

THESE

PRESENTEE ET PUBLIQUEMENT SOUTENUE DEVANT LA FACULTE DE
PHARMACIE DE MARSEILLE

LE VENDREDI 26 AVRIL 2019

PAR

Mlle AIM Rebecca

Née le 20 Septembre 1991 à Aix- en –Provence

EN VUE D'OBTENIR

LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE :

PRISE EN CHARGE DES LEUCEMIES AIGUES A L'OFFICINE

ET

ELUCIDATION DES MECANISMES MOLECULAIRES DE RESISTANCES AUX INHIBITEURS DES
BROMODOMAINES DANS LA LEUCEMIE AIGUE MYELOIDE

JURY :

Président : Madame le Professeur **Laurence Camoin-Jau**

Membres : Madame **Sylvie Cointe**, Maitre de conférences

Monsieur **Michel Jourdan**, Docteur en Pharmacie

Sommaire

Remerciements.....	1
RESUMÉ	8
I) <u>Partie I</u>	
A. Introduction : Les Leucémies Aiguës	9
a) Epidémiologie.....	9
b) Clinique.....	10
c) Facteurs de risques.....	11
d) Diagnostic.....	11
e) Classifications	12
f) Bilan pré-thérapeutique.....	13
g) Traitements actuels	14
h) Facteurs pronostics et rechutes	24
i) Prise en charge de la maladie	26
j) Suivi de la maladie	25
B. La prise en charge des effets indésirables de la chimiothérapie à l'officine	28
a) Les produits disponibles en officine	29
1. Nausées et vomissements	29
2. La dénutrition.....	30
3. Les mucites et stomatites	31
4. L'asthénie.....	31
5. L'alopécie.....	32
6. La diarrhée	33
7. Les troubles dermatologiques	34
8. Autres troubles	36
II) <u>Partie II</u>	
A. Bromodomaines et inhibiteurs des bromodomaines	38
B. Objectifs du travail.....	39
C. Résultats.....	40
1. Sélection des lignées cellulaires.....	41
2. Expression génique de <i>BRD4</i> et <i>MYC</i> dans différentes lignées cellulaires de LAM.....	42
3. Analyses transcriptomiques.....	42

4. Rôle de CCL2 combiné à OTX-015 dans différentes lignées cellulaires de LAM46.....	47
5. Combinaison thérapeutique entre OTX-015 et ABT-263.....	50
D. Discussion.....	53
E. Perspectives	56
III) Matériel et méthodes	57
1. Les lignées cellulaires	57
2. Composés	57
3. Méthodes analyses transcriptomiques.....	58
4. RT-PCR quantitative	58
5. Test de cytotoxicité.....	59
6. Analyses statistiques.....	59
IV) Références bibliographiques.....	60

Dédicace

Je dédie cette thèse à ma cousine Claire, qui n'est plus de ce monde, mais qui m'a accompagné dans toutes mes épreuves. Des plus faciles aux plus douloureuses. Je continuerai à vivre pour toi. J'espère te rendre fière si tu regardes. Je t'aime à l'infini. Tu me manques tous les jours de ma vie. Ce n'est jamais une tâche facile d'assumer ton absence ...

Je tiens également à dédier cette thèse à mon grand-père. Merci de m'avoir donné le goût de la santé. Je t'aime mon papy. Merci à Mamie aussi. Je vous aime.

« Quand un point commence à bouger pour devenir une ligne, cela demande du temps. De même quand une ligne devient plan, et que des plans en mouvement produisent des espaces. L'œuvre d'art surgit -elle d'un seul coup ? Non. Elle se construit. »

Paul Klee

« Je ne savais pas trop quoi dire. Je me sentais très maladroit. Je ne savais comment l'atteindre, où le rejoindre. C'est tellement mystérieux le pays des larmes ... »

Le petit prince

« Une des décisions les plus difficiles que tu auras à faire dans ta vie, est de savoir choisir entre abandonner ou de s'obstiner »

Z. Abdelnour

« Alors apprenez à perdre... faites de la boxe et faites-vous tabasser, faites de l'escalade et tombez, passez les ECN et ratez-les !!!! Et surtout ... n'ayez pas peur... »

Anonyme (Interne des Hôpitaux)

Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon Jury, Laurence Camoin et Sylvie Cointe qui ont accepté de prendre en charge cette thèse malgré leur emploi du temps chargé. Merci à Mr. Jourdan qui m'a donné le goût de l'officine, qui m'a appris mes premiers pas au travers du rôle de pharmacien. Merci à Anne-Laure d'avoir relu et corrigé la première partie de ce travail et à Loïc de m'avoir aidé à perfectionner le résumé.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon Papa qui a su se rendre disponible pour moi jour et nuit pendant toutes ces années. Qui m'a aidé à traverser cette longue et, malgré tout le plaisir que j'ai pu avoir au travers de ces études, parfois lourde épreuve.

Papa tu as été mon soutien, mon confident, mon ami, mon Papa à qui tous les remerciements du monde ne seront jamais suffisants. Sache que je suis éternellement reconnaissante de tout ce que tu as fait et fais encore pour moi au quotidien. Je ne serais pas où j'en suis et qui je suis aujourd'hui si tu n'avais pas été là. « Serre les dents... et fonce ! ». J'ai beaucoup de chance d'avoir le Papa que j'ai. Merci à Mymy aussi car on sait que derrière tout homme qui réussit... il y a une femme formidable.

Merci à ma Mommy, qui a su gérer, malgré les milliers de kilomètres qui nous séparaient, sa fille aussi bien que personne n'aurait jamais pu. Sache que sans toi rien de tout cela n'aurait été possible. Merci d'avoir été un modèle à suivre au cours de ma vie. Et merci de m'avoir aidé afin de rendre ce travail (presque) sans fautes ... love you mommy ! Merci à toi Denis d'avoir été présent dans autant de moments dans ma vie. Je suis contente d'avoir une connexion si particulière avec toi.

Ben... I really don't know what I would've done without you. Thank god for time difference... For being available for me whenever I needed. No amount of love will ever be thrown your way to show you how much gratitude I owe you. I love you with all my heart, you're the best brother anyone could ever ask for. I'm so happy you have found Iris by the way, which comforts me in the fact that you can handle yourself on the other side of the Atlantic cause love is given in such fun and sincere way. I hope to find someday the same bond with someone that you guys share. I love you guys so much.

Petite aparté pour mes autres frères ; Dorian et Charles. Qui m'ont vu grandir et qui ont toujours été présent, qui ne m'ont jamais jugé, que je compte parmi mes meilleurs amis et que j'aime terriblement fort.

Merci à mes autres « Mamans » ... Olivia, Myriam, Nathalie, Evelyne ... Qui ont su apporter leur touche maternelle à mon développement personnel. Merci à toutes d'avoir été des femmes brillantes, indépendantes, marrantes, disponibles, et que j'admèrerai éternellement.

Merci au reste de ma famille, Marie d'amour, mon Matt Matt bébé, Papy, Mamie, Renée, Henri, et Franck... Toutes ces belles personnes qui m'ont aimé et qui se sont rendu compte de l'importance, de l'investissement et de la dévotion que j'ai attribué à ces longues années d'études.

A mon autre famille Tonton Fredouille (Merci pour les discussions, ce sont des souvenirs que je garde précieusement au fond de mon cœur... j'ai bien dit cœur), Tatie Valérie, Tatou d'amour, Sasouille.... Merci de m'avoir accepté dans vos cœurs et votre famille. Je vous aime.

Merci à ma sœur Johanna. Rien ni personne ne pourra jamais te remplacer. Tu n'imagines pas tout l'amour que j'éprouve pour toi. Je garderai en souvenir tous ces événements qu'on a créé ensemble en 10ans, nos premières années au lycée, à nos concours réussis... à un bébé Louis que j'aime déjà tant. Merci d'avoir cru en moi et d'être fière de moi. Je suis si heureuse de te compter parmi ma famille. Merci à toi aussi Auré. Je suis si heureuse que ma meilleure amie soit avec quelqu'un d'aussi exceptionnel.

A Julia ... Merci de m'avoir donné le courage de prendre les décisions que j'ai prise. J'ai eu tellement de chance de t'avoir. Tu es pour moi... Tout mon petit monde préféré regroupé en une seule et unique personne. Je t'aime beaucoup trop.

Merci à toi aussi Charlotte de m'avoir épaulé également pendant tant d'années... Je t'aime plus que tout.

Ma Irisson. Je pense que je ne pourrais te remercier suffisamment. Tu es LA personne sur laquelle je sais que je peux compter. Je t'adore à l'infini et au-delà. J'ai énormément de chance de te compter parmi mes amies. Je t'aime je t'aime je t'aime. Un petit bisou à Hugo aussi et Yaya que je n'oublie pas.

Ma Vivi. Merci pour tout. Pour tes conseils, ta disponibilité, ton sourire, ton caractère !!! Tu es une femme d'exception.

Petite pensée pour Aurore ... je ne sais pas où tu es dans le monde mais ... you go girl !!!!
Merci d'avoir cru en moi à votre tour les filles !

Mes copines d'internat. Celia et Mathilde. Je ne sais même pas quoi dire, quoi écrire tellement tout semblerait fade. Sachez que j'ai trouvé en vous un bonheur immense de rencontrer enfin des amies, adultes, qui m'aiment pour qui je suis, qui ne m'ont jamais jugé et qui ont été présente pour moi.

Mes co-internes du NORD-EST !!! Si vous pensiez que j'allais vous oublier ! Jonathan, Laura, Kevin, Amine, Gabriel et Agnès. Merci d'avoir rendu cette épreuve aussi belle que possible. Merci à toi Agnès, je t'admire énormément, et c'est grâce à des gens comme toi qu'aujourd'hui, je suis extrêmement fière d'être pharmacienne.

Aymeric je te vois déjà faire la tête punaise ! Ça suffit oui !!!! Aller vient on va boire une bière et râler sur tous les cotoreps de la terre !! Merci d'avoir été et d'être le meilleur potos que je n'ai jamais eu !!! On se retrouve en Enfer. A plus.

Mon Jerem... Thank you for everything. For telling me to stop being a damn child, a damn fool and start aiming for the stars. I know it's tough love, but I take it well from you. I love you with all my heart don't you ever forget it.

À mes anciens colocs...

Cecile, je t'adore plus que tout. Merci de m'avoir secouru quand il fallait et être à l'écoute quand tu le devais. J'ai été contente d'avoir une grande sœur. Sache-le !!

Celine, tu es un petit être merveilleux. Je suis si heureuse de partager des moments avec toi, et si heureuse de te compter parmi mes amies. J'ai vraiment beaucoup de chance.

Alexis, Pour toutes ces soirées à philosopher sur la terrasses de 2m2... J'ai été contente de partager 6 mois avec toi. Tu m'as rendu très heureuse, et un peu plus intelligente.

Oui oui j'y vient Jojo... !! Je tiens simplement à te remercier de m'avoir aidé pendant une période de transition qui était délicate dans ma vie. Donc Merci ☺. You were such a good « fun » friend ! (Owwwwww !)

Lydie et Yuta. Vous avez été les meilleures rencontres de mon M2 !!! Merci Yuta pour ton visé sans faille au BP, tu m'as au moins servi à cela !

Lydie... j'ai tellement de chance de t'avoir. En si peu de temps tu es devenue ma meilleure amie. Je t'adore ... comme tu es. Et merci de m'avoir accepté dans ton monde. Tu es merveilleuse.

À Clément ... je t'adore depuis et pour toujours. Merci d'être revenu dans ma vie !! On repart quand en voyage pour oublier TES études maintenant ??

Petite pensée pour Jeremy qui m'a soutenu et supporté pendant presque 5ans. J'ai eu beaucoup de chance d'être autant aimé et je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi.

Merci à Max d'avoir renversé son café latté macchiato sur mon ordi 3 jours avant le dépôt de ma thèse, et d'avoir corrigé les (trop nombreuses) fautes d'orthographe de ce travail !

Merci à Marie de m'avoir montré qu'il était encore possible, de nos jours, de rencontrer de belles personnes.

Et ... Merci à toi Alex d'être apparu dans les derniers moments de ce parcours. Je ne m'y attendais pas du tout et cela n'a fait qu'embellir sa finalité. Je suis vraiment heureuse de t'avoir dans ma vie. Je ne t'échangerai pour rien au monde. (Peut-être une caisse à outils... ? Et voilà !! J'ai encore tout gâché !)

Tout cela ... et je pourrais continuer. Je pense qu'à l'heure actuelle très peu de gens peuvent dire qu'ils sont si bien entourés. J'ai tellement de chance... vous n'imaginez pas...

RESUME

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) forment un groupe très hétérogène d'hémopathies malignes dues à la survenue d'anomalies génétiques et épigénétiques. Récemment, des protéines à bromodomaines (BRD) impliquées dans les mécanismes de la dérégulation épigénétique à l'origine des LAM ont pu être caractérisées. Ces découvertes ont rapidement conduit au développement d'inhibiteurs de bromodomaines (iBRD) mais leur efficacité en monothérapie reste modeste et l'apparition de résistances a déjà été identifiée *in vitro*. Ainsi, il apparaît nécessaire d'identifier les mécanismes moléculaires permettant de prédire la réponse à cette nouvelle classe d'agents pharmacologiques dans le cadre des LAM.

J'ai commencé par sélectionner 6 lignées cellulaires de LAM. Afin d'élucider les mécanismes moléculaires de résistance des LAM, la lignée NB4 a servi de modèle de lignée résistante et la lignée MOLM14 de lignée sensible. Des analyses transcriptomiques ont été menées afin d'identifier les gènes dont le niveau de gènes était exprimé de manière statistiquement significative après traitement par un iBRD (OTX-015). Cela m'a permis de déceler des gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux iBRD des lignées cellulaires de LAM. *CCL2*, un gène différentiellement exprimé, a suscité notre intérêt puisqu'il était fortement exprimé dans les lignées résistantes et peu ou pas exprimé dans les lignées sensibles aux iBRD. Cependant les expérimentations réalisées n'ont pas permis de démontrer le rôle joué par celui-ci dans la réponse au traitement. Cependant, nos analyses transcriptomiques ont permis d'identifier qu'un traitement par iBRD induisait une diminution du niveau d'expression de *MYC* et l'augmentation d'*EGR1* dans les deux lignées cellulaires étudiées. Selon des données bibliographiques, ces modifications d'expressions géniques sont normalement associées à une induction de l'apoptose via l'activation des protéines pro-apoptotique BIM / PUMA. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'activation de cette voie apoptotique était défaillante dans les lignées résistantes aux iBRD. Afin de tester cette hypothèse nous avons réalisé des expériences de combinaison entre l'OTX-015 et un mimétique de BIM : ABT-263 (Navitoclax) et avons ainsi pu restaurer la sensibilité des lignées résistantes au traitement.

Ces données devront être confirmées par des analyses sur des échantillons de patients. Si ces résultats sont validés, ils pourront par la suite être étudiés dans des essais précliniques. Ceci permettra le développement de nouvelles perspectives thérapeutiques dans les LAM.

D) Partie I

A. Introduction : Les Leucémies Aiguës

Les leucémies aiguës (LA) constituent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes, caractérisées par la prolifération clonale (blastes) de précurseurs myéloïdes ou lymphoïdes et par une altération de l'hématopoïèse. On distingue deux grands types de leucémies aiguës en fonction de l'origine des blastes. Ils proviennent de l'acutisation d'une pathologie antérieure provenant, soit, de la lignée myéloïde (LAM), soit de la lignée lymphoïde (LAL). Le qualificatif « aiguë » est ajouté pour décrire l'apparition rapide des signes cliniques et ou biologiques faisant de cette maladie une urgence médicale.

Leucémies aiguës myéloïdes (LAM)	Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)
Les plus fréquentes des leucémies aiguës de l'adulte	Les plus fréquentes des leucémies de l'enfant
Age médian de survenue autour de 65 ans (l'incidence augmente avec l'âge)	Age de survenue entre 2 et 15 ans
Chez les enfants : rare	Chez les adultes : rare

a. Epidémiologie

Les leucémies aiguës, lymphoïdes et myéloïdes représentent 10 à 15% des hémopathies malignes et sont des affections rares et qui en dehors de quelques formes sont souvent de pronostics péjoratifs. Les LAM ont une fréquence qui augmente avec l'âge (65 ans), et les LAL, surtout observés chez l'enfant, représentent 1/3 des cancers pédiatriques. Ils peuvent également être retrouvés chez l'adulte après 50 – 60 ans. (1)

Les LA représentent des affections rares avec 4 à 5 cas pour 100 000 habitants par an, avec environ 3 000 nouveaux cas par an, en France.

Les LAM sont les plus fréquentes leucémies chez l'adulte et leur incidence est estimée de 2,5 à 3,5 cas pour 100 000 habitants/an. On estime qu'en 2012 en France, il y eu environ 2 800 nouveaux cas. (1) L'âge médian de survenue est situé aux alentours de 63 ans pour les deux

sexes avec une prédominance masculine. Les LAM ont une survie à 5 ans inférieure à 20% et qui ne s'améliore pas au fil du temps. (2)

Les LAL représentent 30% des LA. Ce sont en majorité des pathologies de l'enfant. Environ 75% des cas surviennent chez les moins de 18 ans avec un pic de fréquence entre 2 et 5 ans. Le deuxième pic de fréquence se situe chez l'adulte, autour de 70 ans. Leur incidence est de 1,5 cas pour 100 000 habitants/an.

Elles proviennent de la transformation néoplasique d'une cellule lymphoïde primitive soit au niveau d'un progéniteur très primitif commun aux lignées T et B (LLA nulles, exceptionnelles), ou à un niveau plus avancé dans la différenciation lymphoïde LLA T ou LLA B.

Les LLA B représentent 80% des LLA de l'enfant ; chez l'adulte, la fréquence des LLA T se situe aux alentours de 15%. Les LAL B sont plus fréquentes et de meilleur pronostic que les LAL T.

Le pronostic de survie à 5 ans des LAL est de 90% chez l'enfant alors qu'elle n'est que de 35 à 40 % chez l'adulte. (2)

b. Clinique

Le tableau clinique se définit selon 3 critères principaux : L'insuffisance médullaire, le syndrome tumoral, et les signes d'extrêmes gravité qui nécessitent une urgence thérapeutique. L'insuffisance médullaire se caractérise par une anémie (pâleur, dyspnée, tachycardie, vertiges...), une neutropénie (infections multiples et diverses), ainsi qu'une thrombopénie (hémorragie).

Le syndrome tumoral se définit par des adénopathies, une hépatomégalie, une splénomégalie, ainsi qu'une atteinte viscérale. Ce tableau peut être modifié en présence d'une aplasie médullaire.

c. Facteurs de risques

Dans la majorité des cas les LAM n'ont pas de cause ou de facteur déclenchant connu et surviennent chez des sujets jusque-là en « bonne santé » apparente. Certains facteurs de risque ont néanmoins été identifiés :

- L'exposition à des rayonnements ionisants, à des produits chimiques (benzènes et solvants dérivés...)
- Des antécédents de chimiothérapies
- Certaines anomalies génétiques constitutionnelles (trisomie 21, maladie de Fanconi...)
- Pathologies hématologiques préexistantes (syndrome myélodysplasiques, myéloprolifératives...)

d. Diagnostic

➤ Circonstances de découverte

Il n'existe pas de signe spécifique de LA et le diagnostic est suspecté dès qu'une complication clinique se manifeste. La complication clinique peut être liée à la cytopénie avec manifestation d'asthénie (syndrome anémique, hémorragique, état infectieux) et/ou devant un hémogramme faisant suspecter une atteinte médullaire (syndrome anémique, infection bactérienne, hémorragie, CIVD).

Le patient peut être totalement asymptomatique et la découverte fortuite par un hémogramme de routine. A contrario le patient peut présenter un tableau clinique initial grave nécessitant une hospitalisation urgente en milieu spécialisé.

La présence d'un syndrome tumoral peut conduire à réaliser un hémogramme. Le syndrome tumoral peut se manifester par la présence d'une des pathologies suivantes : adénopathies, splénomégalies, hépatomégalie, douleurs osseuses, nodules dermiques, hypertrophie gingivale...

➤ Démarche diagnostique

L'interrogatoire du patient doit inclure les antécédents personnels, familiaux, et les facteurs de risque pouvant faire évoquer une LA. L'examen clinique doit rechercher les manifestations tumorales, infectieuses, hémorragiques et anémiques.

➤ Confirmation du diagnostic

La biologie incluant l'hémogramme et le myélogramme sont primordiaux afin de confirmer le diagnostic. Les autres examens biologiques tels que la cytochimie, l'immunophénotypage, la cytogénétique et la biologie moléculaire permettent par la suite d'effectuer une classification leucémique et d'établir un pronostic.

L'hémogramme présente en général dans les LAM un portrait ANNA (anémie, normocytaire, normochrome, arégénérative), une thrombopénie, une neutropénie, une hyperleucocytose, la présence de blastes circulants en nombre variable. Ces pathologies peuvent être associées ou isolées. Le myélogramme réalisé en urgence afin de poser le diagnostic et identifier le type de LA avec 20% de LAM et 25% de LAL.

e. Classifications

➤ La classification **FAB** franco-américano-britannique des leucémies aiguës

Cette classification permet de distinguer 3 types de LAL et 9 types de LAM. La LAM de type

LAL	LAL 1	
	LAL 2	
	LAL 3	Leucémie de type Burkitt
LAM	LAM 0	Indifférenciée
	LAM 1	Myéloblastique sans différenciation
	LAM 2	Myéloblastique avec différenciation
	LAM 3	Promyélocytaire
	LAM 4	Myélomonocytaire
	LAM 4Eo	Myélomonocytaire avec éosinophilie
	LAM 5	Monoblastique
	LAM 6	Érythroblastique
	LAM 7	Mégacaryoblastique

3 est une urgence vitale puisqu'elle est associée à un risque hémorragique accru. Cependant, cette dernière est hautement curable.

➤ La classification **OMS** (3)

Elle vient compléter la classification FAB. Elle prend en compte les caractéristiques génétiques et dans une grande majorité de cas sera utilisée pour déterminer le pronostic et le traitement optimal.

- 1) LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes
 - a) Translocations équilibrées / inversions
 - b) Mutations génétiques favorable ou défavorables
- 2) LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies
- 3) LAM post chimio ou radiothérapie
- 4) LAM sans spécification particulière
- 5) Sarcome granulocyttaire
- 6) Prolifération myéloïdes associées à la trisomie 21 constitutionnelle
- 7) Tumeur blastique plasmocytoïde dendritiques
- 8) LA / lymphoblastiques B
- 9) LA / lymphoblastique T
- 10) LA de lignée ambiguë

f. Bilan pré-thérapeutique

Il permet d'identifier les pathologies et complications associées afin d'évaluer la faisabilité des différentes options de traitement. Ces différents éléments permettent de discuter grâce aux réunions de concertation pluridisciplinaire d'un traitement adapté.

Il se déroule selon le schéma suivant :

- Clinique : Evaluation de l'état général
- Biologie : Ionogramme, fonction rénale, calcémie, phosphorémie, uricémie LDH, bilan d'hémostase, ponction lombaire (évaluation d'hyperleucocytose), bilan pré-transfusionnel, sérologies (VIH, VHB, VHC, CMV, VZV), typage HLA (pour les patients susceptibles de recevoir une greffe de cellules souches hématopoïétiques CSH), hémocultures, bilan hépatique, albuminémie, test de grossesse pour les femmes en âge de procréer.
- Imagerie : ECG et échographie cardiaques, radiographie thoracique, et panoramique dentaire.

- Préservation de la fertilité : cryoconservation de sperme pour l'homme et cryoconservation de tissu ovarien chez la femme.

g. Traitements actuels

La classification des risques génétiques et moléculaire est devenue la clé principale pour orienter les traitements des leucémies aiguës. (4)

Les LA sont généralement considérées comme étant des urgences thérapeutiques

Le traitement est généralement basé sur une polychimiothérapie longue et intensive. Le traitement se déroule de manière classique selon une phase d'induction, une phase de consolidation, puis une phase d'entretien. Le traitement d'induction a pour objectif la rémission complète RC. Elle se déroule selon un protocole comprenant 4 phases : la réduction blastique, l'aplasie liée au traitement, la régénération et la rémission. Cette phase d'induction est réalisée en hospitalisation d'au minimum un mois. La phase de consolidation a pour objectif de prévenir une rechute. Après la RC il comporte une ou plusieurs cures de polychimiothérapie et à ce moment-là peut être proposé une greffe de CSH. Le traitement d'entretien est ensuite réalisé en ambulatoire. Il n'est pas forcément nécessaire, notamment en cas de greffe de CSH.

Les greffes de CSH sont en général allogéniques et réalisées avec soit un membre de la fratrie, un donneur volontaire, ou du sang placentaire. La procédure de greffe de CSH comprend un conditionnement préalable par une chimiothérapie intensive ayant pour but l'obtention d'une aplasie sévère. Par la suite, le patient sera apte à recevoir le greffe.

➤ **Traitements pharmacologiques proposés pour les LAM**

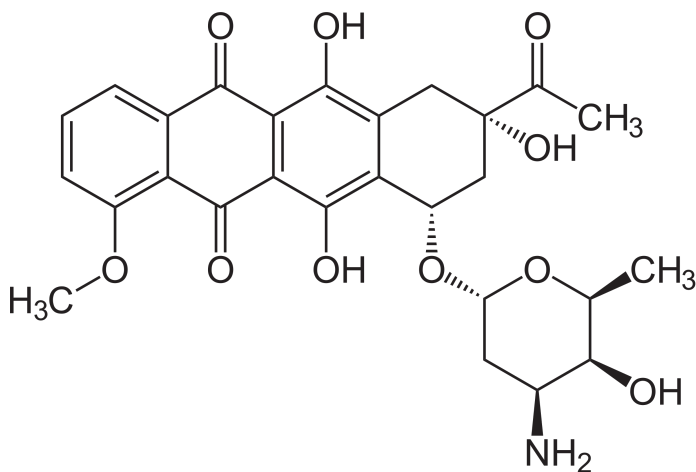
La chimiothérapie administrée pour la LAM comporte habituellement une association de 2 ou 3 médicaments.

L'association chimiothérapeutique à laquelle on a le plus souvent recours est à base de cytarabine (Cytosar, Ara-C) ainsi qu'un traitement antitumoral. L'approche habituelle est le plus souvent connue sous le nom de protocole 7 et 3, c'est-à-dire qu'on administre de la cytarabine en continu pendant 7 jours, puis le traitement antitumoral chaque jour pendant 3

jours. Les traitements antitumoraux couramment employés pour le protocole 7 et 3 sont les suivants :

- daunorubicine
- doxorubicine
- idarubicine
- mitoxantrone

La daunorubicine (représentée ci-dessous), doxorubicine et l'idarubicine sont des médicaments anticancéreux de la famille des anthracyclines (antibiotiques).



Mécanisme d'action

Les anthracyclines ont la particularité de s'intercaler entre deux bases G-C à la suite de la formation de liaisons d'hydrogène spécifiques entre la daunorubicine et la guanine. Les adduits de l'ADN activeront par la suite les réponses de mort cellulaire qui conduira ainsi la cellule à l'apoptose.

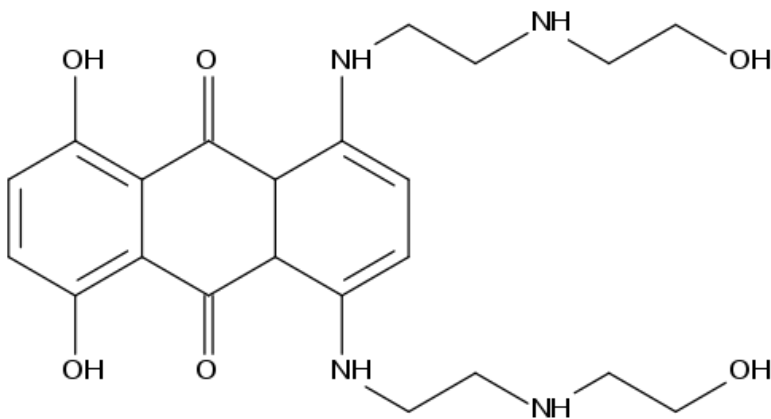
Effets indésirables

- Toxicité cardiaque aigue survenant dans les 48 heures. Cependant des troubles à l'ECG peuvent apparaitre dans la traduction clinique.
- Toxicité cardiaque chronique liée à la dose cumulative administrée. Cette dernière peut évoluer jusqu'à une insuffisance cardiaque congestive.

- L'insuffisance médullaire
- L'extravasation
- L'Alopécie
- Troubles digestives prenant en compte, des nausées, des vomissements, des stomatites et des diarrhées.
- Une coloration rouge des urines peut également apparaître.
- Des troubles des fonctions reproductives peuvent également avoir lieu.

En règle générale, ces effets secondaires sont réversibles à l'arrêt du traitement.

La mitoxantrone (représentée ci-dessous) est une anthracène dione qui est produite par synthèse totale. Elle est apparentée à la classe des anthracyclines.



Mécanisme d'action

La mitoxantrone agit en tant qu'inhibiteur de la topoisomérase II. Elle interrompt la synthèse et la réparation de l'ADN chez les cellules cancéreuses ainsi que les cellules saines. Elle agit via son mécanisme intercalant. Sa particularité par rapport aux anthracyclines est sa moindre cardiotoxicité.

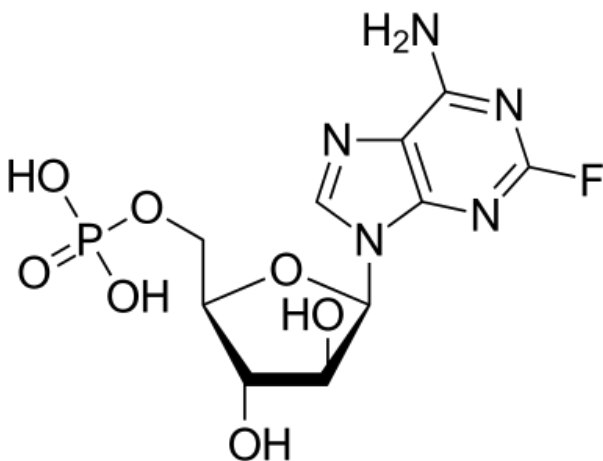
Effets indésirables

Les effets indésirables sont identiques à ceux de la daunorubicine.

Pour traiter la LAM nous pouvons également avoir recours à d'autres traitements tels que :

- fludarabine
- étoposide
- cyclophosphamide
- topotécan
- méthotrexate
- azacitidine

La fludarabine (représentée ci-dessous) est un analogue de la purine.



Mécanisme d'action

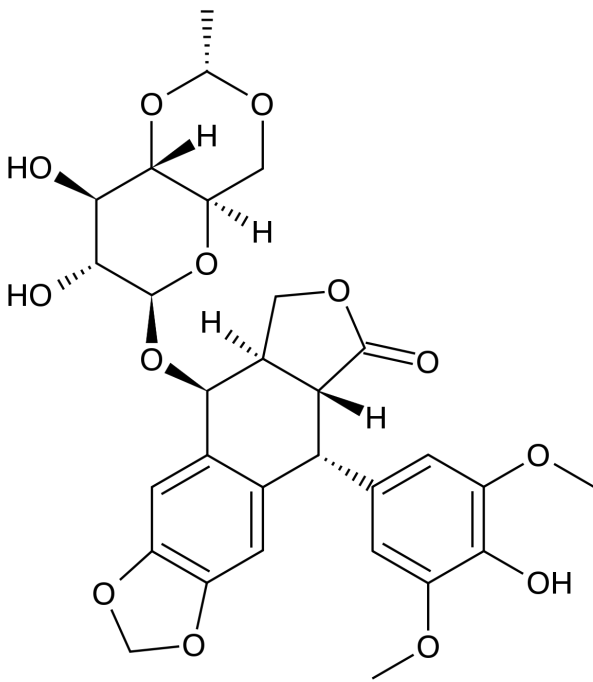
Ses effets sur l'ADN, l'ARN et la synthèse des protéines contribuent tous à l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'inhibition de la synthèse de l'ADN étant le facteur prédominant. De plus, des études *in vitro* ont montré que l'exposition de lymphocytes au fludarabine déclenche une fragmentation importante de l'ADN et une mort cellulaire caractéristique de l'apoptose.

Effets indésirables

- Infection opportuniste
- Leuco-encéphalopathie multifocale progressive
- Infection due à l'herpès virus
- Infection due au virus d'Epstein Barr

- Affection lymphoprolifératrice liée à l'EVB
- Syndrome myélodysplasique

Etoposide (représentée ci-dessous) est un agent intercalant. C'est une molécule semi synthétique dérivée de la podophlotoxine.



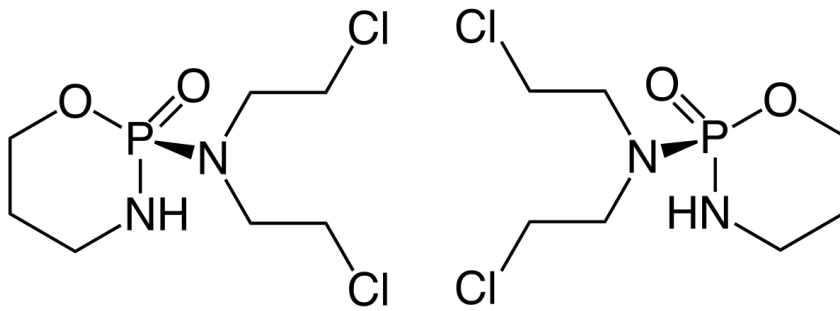
Mécanisme d'action

L'étoposide est un inhibiteur de la topoisomérase II. Elle inhibe donc l'entrée en mitose (prophase) des cellules tumorales. A forte concentration l'étoposide présente une action de lyse sur les cellules tumorales.

Effets indésirables

- Toxicité hématologique
- Toxicité allergique (choc anaphylactique)
- Toxicité cancérigène (leucémies secondaires)

Cyclophosphamide (représente ci-dessous) est un agent alkylant de la famille moutarde à l'azote.



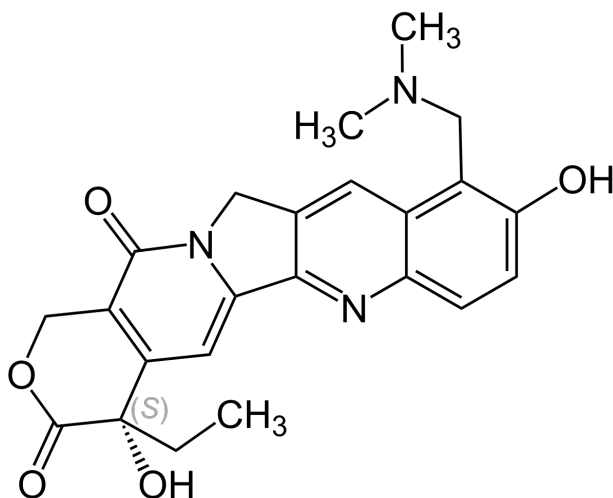
Mécanisme d'action

Les agents alkylants ont la particularité de remplacer un groupement hydrogène par un groupement alkyle. Ces derniers vont pouvoir créer des liaisons covalentes entre brins d'ADN ce qui entravera le processus de réplication de l'ADN.

Effets indésirables

- Toxicité hématologique
- Toxicité pulmonaire
- Toxicité digestive
- Toxicité dermatologique
- Alopecie

Topotécan (représentée ci-dessous) est un agent intercalant.



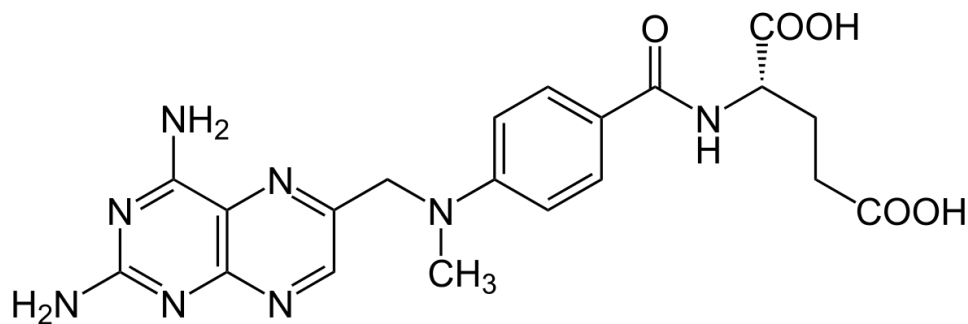
Mécanisme d'action

Il inhibe la topoisomérase I entraînant ainsi des troubles de la réplication au niveau de l'ADN.

Effets indésirables

- Troubles hématologiques
- Troubles pulmonaire : pathologie pulmonaire interstitielle

Méthotrexate (représentée ci-dessous) est un anti métabolite de la classe des anti-foliques.



Mécanisme d'action

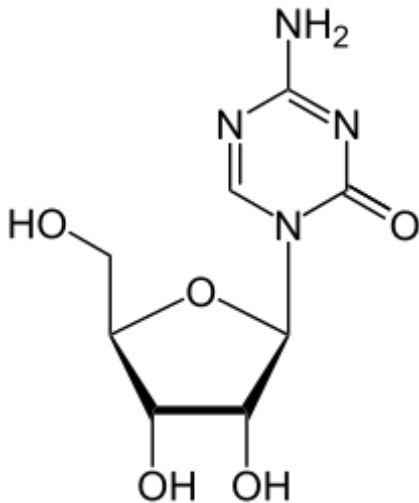
Le méthotrexate va inhiber le DHFR (deshydrofolate reductase) empêchant alors le passage de l'acide dihydrofolique à l'acide tetrahydrofolique, substrat pour la thymidylate synthase acteur à part entière de la réplication et réparation de l'ADN par le biais de l'action de l'acide folique.

Effets indésirables

- Troubles bucco-dentaires
- Toxicité digestive
- Asthénie
- Toxicité infectieuse
- Toxicité hématologique

Azacitidine (représentée ci-dessous) est un anti métabolite de la famille des antipyrimidiniques.

Cette molécule fait partie de la même classe que la Cytarabine. Elle aura donc le même mécanisme d'action ainsi que les mêmes effets indésirables.



Si la LAM ne répond pas aux médicaments administrés précédemment ou si elle récidive, on peut avoir recours aux méthodes suivantes :

- Le protocole 7 et 3 à base de cytarabine et d'un antitumoral identique ou différent
- La cytarabine à forte dose (HDAC) administrée seule ou associée à un antitumoral
- MEC – étoposide, cytarabine et mitoxantrone
- étoposide à forte dose et cyclophosphamide
- GLAG-M – cladribine, cytarabine, mitoxantrone et facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF)
- fludarabine, cytarabine et G-CSF

➤ **Stratégie thérapeutique en cas de LAM**

Pour les sujets de moins de 60 ans :

Chez ces patients, le traitement est presque exclusivement à visée curative. Elle repose sur une chimiothérapie intensive d'une durée de 6 mois environ. Celle-ci comporte : une phase d'induction et une phase de consolidation adaptée au type de LAM du patient.

Le protocole de référence de la chimiothérapie d'induction associe une anthracycline et la cytarabine. Cette chimiothérapie est systématiquement suivie d'une aplasie de 4 à 6 semaines qui nécessite une hospitalisation.

Pour le traitement des LAM 3, une chimiothérapie d'entretien complétera la chimiothérapie intensive et comporte au moins une anthracycline (ATRA : acide tout trans rétinoïque) qui guérit au moins 75% des patients.

La rémission complète RC, qui se caractérise en étant la première étape vers la guérison, est définie : - par l'amélioration de l'hémogramme (absence de blastes circulants, nombre de polynucléaires > 1 G/L, nombre de plaquettes > 100 G/L) ainsi que par un frottis médullaire riche (comportant moins de 5% de cellules blastiques et une absence de corps d'Auer).

Le risque de rechute reste cependant important et justifie un traitement de consolidation adapté au type de LAM du patient associé à ses facteurs pronostiques.

On définit un patient guérit par une rémission complète de plus de 5 ans.

Pour les sujets de plus de 60 ans :

Chez ces patients il est préférable d'attendre les résultats cytogénétiques avant de prendre les décisions thérapeutiques.

Une **chimiothérapie intensive d'induction** est réalisée chez les patients avec :

- un bon **score de performance** : PS de l'OMS

0	Activité physique intacte
1	Réduction des efforts mais autonomie complète
2	Personne autonome mais nécessitant un repos d'environ 6 heures
3	Personne dépendante – lever possible mais besoin d'assistance pour la toilette
4	Dépendance totale – quasi grabataire

- des dysfonctions organiques ou comorbidités minimales

- une cytogénétique favorable ou intermédiaire

Le protocole de référence sera alors quasi identique à celui utilisé chez l'adulte de moins de 60 ans.

Les patients âgés de 60 ans à 65 ans peuvent bénéficier d'une greffe de CSH à conditionnement atténué si leur état clinique est satisfaisant et si un donneur est disponible.

Les patients non éligibles à une chimiothérapie intensive se voient proposer des soins palliatifs : support par transfusions, agents anti-infectieux et chimiothérapie palliative. Ce dernier ayant comme objectif la qualité de vie. La participation à un essai clinique peut également être discutée avec le patient et envisagée.

Si ces patients disposent de blastes médullaires de 20 à 30% des agents déméthylants (5-azacytidine) peuvent être utilisés dans certaines formes de LAM.

➤ **Stratégie thérapeutique en cas des LAL**

➤ **Pour les sujets de moins de 60 ans :**

Chez ces patients, le traitement est à visée curative. Cette dernière repose sur une chimiothérapie intensive d'une durée de 6 mois environ. Elle est composée successivement d'une phase d'induction puis d'une phase de consolidation. (Cette chimiothérapie nécessite une prévention des atteintes neuro méningées pour les chimiothérapie intrathécale et irradiation encéphalique).

La chimiothérapie d'entretien est ambulatoire pendant 2 ans. Pour certains patients, une allogreffe de CSH est possible.

Les thérapies sont le plus souvent composées de cyclophosphamide, la vincristine, la L-asparaginase, certaines anthracyclines, le méthotrexate, la cytarabine, l'étoposide, la 6-mercaptopurine et/ ou des corticostéroïdes.

Au niveau du caryotype, la présence du chromosome de Philadelphie (Ph) ou d'un transcrite de fusion BCR-ABL doit être connue dans les 8 premiers jours du diagnostic. Cette dernière oriente précocement la prise en charge. La prise en charge se fait alors de façon spécifique avec un inhibiteur de tyrosine kinase (imatinib en première intention puis dasatinib ou ponatinib en cas d'échec ou même d'intolérance), associé à la chimiothérapie. La phase d'entretien ambulatoire pendant 2 ans implique le médecin généraliste et le pharmacien qui ont un rôle important à jouer dans l'observance du traitement.

➤ **Pour les sujets de plus de 60 ans :**

L'approche thérapeutique est adaptée à l'âge. Les doses de chimiothérapie peuvent être réduites en fonction de la tolérance.

h. **Facteurs pronostics et rechutes**

Le caryotype est le facteur prédictif le plus fort de la réponse initiale au traitement. C'est également lui qui dicte le risque de rechute.

Les facteurs de mauvais pronostics initiaux reconnus dans les LAM sont l'âge (>60ans), Une cytogénétique défavorable contenant certaines anomalies moléculaires, une évolution depuis un syndrome myélodysplasique ou une néoplasie myéloproliférative ainsi qu'une évolution

secondaire à une chimiothérapie antérieure, un score de performance OMS > 2, des comorbidités préexistantes et une hyperleucocytose initiale. Le facteur de mauvais pronostic lié à la réponse du traitement se limite à l'absence d'obtention de la rémission complète en une cure ainsi qu'une maladie résiduelle persistante en biologie moléculaire. Concernant les LAL les facteurs de mauvais pronostics sont souvent identiques en rajoutant en mauvais pronostics initiaux une atteinte méningée. A cela se rajoutera la résistance aux corticoïdes dans les facteurs de mauvais pronostic liés à la réponse aux traitements.

Les signes évocateurs de rechutes sont le plus souvent les signes cliniques. Il convient d'informer correctement les patients de ces signes afin de prendre en charge le plus rapidement possible ces rechutes. (Voir paragraphe sur l'ETP : éducation thérapeutique du patient).

➤ **Rechutes de LAM et formes réfractaires**

La **rechute** est définie comme la réapparition de blastes dans le sang ou dans la moelle ($\geq 5\%$) chez un malade en rémission complète.

Les patients ne répondant pas à un ou deux cycles de traitement d'induction sont considérés comme **réfractaires** et à très haut risque d'échec d'un traitement ultérieur.

Le trioxyde d'arsenic est utilisé dans le traitement des rechutes des LAM 3.

Dans la mesure du possible, ces patients doivent être inclus dans des essais cliniques mais le pronostic reste réservé.

➤ **Rechutes de LAL et formes réfractaires**

La prise en charge des rechutes de LAL et des formes réfractaires est difficile à standardiser car elle dépend de chaque situation.

➤ **Leucémie de type Burkitt**

Il s'agit d'une urgence vitale. Sa prise en charge relève d'un traitement différent des autres LAL, avec une chimiothérapie initiale progressive (afin d'éviter un syndrome de lyse tumorale), puis une chimiothérapie séquentielle intensive prolongée.

i. Prise en charge de la maladie

Tout au long du traitement le patient doit jouer un rôle important dans sa propre pathologie. Son implication est primordiale afin d'avoir une bonne observance du traitement (surtout lors de la phase d'entretien).

Le patient doit être informé de la nécessité de consulter lors des symptômes, surtout non spécifiques, de sa maladie. Ces derniers peuvent être liés à des signes généraux (perte de poids, sueurs nocturnes, fièvre ou asthénie importante). Ils peuvent également inclure des signes cliniques en rapport avec l'insuffisance médullaire ou le syndrome tumoral (asthénie, douleurs osseuses, signes respiratoires, splénomégalies, hépatomégalies, troubles neurologiques...).

De même, l'éducation thérapeutique du patient ETP constitue une dimension de stratégie dans la prise en charge d'une personne atteinte d'un cancer. Elle a pour but de rendre le patient autonome dans sa propre prise en charge. Cela facilitera son adhésion au traitement prescrit et améliorera sa qualité de vie. Cette ETP peut être proposée dès l'annonce du diagnostic de la maladie ou pendant à partir du moment où le patient est apte à recevoir ces informations. Pour une personne atteinte de LA cette ETP contribue au développement de connaissances et de compétences qui lui permettra de comprendre sa maladie, les traitements, et leurs effets indésirables. Elle permettra également au patient d'autogérer des situations telles que la prise en charge de son cathéter central, ainsi que d'être sensibilisé aux signes liés aux syndromes anémiques, infectieux, hémorragiques ou même de reprise évolutive de leur maladie.

j. Suivi de la maladie

Le suivi repose sur un examen clinique qui permet de surveiller les effets indésirables des traitements. Il est réalisé de manière précoce à 1 mois, puis tous les 3 mois sur une période d'un an, puis tous les 6 mois sur une période de 5 ans jusqu'à RC. Le suivi repose également sur une surveillance biologique avec la réalisation d'un hémogramme (tous les 1 à 3 mois sur une période de deux ans, puis tous les 3 à 6 mois jusqu'à la RC). On notera qu'il est également possible d'effectuer un myélogramme à condition que l'hémogramme devienne anormal.

Certains sous types de LA, ayant un profil de biologie moléculaire et de cytométrie particulière, nécessitent l'évaluation de la maladie résiduelle qui sera réalisée tous les 3 mois pendant 2 ans. Le suivi comprend souvent un temps d'échange avec le patient. Il faut être en mesure de comprendre et d'accompagner le patient en fonction de ses différents besoins liés à la pathologie.

Le dépistage d'un cancer secondaire suite à une LAL est supérieur à la normale. Il existe des affections hématologiques secondaires précocement et de tumeurs solides plus tardivement, notamment après une greffe de CSH. Il est donc nécessaire de prendre en compte la possibilité de survenue de ces différentes pathologies afin de pouvoir un faire le diagnostic le plus précocement possible et d'orienter le patient rapidement vers une structure de prise en charge.

B. La prise en charge des effets indésirables de la chimiothérapie à l'officine

Avant toute prise en charge du patient à l'officine il est indispensable que le pharmacien soit informé de la thérapie qui est suivie par le patient. Chaque traitement sera soumis à un contrôle minutieux du pharmacien afin de conseiller un traitement adapté, ainsi que dénué d'interactions médicamenteuses. On notera que la plupart des effets secondaires seront directement pris en charge à l'hôpital par l'équipe médicale.

Les effets secondaires peuvent se produire ou non. Chaque patient sera plus ou moins sujet aux effets secondaires et chaque patient les ressent différemment. Il sera donc le plus approprié d'être à l'écoute de chaque patient et de chaque symptôme qu'il présentera afin d'avoir une action la plus ciblée possible.

La chimiothérapie peut causer des effets secondaires puisqu'elle risque d'endommager les cellules saines tout en détruisant les cellules cancéreuses. Les effets secondaires peuvent se manifester n'importe quand pendant, tout de suite après ou quelques jours voire quelques semaines après la chimiothérapie. Il arrive parfois que des effets secondaires apparaissent des mois ou des années à la suite de la chimiothérapie. La plupart disparaissent d'eux-mêmes ou peuvent être traités. On notera qu'il existe cependant un risque que certains effets indésirables puissent durer longtemps ou être permanents.

Les effets secondaires de la chimiothérapie dépendent surtout du type de médicament ou d'association médicamenteuse, de la dose, du mode d'administration et de l'état de santé global.

Voici certains effets secondaires courants des agents chimiothérapeutiques employés pour traiter la LAM :

- Aplasie médullaire : risque infectieux (généralement pris en charge en milieu hospitalier)
- Nausées et vomissements
- Perte d'appétit
- Douleurs dans la bouche et dans la gorge
- Asthénie
- Perte de poils et cheveux
- Diarrhée
- Troubles dermatologiques

- Troubles de fertilité
- Fièvre

Il est important d'informer les patients qu'ils doivent avertir leurs professionnels de santé à toute survenue de suspicion d'effets indésirables. Au plus vite le problème est mentionné et au plus vite le problème peut être pris en charge. Si ces derniers peuvent être en grande majorité des effets secondaires bénins, il ne faudra pas négliger un risque de gravité et prudemment rediriger le patient vers son oncologue.

a) Produits disponibles en officine

1. Nausées et Vomissements

Pour les nausées et vomissements liés à la chimiothérapie les patients sont généralement munis d'antiémétiques prescrit par leur oncologue. Ces derniers sont des antiémétiques puissants tel que : aprépitant, granisétron, ondansétron, palonosétron, tropisétron, métoclopramide, et dompéridone.

Toutefois, si le patient ne dispose pas d'antiémétiques nous pouvons suggérer le métopimazine (VOGALENE LYOC) en attendant une prescription plus adaptée par son oncologue ou médecin généraliste.



Il ne faut pas oublier de rappeler aux patients les mesures hygiéno-diététiques afin de limiter ces effets indésirables au maximum. Il faut conseiller des repas légers fractionnés, de l'eau fraîche, des soda cola dégazéifiés, des biscottes, des fruits cuits, ainsi que des viandes maigres

Il est préférable d'attendre 1h avant de s'allonger après le repas et d'éviter les aliments riches en graisses, boissons gazeuses, odeurs, tabac, café, lait, alcool, coucher précoce après le repas

Les nausées et vomissements sont répertoriés en 4 catégories allant du grade 1 au grade 4 selon la gravité. Le grade 4 étant la mise en jeu du pronostic vital et la prise en charge se fait donc à l'hôpital.

2. La dénutrition

La diminution de l'appétit à comme conséquence la dénutrition si cette dernière dure trop longtemps. Cela est souvent le cas de part le fait que de nombreux patients perdent les saveurs pendant la durée de leur traitement. Le corps humain nécessite un apport calorique suffisant afin de fonctionner correctement. Il est donc important de rappeler aux patients qu'ils doivent se nourrir ou se « forcer » afin de ne pas engendrer d'autres troubles plus importants par la suite tel qu'un arrêt cardio-respiratoire dans les cas les plus graves.

Il faut conseiller aux patients de manger toutes les 3 à 4 heures où dès leur survenu d'appétit. Il faut également les avertir qu'il n'est pas nécessaire de les limiter dans leur régime alimentaire. Si cela ne suffit pas à remplir leur besoin calorique quotidien nous pouvons alors les orienter vers des compléments alimentaires tel que le Clinutren HP/HC (hyperprotéique/hypercalorique). Ces derniers peuvent être prescrit par un médecin généraliste afin d'être remboursé par la sécurité sociale. Il est également nécessaire de prévenir les patients que ces derniers ne substituent en rien une alimentation normale et équilibrée mais qu'elle est complémentaire de leur régime alimentaire. Ces derniers se prennent au moment des collations, c'est-à-dire entre les repas. Il existe également des gammes de produits riches en protéines tel que le « FORTIMEL CARE » de Cinutren qui contient 18g de protéines pour une bouteille de 50cL consommée.

Plusieurs goûts sont proposés afin de convenir à la plus grande majorité des patients. Il existe également des repas HP/HC si les patients le désire.



3. Mucites et stomatites

Les mucites sont répertoriées du grade 1 au grade 4. Le grade 4 étant le plus grave (nécros et hémorragies spontanées) et nécessite une prise en charge hospitalière puisque le pronostic vital est généralement engagé.

Il faut conseiller aux patients plusieurs remèdes à leurs problèmes.

S'ils présentent une bouche sèche on pourra leur conseiller un spray d'eau thermal à pulvériser dans la bouche par exemple de la gamme AVENE. Nous pouvons également les orienter vers un spray buccal aqueux de type AEQUASAL de BUCCOTHERME.

Il faut également rappeler aux patients qu'il est préférable de favoriser une alimentation froide, à température ambiante, et mixée (crème glacée ou sorbets, compote de fruits, desserts lactés, légumes cuits, écrasés ou en purées, viandes ou poissons écrasés ou mixés) pour prévenir les mucites ou éviter de raviver les douleurs si ces dernières sont déjà présentes. Si le patient détient des mucites douloureuses il est convenable de lui conseiller de sucer un glaçon avant de s'alimenter pour anesthésier ces parties buccales, les rendant donc moins douloureuse.

Si le patient a une surinfection, peu importe l'origine, un traitement spécifique doit lui être proposé. Ex : Bains de bouche pluriquotidien à base de bicarbonate (**5 à 6x/j**), avant et 20 min après le repas avec adjonction antifongique. Si les douleurs sont trop intenses un traitement à base de xylocaïne peut être envisagé, il faudra donc rediriger le patient vers son oncologue, médecin traitant, ou dentiste. Nous pouvons également orienter le patient vers de gamme de dentifrices et bain de bouches, de type BUCCOTHERME, sans alcool afin de ne pas induire de traumatismes supplémentaires à leurs muqueuses.

4. L'asthénie

La fatigue intense est un des effets indésirables les plus courant pendant une chimiothérapie. Il est conseillé de proposer aux patients des compléments alimentaires basiques tel que du BION 3 ou le CENTRUM afin d'éviter qu'ils soient en carence de vitamines et minéraux principaux. Il est également utile de rappeler qu'un mode de vie sain peu aider à faire diminuer la sensation d'asthénie. On propose alors d'éviter l'alcool, le tabac, ainsi que les produits ultra transformés à des fins alimentaires. On proposera par la suite, une activité

physique calme mais régulière tel qu'une promenade de 20 min par jour afin de renforcer le corps.



5. L'Alopécie

L'alopécie est une chute de cheveux et de tous poils y compris cils et sourcils, totale ou partielle. Souvent mal vécue par les malades. Elle débute 10 à 20 jours après le début de la chimiothérapie, toujours réversible à l'arrêt du traitement avec repousse des cheveux d'environ 1 cm par mois. Il faut informer le patient sur l'éventualité et la réversibilité de l'alopécie. Nous pouvons préconiser l'achat d'une perruque ou d'une prothèse capillaire avant le début du traitement afin de s'habituer en amont au changement. Il est possible d'orienter les patients vers un centre de perruques. Ces derniers étant partiellement pris en charge par la sécurité sociale et également par la complémentaire santé. En officine nous pouvons cependant conseiller l'utilisation d'un casque réfrigérant (marque ELASTOGEL). Nous pouvons également rappeler aux patients les bonnes mesures à prendre pour ralentir le procédé de survenue de l'alopécie : Se laver les cheveux avant le traitement puis seulement 2 à 8 jours après à l'aide d'un produit doux (gamme bébé par exemple) avec de l'eau pas trop chaude puis un séchage doux, pas de soins agressifs (permanentes, coloration...), ainsi qu'un brossage doux.



6. Diarrhée

Les diarrhées sont catégorisées en 4 allant du stade 1 au stade 4. Le stade 4 est la mise en jeu du pronostic vital et est donc prise en charge en milieu hospitalier.

La prise en charge du patient à l'officine consiste à rappeler les aliments à éviter : produits épicés, riches en graisses, la caféine, les boissons glacées, le lait, les fruits, les légumes crus, les céréales, le pain complet ou multi céréales, les légumineuses et même les boissons gazeuses. Il faudra ainsi, au détriment de ces derniers, conseiller une alimentation privilégiée en viandes blanches, poissons maigres, féculents (carottes, banane, fromage à pâte cuite...), une bonne hydratation quotidienne, en alternant avec des boissons sucrées et salées. Il faudra tout de même faire penser au patient que s'il constate des signes de déshydratations, il faudra procéder à une réhydratation à base d'hydro électrolytes. Cette dernière peut être faite par voie orale ou par voie parentérale si besoin. Nous pourrions conseiller des traitements anti diarrhéiques standard tel que le loperamide, le racécadotril, ou même le diosmectite. Il faudra tout de même rappeler qu'il est indispensable de prendre ces médicaments (surtout diosmectite) à distance des autres médicaments, dans un délai de 2 heures environ. Il est contre indiqué de conseiller de prendre des prébiotiques et des probiotiques lorsque le patient a une chambre implantable puisque ce dernier peut induire des infections néfastes au patient qui est déjà en faiblesse immunitaire. Il faut également rappeler aux patients que si les effets indésirables persistent, ils doivent

impérativement consulter leur médecin traitant ou oncologue qui pourront éventuellement suspendre les traitements le temps des diarrhées.



7. Troubles dermatologiques

Ces troubles dermatologiques sont catégorisés du grade 1 au grade 4. Le grade 4 est une mise en jeu du pronostic vital et est donc pris en charge à l'hôpital.

Les troubles dermatologiques sont nombreux. Il existe le syndrome d'erythrodysesthésie palmo plantaire plus couramment connu sous le nom du syndrome mains-pieds. Il peut également apparaître des folliculites, ainsi que des xéroses ou fissures, ainsi qu'une photosensibilité.

Le syndrome mains-pieds peut présenter des signes précoces avec apparition de dysesthésie, ainsi que des sensations de brûlures. La phase d'état est une hyperkératose inflammatoire avec halo érythémateux péri-lésionnel et œdème, voire bulleuse qui nécessite un perçage aseptique. La phase tardive est une lésions sèches hyperkératosiques et épaissies avec desquamation en lambeaux. Pour les signes précoces on peut conseiller les crèmes émoullientes ainsi que des kératolytiques pour les syndromes hyperkératosiques. Ici, nous avons présenté la gamme URIAGE qui propose ce type de produits. La crèmes Xémose permet d'éviter les irritations et de nourrir la peau en profondeur. De même la crème Kératostane permet de prévenir les signes primaires de l'hyperkératosité. Nous rappelons que ces crèmes sont uniquement en usage préventif des effets indésirables, lorsqu'il y a une modification légère de la peau (Grade 1). Les grades 2 et 3 seront traités par corticoïdes III ou

IV locaux. Le grade 3 peut amener à une suspension de traitement jusqu'à régression des effets indésirables. Il sera donc judicieux de rediriger les patients vers leur médecin traitant ou oncologue.



Concernant les folliculites qui se présentent sous forme de papules ou pustules ainsi qu'un léger prurit, nous pouvons conseiller un antiseptique local tel que la BISEPTINE associé à une crème émollissante de la gamme URIAGE et un antihistaminique anti H1 de type cétirizine en vente libre. Si ces dernières sont trop étendues nous pouvons conseiller du maquillage médical en supplément d'un traitement de type COUVRANCE par AVENE. Les folliculites de grades supérieurs au grade 1 nécessite une prise en charge par antibiotiques. Nous devons alors réorienter le patient vers son médecin traitant.



Les xéroses et les fissures sont des sècheresses cutanées tardives et persistantes. Elles sont plus ou moins associées à un prurit on conseillera alors des crèmes au pouvoir cicatrisantes, des pansements occlusifs à la vaseline, pommade vitA de type A313 ou de l'hydrogel.

Les fissures nécessitent une crème émolliente avec un lavage à la povidone iodée de type BETADINE scrub. Si ce dernier est allergique à l'iode ou intolérant il lui faudra utiliser l'HIBISCRUB. Si des écoulements apparaissent il faudra rediriger le patient vers un médecin afin d'instaurer un traitement à base de fucidine.



8. Autres troubles

Une des plus grandes complications liée au traitement est le trouble de la fertilité. L'homme peut être amené à réaliser un spermogramme de contrôle après la fin de sa cure de chimiothérapie (jusqu'à deux ans après). Les troubles cardiaques liés à l'utilisation des anthracyclines demandent un examen clinique annuel ainsi qu'un examen d'échographie cardiaque tous les 3 à 5 ans. Les fibroses pulmonaires sont également fréquentes et demandent une surveillance accrue de tout signe de troubles respiratoires.

Le suivi post – allogreffe de CSH implique la recherche de nombreux troubles tels que les complications dermatologiques, thyroïdiennes, osseuses ainsi qu'oculaires. Ces troubles ne sont pas pris en charge en officine de ville. Il est cependant important d'être vigilant quant aux signes d'appel de ces pathologies afin d'orienter le mieux possible les patients.

II. Partie II

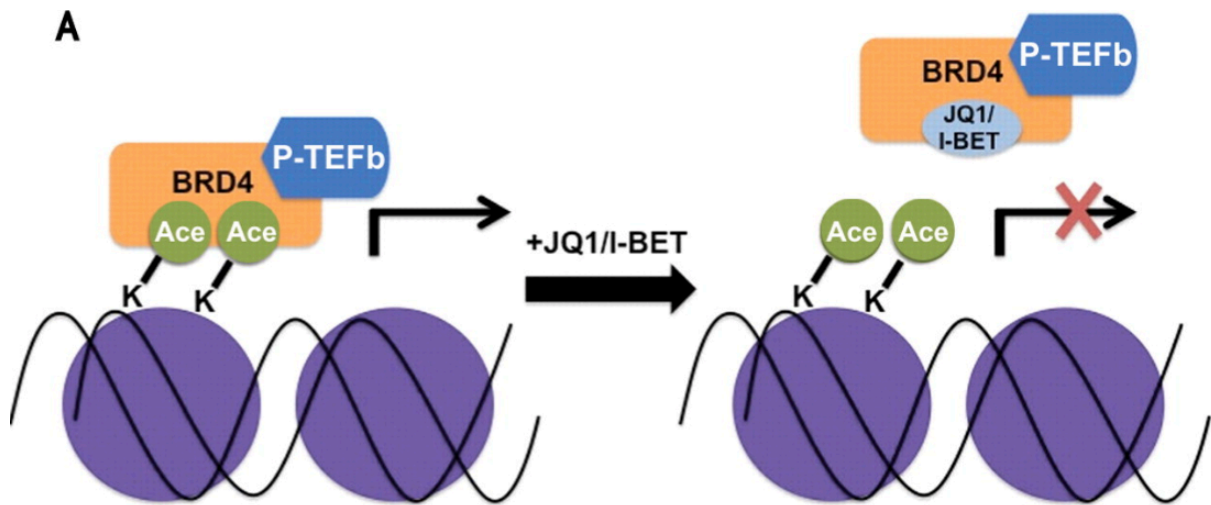
A. Bromodomaines et inhibiteurs des bromodomaines

Le séquençage direct des LAM a mis en évidence un vaste champ mutationnel. Les mutations les plus fréquemment retrouvées sont principalement responsables d'action au niveau de modulateurs épigénétiques. Ces modulateurs, des enzymes qui ont la capacité d'apporter des modifications à la chromatine, sont des facteurs impliqués dans la régulation de l'expression des gènes pouvant alors conduire à favoriser le potentiel oncogénique s'ils sont mutés.

Concernant les LAM, les protéines à bromodomaines (BRD) sont les cibles privilégiées afin d'assurer un maintien et une stabilisation de la leucémie. Ces BRD, 61 identifiés à ce jour (8), sont des protéines d'environ 110 acides aminés capables de reconnaître des zones acétylées de la partie terminale des histones. Ce sont des « lecteurs » (connus sous le nom « readers » en anglais) de ces zones permettant alors de réguler l'activité génique. Ici, nous nous intéressons aux BRD de la famille bromodomaine et domaine extra-terminal (BET) qui contient 4 membres : BRD2, BRD3, BRD4, et BRDT. Les protéines BET ont une expression et/ou une activité dérégulée dans les cancers dans lesquels elles sont des acteurs majeurs dans le maintien du phénotype transformé et de la résistance thérapeutique. Un criblage pangénomique de siRNA réalisé sur des cellules leucémiques a révélé que la protéine BRD4 jouait un rôle essentiel dans le maintien des LAM (9). Les inhibiteurs des protéines BET (iBET) offrent la possibilité d'abroger leurs fonctions oncogéniques. Les iBET se fixent aux protéines BET empêchant alors leur liaison aux zones de lectures situées sur la chromatine. Ce mécanisme empêche la lecture des sites acétylés et donc leur phénotype transformé muté pouvant être responsable d'un pouvoir oncogène. (Figure ci-dessous)

L'activité que peuvent apporter la thérapie des iBET semble présenter des rendements modestes lorsqu'ils sont appliqués en monothérapie. De plus ils semblent présenter d'ores et déjà des mécanismes de résistance. (10)

A) Mécanisme d'action des iBRD au niveau des zones acétylés de la chromatine



B. Objectif du travail

L'évolution rapide vers une résistance aux traitements en plus de nombreuses résistances acquises nécessite le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il est donc important de développer de nouveaux critères diagnostiques afin de proposer un traitement plus adapté à la pathologie des patients. Ceci permet par la suite d'attribuer des traitements plus spécifiques aux patients évitant alors des échecs thérapeutiques précoces. Cette étude aura pour but de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance et la sensibilité aux inhibiteurs de Bromodomaines (iBRD) de la famille BET (Bromodomaines and Extra Terminal motif) dans la leucémie aigüe myéloïde (LAM).

C. Résultats

1. Sélection des lignées cellulaires

Nous avons identifié 6 lignées cellulaires de LAM, à partir de données générées par notre laboratoire, et évalué leur sensibilité à 2 inhibiteurs de bromodomains iBRD (JQ1 et OTX-015). Les iBRD sont capables d'inhiber la viabilité des différentes lignées cellulaires de LAM de manière dose dépendante. Ces analyses sont rapportées avec OTX-015. Les 6 lignées (*MOLM14*, *SKM1*, *THP1*, *KG1a*, *NB4*, et *HL60*), ont été exposées à une gamme de concentration allant de 0,01nM à 10µM d'OTX-015. Les courbes représentent l'effet dose d'OTX-015 en fonction de chaque lignée cellulaire des LAM. Les quatre courbes qui diminuent le plus rapidement (*MOLM14*, *SKM1*, *THP1*, et *KG1a*) voient leurs viabilité cellulaire (%) diminuer. Ces lignées présentent donc une sensibilité plus élevée à OTX-015. Les deux courbes situées en haut du graphe (*HL60*, *NB4*) tardent à décroître en comparaison avec les 4 lignées précédentes. Ceci signifie que leur viabilité cellulaire (%) est plus élevée et qu'elles sont moins sensibles à OTX-015. Ici, nous pouvons voir que la plus basse viabilité en fonction de la gamme d'OTX-015 est attribuée à la lignée *MOLM14* alors qu'à l'inverse celle avec la plus haute viabilité est attribuée à la lignée *NB4*. Les tests sont effectués de façon indépendante, 3 fois, afin d'être statistiquement interprétables (**Figure 1A**). De même, L'EC50 d'OTX-015 (la concentration efficace médiane) calculée pour ces 6 lignées montre que l'EC50 est comprise entre 80 et 250 nM pour les lignées *MOLM14*, *SKM1*, *THP1*, et *KG1a* alors que l'EC50 est comprise entre 0.8 et 5 µM pour les *HL60*, *NB4*. La lignée cellulaire présentant la plus faible EC50 est attribuée à la lignée cellulaire *MOLM14* alors que l'EC50 la plus élevée est attribuée à la lignée cellulaire *NB4*. Il faudra donc deux fois plus d'OTX-015 pour inhiber la croissance cellulaire des *NB4* comparé aux *MOLM14* (**Figure 1B**). Ces résultats ont permis de montrer que 4 lignées (*MOLM14*, *THP1*, *SKM1* et *KG1a*) étaient sensibles aux iBRD tandis que 2 autres lignées (*HL60* et *NB4*) étaient résistantes. Cela nous a donc permis de sélectionner deux lignées pour la suite des travaux : la plus sensible, *MOLM14* ainsi que la plus résistante *NB4*.

Figure 1 : Effet d'OTX-015 sur la viabilité cellulaire des différentes lignées cellulaires de LAM

Figure 1(A)

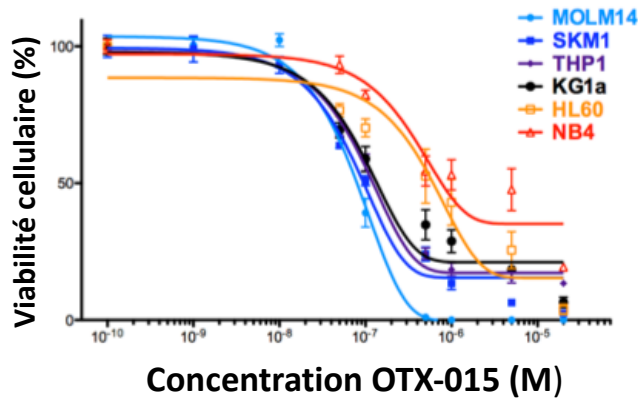
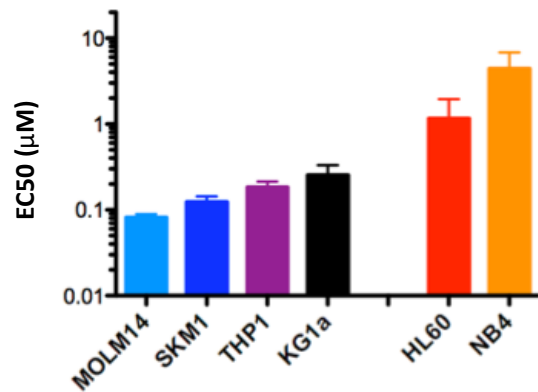


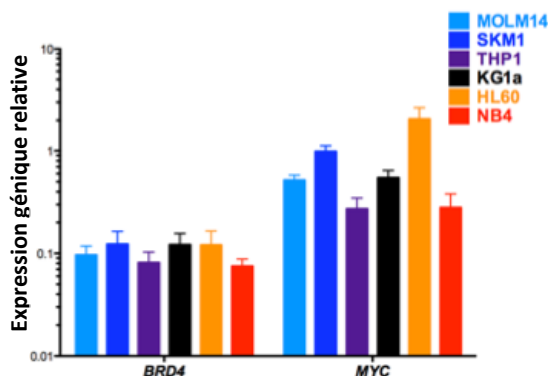
Figure 1(B)



(A) Effet anti-prolifératif d'OTX-015 en monothérapie sur 6 lignées de LAM, en utilisant le bleu d'Alamar après 72h d'incubation avec la drogue étudiée. % de viabilité cellulaire par rapport aux cellules témoins non traitées. Point, *moyenne de 3 runs indépendants*; Barre d'erreur, *écart-type à la moyenne*; Echelle : *Log10*

(B) Représentation des EC50 (concentration inhibant 50% de la viabilité cellulaire) des d'OTX-015 dans 6 lignées en monothérapie par OTX-015. Point, *moyenne de 3 runs indépendants*; Barre d'erreur: *écart type à la moyenne*

Figure 2 : Expression génique de *BRD4* et *MYC* dans différentes lignées cellulaires de LAM



Le niveau d'expression génique des cibles moléculaires d'intérêt, déterminé par qRT-PCR et normalisé par rapport à un gène de référence, *YWHAZ* dans 6 lignées préétablies de LAM.

Point, *moyenne de 3 runs indépendants*; Barre d'erreur : *écart type à la moyenne*; Echelle : *Log10*

2. Expression génique de *BRD4* et *MYC* dans différentes lignées cellulaires de LAM

Sachant qu'OTX-015 est un iBRD nous avons voulu savoir s'il existait une corrélation entre l'expression génique relative de *BRD4* (une des cibles principales des iBRD) et *MYC* puisque ce proto-oncogène est également une cible majeure des iBRD. Nous avons donc effectué une analyse d'expression génique sur les 6 lignées cellulaires de LAM (**Figure 2**). Peu de différences d'expression entre les différentes lignées a été observée pour *BRD4*. Cependant l'expression génique de *MYC* présente une variabilité un peu plus importante pour les 6 lignées. La plus grande différence se situe entre *THP1* et *HL60* (~facteur 10).

Cette analyse d'expression génique par qRT-PCR n'a donc révélé aucune corrélation entre la sensibilité à OTX-015 et le niveau d'expression de *MYC* et *BRD4* dans les différentes lignées cellulaires de LAM (**Figure 2**). Ces résultats suggèrent qu'il existe d'autres mécanismes régulateurs de la réponse aux iBRD dans les cellules de LAM.

3. Analyse Transcriptomique

Nous avons donc émis l'hypothèse que d'autres gènes seraient susceptibles d'être responsables du caractère sensible ou résistant des cellules de LAM. Pour analyser les autres mécanismes régulateurs nous avons entrepris une analyse transcriptomique dans les deux lignées cellulaires sélectionnées précédemment : *MOLM14* et *NB4*. Cette analyse permet de distinguer les gènes qui sont « up-régulés » ou « down-régulés » après traitement par OTX-015 (**Figure 3A**).

Nous nous sommes particulièrement intéressés à deux catégories de gènes :

- a) Les « early responders » ER : gènes dont le niveau d'expression varie dès 1h de traitement.
- b) Les gènes différentiels GD : gènes dont le niveau d'expression varie de manière inverse entre les deux lignées cellulaires.

Ici, le diagramme de VENN nous permet d'identifier le nombre de gènes qui varient de manière statistiquement significative dans les deux lignées cellulaires en présence d'OTX-015 à 250nM.. Ces deux lignées ont 753 gènes en commun qui varient de manière identique sur un total de 4740 gènes, soit environ 16% de la totalité des gènes. Nous avons ensuite analysé la variation des gènes en présence d'OTX-015 à différents time-point : 1heure, 4heures, et 24heures d'incubation.

Dans la première figure, en partant de la gauche, nous voyons les variations de gènes au bout de 1h de traitement avec OTX-015. Peu de gènes varient de manière précoce (15 gènes) dans les deux lignées cellulaires. Au bout de 4h de traitement, un total de 1110 gènes varient dans

les deux lignées. Au bout de 24h de traitement, 3100 gènes varient pour les *MOLM14* contre 1287 pour les *NB4*. Nous remarquons ainsi que plus le temps augmente, plus le nombre de gènes dont le niveau d'expression varie de manière significative augmente au sein des deux lignées.

Figure 3 : Analyse transcriptomique dans deux lignées cellulaires de LAM

Figure 3A

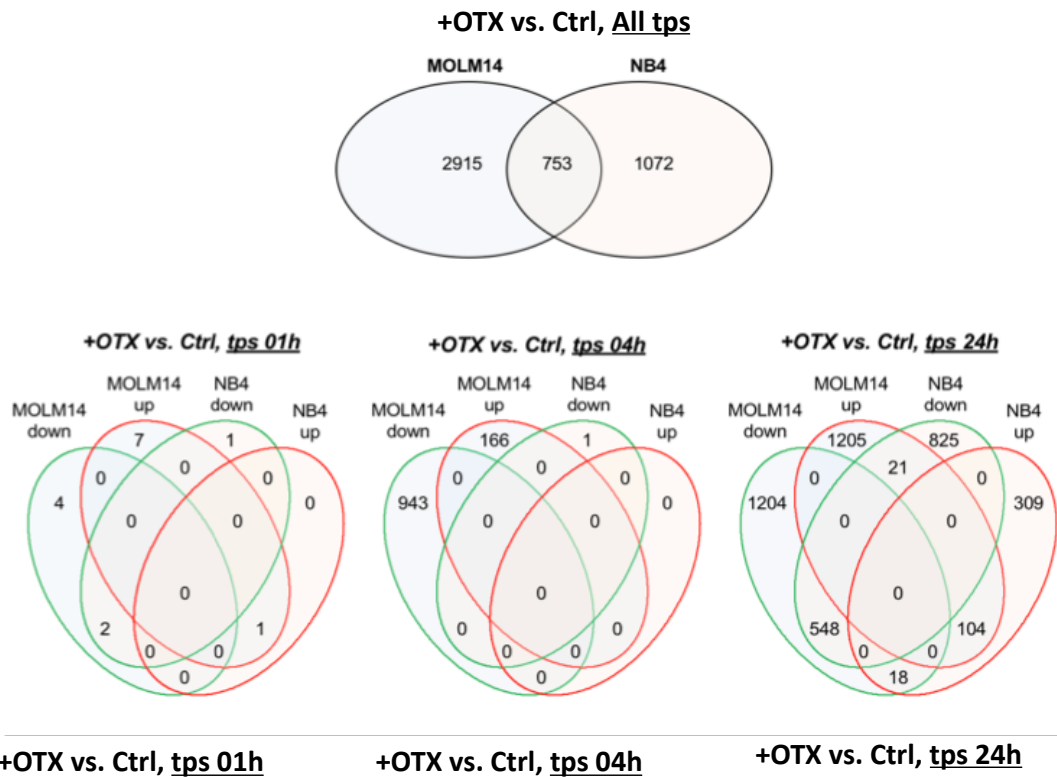


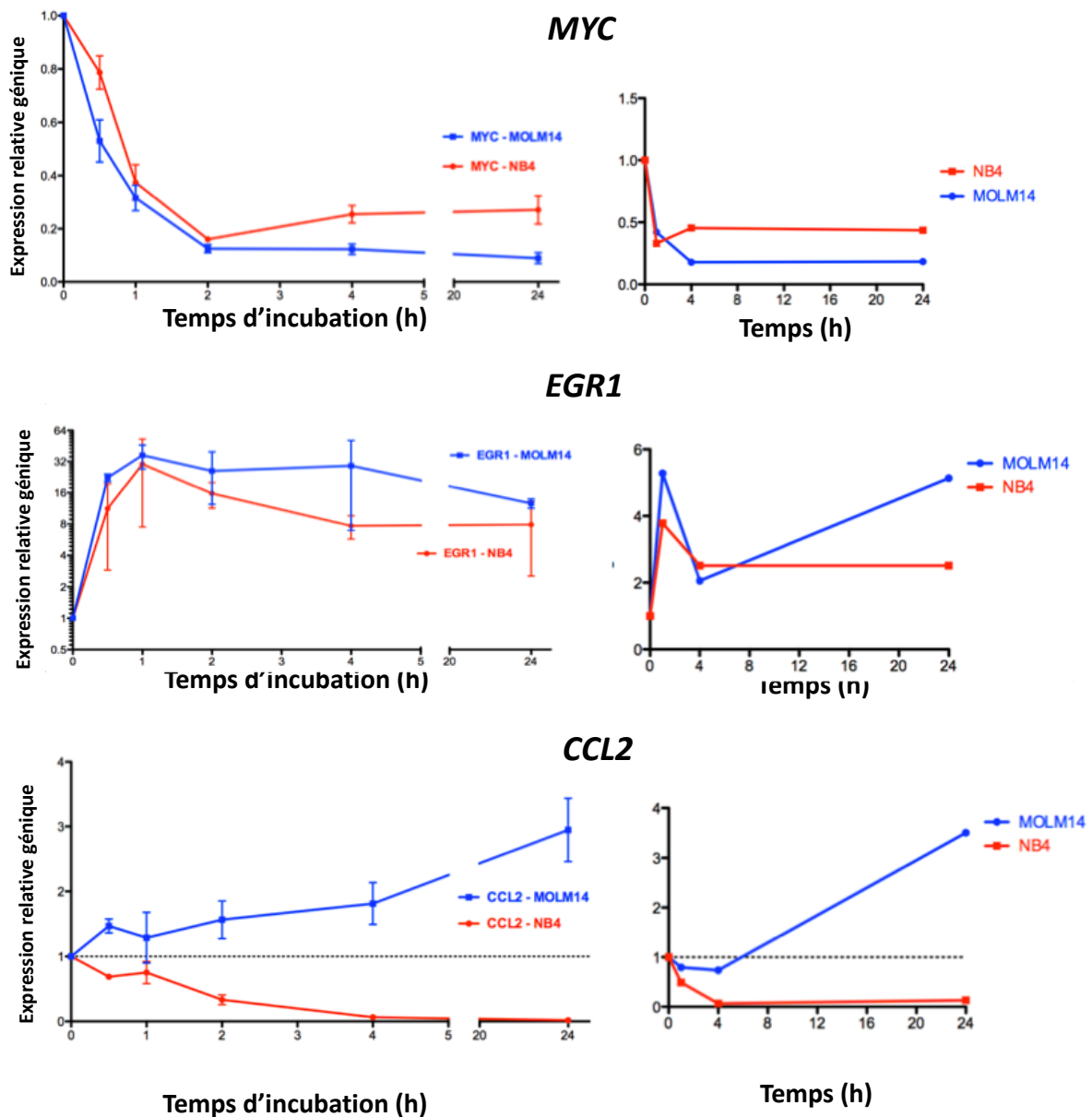
Diagramme de VENN représentant les gènes up-régulés (rouge) et down-régulés (vert) dans les cellules sensibles (MOLM14) et résistantes (NB4) suite au traitement avec OTX-015 à 250nM. Le diagramme du haut représente la totalité des gènes dont le niveau d'expression est significativement altéré. De gauche à droite les diagrammes représentent les gènes dont le niveau d'expression est significativement altéré au bout d'1, 4 et 24 heures d'incubation.

Condition d'analyse : $p < 0,05$, $q < 0,25$, $|FC| > 1,5$, 2 runs effectués et validés par qRT-PCR

Suite à ces analyses transcriptomiques, nous nous sommes attachés à valider nos résultats par RT-PCR quantitative (**Figure 3B**). Dans un premier temps, nous nous sommes principalement intéressés à 2 gènes ER : *EGR1* ainsi que *MYC*. Les données transcriptomiques sont représentées par le graphe de droite, tandis que les résultats des expériences de validation par qRT-PCR sont représentés par les graphes de gauche. Les 2 gènes précoces *MYC* et *EGR1*, montrent des effets très similaires entre les deux lignées *MOLM14* et *NB4*. Le niveau d'expression de *MYC* diminue de plus de 80% dès 2 heures de traitement et à l'inverse le niveau d'expression d'*EGR1* augmente d'un facteur 30 dès 1 heure. Nous avons par ailleurs obtenu des résultats similaires pour 5 autres gènes ER (*TXNIP*, *MRRF*, *A20*, *ZNF217* et *ZNF689* – données non présentées).

Nous avons identifié par ailleurs de nombreux gènes qui sont modulés de façon différentielle (d'où le nom de gènes différentiels GD) entre la lignée cellulaire *sensible* et *résistante* à long terme (24 heures) : 21 sont « up régulés » dans les *MOLM14* alors qu'ils sont « down régulés » dans les *NB4*, et à l'inverse, 18 sont « up régulés » dans les *NB4* alors qu'ils sont « down régulés » dans les *MOLM14*. Nous avons sélectionné un gène différentiel GD : *CCL2*, qui montre des effets inverses entre les deux lignées *MOLM14* et *NB4* en présence traitement par iBRD. Le niveau d'expression *CCL2* augmente dans les *MOLM14* d'un facteur 3 et diminue dans les *NB4* de presque 100% au bout de 24 heures. Nous avons par ailleurs obtenu des résultats similaires pour 10 autres DG (*BCL2*, *FGR*, *G LI2*, *VASP*, *DDIT4*, *LRP6*, *CDC6*, *HELLS*, *BLM*, et *FEN1* - données non présentées).

Figure 3B



(B) Expression génique relative dans deux lignées de LAM étudiées après traitement par OTX-015
Premier graphe (gauche) : confirme par qRT-PCR les données transcriptomiques et qRT-PCR normalisée par rapport à un gène de référence, *YWHAZ* dans les 2 lignées établies de LAM (MOLM14 et NB4).
Deuxième graphe (droite) : données transcriptomiques du niveau d'expression génique de gènes d'intérêt

Point : moyenne de 3 runs indépendants; Barre d'erreur, écart type à la moyenne; Echelle : linéaire sauf *EGR1* graphe de gauche : \log_2

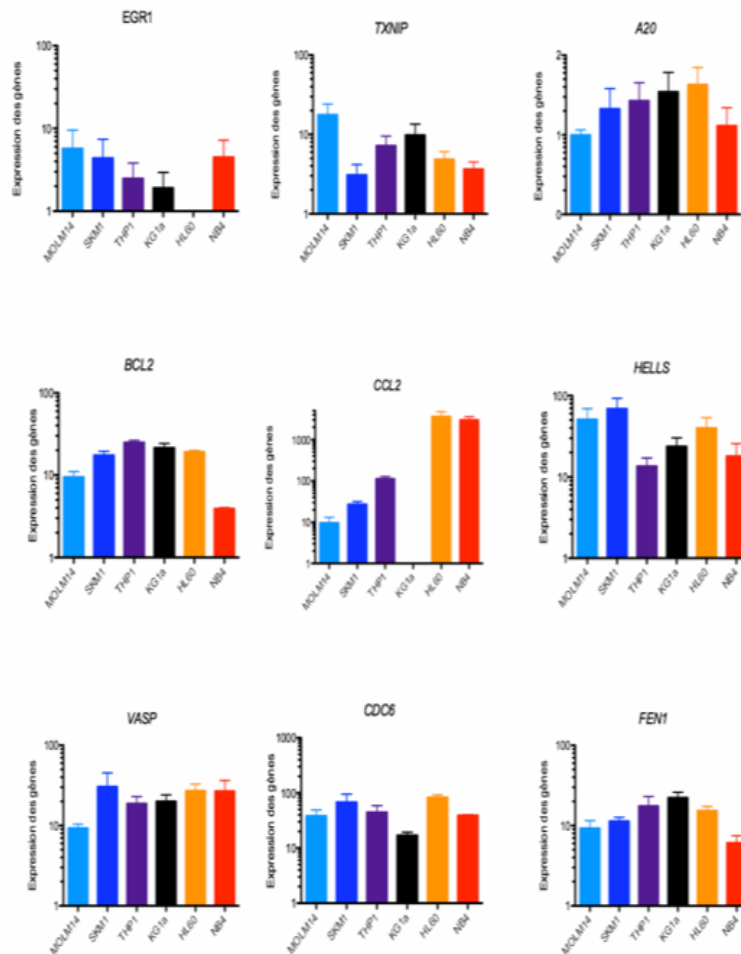
Nous nous sommes par la suite intéressés de plus près aux ER et aux GD pour voir s'il y avait une corrélation potentielle entre leur niveau d'expression et la sensibilité des cellules de LAM aux iBRD (**Figure 4**). Plus précisément nous avons choisi de représenter 3 ER (*EGR1*, *TXNIP*, *A20*), représentés par les 3 graphes du haut, et 6 GD (*BCL2*, *CCL2*, *HELLS*, *VASP*, *CDC6*, et *FEN1*), qui sont représentés par les 6 graphes du bas, que nous avons estimé être les plus pertinents en fonction de leur données transcriptomiques et de leur confirmation par qRT-PCR. Le niveau d'expression génique de ces 9 gènes a été rapporté au sein des 6 lignées de LAM. Certains ne présentent pas de variation entre les différentes lignées tel que *EGR1* ou *VASP*, tandis que d'autre montre un plus grande variabilité tel que *CCL2*. Il y a donc aucune corrélation visible entre le niveau d'expression et la sensibilité sauf pour *CCL2*. Ce gène est peu ou pas (*KG1a*) exprimé dans les lignées *sensibles* alors qu'il est fortement exprimé dans les lignées *résistantes*. Il existe une différence d'un facteur 30 entre la lignée la plus *sensible* et la lignée la plus *résistante*. Nous avons alors émis l'hypothèse que *CCL2* pouvait jouer un rôle dans les résistances aux iBRD.

4. Rôle de CCL2 combiné à OTX-015 dans différentes lignées cellulaires de LAM

Nous avons regardé de plus près les ER et les GD pour voir s'il y avait une corrélation potentielle entre leur niveau d'expression et la sensibilité des cellules de LAM aux iBRD. Plus précisément nous avons choisi de représenter 3 ER (*EGR1*, *TXNIP*, *A20*), représentés par les 3 graphes du haut, et 6 GD (*BCL2*, *CCL2*, *HELLS*, *VASP*, *CDC6*, et *FEN1*), qui sont représentés par les 6 graphes du bas, que nous avons estimé être les plus pertinents en fonction de leur données transcriptomiques et de leur confirmation par qRT-PCR. Le niveau d'expression génique de ces 9 gènes a été rapporté au sein des 6 lignées de LAM. Certains ne

présentent pas de variation entre les différentes lignées tel que *EGR1* ou *VASP*, tandis que d'autre montre un plus grande variabilité tel que *CCL2*. (Figure 4)

Figure 4 : Niveau d'expression de 9 gènes au sein des 6 lignées de LAM



Niveau d'expression génique de 9 gènes d'intérêt (*EGR1*, *TXNIP*, *A20*, *BCL2*, *CCL2*, *HELLS*, *VASP*, *CDC6*, *FEN1*), déterminé par qRT-PCR et normalisé par rapport à un gène de référence, *YWHAZ* dans les 6 lignées établies de LAM

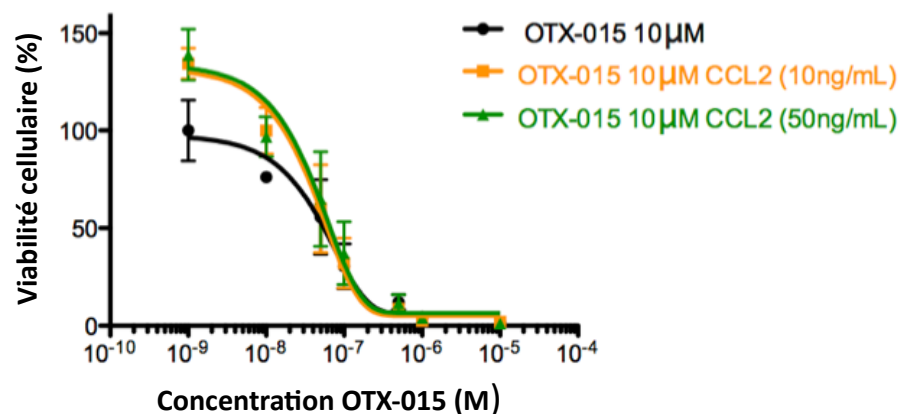
Point, moyenne de 3 runs indépendants ; Barre d'erreur, écart type) la moyenne; Echelle : log₁₀

Il y a donc aucune corrélation visible entre le niveau d'expression et la sensibilité sauf pour *CCL2*. Ce gène est peu ou pas (*KG1a*) exprimé dans les lignées *sensibles* alors qu'il est fortement exprimé dans les lignées *résistantes*. Il existe une différence d'un facteur 30 entre la lignée la plus *sensible* et la lignée la plus *résistante*. On a alors émis l'hypothèse que *CCL2* pouvait jouer un rôle dans les résistances aux iBRD.

En partant de cette hypothèse, nous avons ajouté du *CCL2* au milieu de culture cellulaire des *MOLM14* traitées par OTX-015 10 μ M dans le but de rendre résistante les *MOLM14*. Ceci aurait pour but de démontrer que *CCL2* joue bien un rôle dans les mécanismes de résistances au sein des lignées cellulaires.

Cependant, l'ajout de *CCL2* dans le milieu cellulaire augmente le pourcentage de viabilité des cellules *MOLM14* de 20% mais n'altère pas de manière significative leur sensibilité à OTX-015 (**Figure 5**). Ces résultats suggèrent donc que *CCL2* n'est pas directement impliqué dans la régulation de la réponse aux iBRD dans les cellules de LAM.

Figure 5 : Impact de CCL2 sur la sensibilité des cellules MOLM14 à OTX-015



Effet anti-prolifératif par analyse de viabilité cellulaire (%) dans la lignée sensible (MOLM14) en utilisant le bleu d'Alamar après 72h d'incubation avec OTX-015 à 10 μ M avec ou sans *CCL2* à 10ng/mL puis 50ng/mL. *CCL2* : gène différentiel ajouté au milieu de culture cellulaire contenant les MOLM14 dans le but de diminuer leur sensibilité.

, Point: moyenne de 3 runs indépendants; Barre d'erreur : écart type à la moyenne; Echelle : linéaire

5. Combinaison thérapeutique entre OTX-015 et ABT-263

Les expériences de validation de données de transcriptomiques ont révélé que le niveau d'expression des gènes ER variait de manière similaire dans les lignées *sensibles* et *résistantes*, ces résultats suggèrent que les mécanismes de résistance se situent en aval de ces événements précoces. L'étude de données bibliographiques suggère par ailleurs que la diminution du niveau d'expression de *MYC* d'une part et l'augmentation du niveau d'*EGR1* d'autre part doit conduire à une induction de l'apoptose via l'activation des protéines pro-apoptotique BIM / PUMA (figure du dessous page 51) (11). Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'activation de la voie apoptotique BIM / PUMA était défaillante dans les lignées résistantes. Afin de tester cette hypothèse nous avons réalisé des expériences de combinaisons entre l'OTX-015 et un mimétique de BIM : ABT-263 (Navitoclax).

L'étude pharmacologique au sein des *NB4* montre une potentialisation d'action entre une gamme de concentration d'OTX-015 et ABT-263. Le pourcentage de viabilité cellulaire entre OTX-015 et son association à ABT-263 est diminué au profit de l'association des deux molécules (**Figure 6A**). En cohérence avec ces résultats l'EC50 présente une diminution de près de 60% entre OTX-015 utilisé en monothérapie et associé à ABT-263 (**Figure 6B**). Cela montre donc qu'il est possible de « resensibiliser » la lignée résistante *NB4* à l'OTX-015 en introduisant un mimétique BIM. L'impact d'ABT-263 joue probablement un rôle sur la sensibilisation des cellules *NB4* à OTX-015.

Figure 6 : Impact d'ABT-263 sur la sensibilisation des cellules NB4 à OTX-015

Figure 6 (A)

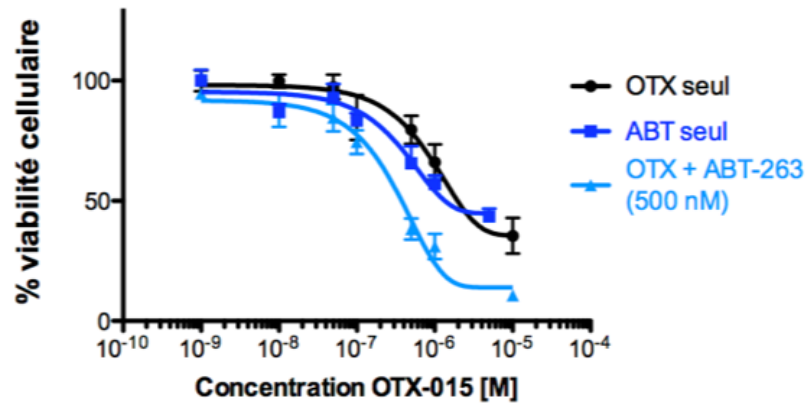
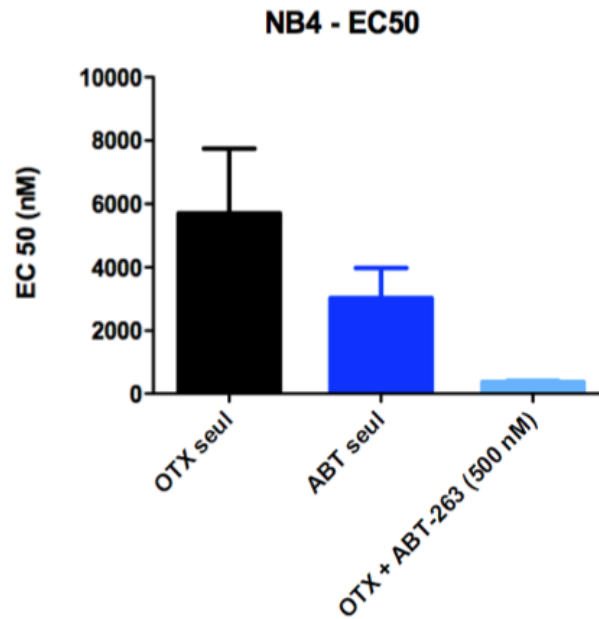


Figure 6 (B)



(A) Effet anti-prolifératif en combinant OTX-015 à l'ABT-263 (Navitoclax) sur la NB4 en utilisant le bleu d'Alamar après 72h d'incubation. Le % de viabilité cellulaire en présence et en absence d'ABT-263 à 500nM

Point: *moyenne de 3 runs indépendants*; Barre d'erreur: *écart-type à la moyenne*; Echelle: *linéaire*

(B) Représentation des EC50 des OTX-015 seul, OTX-015 en présence d'ABT-500nM, et ABT seul dans la lignée NB4.

Point: *moyenne de 3 runs indépendants*; Barre d'erreur: *écart type à la moyenne*; Echelle: *Linéaire*

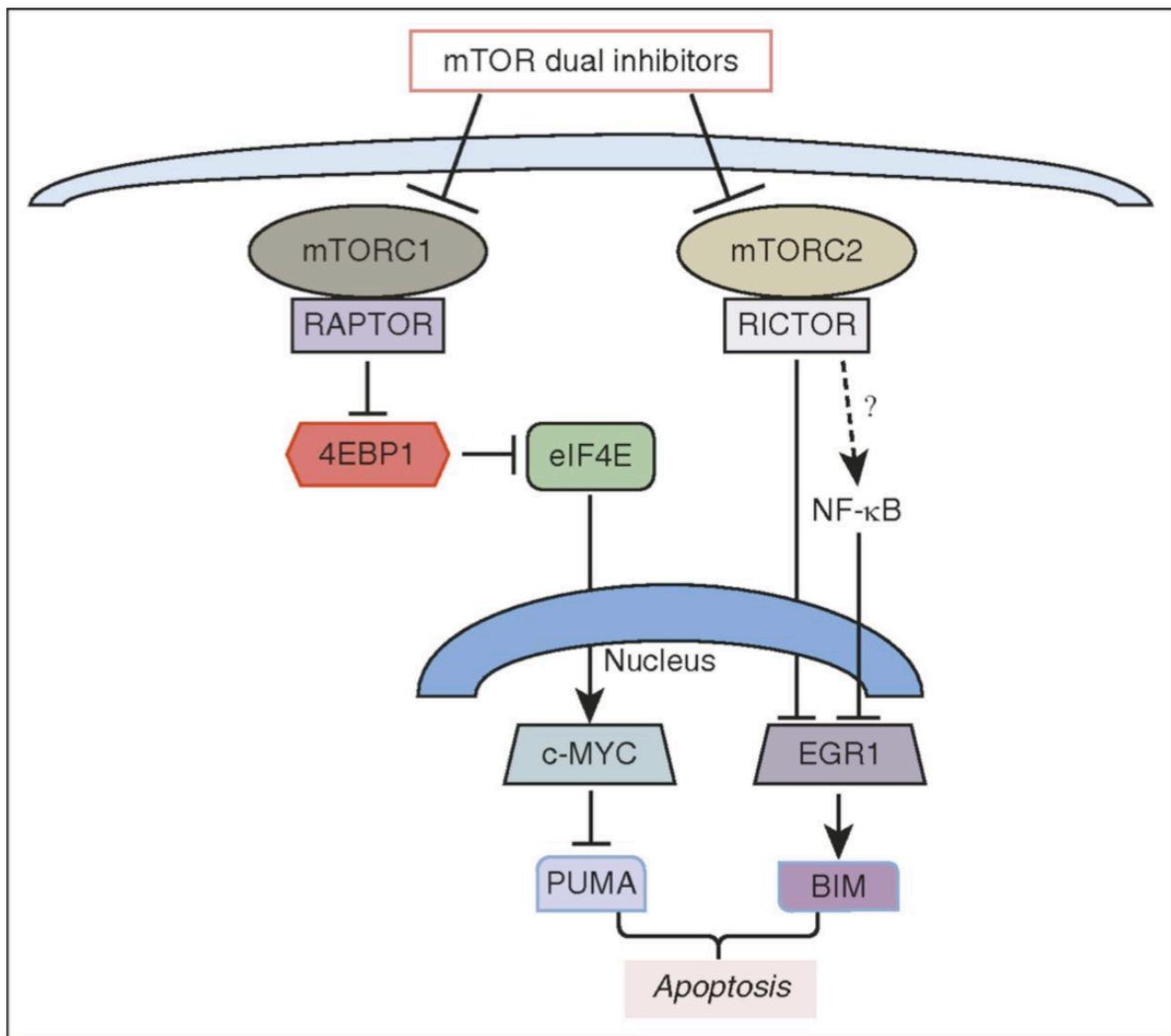


Image extraite de l'article : 4EBP1/c-MYC/PUMA and NF-κB/EGR1/BIM pathways underlie cytotoxicity of mTOR dual inhibitors in malignant lymphoid cell ; Yun Et. Al, Blood (2016)

D. Discussion

Les LAM représentent à ce jour des hémopathies malignes relativement bien guéries puisqu'on compte 70 à 90% de rémission. Cependant lorsque les LAM des patients deviennent résistantes aux traitements, que ces résistances soient innées ou acquises, l'évolution vers un pronostic fatal est rapide. Ceci représente un réel enjeu de santé public en l'absence de nouvelles lignes de traitements puisqu'on compte un taux de survie globale de 10-20% dès l'apparition d'une rechute avec résistance (12).

Les LAM sont des hémopathies présentant des pronostics hétérogènes dû fait de leur hétérogénéité moléculaire importante. Cette hétérogénéité signifie que de nombreuses mutations en agissant sur leur large spectre moléculaire peuvent faire varier de nombreux gènes. Afin d'agir sur la régulation épigénétique entraînant par la suite un rétablissement de ces anomalies moléculaires, le recours aux épidrugs semble être, à ce stade, incontournable. Ces médicaments ciblent des enzymes spécifiques appartenant à un des nombreux complexes de régulation de l'expression des gènes. Les iBRD appartiennent à cette famille de médicaments et agissent sur la régulation épigénétique en ciblant, en grande partie, les protéines BET : BRD2, BRD3, BRD4, et BRDT.

Plusieurs iBRD sont actuellement en cours de développement clinique dans de nombreux cancers dont les hémopathies tel que les leucémies aiguës (13). De même, plusieurs études ont mis en avant les bienfaits d'associer les épidrugs à d'autres traitements anticancéreux utilisés en routine. Ces associations permettent d'améliorer la prise en charge du patient par une thérapie plus adaptée et qui obtiendrait des résultats présentant plus de bénéfices pour le patient. Plusieurs études où le bénéfice thérapeutique d'associer une épidrugs et une thérapie conventionnelle ont déjà été rapportées comme pour le cancer du pancréas (14), de la prostate (15), ou du poumon (16). Toutes ces études proposent un fort rationnel à développer ces thérapies.

Ainsi, il paraît crucial d'identifier des marqueurs moléculaires de réponse au traitement pour pouvoir proposer un traitement personnalisé. Dans notre étude, nous avons cherché à élucider les mécanismes moléculaires régissant la réponse aux iBRD, une nouvelle classe d'agents anticancéreux épigénétiques en cours d'essais cliniques sur des patients atteints de LAM.

Dans ce contexte actuel, l'approche que nous proposons pourrait susciter un réel intérêt.

Tout d'abord, nous avons émis l'hypothèse qu'élucider les mécanismes moléculaires des iBRD en comparant les différentes lignées cellulaires, *Résistantes* et *Sensibles*, au sein des LAM pourrait nous aider à comprendre et ainsi maîtriser ces mécanismes.

Notre étude *in vitro* a donc comparé l'efficacité des iBRD dans des lignées *sensibles* et *résistantes*. Nous avons comparé le taux d'expression de leur cible thérapeutique directe *BRD4* et indirecte *MYC* et nous avons mis en évidence une absence de corrélation entre leur niveau d'expression et la sensibilité aux iBRD (**Figure 2**). Ceci nous a conduit à rechercher d'autres cibles pouvant entraîner des résistances aux iBRD.

Les analyses transcriptomique que nous avons effectuées nous ont permises de classer les variations de gènes, en présence d'OTX-015, dans les deux lignées cellulaires MOLM14 et NB4 en deux catégories principales : Les Early Responders ER (gènes dont le niveau d'expression varie dès 1h de traitement) et les Gènes Différentiels GD (gènes dont le niveau d'expression varie de manière inverse entre les deux lignées cellulaires). Les ER traduisent l'apparition des événements précoces. Ces derniers sont très similaires entre la lignée cellulaire sensible MOLM14 et résistante NB4. Ceci suggère que les différences transcriptionnelles entre les deux lignées cellulaires vont s'effectuer en aval (**figure 3A**).

Parmi les GD, seul *CCL2* montrait une corrélation entre son niveau d'expression et la réponse aux iBRD. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'ajout du gène *CCL2* dans le milieu de culture contenant la lignée *sensible* MOLM14 rendrait résistante. Cependant, nos résultats ont montré que *CCL2* favorisait la prolifération des cellules de LAM (**figure 5**) mais n'influe pas sur la résistance aux iBRD.

Ceci nous a donc orienté sur la possibilité d'un mécanisme de résistance se situant plus en aval. En effet, les événements précoces sont similaires dans les deux lignées : *sensible* ou *résistante*, notamment en ce qui concerne *MYC* et *EGR1*. Ces changements d'expression doivent normalement conduire à l'apoptose. L'apoptose est bien présente dans la lignée *sensible* mais pas dans la lignée *résistante*. C'est pour cela que nous avons émis l'hypothèse d'associer un iBRD (OTX-015) à un mimétique de BIM (ABT-263) afin que ce dernier puisse restaurer la sensibilité de la lignée aux iBRD et ainsi conduire la voie de signalisation à l'apoptose.

Cette association montre alors une potentialisation d'action entre OTX-015 et ABT-261 (**Figure 7**).

Cette découverte ouvre des perspectives thérapeutiques majeurs dans les LAM. On pourrait donc envisager d'utiliser ce type de combinaison en clinique pour les traitements des LAM en rechutes. Des essais précliniques similaires ont déjà été autorisés concernant d'autres cancers, tels que le gliome malin (17), ou encore les hémopathies lymphoïdes (18) mais jamais pour les LAM.

E. Perspectives

Notre étude a permis la mise au point d'un test permettant de prédire la réponse aux iBRD en analysant le niveau d'expression des gènes *MYC* et *EGR1*. Ce test permet de nous orienter vers une information importante qui est reproductible, facile à réaliser en routine, rapide et qui nous permettra d'évaluer l'efficacité de nouveaux iBRD.

À l'heure des thérapies personnalisées, ce nouveau test pourrait orienter les patients souffrant de LAM vers des thérapies plus adaptées à leur type de LAM. Les profils moléculaires très hétérogènes de ces onco pathologies nécessitent un renseignement adapté sur l'éligibilité à un traitement spécifique. Ceci permettra d'assurer une meilleure prise en charge de la LAM des patients.

Parallèlement à ce projet notre équipe de recherche a participé à l'élaboration de « inhouse drugs ». Notre équipe de recherche a permis une élaboration de 7 molécules pouvant être candidates à nos futures recherches. Ces molécules, initialement testées par test cytotoxique, ont pu bénéficier d'un test *in vitro* permettant le renseignement sur leurs caractéristiques biologiques à agir sur les iBRD des différentes lignées cellulaires de LAM.

La molécule, qui présente à l'heure actuelle, la meilleure fonctionnalité d'iBRD est la « 5464 ». Cette dernière continuera d'être améliorée au fur et à mesure au sein de notre laboratoire. Ceci permettra également de mettre au point de nouveaux tests d'efficacité de traitement par le biais d'identification d'évènements précoces qui seront induites par de nouvelles molécules.

II) Matériel et méthodes

1. Les lignées cellulaires

Nom de la lignée	Classification (diagnostic patient)	Milieu de culture
MOLM14	Leucémie monocyttaire aiguë	MEM + 10% FCS
THP1	Leucémie monocyttaire aiguë	RPMI + 10% FCS
KG1a	Leucémie myélocytaire aiguë	IMDM + 20% FCS
SKM1	Leucémie myéloïde aiguë	RPMI + 20% FCS
HL60	Leucémie promyélocytaire aiguë	IMDM + 20% FCS
NB4	Leucémie promyélocytaire aiguë	RPMI + 10% FCS

FCS : Fœtal calf sérum

On notera que les lignées utilisées pour le reste des expériences (*NB4* et *MOLM14*) ont été cultivées en présence 1% de pénicilline-streptavidine, et 1% de L-Glutamine (*MOLM14*) ou 1% de pyruvate de sodium (*NB4*). Les deux lignées cellulaires finales (*MOLM14* et *NB4*) ont été maintenues dans une étuve à 37°C, en atmosphère humide et enrichie à 5% de CO₂. L'ensemencement des cellules a été effectué après lavage au PBS (Phosphate Buffered Saline, 1X).

La récupération de 10 million de cellules ont été resuspendues dans 10mL de milieu dans une T25 culture flask.

2. Composés

Molécules utilisées :

- **OTX – 015** : 2-[(6S)-4-(4-Chlorophenyl)-2,3,9- trimethyl-6H-thieno[3,2-f][1,2,4]triazolo-[4,3-a] [1,4] diazepin-6-yl]-N-(4-hydroxyphenyl) acetamide)
Molécule de référence, dans nos expériences.
- **RVX – 208** : 2-(4-(2-Hydroxyethoxy)-3,5-dimethylphenyl)-5,7-dimethoxyquinazolin-4(3H)-one
- **ABT – 263 ou navitoclax** : 4-(4-{[2-(4-Chlorophenyl)-5,5-dimethyl-1-cyclohexen-1-

yl]methyl}-1-piperaziny]-N-[(4-{{(2R)-4-(4-morpholinyl)-1-(phenylsulfanyl)-2-butanyl]amino}-3-[(trifluoromethyl)sulfonyl]phenyl)sulfonyl]benzamide

- Molécules « **inhouse** » 5292, 5386, 5392, 5458, 5459, 5463, 5464 synthétisées sur site par l'équipe iSCB.

Toutes ces molécules ont été solubilisées dans du DMSO (solution stock à 10 – 50uM) et conservée à -20°C Les cellules contrôle ont été incubées avec du DMSO à 0,1%.

3. Méthode analyse transcriptomique

Les analyses de transcriptomiques par puces Affymetrix (ou DNA microarray) permettent d'identifier l'ensemble des gènes dont le niveau d'expression est altéré (diminué ou augmenté) par un traitement donné. Les lignées *MOLM14* et *NB4* ont été traitées à l'identique par un iBRD (OTX-015) à 250nM en, 1heure, 4heures et 24 heures puis un contrôle au même dosage de DMSO a été effectué. L'extraction d'ARN a été réalisée avec le Kit RNeasy Plus du laboratoire (*Qiagen*). Ces résultats obtenus ont donc ensuite été validés par qRT-PCR. Les analyses transcriptomiques ont été réalisées par la plateforme d'oncogénétique moléculaire à l'aide du bit et les échantillons ont été hybridés sur puces Affymetrix HUGENE 2.0 (*Lifetechnologies*) Genechip WT Plus reagent (*Lifetechnologies*).

4. RT-PCR quantitative

L'objectif de la qRT-PCR (quantitative Real Time – Polymerase Chaine Reaction) est de déterminer le niveau d'expression de gènes d'intérêt dans des différentes lignées établies de LAM. Différentes étapes sont nécessaires : l'extraction d'ARN (acide ribonucléique) totaux des différentes lignées cellulaires a été effectuée par purification sur colonne d'affinité en utilisant le kit RNeasy Plus (*Qiagen*). Les ARN extraits ont été quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 nm au spectrophotomètre, Nanodrop[®] (*Thermo Scientific*). La reverse transcription a été effectuée dans un second temps à l'aide du kit OneScript[®] Plus cDNA Synthesis Kit (*abm*). Elle avait pour objectif de synthétiser 1µg d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'1µg d'ARN. La qRT-PCR constituait la dernière étape, elle permettait l'amplification de l'ADNc et était effectuée à l'aide d'amorces spécifiques pour les gènes d'intérêt et le gène housekeeper *YWHAZ* (KiqCstart Primer ; *Sigma*). La qRT-PCR a été effectuée avec le kit iQTM SYBR[®] Green Supermix (*Bio-Rad*) basé sur la technologie SYBR[®] Green, molécule fluorescente permettant de détecter les produits de PCR en se liant à l'ADN double brin. L'appareil CFX96 Touch[®]

(Bio-Rad) a été utilisé pour la détection et la mesure de fluorescence. Les données ont été analysées par le biais des logiciels CFXMaestro[®] et GraphPad[®].

5. Test de cytotoxicité

L'objectif est de tester l'effet cytotoxique induite par différents agents thérapeutiques seuls ou en association. L'analyse des changements d'expression des gènes dans les lignées *MOLM14* et *NB4* ont été faites en présence d'iBRD pendant 30min, 1heure, 2heures, 4heures, et 24heures avec extraction d'ARN. La cytotoxicité des traitements a été déterminée par colorimétrie. Ce test repose sur l'utilisation de l'Alamar Blue[®] (*i.e* Résazurine, 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10 oxide), un composé bleu (forme oxydée) que seules les cellules vivantes métabolisent en résofurine (forme réduite), de couleur rose par le biais d'enzymes mitochondriales (*i.e* NADPH et NADPH déshydrogénase). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits (à une concentration de 6000 cellules par puits pour les *MOLM14* et 7500 pour les *NB4*) et traitées avec des concentrations croissantes de molécules thérapeutiques OTX-015, ABT-263, et *CCL2*. Après 72h d'incubation, 25 µl d'Alamar blue ont été ajoutés dans chaque puits. Après 5h d'incubation, l'absorbance des plaques a été lue au spectrophotomètre *Pherastar FS*, (*BMG Labtech*) à 570 et 595 nm. Les données ont été analysées par le biais du logiciel GraphPad[®] Prism version 6.0 (*GraphPad Software, Inc*) afin de déterminer les EC50 (concentration nécessaire pour inhiber 50% de la viabilité cellulaire à 72h).

6. Analyses statistiques

Chacune de ces expériences a été répétée de façon indépendante au moins 3 fois et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad en utilisant le test de Student (test bilatéral pour des échantillons indépendants ou échantillons appariés en fonction des expériences)

IV) Références bibliographiques

- 1) http://www.medecine.ups-tlse.fr/dcem3/module10/laurent/162_leucemies.pdf
- 2) Epidémiologie des leucémies aiguës Marc Maynadié, Xavier Troussard de Elsevier Masson SAS (2015)
- 3) <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/hematologie-et-pathologie-generale/64-enseignement-de-lhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/classification-oms-2016-des-maladies-hematologiques-malignes/62-classification-oms-des-leucemies-aigues-myeloides>
- 4) http://sfh.hematologie.net/fr/telechargements/Livret_Patient/leucemieaiguemyeloblastique.pdf
- 5) <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-traitements/Chimiotherapie>
- 6) https://www.vidal.fr/Medicament/cyclophosphamide_sandoz_1000_mg_pdre_p_sol_inj_p_perf-162522.htm
- 7) Pharmamémo Hématologie édition (2017)
- 8) https://www.jle.com/download/hma-289321-leucemies_aigues_de_ladulte-JohnLibbey-W4aiZX8AAQEAAEtZLQMAAAAAA-u.pdf
- 9) <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0186570>
- 10) H.Hermann Et. Al Small-molecule inhibition of BRD4 as a new potent approach to eliminate leukemic-stem- and progenitor cells in acute myeloid leukemia (AML). *Oncotarget* (2012)
- 11) Marie-Magdelaine Coudé. Et al. BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells. *Oncotarget* (2015)
- 12) Lu R Et al. Investigational BET bromodomain protein inhibitors in early stage clinical trials for acute myelogenous leukemia (AML). *Front Oncol* (2017)
- 13) Veenstra MJ Et al. Epidrug-induced upregulation of functional somatostatin type 2 receptors in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Oncotarget* (2016)
- 14) Warren Fiskus, Sunil Sharma, Jun Qi, et al. Highly Active Combination of BRD4 Antagonist and Histone Deacetylase Inhibitor against Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. *Mol Cancer Ther* (2014)
- 15) Ishida CT Et al. BH3-mimetics and BET-inhibitors elicit enhanced lethality in malignant glioma. *Oncotarget* (2017)

- 16) [http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=4131&path\[\]=9114](http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=4131&path[]=9114)
- 17) Duruisseaux Michael, Esteller Manel Et al. Lung cancer epigenetics: from knowledge to applications. *Seminars in Cancer Biology* (2017)
- 18) Georg E. Winter Et al. BET Bromodomain Proteins Function as Master Transcription Elongation Factors Independent of CDK9 Recruitment. *Molecular Cell* (2017)
- 19) <http://www.edimark.fr/correspondances-onco-hematologie/therapie-epigenetique-nouvelle-generation-mecanismes-action-inhibiteurs-proteines-bet>
- 20) Lee W ET al. Reduction of two histone marks, H3k9me3 and H3k27me3 by epidrug induces neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Cell Biochem* (2018)
- 21) Marie-Magdelaine Coudé. Et al. BET inhibitor OTX015 targets BRD2 and BRD4 and decreases c-MYC in acute leukemia cells. *Oncotarget* (2015)
- 22) Tim-Michael Decker. *Et al.* Transcriptome analysis of dominant-negative Brd4 mutants identifies Brd4-specific target genes of small molecule inhibitor JQ1. *Scientific reports* (2017)
- 23) Jessica E. et al. Bolden Inducible In Vivo Silencing of Brd4 Identifies Potential Toxicities of Sustained BET Protein Inhibition. *National institutes of health* (2014)
- 24) Alexandre Puissant Et al. Targeting MYCN in Neuroblastoma by BET Bromodomain Inhibition. *Cancer discovery* (2013)
- 25) Roe and Vakoc Et al. The Essential Transcriptional Function of BRD4 in Acute Myeloid Leukemia. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (2016)
- 26) Warren Fiskus, Sunil Sharma, Jun Qi, Et al. Highly Active Combination of BRD4 Antagonist and Histone Deacetylase Inhibitor against Human Acute Myelogenous Leukemia Cells. *Mol Cancer Ther* (2014)
- 27) Amanda Nordigården Et al. BH3-only protein Bim more critical than Puma in tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis of human leukemic cells and transduced hematopoietic progenitors carrying oncogenic FLT3. *Blood Journal* (2016)
- 28) <http://www.agence-nationale-recherche.fr/Projet-ANR-07-EMPB-0012>
- 29) https://www.jle.com/en/revues/hma/e-docs/ciblage_des_proteines_a_bromodomaines_bet_dans_les_hemopathies_malignes_309047/article.phtml?tab=texte
- 30) https://savoirs.usherbrooke.ca/bitstream/handle/11143/12105/Delannoy_Aurelie_PhD

[_2017%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y](#)