW, Vanholder RC, Ringoir SMG: Angiotensin-converting enzyme inhibitors and higher erythropoietin requirements in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:2107-2109.
70. Casadevall N, Nataf J, Viron B et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 2002;346:469-475.
71. Kooistra MP, Marx JJ. The absorption of iron is disturbed in recombinant human erythropoietin-treated peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2578-2582.
72. Kooistra MP, Niemantsverdriet EC, van Es A et al. Iron absorption in erythropoietin-treated haemodialysis patients: effects of iron availability, inflammation and aluminium. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:82-88.
73. Deira J, Martin M, Sanchez S et al. Evaluation of intestinal iron absorption by indirect methods in patients on hemodialysis receiving oral iron and recombinant human erythropoietin. *Am J Kidney Dis* 2002;39:594-599.

74. Milman N. Iron absorption measured by whole body counting and the relation to marrow iron stores in chronic uremia. *Clin Nephrol* 1982;17:77-81.
75. Skikne BS, Cook JD. Effect of enhanced erythropoiesis on iron absorption. *J Lab Clin Med* 1992;120:746-751.
76. Macdougall IC, Tucker B, Thompson J et al. A randomized controlled study of iron supplementation in patients treated with erythropoietin. *Kidney Int* 1996;50:1694-1699.
77. Fishbane S, Lynn RI. The efficacy of iron dextran for the treatment of iron deficiency in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1995;44:238-240.
78. Nissenson AR, Lindsay RM, Swan S et al. Sodium ferric gluconate complex in sucrose is safe and effective in hemodialysis patients: North American Clinical Trail. *Am J Kidney Dis* 1999;33:471-482.
79. Silverberg DS, Iaina A, Peer G et al. Intravenous iron supplementation for the treatment of the anemia of moderate to severe chronic renal failure patients not receiving dialysis. *Am J Kidney Dis* 1996;27:234-238.
80. Silverberg DS, Blum M, Peer G et al. Intravenous ferric saccharate as an iron supplement in dialysis patients. *Nephron* 1996;72:413-417.
81. Fishbane S, Frei GL, Maesaka J. Reduction in recombinant human erythropoietin doses by the use of chronic intravenous iron supplementation. *Am J Kidney Dis* 1995;26:41-46.
82. Taylor JE, Peat N, Porter C et al. Regular, low-dose intravenous iron therapy improves response to erythropoietin in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1079-1083.
83. Sepandj F, Jindal K, West M et al. Economic appraisal of maintenance parenteral iron administration in treatment of the anaemia in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:319-322.
84. Fishbane S, Ungureanu V, Maesaka JK et al. Safety of intravenous iron dextran in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996;28:529-534.
85. Sunder-Plassmann G, Horl WH. Safety of intravenous injection of iron saccharate in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1797-1802.
86. Zanen AL, Adriaansen HJ, van Bommel EF et al. "Oversaturation" of ttransferrin after intravenous ferric gluconate (Ferrlecit<sup>®</sup>) in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:820-824.
87. Seifert A, von Herrath D, Schaeffer K. Iron overload, but not treatment with desferrioxamine favours the development of septicemia in patients on maintenance hemodialysis. *Q J Med* 1987;65:1015-1024.
88. Hoen B, Kessler M, Hestin D et al. Risk factors for bacterial infections in chronic haemodialysis adult patients: A multicenter prospective survey. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:377-381.

89. Cantinieaux BF, Boelaert J, Hariga CF et al. Impaired neutrophil defense against *Yersinia enterocolytica* in patients with iron overload who are undergoing dialysis. *J Clin Lab Med* 1988;111:524-528.
90. Flament J, Goldman M, Waterlot Y et al. Impairment of phagocyte oxidative metabolism in hemodialyzed patients with iron overload. *Clin Nephrol* 1986;25:227-230.
91. Waterlot Y, Cantinieaux BF, Harriga-Muller C et al. Impaired phagocytic activity of neutrophils in patients receiving hemodialysis: The critical role of iron overload [anstract]. *BMJ* 1985;291:501.
92. Boelaert JR, Cantinieaux BF, Harriga CF et al. Recombinant erythropoietin reverses polymorphonuclear granulocyte dysfunction in iron-overloaded dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1990;5:504-507.
93. Ali M, Fayemi AO, Rigolosi R et al. Hemosiderosis in hemodialysis patients. An autopsy study of 50 cases. *JAMA* 1980;244:343-345.
94. Deicher R, Horl WH. New insights into the regulation of iron homeostasis. *Eur J Clin Invest* 2006;36:301-309.
95. Flemming MD, Trenor Cc, Su MA et al. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 1997;16:383-386.
96. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997;338:482-488.
97. Chen H, Su T, Attieh ZK et al. Systemic regulation of Hephaestin and Ireg1 revealed in studies of genetic and nutritional iron deficiency. *Blood* 2003;102:1893-1899.
98. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM et al. A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut* 2003;52:340-346.
99. Frazer DM, Anderson GJ. Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G631-G635.
100. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2000;275:19906-19912.
101. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron transporter. *Nature* 2000;403:776-781.
102. McKie AT, Marciani P, Rolfs A et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 2000;5:299-309.
103. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL et al. The iron exporter ferroportin/S1c40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab* 2005;1:191-200.

104. Canonne-Hergaux F, Donovan A, Delaby C et al. Comparative studies of duodenal and macrophage ferroportin proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G156-G163.
105. Anderson GJ, Frazer DM. Recent advances in intestinal iron transport. *Curr Gastroenterol Rep* 2005;7:365-372.
106. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-554.
107. Poss KD, Tonegawa S. The heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;95:10919-10924.
108. Jabado N, Canonne-hergaux F, Gruenheid S et al. Iron transporter Nramp2/DMT-1 is associated with the membrane of phagosomes in macrophages and Sertoli cells. *Blood* 2002;100:2617-2622.
109. Gruenheid S, Canonne-hergaux F, Gauthier S et al. The iron transport protein Nramp2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J Exp Med* 1999;189:831-841.
110. Fleming MD, Romano MA, Su MA et al. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1148-1153.
111. Knutson MD, Vafa MR, Haile DJ et al. Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood* 2003;102:4191-4197.
112. Knutson MD, Oukka M, Koss LM et al. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:1324-1328.
113. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is over-expressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276:7811-7819.
114. Fleming RE, Bacon BR. Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med* 2005;352:1741-1744.
115. Ahmad KA, Ahmann JR, Migas MC et al. Decreased liver hepcidin expression in the Hfe knockout mice. *Blood Cell Mol Dis* 2002;29:361-366.
116. Mazur A, Feillet-Coudray C, Romier B et al. Dietary iron regulates hepatic hepcidin 1 and 2 mRNAs in mice. *Metabolism* 2003;52:1229-1231.
117. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037-1044.

118. Nemeth E, Valore EV, Territo M et al. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003;101:2461-2463
119. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM et al. Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporter and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 2002;123:835-844.
120. Ganz T. Hepcidin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol* 2004;11:251-254.
121. Roy CN, Andrews NC. Anemia of inflammation: the hepcidin link. *Curr Opin Hematol* 2005;12:107-111.
122. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing internalization. *Science* 2004;306:2090-2093.
123. de Jong G, von Dijk IP, van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta* 1990;190:1-46.
124. Huebers H, Bauer W, Huebers E et al. The behavior of transferrin iron in the rat. *Blood* 1981;57:218-228.
125. Huebers H, Csiba E, Huebers E et al. Competitive advantage of diferric transferrin in delivering iron to reticulocytes *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:300-304.
126. Huebers H, Csiba E, Josephson B et al. Interaction of human diferre transferrin with reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:621-625.
127. Klausner RD, Ashwell G, Van Renswonde J et al. Binding of apotransferrin to K562 cells: Explanation of the transferrin cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2263-2266.
128. Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2258-2262.
129. Bridges KR, Cudkowicz A. Effect of iron chelators on the transferrin receptor in K562 cells. *J Biol Chem* 1984;259:12970-12977.
130. Kaltwasser JP, Gottshalk R. Erythropoietin and iron. *Kidney Int* 1999;55 (Suppl 69):S49-S54.
131. Rao KK, Shapiro D, Mattia E et al. Effects of alterations in cellular iron on biosynthesis of the transferrin receptor in K562 cells. *Mol Cell Biol* 1985;5:595-600.
132. Huebers HA, Beguin Y, Pootraku P et al. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* 1990;75:102-107.
133. Cazzola M, Beguin Y. New tools for the clinical evaluation of erythron function in man. *Brit j Haematol* 1992;80:278-284.
134. Punnonen K, Irajala K, Rajamaki A. Iron deficiency anaemia is associated with high concentration of transferrin receptor in serum. *Clin Chem* 1994;40:774-776.

135. Thorstensen K, Romslo I. The transferrin receptor: its diagnostic value and its potential as therapeutic target. *Scand J Clin Lab Invest* 1993;53 (Suppl 215):113-120.
136. Hershko C, Cook JD, Finch CA. Storage iron kinetics. II. The uptake of hemoglobin iron by hepatic parenchymal cells. *J Lab Clin Med* 1972;80:624-634.
137. Epsztejn S, Kakhlon O, Glickstein H et al. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal Biochem* 1997;248:31-40.
138. Roy CN, Blemings KP, Deck KM et al. Increased IRP-1 and IRP-2 RNA binding activity accompanies a reduction of the labile iron pool in HFE-expressing cells. *J Cell Physiol* 2002;190:218-226.
139. Aziz N, Munro HN. Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8478-8482.
140. Kim S, Wing SS, Ponka P. S-nitrosylation of IRP-2 regulates its stability via the ubiquitin-preteasome pathway. *Mol Cell Biol* 2004;24:330-337.
141. Rogers JT. Ferritin translation by interleukin-1 and interleukin-6: the role of sequences upstream of the start codons of the heavy and light subunit genes. *Blood* 1996;87:2525-2537.
142. Rouault TA, Klausner R. Regulation of iron metabolism in eukaryotes. *Curr Top Cell Regul* 1997;35:1-19.
143. Eisenstein R, Blemings KP. Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. *J Nutr* 1998;128:2295-2298.
144. Haile DJ. Regulation of genes of iron metabolism by the iron-response proteins. *Am J Med Sci* 1999;318:230-240.
145. Li JY, Ram G, Gast K et al. Detection of intracellular iron by its regulatory effect. *Am J PhysiolCell Physiol* 2004;287:C1547-C1559.
146. LaVaute T, Smith S, Cooperman S et al. Targeted deletion of the gene encoding iron regulatory protein-2 causes misregulation of iron metabolism and neurodegenerative disease in mice. *Nat Genet* 2001;27:209-214.
147. Leibold EA, Munro HN. Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2171-2175.
148. Rouault TA, Hentze MW, Caughman SW et al. Binding a cytosolic protein to the iron-responsive element of human ferritin messenger RNA. *Science* 1988;241:1207-1210.
149. Alcantara O, Denham CA, Phillips JL et al. Transcriptional regulation of transferrin receptor expression by cultured lymphoblastoid T cells treated with phorbol diesters. *J Immunol* 1989;142:1719-1726.

150. Busfield SJ, Tilbrook PA, Callus BA et al. Complex regulation of transferrin receptors during erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells – elevated transcription and mRNA stabilisation produce only modest rise in protein content. *Eur J Biochem* 1997;240:77-84.
151. Chan RY, Seiser C, Schulman HM et al. Regulation of transferrin receptor mRNA expression. Distinct regulatory features in erythroid cells. *Eur J Biochem* 1994;220:683-692.
152. Festa M, Ricciardelli G, Mele G et al. Overexpression of H ferritin and up-regulation of iron regulatory protein genes during differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes. *J Biol Chem* 2000;275:36708-36712.
153. Lok CN, Chan KF, Loh TT. Transcriptional regulation of transferrin receptor expression during phorbol-ester-induced HL-60 cell differentiation. Evidence for a negative regulatory role of the phorbol-ester-responsive element-like sequence. *Eur J Bioch* 1996;236:614-619.
154. Marziali G, Perrotti E, Ilari R et al. Role of Ets-1 in transcriptional regulation of transferrin receptor and erythroid differentiation. *Oncogene* 2002;21:7933-7944.
155. Seiser C, Teixeira S, Kuhn LC. Interleukin-2-dependent transcriptional and post-transcriptional regulation of transferrin receptor mRNA. *J Biol Chem* 1993;268:13074-13080.
156. Testa U, Kuhn L, Petrini M et al. Differential regulation of iron regulatory element-binding protein(s) in cell extracts of activated lymphocytes versus monocytes-macrophages. *J Biol Chem* 1991;266:13925-13930.
157. Rivera S, Nemeth E, Gabayan V et al. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood* 2005;106:2196-2199.
158. Shike H, Lauth X, Westerman ME et al. Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem* 2002;269:2232-2237.
159. Peterson T, Kivivuori SM, Siimes MA. Is serum transferrin receptor useful for detecting iron deficiency in anaemic patients with chronic inflammatory diseases? *Brit J Haematol* 1994;33:740-744.
160. Skikne BS. Circulating transferrin receptor assay-coming of age. *Clin Chem* 1998;44:45-51.
161. Fernandez-Rodriguez AM, Guindeo-Casasus MC, Molero-Labarta T et al. Diagnosis of iron deficiency in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1999;34:508-513.
162. Cook JD, Skikne BS, Lynch SR et al. Estimates of iron sufficiency in the US population. *Blood* 1986;68:726-731.
163. van Zebben D, Bieger R, van Wermeskerken RK et al. Evaluation of microcytosis using serum ferritin and red blood cell distribution width. *Eur J haematol* 1990;44:105-108.
164. Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Engl J Med* 1974;290:1213-1216.

165. Aljama P, Ward MK, Pierides AM et al. Serum ferritin concentration: A reliable guide to iron overload in uremic and hemodialyzed patients. *Clin Nephrol* 1978;10:101-104.
166. Kalantar-Zadeh K, Hoffken B, Wunsch H et al. Diagnosis of iron deficiency anemia in renal failure patients during the post-erythropoietin era. *Am J Kidney Dis* 1995;26:292-299.
167. Fishbane S, Kowalski EA, Imbriano LJ et al. The evaluation of iron status in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2654-2657.
168. Tarny DC, Chen TW, Huang TP. Iron metabolism indices for early detection of the response and resistance to erythropoietin therapy in maintenance hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 1995;15:230-237.
169. Bell JD, Kincaid WR, Morgan RJ et al. Serum ferritin assay and bone-marrow iron stores in patients on maintenance hemodialysis. *Kidney Int* 1980;17:237-241.
170. Witte DL. Can serum ferritin be effectively interpreted in the presence of the acute-phase response? *Clin Chem* 1991;37:484-485.
171. Besarab A, Kaiser JW, Frinak S. A study of parenteral iron regimens in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1999;34:21-28.
172. Besarab A. Evaluating iron sufficiency: A clear view. *Kidney Int* 2001;60:2412-2414.
173. Bandhari S, Norfolk D, Brownjohn A et al. Evaluation of RBC ferritin and reticulocyte measurements in monitoring response to intravenous iron therapy. *Am J Kidney Dis* 1997;30:814-821.
174. Bandhari S, Brownjohn AM, Turney JH. Response of mean reticulocyte haemoglobin content to intravenous iron therapy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:3276-3277.
175. Fishbane S, Galgano C, Langley RC et al. Reticulocyte hemoglobin content in the evaluation of iron status of hemodialysis patients. *Kidney Int* 1997;52:217-222.
176. Mittman N, Sreedhara R, Mushnick R et al. Reticulocyte hemoglobin content predicts functional iron deficiency in hemodialysis patients receiving rHuEPO. *Am J Kidney Dis* 1997;30:912-922.
177. Cullen P, Soffker MH, Bremer C et al. Hypochromic red cells and the reticulocyte haemoglobin content as markers of iron-deficient erythropoiesis in patients undergoing chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 199;14:659-665.
178. McDougall IC, Cavill I, Hulme B et al. Detection of functional iron deficiency during erythropoietin treatment: a new approach. *BJM* 1992;304:225-226.
179. Schaeffer M, Schaeffer L. The hypochromic red cell: a new parameter for monitoring of iron supplementation during rHuEPO therapy. *J Perinat Med* 1995;23:83-88.

180. Braun J, Lindner K, Schreiber M et al. Percentage of hypochromic red blood cells as a predictor of erythropoietic and iron response after i.v. iron supplementation in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:1173-1181.
181. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 2002;48:1066-1076.
182. Flowers CH, Skikne BS, Covell AM et al. The clinical measurement of serum transferrin receptor. *J Lab Clin Med* 1989;114:368-377.
183. Junca J, Fernandez-Aviles F, Oriol A et al. The usefulness of the serum transferrin receptor in detecting iron deficiency in the anemia of chronic disorder. *Haematologica* 1998;83:676-680.
184. Beguin Y, Loo M, R'Zik S et al. Early prediction of response to recombinant human erythropoietin in patients with the anemia of renal failure by serum transferrin receptor and fibrinogen. *Blood* 1993;82:2010-2016.
185. de Paoli Vitali E, Ricci G, Perini L et al. The determination of plasma transferrin receptor as good index of erythropoietic activity in renal anemia and after renal transplantation. *Nephron* 1996;72:552-556.
186. Chiang WC, Tsai TJ, Chen YM et al. Serum soluble transferrin receptor reflects erythropoiesis but not iron availability in erythropoietin-treated chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2002;58:363-369.
187. Besarab A, Amin N, Ahsan M et al. Optimization of epoietin therapy with intravenous iron therapy in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2001;11:530-538.
188. Chang CH, Chang CC, Chiang SS. Reduction in erythropoietin doses by the use of chronic intravenous iron supplementation in iron-replete hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2002;57:136-141.
189. Richardson D, Bartlett C, Will EJ. Optimizing erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001;38:109-117.
190. Tessitore N, Solero GP, Lippi G et al. The role of iron status markers in predicting response to intravenous iron in haemodialysis patients on maintenance erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1416-1423.
191. Goodnough LT. Erythropoietin as a pharmacologic alternative to blood transfusion in the surgical patient. *Transfus Med Rev* 1990;4:288-296.
192. Mintz PD. Autologous transfusion endorsed. *JAMA* 1985;254:507-508.
193. Toy PTCY, Strauss RG, Stehling, et al. Predeposited autologous blood for elective surgery: A national multicenter study. *N Engl J Med* 1987; 316:517-520.

194. Goodnough LT, Price TH, Rudnik S. Iron-restricted erythropoiesis as a limitation to autologous blood donation in the erythropoietin-stimulated bone marrow. *J Lab Clin Med* 1991;118:289-296.
195. Goodnough LT, Skikne B, Brugnara C. Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. *Blood* 2000; 96: 823-833.
196. Cavill I. Erythropoiesis and iron. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15: 399-409.
197. Goodnough LT, Brittenham GM. Limitations of the erythropoietin response to serial phlebotomy: Implications for autologous blood donor program. *J Lab Clin Med* 1990;115:28-35.
198. Crosby WH. Treatment of haemochromatosis with energetic phlebotomy. One patient's response to letting of 55 litres of blood in 11 months. *British Journal of Haematology* 1958;4:82-88.
199. Sautois B, Baudoux E, Salmon JP et al. Administration of erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor in donor/recipient pairs to collect peripheral blood progenitor cell (PBPC) and red blood cell units for use in the recipient after allogeneic PBPC transplantation. *Haematologica* 2001;86:1209-1218.
200. Weisbach V, Skoda P, Rippel R, et al. Oral or intravenous iron as adjuvant to autologous blood donation in elective surgery: a randomized, controlled study. *Transfusion* 1999;39:465-472.
201. Adamson JW. The erythropoietin/hematocrit relationship in normal and polycythemic man: Implications of marrow regulation. *Blood* 1968;32:597-609.
202. Barosi G. Inadequate erythropoietin response to anemia: definition and clinical relevance. *Ann Hematol* 1994; 68: 215-223.
203. Goodnough LT, Bravo J, Hsueh Y et al. Red blood cell volume in autologous and allogeneic blood units: Implications for risk/benefit assessment for autologous blood "crossover" and directed blood transfusion. *Transfusion* 1989;29:821-822.
204. Laupacis A, Fergusson D. Erythropoietin to minimize perioperative blood transfusion: A systemic review of randomized trials. The International Study of Peri-operative Transfusion (ISPOT) Investigators. *Transfus Med* 1998;8:309-317.
205. Goodnough LT, Rudnik S, Price TH, et al. Increased preoperative collection of autologous blood with recombinant human erythropoietin therapy. *N Engl J Med* 1989;321:1163-1168.
206. Cook JD, Skikne BS, Lynch SR, Reusser ME. Estimates of iron sufficiency in the US population. *Blood* 1986;68:726-731.
207. Holland PV, Schmidt PH, eds. *Standards for blood banks and transfusion services*. 12<sup>th</sup> ed. Arlington, Va.: American Association of Blood Banks, 1987:39.
208. Hayashi J, Shinonaga M, Nakazawa S, et al. Does recombinant human erythropoietin accelerate erythropoiesis for predonation before cardiac surgery? *Jpn Circ J* 1993;57:475-479.

209. Watanabe M, Kituchi K, Kobayashi K, et al. Autologous blood transfusion for pulmonary and mediastinal surgery in 144 patients: The effectiveness of recombinant erythropoietin injection. *Chest* 1994;105:856-859.
210. Goodnough LT, Price TH, Rudnik S. Preoperative red cell production in patients undergoing aggressive autologous blood phlebotomy with and without erythropoietin therapy. *Transfusion* 1992;5:441-445.
211. Biesma DH, Marx JJM, Kraaijenhagen RJ, et al. Lower allogeneic blood requirement in autologous blood donors after treatment with recombinant human erythropoietin. *Lancet* 1994;344:367-370.
212. Rutherford CJ, Schneider TJ, Dempsey H, et al. Efficacy of different dosing regimens for recombinant human erythropoietin in a simulated perisurgical setting: The importance of iron availability in optimizing response. *Am J Med* 1994;96:139-145.
213. Tasaki T, Ohto H, Nogushi M, et al. Iron and erythropoietin measurement in autologous blood donors with anemia: Implication for management. *Transfusion* 1994;34:337-343.
214. Goodnough LT, Marcus RE. Erythropoiesis in patients stimulated with erythropoietin: The relevance of storage iron. *Vox Sang* 1998;75:128-133.
215. Skikne BS, Cook JD. Effect on enhanced erythropoiesis on iron absorption. *J Lab Clin Med* 1992;120:746-751.
216. Baynes RD. Assesment of iron status. *Clin Biochem* 1996;29: 209-215.
217. Cavill I: Diagnostic methods. *Clinics Haematol* 1982;11: 259-273.
218. Macdougall IC, Cavill I, Hulme B et al. Detection of functional iron deficiency during erythropoietin treatment: a new approach. *Br Med J* 1992;304: 225-226.
219. Sunder-Plassman G, Horl WH. Iron metabolism and iron substitution during erythropoietin therapy. *Clin Investig* 1994;72 (Suppl):S11-S15.
220. Schaefer RM, Schaefer L. The hypochromic red cell: a new parameter for monitoring of iron supplementation during rhEPO therapy. *J perinat Med* 1995;23: 83-88.
221. Sunder-Plassman G, Spitzauer S et al. The dilemma of evaluating iron status in dialysis patients- limitation of available diagnostic procedures. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12: 1575-1580.
222. Macdougall IC. Merits of percentage hypochromic red cells as a marker of functional iron deficiency. *Nephrol dial Transplant* 1998;13: 847-849.
223. BasileG, Casino F, Lopez T. Percent reduction in blood urea concentration during dialysis estimates Kt/V in a simple and accurate way. *Am J Kidney Dis* 1990;15:40-45.

224. Means RT, Krantz SB. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood* 1992;80:1639-1647.
225. Rogers, J, Lacroix L, Durmowitz G, et al. The role of cytokines in the regulation of ferritin expression. *Adv Exp Med Biol.* 1994;356:127-32.
226. Tran TN, Eubanks SK, Schaffer KJ et al. Secretion of ferritin by rat hepatoma cells and its regulation by inflammatory cytokines and iron. *Blood* 1997;90:4979-4986.
227. Macdougall IC, Hutton RD, Cavill I et al. Poor response to treatment of renal anaemia with erythropoietin corrected by iron given intravenously. *BMJ* 1989;199:157-158.
228. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR et al. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *N Engl J Med* 1987;316:73-78.
229. Van Wijck DB. Iron management during recombinant human erythropoietin therapy. *Am J Kidney Dis* 1989;14(suppl.1):9-13.
230. Kooistra MP, van Es A, Struyvenberg A et al. Iron metabolism in patients with the anaemia of end-stage renal disease during treatment with recombinant human erythropoietin. *Br J Haematol* 1991;79:634-639.
231. Saltissi D, Sauvage D, Westhuyzen J. Comparative response to single or divided doses of parenteral iron for functional iron deficiency in hemodialysis patients receiving erythropoietin (EPO). *Clin Nephrol* 1998;49:45-48.
232. Beguin Y, Huebers HA, Josephson B et al. Transferrin receptors in rat plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:637-640.
233. Marti HR, Fischer S, Killer D et al. Can automated hematology analysers discriminate thalassemia from iron deficiency. *Acta Haematol* 1987;78:180-183.
234. d'Onofrio G, Zini G, Ricerca BM et al. Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and  $\beta$ -thalassemia trait. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:84-89.
235. Robertson EP, Pollock A, Yauss KS, et al. Use of Technicon H\*1 technology in routine thalassemia screening. *Med Lab Sciences* 1992;49:259-264.
236. Bunyaratvej A, Fucharoen S, Greenbaum A et al. Hydratation of red cells in  $\alpha$  and  $\beta$  thalassemia differs. A useful approach to distinguish between these red cell phenotypes. *Am J Clin Pathol* 1994;102:217-222.
237. Jimenez CV, Minchinel J, Ros J. New indices from the H\*2 analyser improve differentiation between heterozygous  $\beta$  or  $\delta\beta$  thalassemia and iron-deficiency anemia. *Clin Lab Haem* 1995;17:151-155.

238. Bunyaratvej A, Bunyaratvej P. Measurements of cell volume and hemoglobin concentration of erythrocytes from hereditary ovalocytosis and hereditary spherocytosis. *J Med Assoc Thai* 1992;75(suppl 1):248-252.
239. Navarro JF, Macia ML. Hypochromic red cells as an indicator of iron deficiency. *J Rheumatol* 1997;24:804-805.
240. Brugnara C, Kruskall MS, Johnstone RM. Membrane properties of erythrocytes in subject undergoing multiple blood donations with or without recombinant erythropoietin. *Br J Haematol* 1993;84:118-130.
241. McKay PJ, Stott DJ, Holyoake T et al. Use of the erythrogram in the diagnosis of iron deficiency in elderly patients. *Acta Haematol* 1993;89:169-173.
242. Bovy C, Tsobo L, Crapanzano L et al. Factors determining the percentage of hypochromic red blood cells in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999;56:1113-1119.
243. Sautois B, Baudoux E, Salmon JP et al. Administration of erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor in donor/recipient pairs to collect peripheral blood progenitor cells (PBPC) and red blood cell units for use in the recipient after allogeneic PBPC transplantation. *Haematologica* 2001;86:1209-1217.
244. Bovy C, Krzesinski JM, Gothot A et al. Impact of erythropoietic activity on red cell parameters in chronic renal failure patients. *Haematologica* 2004;89:748-749.
245. Paterakis GS, Laoutaris NP, Alexia SV et al. The effect of red cell shape on the measurement of red cell volume. A proposed method for the comparative assessment of this effect among various haematology analysers. *Clin Lab Haematol* 1994;16:235-45.
246. Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta* 2003;329:9-22.
247. Delano BG. Improvement in quality of life following treatment with r-HuEPO in anemic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1989;14:14-18.
248. Grutzmacher P, Scheuermann E, Low I et al. Correction of renal anaemia with recombinant human erythropoietin: Effects on myocardial function. *Contrib Nephrol* 1988;66:176-184.
249. Collins AJ, Ma JZ, Ebbin J. Impact of hematocrit on morbidity and mortality. *Semin Nephrol* 2000;20:345-349.
250. Fletes R, Lazarus JM, Gage J et al. Suspected iron dextran-related adverse drug events in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2001;37:745-749.
251. Ahlmén J, Vaage-Nilsen O. Safety evaluation of iron (Ferlecit®, DexFerrum®, INFeD®) from 21,060,000 doses administered I.V. in the US 1998-2000. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(Suppl 1):133.

252. Teehan GS, Bahdouch D, Ruthazer R et al. Iron storage indices: novel predictors of bacteremia in hemodialysis patients initiating intravenous iron therapy. *Clin Infect Dis* 2004;15:1090-1094.
253. Canziani ME, Yumiya ST, Rangel EB et al. Risk of bacterial infection in patients under intravenous iron therapy: dose versus length of treatment. *Artif Organs* 2001;25:866-869.
254. Zager RA, Johnson ACM, Hanson SY et al. Parenteral iron formulations : A comparative toxicologic analysis and mechanisms of cell injury. *Am J Kidney Dis* 2002;40:90-103.
255. Tovbin D, Mazor D, Vorobiov M et al. Induction of protein oxidation by intravenous iron in hemodialysis patients: role of inflammation. *Am J Kidney Dis* 2002;40:1005-1012.
256. d'Onofrio G, Chirillo R, Zini G et al. Simultaneous measurements of reticulocyte and red blood cell indices in healthy subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia. *Blood* 1995;3:818-823.
257. Collela GM, Fan S, Mohandas N. Changes in cell volume, haemoglobin content, and haemoglobin concentration during maturation of normal human reticulocytes [abstract]. *Blood* 1991;78:407a.
258. Bovy C, Gothot A, Krzesinski JM et al. Mature erythrocyte indices: new markers of iron availability. *Haematologica* 2005;90:549-551.
259. Hörl WH, Dreyling K, Steinhauer HB et al. Iron status of dialysis patients under rhuEPO therapy. *Contrib Nephrol* 1990;87:78-86.
260. Brugnara C, Collela GM, Cremins J et al. Effects of subcutaneous recombinant erythropoietin in normal subjects: Development of decreased reticulocyte hemoglobin content and iron-deficient erythropoiesis. *J Lab Clin Med* 1994;123:660-667.