



Université de Strasbourg
FACULTÉ DE PHARMACIE

N° d'ordre: _____

MÉMOIRE DE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

—

**EFFET DU ROMIPLOSTIM SUR LA THROMBOPENIE
INDUITE PAR LA CHIMIOThERAPIE**

Présenté par

Jérôme Santer

Soutenu le 05/09/2024 devant le jury constitué de

Professeur LEHMANN Maxime, Président

Docteur ECKLY-MICHEL Anita, Directrice de thèse

Docteurs ETIENNE-SELLOUM Nelly, SICK Emilie, SCHAEFFER Franck, Autres membres
du jury

Approuvé par le Doyen et
par le Président de l'Université de Strasbourg



Doyen

Esther KELLENBERGER

Directeurs adjoints

Julien GODET

Béatrice HEURTAULT

Emilie SICK

Directeur adjoint étudiant

Léo FERREIRA-MOURIAUX

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs :

Philippe	BOUCHER	Physiologie
Nathalie	BOULANGER	Parasitologie
Line	BOUREL	Chimie thérapeutique
Pascal	DIDIER	Biophotonique
Saïd	ENNAHAR	Chimie analytique
Valérie	GEOFFROY	Microbiologie
Philippe	GEOGEL	Bactériologie, Virologie
Jean-Pierre	GIES	Pharmacologie moléculaire
Béatrice	HEURTAULT	Pharmacie galénique
Esther	KELLENBERGER	Bio-informatique
Maxime	LEHMANN	Biologie cellulaire
Eric	MARCHIGNI	Chimie analytique
Francis	MEGERLIN	Droit et économie pharm.
Yves	MELY	Physique et Biophysique
Jean-Yves	PABST	Droit Economie pharm.
Françoise	PONS	Toxicologie
Valérie	SCHINI-KERTH	Pharmacologie
Florence	TOTI	Pharmacologie
Thierry	VANDAMME	Biogalénique
Catherine	VONTHRON	Pharmacognosie
Pascal	WEHRLÉ	Pharmacie galénique

Professeurs-praticiens hospitaliers

Julien	GODET	Biostatistiques - science des données
Jean-Marc	LESSINGER	Biochimie
Bruno	MICHEL	Pharm. clinique santé publique
Pauline	SOLLAS-SPRAUEL	Immunologie
Geneviève	UBEAUD-SÉQUIER	Pharmacocinétique

Enseignants contractuels

Alexandra	CHAMPERT	Pharmacie d'officine
Matthieu	FOHRER	Pharmacie d'officine
Philippe	GALAIS	Droit et économie pharm.
Philippe	NANDE	Ingénierie pharmaceutique
Caroline	WILLER - WEHRLÉ	Pharmacie d'officine

Maîtres de Conférences :

Nicolas	ANTON	Pharmacie biogalénique
Fareeha	BATOOL	Biochimie
Martine	BERGAENTZLÉ	Chimie analytique
Elsa	BOMBARDA	Biophysique
Aurélia	BOURDERIOUX	Pharmacochimie
Emmanuel	BOUTANT	Virologie et Microbiologie
Véronique	BRUBAN	Physiologie et physiopath.
Anne	CASSET	Toxicologie
Thierry	CHATAIGNEAU	Pharmacologie
Manuela	CHIPER	Pharmacie biogalénique
Guillaume	CONZATTI	Pharmacie galénique
Marcelia	DE GIORGI	Pharmacochimie
Serge	DUMONT	Biologie cellulaire
Gisèle	HAAN-ARCHIPOFF	Plantes médicinales
Célien	JACQUEMARD	Chémoinformatique
Julie	KARPENKO	Pharmacochimie
Sonia	LOBDEL	Chimie analytique
Clarisse	MAECHLING	Chimie physique
Rachel	MATZ-WESTPHAL	Pharmacologie
Cherifa	MEHADJI	Chimie
Nathalie	NIEDERHOFFER	Pharmacologie
Sergio	ORTIZ AGUIRRE	Pharmacognosie
Sylvie	PERROTEY	Parasitologie
Romain	PERTSCH	Chimie en flux
Frédéric	PRZYBILLA	Biostatistiques
Patrice	RASSAM	Microbiologie
Eléonore	REAL	Biochimie
Andreas	REISCH	Biophysique
Ludivine	RIFFAULT-VALOIS	Analyse du médicament
Carole	RONZANI	Toxicologie
Emilie	SICK	Pharmacologie
Yaouba	SOUAIBOU	Pharmacognosie
Maria-Vittoria	SPANEDDA	Chimie thérapeutique
Jérôme	TERRAND	Physiopathologie
Nassera	TOUNSI	Chimie physique
Aurélia	URBAIN	Pharmacognosie
Bruno	VAN OVERLOOP	Physiologie
Maria	ZENIDU	Chimiogénomique

Maîtres de conférences - praticiens hospitaliers

Julie	BRUNET	Parasitologie
Nelly	ÉTIENNE-SELLOUM	Pharmacologie- pharm. clinique

Assistant hospitalier universitaire

Damien	REITA	Biochimie
--------	-------	-----------



SERMENT DE GALIEN

JE JURE,

en présence des Maîtres de la Faculté,
des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens
et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit
dans les préceptes de mon art et de
leur témoigner ma reconnaissance en
restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique,
ma profession avec conscience et de respecter non
seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles
de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne dévoiler à personne les secrets
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,
que je sois moi-même honoré
et estimé de mes confrères
et de mes patients.



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dr ECKLY-MICHEL Anita d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse et de m'avoir accompagné, conseillé, soutenu durant cette dernière année.

Je remercie Pr LEHMANN Maxime pour m'avoir conseillé et d'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie Dr ETIENNE-SELLOUM Nelly pour ses informations et données, et pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je remercie également Dr SICK Emilie et Dr SCHAEFFER Franck pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

A toute l'équipe officinale de la Pharmacie du Cerf de Brumath, merci de m'avoir formé et encadré, toujours dans une ambiance plus qu'agréable.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'EFS qui m'a permis de passer de très bons moments et de réaliser mes stages dans une très bonne ambiance. Merci tout particulièrement à Anita, Claire, Fabienne Jean-Yves, Maxime et Fareeha pour votre aide, soutien et bonne humeur au quotidien.

A Oriane, Romane, Anna, Maud, Ludovic, Siméon, Léopold..., amis de promotion, avec qui nous avons très bien profité de notre vie étudiante. Toujours présent dans les bons comme dans les mauvais moments, ces années auraient été bien fades sans vous. Un mot, merci !

Je remercie Mattieu, Kévin et tous mes autres amis pour ces moments de décompression et de soutien.

A mes parents, qui m'ont soutenu tout le long de mes études et qui, sans eux, je n'y serai pas arrivé. Merci pour votre soutien, disponibilité, et implication durant ces longues années d'études.

A Anna, qui arrive à me supporter tous les jours... Merci d'être là, dans les bons, comme dans les mauvais moments. Il nous reste de belles aventures à vivre.

Table des matières

Introduction générale	12
1 Cadre général	13
2 Organisation du manuscrit.....	13
Revue bibliographique	14
1 La production des plaquettes sanguines dans la moelle osseuse	15
1.1 La moelle osseuse	15
1.1.1 Localisation de la moelle osseuse.....	15
1.1.2 La vascularisation de la moelle	15
1.1.3 Les cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	16
1.2 La production des plaquettes sanguines par le mégacaryocyte	17
1.2.1 L'endomitose : une caractéristique unique des mégacaryocytes polyploïde.	18
1.2.2 Le DMS : un réservoir de membranes internes destiné à former la membrane plasmique des futures plaquettes	19
1.2.3 Les granules plaquettaires : une autre caractéristique des MK matures.	19
1.2.4 Les stades de maturation des MK.....	20
1.2.5 Régulation de la mégacaryopoïèse par la thrombopoïétine	21
1.2.6 Autres cytokines stimulant les MK.....	23
1.3 Les plaquettes sanguines	23
1.3.1 L'hémostase.....	24
1.3.2 La thrombopénie.....	25
2 La thrombopénie induite par chimiothérapie.....	26
2.1 Historique du traitement anticancéreux	26
2.2 Les chimiothérapies sont responsables de nombreux effets indésirables	28
2.3 Exemple d'un agent alkylant : carboplatine.....	30
2.4 Exemple d'un antimétabolite : gemcitabine.....	31
3 La prise en charge des CIT	33
3.1 La transfusion de concentré plaquettaire.....	33
3.2 Autres stratégies.....	34

3.2.1	L'oprelvekin	34
3.2.2	Les anti-fibrinolytiques	35
3.3	La potentielle utilisation des analogues/agonistes de la TPO	35
3.3.1	Les analogues de première génération.....	35
3.3.2	L'eltrombopag dans la prise en charge des CIT	35
3.3.3	L'avatrombopag dans les CIT	36
3.3.4	Place du romiplostim (Nplate®) dans les CIT	37
	Mise en place d'un modèle préclinique de prise en charge de la CIT par le romiplostim.....	41
1	Analyse bibliographique.....	42
2	Objectifs.....	44
3	Matériels et méthodes.....	45
3.1	Axe 1 : mise en place du modèle murin.....	45
3.1.1	Modèle de souris et expérimentation animale.....	45
3.1.2	Suivi de la numération plaquettaire et définition des phases de régénération	45
3.1.3	Dosage de la TPO	45
3.2	Axe 2 : étude morphologique de la moelle et des mégacaryocytes	46
3.2.1	Etude de la moelle osseuse par microscopie confocale	46
3.2.2	Etude des mégacaryocytes par MET	46
3.3	Axe 3 : analyses structurales et fonctionnelles des plaquettes sanguines	47
3.3.1	Analyse phénotypique des plaquettes par cytométrie en flux	47
3.3.2	Etude fonctionnelle des plaquettes sanguines	48
3.4	Analyse statistique.	48
4	Résultats.....	49
4.1	Le romiplostim prévient la thrombopénie induite par le carboplatine.....	49
4.2	Le carboplatine provoque une décellularisation de la moelle qui fragilise les sinusoides.....	52
4.3	Caractérisation globale de la mégacaryopoïèse dans la phase de régénération.....	54
4.4	Les mégacaryocytes produits après stimulation au romiplostim sont immatures et libèrent des fragments hétérogènes	56
4.5	Production de plaquettes immatures au cours des thrombopoïèses réactionnelle et stimulée	58

5	Bilan de l'étude	60
	Conclusion générale et perspectives	61
1	Discussion.....	62
1.1	Génération de MK atypique au cours de la thrombopoïèse réactionnelle	62
1.2	Le traitement par romiplostim impacte la maturation des MK	62
1.3	Le traitement par romiplostim provoque une fragmentation anormale des MK	63
1.4	Importance physiopathologique des études.....	64
1.5	La polymédication chez les patients cancéreux.....	65
2	Conclusion générale	66
	Bibliographie	67

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

Akt : Protéine kinase B

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AMR : récepteur hépatique Ashwell-Morrel

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ASCO : American Society of Clinical Oncology

CFU-GEMM : Colony Forming Unit granulocytaire, érythroblastique, mégacaryocytaire et monocytaire

CFU-L : Colony Forming Unit lymphocytaire

CFU-MEP : Progéniteur commun-érythroblastique-mégacaryocytaire

CIT : Thrombopénie induite par chimiothérapie

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

CMH I : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

c-Mpl : Cellular-Myeloproliferative leukemia

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CSH-LT : Cellule souche hématopoïétique à long terme

dCDA : déoxycytidine déaminase

dCK : Déoxycytidine kinase

dFdCDP : Gemcitabine-diphosphate

dFdCTP : Gemcitabine-triphosphate

dFdU : 2',2'-Difluorodeoxyuridine

DMS : Demarcation Membran System

EFS : Etablissement Français du Sang

EMA : European Medicines Agency

FABP4 : Fatty acid binding protein 4

Fc : Fragment constant

FDA : Food and Drug Administration

G-CSF : facteur de croissance hématopoïétique granulocytaire

GP : Glycoprotéine

GTPase : Guanosine triphosphate phosphatase

hCNT : Transporteurs de nucléosides concentrés

hCTR1 : human Copper Transport Protein 1

hENT : Transporteurs de nucléosides équilibrants humains

HLA : Human Leucocyte Antigen

HLA : Human leukocyte antigen

hNT : Transporteurs humains de nucléotides

IgG1 : Immunoglobuline de type G1

IL : Interleukine

INF α : Interféron alpha

JAK-2 : Janus Kinases 2

LNK : Protéine adaptatrice des lymphocytes

MAP kinase : Mitogen-activated protein kinase

MK : Mégacaryocyte(s)

NETs : Neutrophil extracellular traps

OMS : Organisation mondiale de la santé

ORL : Otorhinolaryngologie

PEG-rhMGDF : Recombinant humain du facteur de croissance et de développement des mégacaryocytes

PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase

PNN : Polynucléaire neutrophile

PSL : Produit sanguin labile

PTI : Purpura thrombopénique immunologique

RER : Réticulum endoplasmique rugueux

RhoA : Membre homologue de la famille Ras

rhTPO : Recombinant humain de la TPO

ROCK : Rho-associé à une protéine kinase

SCF : Stem cell Factor

SL-MKP : Stem-like megakaryocyte committed progenitors

SMD : Syndrome myélodysplasique

SOCS : Suppresseur de la signalisation des cytokines

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

TF : Facteur tissulaire

TPO : Thrombopoïétine

VIH : Virus de l'immunodéficience humain

Table des illustrations

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Les classes de chimiothérapie.....	27
Tableau 2 : Corrélation entre le risque thrombopénique avec le type de chimiothérapie.....	28
Tableau 3 : Les grades de thrombopénie.....	29
Tableau 4 : Impact de la chimiothérapie sur la microvascularisation des sinusoides.....	30
Tableau 5 : Recommandations transfusionnels en fonction des facteurs de risques.....	33

Liste des figures :

Figure 1 : Vascularisation de la moelle osseuse.....	16
Figure 2 : La formation des plaquettes sanguines et mégacaryopoïèse.....	17
Figure 3 : Comparaison de la mitose et de l'endomitose.....	18
Figure 4 : Formation du système de démarcation membranaire (DMS).....	19
Figure 5 : Granules plaquettaires.....	20
Figure 6 : Morphologie des mégacaryocytes.....	21
Figure 7 : La voie de signalisation de la TPO.....	22
Figure 8 : La boucle de régulation de la TPO.....	23
Figure 9 : Caractéristiques générales des plaquettes sanguines.....	24
Figure 10 : L'hémostase.....	25
Figure 11 : Structure chimique du carboplatine.....	30
Figure 12 : Mécanisme d'action du carboplatine.....	31
Figure 13 : Mécanisme d'action de la gemcitabine.....	32
Figure 14 : Structure de l'eltrombopag.....	36
Figure 15 : Structure de l'avatrombopag.....	37
Figure 16 : Structure du romiplostim.....	37

Figure 17 : Données pré-cliniques liées à la CIT et au romiplostim.....	43
Figure 18 : Le romiplostim est efficace à prévenir la CIT.....	51
Figure 19 : Un traitement par carboplatine entraîne une décellularisation et une dilatation des sinusoides.....	53
Figure 20 : Analyse par microscopie confocale de la mégacaryopoïèse.....	55
Figure 21 : Etude ultrastructural de l'impact du romiplostim sur la maturation des MK.....	57
Figure 22 : La prise en charge de la CIT par le romiplostim entraîne la production de plaquettes immatures.....	59
Figure 23 : Mégacaryopoïèse et thrombopoïèse.....	60
Figure 24 : La mégacaryopoïèse biaisée.....	63

Introduction générale

1 Cadre général

L'hémostase est un processus physiologique essentiel qui concourt à l'arrêt des saignements, et dans lequel les plaquettes sanguines jouent le rôle principal. Un nombre insuffisant de plaquettes, c'est-à-dire une thrombopénie, peut être la cause de saignements et représente un risque majeur pour le patient suivant des traitements anticancéreux par chimiothérapie. Les plaquettes sanguines sont produites par **les mégacaryocytes (MK)**, qui se différencient dans la moelle osseuse sous l'influence de la **thrombopoïétine (TPO)**. Parmi les nouvelles approches thérapeutiques des **thrombopénies induites par chimiothérapies (CIT)**, le romiplostim, une protéine de fusion analogue de la TPO, apparaît aujourd'hui comme un médicament potentiel pour améliorer la prise en charge des patients. Il fait actuellement l'objet d'essais cliniques en phase III dans cette nouvelle indication. Toutefois, des interrogations subsistent concernant notamment son impact sur les mégacaryocytes médullaires, en particulier dans des contextes pathologiques où la chimiothérapie entraîne une perturbation importante de la moelle osseuse.

2 Organisation du manuscrit

La première section de ce manuscrit concerne la revue bibliographique composé de 3 chapitres. Le premier chapitre introduit la production des plaquettes sanguines par les mégacaryocytes et également les différentes formes de thrombopénies. Le deuxième chapitre est dédié à la thrombopénie induite par la chimiothérapie. Un troisième chapitre détaillera la prise en charge des thrombopénies induite par chimiothérapie.

La deuxième section du manuscrit porte sur mes résultats obtenus au courant de mon Master M2 et présente l'effet du romiplostim sur la thrombopénie induite par chimiothérapie dans un modèle murin de CIT.

Dans la troisième section, nous clôturerons cette thèse par une conclusion générale. Nous proposerons des perspectives de travail, certaines présentant un lien avec les résultats que j'ai pu obtenir.

Revue bibliographique

1 La production des plaquettes sanguines dans la moelle osseuse

Chez l'Homme comme chez la souris, la production des cellules sanguines se fait dans la moelle osseuse par un processus nommé l'hématopoïèse. Il s'agit de l'ensemble des mécanismes qui assurent la production continue et régulière des cellules sanguines des lignées myéloïdes et lymphoïdes.

1.1 La moelle osseuse

La moelle osseuse est un compartiment, majoritairement cellulaire, complexe et dynamique. Logée au sein des cavités osseuses, elle participe au maintien et à la régulation des différentes lignées cellulaires sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH).

1.1.1 Localisation de la moelle osseuse

Chez le nouveau-né, les cavités de tous les os sont constituées de moelle hématopoïétique, appelée moelle osseuse rouge. Il s'agit du tissu hématopoïétique actif. La moelle rouge se transforme progressivement en moelle jaune, par un processus appelé la conversion médullaire. Il s'agit d'un tissu adipeux. Ce processus se poursuit tout le long de la croissance. Il est estimé qu'à l'âge de 25 ans, le tissu adipeux représente 50 à 70% du volume totale de moelle osseuse. La moelle rouge est retrouvée, essentiellement, dans les os plats et courts, tels que les os du sternum, du crâne, des côtes, du bassin et de la colonne vertébrale. Après 25 ans, la conversion de moelle rouge en moelle jaune se fait plus lentement, durant toute la durée de la vie (1).

1.1.2 La vascularisation de la moelle

Le système squelettique est richement vascularisé à partir de l'artère afférente centrale. Elle pénètre au niveau des épiphyses et se divise en un réseau de capillaire pour alimenter l'intérieur de la moelle osseuse. Au niveau hématopoïétique, l'artère nourricière principale pénètre dans la diaphyse de l'os et se divise en artères ascendantes et descendantes. Elles se ramifient en petits capillaires riches en oxygène et nutriments, nécessaires au maintien de l'homéostasie sanguine. Les artères et artérioles sont connectées aux capillaires de type H, exclusivement présents dans les métaphyses. Ces capillaires de type H sont raccordés à des capillaires de type L présents dans les diaphyses, correspondant aux sinusoides des vaisseaux sanguins veineux. Ils sont entourés de cellules hématopoïétiques, prenant le rôle de voie de sortie principale des cellules sanguines matures (2). Les sinusoides sont constitués d'une couche de cellule endothéliale, maintenue par une couche incomplète de cellules adventielles qui permet le maintien de la structure. Entre ces deux couches, on y retrouve une lame basale discontinue. Les sinusoides sont connectés à un sinus veineux central, localisé au centre de la cavité osseuse. Il est relié aux veines nutritives qui extraient le sang désoxygéné, les déchets et les cellules sanguines dans la circulation générale (Figure 1).

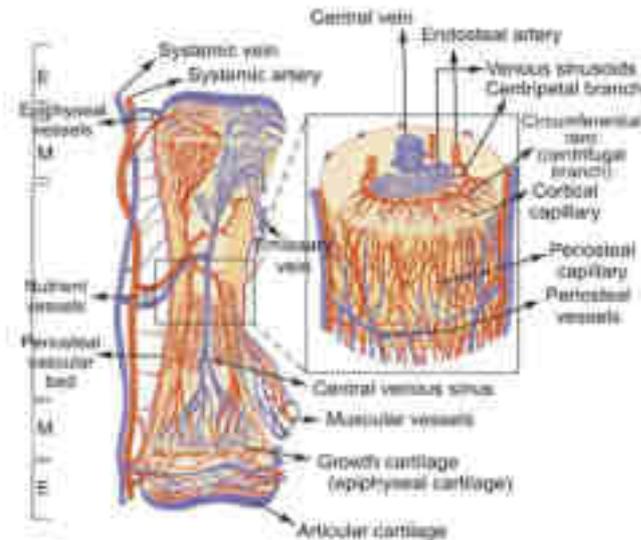


Figure 1 : Vascularisation de la moelle osseuse. Légende : E : épiphyse ; M : métaphyse. Selon Azghar *et al.*, 2019.

Par les différences structurales, il a été mis en évidence des différences environnementales au sein de l'os. La diaphyse, riche en capillaires de type L, contient beaucoup de CSH, en comparaison à la métaphyse. La diaphyse permet le maintien des CSH, on peut parler de niche hématopoïétique (3).

1.1.3 Les cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Les CSH sont des cellules indifférenciées qui sont capables de former des cellules spécialisées par un processus de différenciation. On parle de cellules multipotentes, c'est-à-dire capable de former l'ensemble des cellules de la lignée hématopoïétique. Elles possèdent la capacité d'autorenouvellement, permettant de maintenir un pool constant de CSH et représentent 0,05% des cellules totales de la moelle osseuse. Les CSH sont maintenues dans des niches : microenvironnements permettant le maintien et la régulation des CSH et des progéniteurs. Ces niches sont situées à proximité des sinusoides et des cellules stromales. Cette localisation permet la survie des CSH via la sécrétion de stem cell factor (SCF) et CXCL12 par les cellules endothéliales, stromales et cellules CAR (CXCL12-abundant reticular) (4).

Les CSH sont au sommet de la hiérarchie hématopoïétique. Il est possible de les identifier à l'aide de marqueurs protéiques membranaires. Chez l'Homme, elles sont connues pour être CD34⁺, CD90⁺, CD38⁻, ckit⁻, Lin⁻. Au cours de la différenciation, l'expression du marqueur CD34 diminue, et celle de CD38 augmente. Lors de ce mécanisme, les CSH passent par différents stades d'engagement. Le progéniteur est le premier stade. Cette cellule possède les mêmes capacités que les CSH mais n'a pas de capacité d'autorenouvellement et de multipotence. Il existe deux lignées de progéniteurs : 1) le progéniteur myéloïde CFU-GEMM (Colony Forming Unit granulocytaire, érythroblastique, mégacaryocytaire et monocyttaire), capable de former les cellules de la lignée myéloïde et 2) le progéniteur lymphoïde CFU-L (Colony Forming Unit lymphocytaire), capable de se différencier en cellule de la lignée lymphoïde. Les progéniteurs se différencient ensuite en précurseurs, cellules différenciées immatures.

L'engagement dans ces différentes lignées cellulaires se fait sous l'influence de cytokines. Par exemple, la production de plaquettes sanguines est sous l'influence de la thrombopoïétine (TPO).

1.2 La production des plaquettes sanguines par le mégacaryocyte

La production des plaquettes sanguines est classiquement subdivisée en deux étapes avec i) la mégacaryopoïèse qui permet, à partir d'une CSH de générer les mégacaryocytes et ii) la thrombopoïèse, qui permet aux mégacaryocytes de libérer les plaquettes dans la circulation sanguine (Figure 2). A terme, on estime qu'un MK est capable de former plusieurs milliers de plaquettes sanguines.

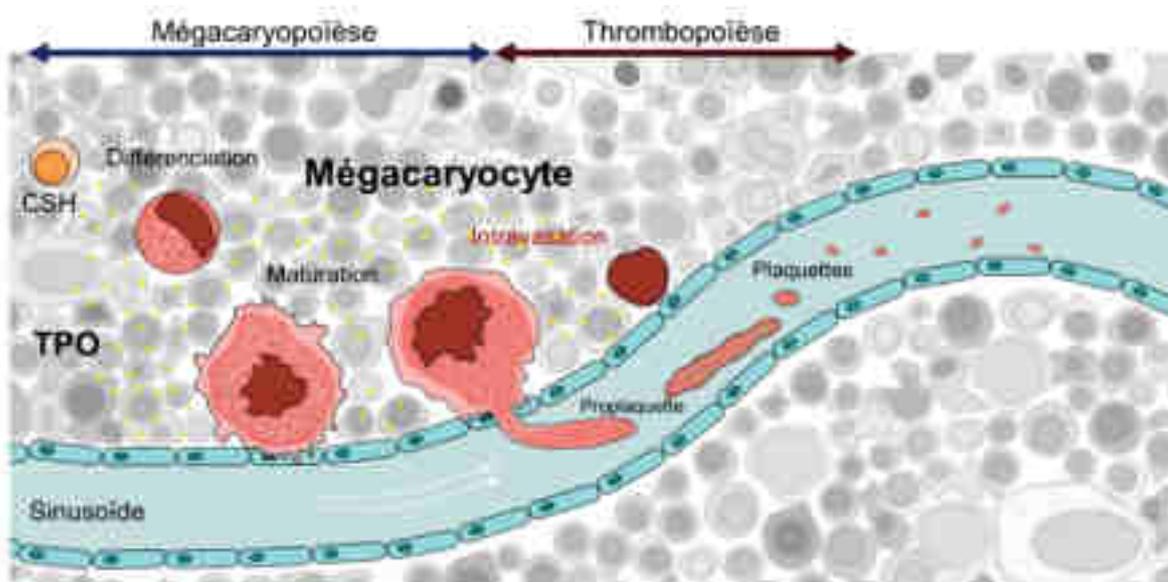


Figure 2 : La formation des plaquettes sanguines et mégacaryopoïèse. La cellule souche hématopoïétique (CSH) se différencie et mature en MK sous l'influence de la TPO. Au stade finale de maturation, les MK sont en contact avec les sinussoïdes et étendent des proplaquettes dans la circulation sanguine qui se remodelent en plaquettes.

La mégacaryopoïèse est un processus complexe qui passe par une succession d'étapes de prolifération, de différenciation et de maturation. Ce processus fait intervenir des interactions avec différents types cellulaires (cellules stromales et hématopoïétiques), des facteurs diffusibles (cytokines et chimiokines), la matrice extracellulaire et des éléments biophysiques (rigidité et concentration en oxygène). Les MK sont produits à partir des cellules souches hématopoïétiques qui, sous l'influence de cytokines EPO, TPO, ...), vont former les CFU-GEMM. Cette cellule se différencie en progéniteur commun-érythroblastique-mégacaryocytaire (CFU-MEP), sous l'influence de la TPO et du SCF. Le CFU-MEP est un progéniteur bipotent, capable de former des érythrocytes et des MK. Il se différencie ensuite en CFU-MK qui forment les précurseurs mégacaryocytaires, également appelés MK immatures. Au cours de la maturation, les MK immatures subissent plusieurs changements afin de pouvoir libérer des plaquettes sanguines, parmi lesquels une augmentation de la ploïdie, la formation d'un réseau de membranes destiné à former les plaquettes et l'apparition de granules plaquettaires.

1.2.1 L'endomitose : une caractéristique unique des mégacaryocytes polyploïde.

La polyploïdie des MK constitue l'une de ses particularités et correspond à l'augmentation du nombre de copies des chromosomes. Ceci est dû à leur capacité unique d'endomitose, c'est-à-dire leur capacité de dupliquer leur ADN sans diviser le cytoplasme (Figure 3). En termes de mécanisme, l'endomitose correspond à un cycle cellulaire comprenant une cytokinèse « avortée » résultant d'une régulation négative de la contractilité dans les progéniteurs mégacaryocytaires (5). Des études par vidéomicroscopie ont permis de montrer que c'est un défaut d'accumulation d'actomyosine au niveau de l'anneau contractile qui serait responsable de la cytokinèse incomplète. La constriction de l'anneau contractile permettant de séparer les cellules filles dépend de l'axe de signalisation RhoA/Rho-kinase/myosine II. C'est l'activité équatoriale de la petite GTPase RhoA qui contrôle la mise en place des faisceaux de filaments d'actine. Le recrutement et l'activation de la myosine II se fait par ROCK qui est activé par RhoA. L'ensemble de ces mécanismes font défaut dans les progéniteurs mégacaryocytaires et n'aboutit pas au clivage habituellement observé en mitose. Ceci conduit à la reformation d'une cellule contenant un noyau polyploïde délimité par une membrane nucléaire unique. Les MK peuvent ainsi atteindre des ploïdies pouvant atteindre 128N. La polyploïdie semble permettre au MK d'augmenter très fortement sa capacité de transcription et de traduction, ce qui est vraisemblablement nécessaire à la production massive de plaquettes (6).

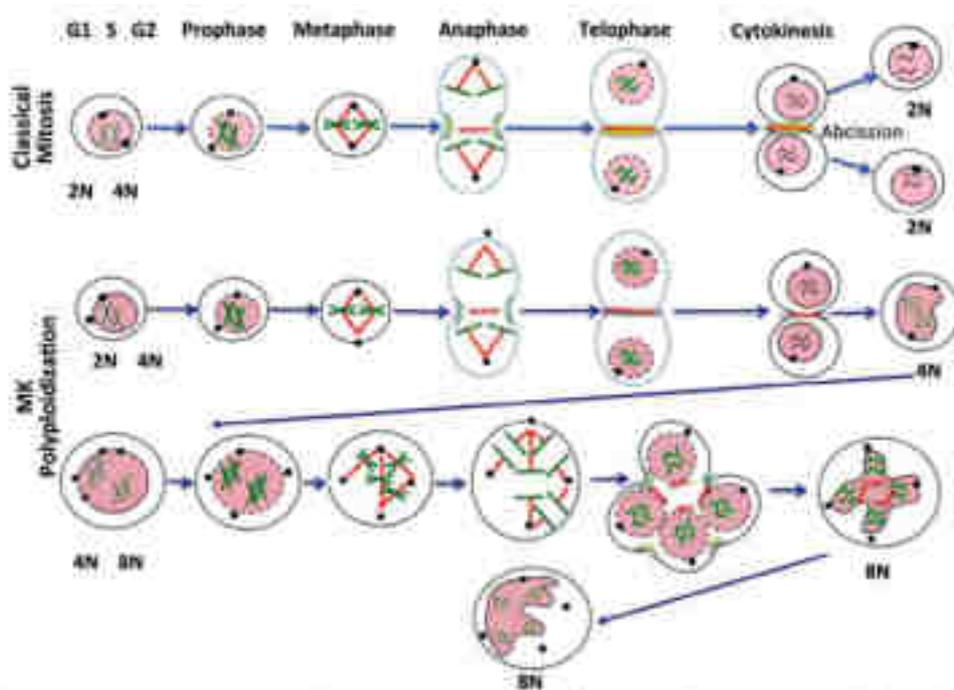


Figure 3 : Comparaison de la mitose et de l'endomitose. Comparé à la mitose, il n'y a pas de cytokinèse dans l'endomitose. Le nombre de copies de l'ADN augmente et double à chaque cycle. Selon Mazzi et al., 2018.

1.2.2 Le DMS : un réservoir de membranes internes destiné à former la membrane plasmique des futures plaquettes

En parallèle, le cytoplasme s'agrandit avec le développement d'un réseau intriqué de membranes appelé système de démarcation membranaire (DMS), constituant un réservoir pour la membrane plasmique des futures plaquettes (5). Il apparaît au cours du développement du MK, le DMS est donc absent des MK de stade I. Cette structure commence à apparaître dans le MK de stade II. Le DMS se forme par invagination à partir de la membrane plasmique de la cellule et s'accumule autour du noyau, entouré de corps de Golgi et réticulum endoplasmique rugueux (RER), on parle de pré-DMS. Ensuite, le DMS continue de se développer de la même manière et des vésicules golgiennes et du RER viennent accentuer ce développement (Figure 4) (7). Ainsi le MK de stade III contient un cytoplasme rempli de DMS, se présentant sous la forme d'un réseau de membrane intracellulaire, continu avec la membrane plasmique.

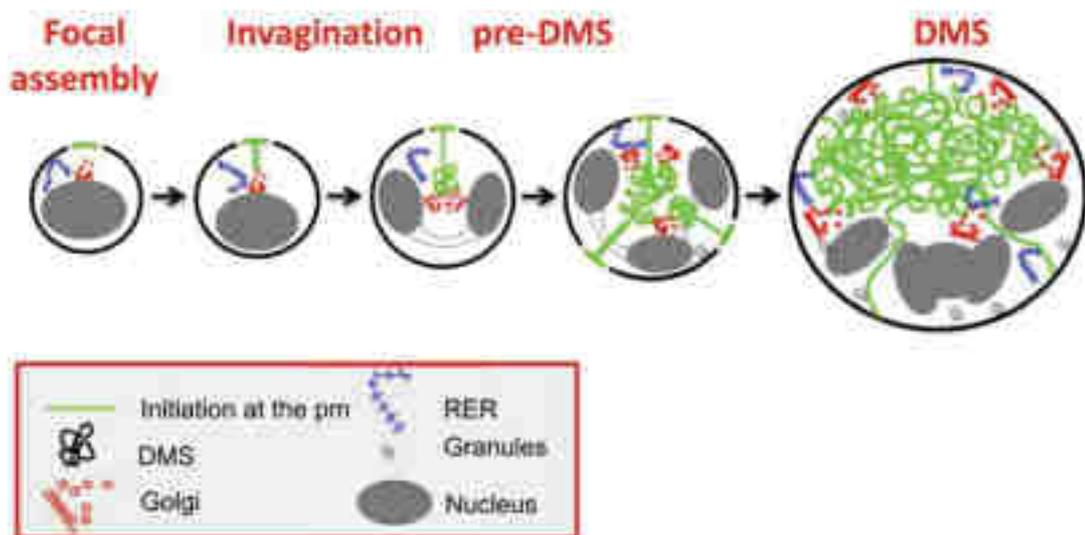


Figure 4 : Formation du système de démarcation membranaire (DMS). Le DMS se forme à partir d'invaginations de la membrane plasmique de la cellule, auxquelles s'ajoutent des vésicules golgiennes et du réticulum endoplasmique. Le MK mature est caractérisé par un cytoplasme rempli de DMS. Selon Eckly *et al.*, 2014.

1.2.3 Les granules plaquettaires : une autre caractéristique des MK matures.

Deux types de granules sont développés lors de la maturation des MK, les granules alpha (α) et les granules denses (δ). Les granules renferment des éléments essentiels au bon fonctionnement plaquettaire. Les granules α sont les plus abondants, il y a entre 50 et 80 granules/plaquettes. Ils contiennent principalement des glycoprotéines adhésives (fibrinogène facteur de Willebrand...), des facteurs de coagulation (V, IX, XIII, TF) et de croissance. Les granules denses sont moins abondants, 3 à 9 par plaquettes. Ils sont constitués de molécules impliquées dans l'agrégation plaquettaire, telles que l'ADP, le calcium, la sérotonine, l'histamine... Les granules sont observables en microscopie électronique à transmission (MET) dans les MK et les plaquettes (Figure 5).

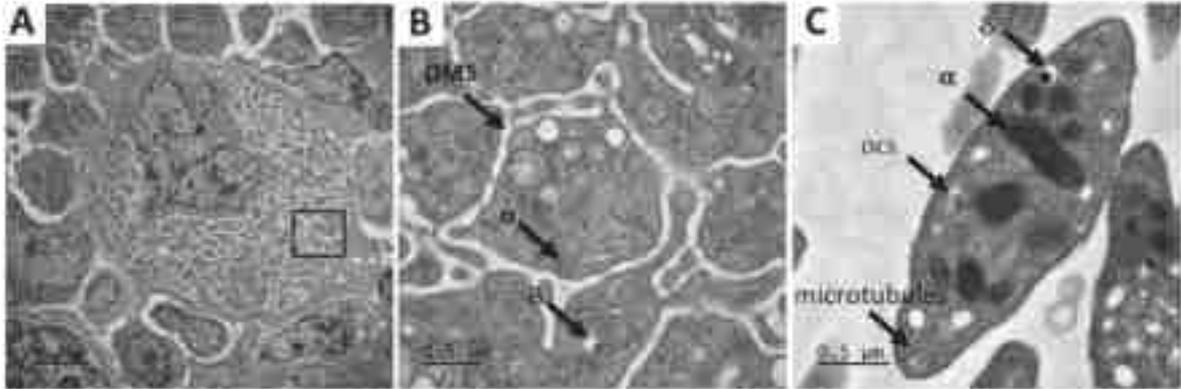


Figure 5 : Granules plaquettaires. Le mégacaryocyte mature (A) contient un cytoplasme rempli d'un réseau membrane continu (DMS) et de granules plaquettaires (α et δ) (B). Les granules sont retrouvés dans les plaquettes (C), également constituées d'un réseau de microtubules qui permet le maintien de la structure discoïde, ainsi que du système canaliculaire ouvert (ocs).

1.2.4 Les stades de maturation des MK

Ainsi les MK passent par différents stades de maturation (Figure 6A). Il est possible de les différencier par MET, en fonction de la taille de la cellule, de la taille et de la morphologie du noyau et du contenu cytoplasmique. Le MK de classe I, aussi appelé mégacaryoblaste, présente une taille comprise entre 10 et 15 μ m. Son cytoplasme est encore immature, avec peu de granules spécifiques et un DMS inexistant. Il se caractérise par un grand noyau par rapport au cytoplasme. Le MK de classe II, nommé promégacaryocyte, se caractérise par une taille entre 15 et 30 μ m de diamètre. Le réseau de membrane est peu développé, mais des granules apparaissent. Enfin, le MK de classe III est le MK mature (Figure 6C). Son diamètre peut atteindre 60 μ m. Le cytoplasme renferme un dense DMS, beaucoup de granules sécrétoires et une zone périphérique riche en actomyosine. Aux derniers stades de maturation, les MK sont en contact avec les sinusoides, microvaisseaux médullaires, et étendent des extensions de leur cytoplasme dans la circulation sanguine. Ces prolongements cytoplasmiques s'allongent et se fragmentent, dans la circulation pulmonaire, sous l'effet de cisaillement du flux sanguin pour former les plaquettes (8). De ce fait, une production optimale de plaquettes tient compte de deux critères essentiels : **une maturation complète des MK et l'apposition des MK aux sinusoides.**

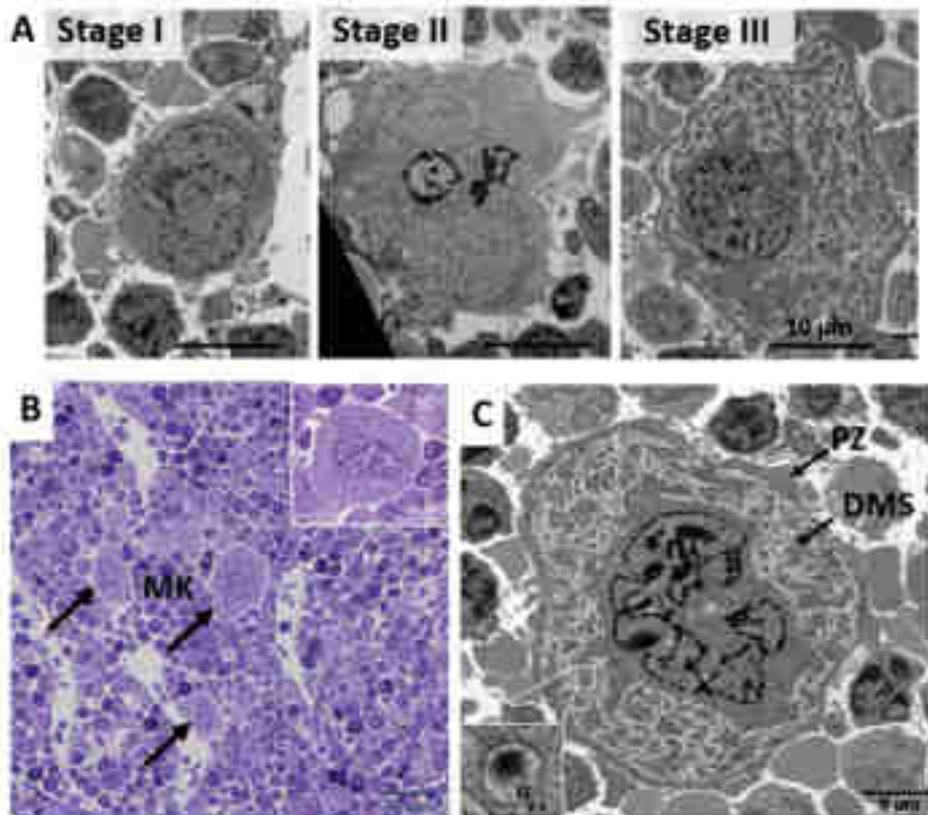


Figure 6 : Morphologie des mégacaryocytes (MK). (A) Evolution du MK dans la moelle osseuse de souris. Le MK de stade I est une grande cellule, constitué d'un grand noyau et un cytoplasme vide en DMS. (B) Coupe histologique d'une moelle osseuse de souris contrasté au bleu de toluidine. Les MK (flèche) sont des cellules rares et géantes dans la moelle osseuse de souris. (C) Image représentative d'un MK mature (stade III) observé par microscope électronique à transmission montrant un noyau polyplénoide (n), un cytoplasme rempli de DMS et la présence de granules sécrétoires (α). La zone périphérique (PZ) du MK est riche en acto-myosine. Source : UMR 51255

1.2.5 Régulation de la mégacaryopoïèse par la thrombopoïétine

L'ensemble de la mégacaryopoïèse est sous l'influence du microenvironnement cellulaire, de la matrice extracellulaire et de cytokines dont la plus importante est la TPO. Identifiée dans les années 1994 par Vainchenker, la TPO est majoritairement synthétisée par le foie (9). C'est un polypeptide de 353 acides aminés. La protéine mature est composée d'un domaine amino-terminal homologue à l'érythropoïétine de 154 acides aminés, repliés en 4 hélices. De plus, la TPO est composée d'un domaine carboxyl-terminal particulier, aidant au repliement de la protéine et lui conférant une grande demi-vie. Malgré les homologies de séquences avec l'érythropoïétine, cette dernière ne se lie pas au récepteur de la TPO (10).

Le récepteur de la TPO, c-Mpl (cellular-Myeloproliferative leukemia) ou CD110, fait partie de la famille des récepteurs de cytokine de type I. Il s'agit d'un récepteur homodimérique à activité tyrosine kinase. Il est principalement exprimé à la surface des plaquettes et des mégacaryocytes (11). La TPO et c-Mpl jouent des rôles essentiels à la croissance et au développement des MK. Dans les modèles murins où l'un ou l'autre est déficient, les plaquettes et les MK sont réduits à 10 % de leurs valeurs normales, sans affecter les autres populations hématopoïétiques matures (12). La liaison de la TPO à son récepteur

c-Mpl induit la dimérisation de ce dernier provoquant alors l'activation des Janus Kinases 2 (JAK-2) par phosphorylation. Cela entraîne alors le recrutement de protéines de signalisations incluant les protéines de la famille STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) qui, en se fixant sur des régions promotrices de l'ADN, activent la traduction de gènes impliqués dans la prolifération et la survie comme les cyclines. La signalisation de la TPO active également des voies de signalisation en aval, notamment les voies de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt et de la MAP kinases, nécessaires à l'expansion et l'autorenouvellement des CSH (11) (Figure 7). Ainsi l'action de la TPO concerne à la fois la régulation plaquettaire et mégacaryocytaire mais aussi la prolifération et la survie des CSH dans la moelle osseuse.

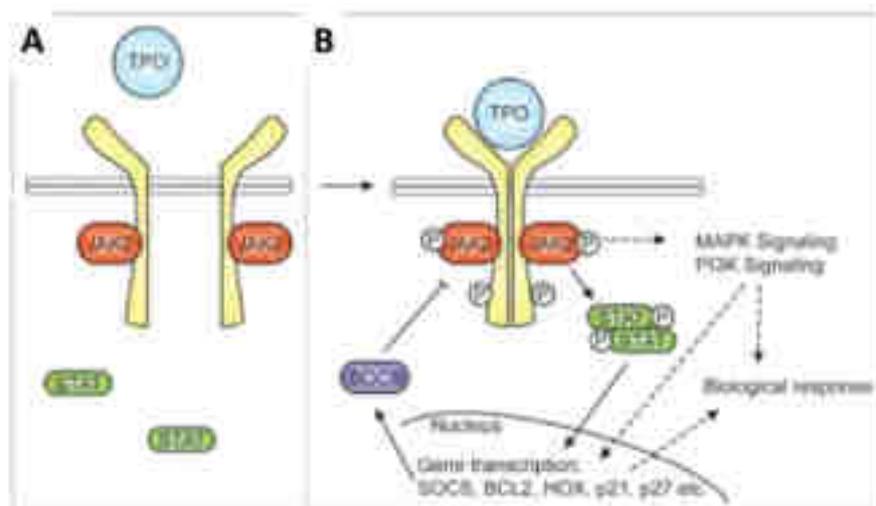


Figure 7 : La voie de signalisation de la TPO. Le récepteur de la TPO est un récepteur homodimérique (A), appelé c-Mpl. Suite à la liaison de la TPO, le récepteur c-Mpl se dimérise, conduisant à la stimulation de plusieurs voies de signalisation (JAK-2, STAT, MAPK, PI3K) (B). Ceci aboutit à la transcription de gènes dans le noyau et à une activation de la mégacaryopoïèse. Issu de de Girard and Metcalé, 2011.

La signalisation est contrôlée par deux mécanismes majoritaires : les régulateurs négatifs et l'internalisation de la TPO. Parmi les protéines activées par le récepteur, la suppressor of cytokine signaling (SOCS), LYN et LNK exercent un rétrocontrôle négatif sur c-Mpl. A côté de cela, la TPO est internalisée et dégradée suite à sa fixation sur le récepteur. L'internalisation se fait via une endocytose médiée par les clathrines. Le récepteur endocyté est ensuite ubiquitiné et dégradé par le protéasome. Ainsi, la concentration plasmatique de TPO (~0,8 fmol/ml chez l'Homme) est régulée par la numération plaquettaire. En effet, sa concentration est en équilibre avec la quantité de plaquettes présente dans la circulation sanguine, et du nombre de mégacaryocytes dans la moelle osseuse, afin de produire rapidement des plaquettes en cas de demande. Les taux de TPO sont inversement proportionnels à la masse plaquettaire/mégacaryocytaire, suggérant une **boucle de rétrocontrôle de la concentration plasmatique de la TPO par les plaquettes**. Ce rétrocontrôle est assuré par un mécanisme d'internalisation et de dégradation de la TPO après fixation sur le récepteur c-Mpl des plaquettes (Figure 8).

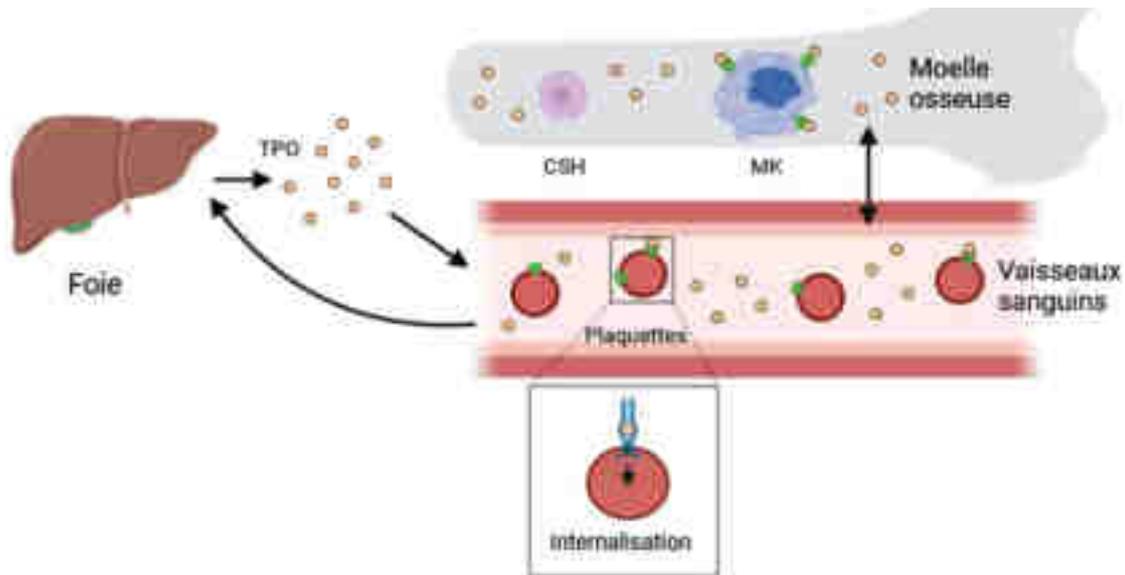


Figure 8 : La boucle de régulation de la TPO. La TPO est essentiellement synthétisée par le foie. La masse plaquettaire régule la demi-vie de la protéine en l'internalisant via le récepteur c-Mpl. Ainsi, en cas de thrombopénie, la capacité d'internaliser la TPO est réduite. Il en résulte une augmentation de la concentration plasmatique de TPO, conduisant à l'activation de la mégacaryopoïèse pour contrebalancer la thrombopénie périphérique. Cela explique pourquoi la concentration de TPO est inversement proportionnelle à la numération plaquettaire.

La production de TPO est stimulée par la perte d'un motif présent à la surface des plaquettes sanguines jeunes. La perte de l'acide sialique à leur surface est identifiée comme un marqueur de plaquette sénescence, on parle de plaquette désialylée. La dégradation de l'acide sialique fait intervenir des sialydases, présentes dans la circulation sanguine. Ces plaquettes sont reconnues et éliminées par le récepteur hépatique Ashwell-Morrell (AMR), complexe glycoprotéique transmembranaire des hépatocytes. L'élimination des plaquettes sénescences stimule l'expression d'ARN messager (ARNm) de la TPO et stimule donc la production de TPO endogène.

1.2.6 Autres cytokines stimulant les MK

La TPO n'est pas la seule cytokine intervenant dans la production de plaquettes sanguines. D'autres facteurs diffusibles interviennent sur les cellules aux différents stades, mais toujours en synergie avec la TPO. En premier lieu, la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires est dépendante de SCF et IL3. Ensuite, l'engagement dans la lignée mégacaryocytaire est sous l'influence de l'IL-1 α . La maturation des MK est également sous l'influence de l'IL-9, l'IL-6, IL-11 et LIF. L'INF α est impliquée dans une maturation rapide des MK.

1.3 Les plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines sont des fragments cellulaires anucléés de forme discoïde d'environ 3 μm de diamètre chez l'Homme (Figure 9). En moyenne, 150 à 450 milliards de plaquettes par litre de sang circulent chez l'Homme (1 000 milliards chez la souris). Leur durée de vie étant de quelques jours

(8 jours chez l'Homme, 4 jours chez la souris), cent milliards de plaquettes sont produites quotidiennement afin de maintenir une concentration sanguine constante. Grâce à leurs propriétés d'adhérence et d'agrégation, elles sont capables d'assurer l'arrêt rapide d'un saignement au niveau d'un site de lésion vasculaire et de maintenir l'intégrité vasculaire (13).



Figure 9 : Caractéristiques générales des plaquettes sanguines, image représentative de la morphologie des plaquettes sanguines par microscope électronique à balayage. Les plaquettes circulantes sont discoïdes et de petites tailles (diamètre < 5 μm).

1.3.1 L'hémostase

L'hémostase est l'ensemble des processus qui participe à l'arrêt et à la prévention des saignements (Figure 10). Le mécanisme, en trois parties, se met rapidement en action après l'ouverture d'une brèche vasculaire : 1.vasoconstriction, 2.hémostase primaire et 3.hémostase secondaire (Figure 10).

La vasoconstriction permet de ralentir le flux sanguin afin de limiter les pertes sanguines et permettre la formation de thrombi.

L'hémostase primaire. La brèche vasculaire laisse la matrice sous-endothéliale, constituée de fibronectine et de collagènes, exposée au sang. Le collagène est une structure capturant le Facteur de Willebrand. Il va alors adhérer à la matrice sous-endothéliale. Par l'intermédiaire de la glycoprotéine GPIb-V-IX, les plaquettes sanguines interagissent avec le Facteur de Willebrand et adhèrent au niveau du site de lésion initial. Ensuite, les intégrines ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$), récepteurs d'adhérence, interviennent afin d'ancrer définitivement les plaquettes. Simultanément à leur recrutement, les plaquettes s'activent par l'intermédiaire des glycoprotéines GPIb-V-IX et GPVI et des intégrines. L'activation des intégrines $\alpha \text{IIb}\beta 3$ permet l'agrégation plaquettaire. De plus, les plaquettes libèrent leurs granules α et δ , et produisent la thromboxane A₂, permettant de renforcer l'activation des plaquettes et de stabiliser la structure. L'hémostase primaire permet la formation d'un thrombus primaire, appelé clou plaquettaire.

L'hémostase secondaire, également nommée cascade de coagulation, vient consolider le clou plaquettaire. Elle est assurée par une cascade de réactions enzymatiques qui sont les facteurs de coagulation, synthétisés dans le foie par les hépatocytes. La cascade de coagulation est initiée par le facteur tissulaire lors d'une lésion vasculaire. Il est exposé par les cellules endothéliales lésées. Le facteur tissulaire permet la formation de thrombine, produite à partir de la prothrombine correspondant à son zymogène plasmatique. La thrombine est un activateur de plaquettes, favorisant l'hémostase primaire, et est un agent pro-coagulant. En effet, elle est capable d'amplifier la cascade de coagulation en activant les facteurs V et VIII et participe à la formation d'un réseau de fibrine stabilisant le clou plaquettaire. La fibrine est issue de modification par la thrombine du fibrinogène. Il en résulte la réparation de la lésion vasculaire grâce à un thrombus stable. Il sera ensuite dégradé par fibrinolyse. La fibrinolyse est le processus aboutissant à la dissolution du thrombus par la plasmine. Concernant la thrombine, en supplément de l'action pro-coagulante, elle réalise un contrôle négatif sur la cascade de coagulation. Cette régulation négative est faite par l'intermédiaire de la protéine C qui inhibe l'activation des facteurs V et VIII. Ce contrôle évite l'emballement de la coagulation par la formation d'un thrombus.

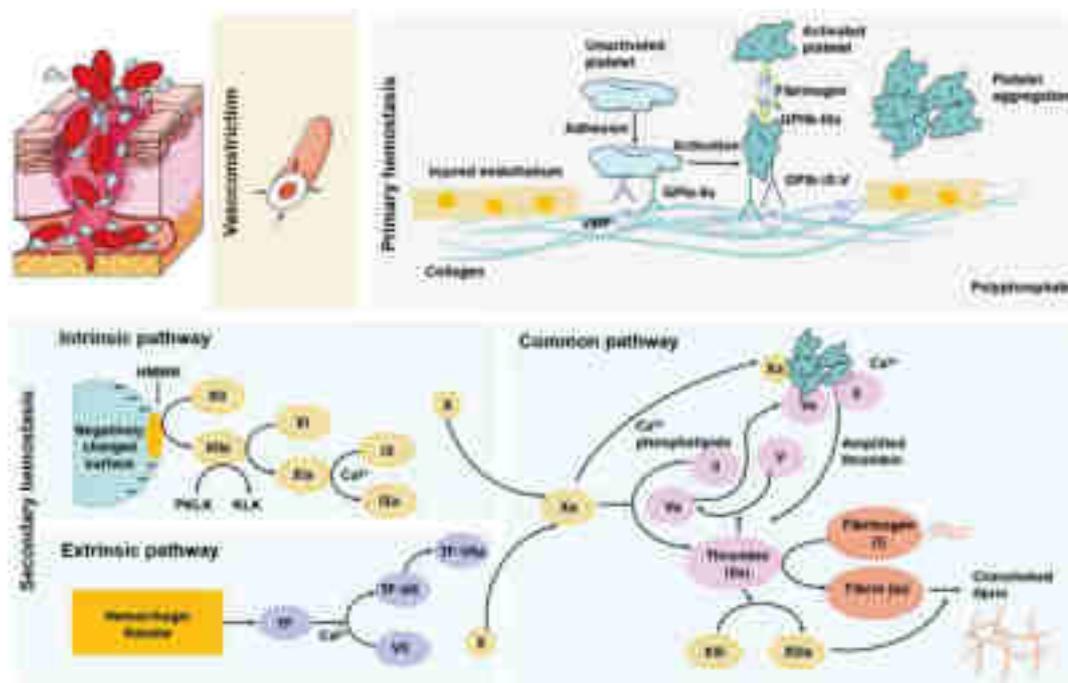


Figure 10 : L'hémostase. Après la vasokonstriction, le sous-endothélium présente des facteurs d'activation plaquettaire, permettant l'aggrégation des plaquettes. Au même moment, l'hémostase secondaire permet de transformer les fibres de fibrinogène en un réseau de fibrine stable et robuste. Selon Jian Du *et al.*, 2023.

1.3.2 La thrombopénie

Chez l'Homme, la thrombopénie est définie par une numération plaquettaire inférieure à 150.10^3 plaquettes/ μ L de sang. Cette diminution peut s'expliquer par deux phénomènes : une thrombopénie périphérique c'est-à-dire une élimination accrue des plaquettes circulantes ou une thrombopénie centrale correspondant à un défaut de production des plaquettes.

Thrombopénie d'origine périphérique. La thrombopénie périphérique peut être causée par une pathologie auto-immune, le purpura thrombopénique idiopathique (PTI). Cette pathologie est caractérisée par la production d'anticorps antiplaquettaires, qui les détruisent prématurément et en abaisse la numération. Une infection virale (hépatite C, VIH...) est susceptible d'engendrer le même effet. Certaines situations, telle que la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) connue pour une activation massive de la coagulation, peuvent conduire à l'épuisement de la réserve plaquettaire et entraîner une thrombopénie.

Thrombopénie d'origine centrale. De nombreuses pathologies diminuent la production de plaquettes par la moelle osseuse. Nous pouvons citer la leucémie, le lymphome ou l'anémie aplasique. Les médicaments cytotoxiques, comme les traitements anticancéreux, sont connus pour provoquer des thrombopénies d'origine centrale. La CIT est typiquement d'origine centrale puisque l'effet secondaire attendu des chimiothérapies est une toxicité médullaire, impliquant une décellularisation de la moelle osseuse avec notamment une destruction des progéniteurs mégacaryocytaires, les précurseurs des plaquettes sanguines.

2 La thrombopénie induite par chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement par des agents systémiques interférant avec les mécanismes de la division des cellules en phase active de prolifération. Ces molécules ciblent l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'acide ribonucléique (ARN) ou des enzymes nécessaires au fonctionnement de la cellule (topoisomérases, protéasome, ...). Ces médicaments disposent d'une place importante dans l'arsenal thérapeutique, ayant prouvé leurs efficacités dans le traitement de cancers. En effet, les chimiothérapies ont fortement augmenté la survie des patients.

2.1 Historique du traitement anticancéreux

Avant 1950, les traitements anti-cancéreux étaient à base de plante. Le développement des chimiothérapies a commencé dans les années 1950, avec l'utilisation du gaz moutarde (agent alkylant) et un antagoniste de l'acide folique (antimétabolite). L'utilisation d'armes chimiques, tel que le gaz moutarde, durant la Seconde Guerre Mondiale a provoqué de nombreux décès. Des autopsies ont montré qu'une exposition à ce gaz provoque une atrophie de la moelle osseuse et des ganglions lymphatiques. Le gaz moutarde touche donc les cellules souches, cellules qui sont en division cellulaire permanente. Cette découverte entraîne la synthèse de nouvelles molécules, chlorambucil et cyclophosphamide. D'un autre côté, le développement des antimétabolites a montré une efficacité dans la leucémie

lymphoblastique, avec de nombreux effets indésirables. Quelques années plus tard, le méthotrexate est développé et est associé à une forte diminution des tumeurs utérines.

En parallèle, les nouvelles connaissances en biologie cellulaire permettent de comprendre les mécanismes d'action des chimiothérapies déjà existantes. Ainsi, les années 1970 ont vu naître les piliers de la chimiothérapie ; 1) administration intermittente sous forme de cycles permettant la régénération des tissus sains, 2) combinaison de plusieurs chimiothérapies avec des mécanismes d'action différents, 3) en complément de la chirurgie et radiothérapie. La chimiothérapie n'est plus un traitement solitaire, mais un adjuvant des autres méthodes. Les techniques deviennent complémentaires les unes des autres. C'est par la découverte de nouvelles chimiothérapies, à mécanisme d'action différent, que la polythérapie est devenue possible. Parmi elles, des antibiotiques (bléomycine, anthracyclines...), des antimétabolites (vinca alcaloïdes), des analogues nucléosidiques et nucléotidiques (cytarabine, 6-mercaptopurine...), étoposide et cisplatine peuvent être cités. Néanmoins, toutes les chimiothérapies de première génération sont très cytotoxiques, leur conférant de nombreux effets indésirables (14).

Avec le développement des connaissances biologiques, la notion de résistance au traitement apparaît. Cette notion amène à penser que l'efficacité d'une chimiothérapie n'est pas seulement liée à la sensibilité des cellules tumorales, mais aussi à la pharmacocinétique. Tous les patients ne sont pas répondant au traitement, il y a des variations interindividuelles dépendantes des habitudes de vie, de l'hygiène, des traitements médicamenteux et du polymorphisme génétique.

A partir de 1990, les progrès de la biologie et de la génétique, ont permis la découverte des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs, du mécanisme d'angiogenèse. Ainsi, les thérapies ciblées font leur apparition sur le marché mondial. Ces anticancéreux sont spécifiques d'une cible, augmentant l'efficacité des traitements en réduisant les effets indésirables.

Aujourd'hui, on dénombre essentiellement quatre classes de molécules de chimiothérapie : les antimétabolites, les inhibiteurs de topoisomérases, les poisons du fuseau et les agents alkylants (**Tableau 1**).

Classe	Exemples
Antimétabolites	Cytarabine, gemcitabine, fludarabine, pémétréxed, ...
Inhibiteurs de topoisomérases	Doxorubicine, étoposide, topotécan, ...
Poison du fuseau	Paclitaxel, vincristine, ...
Agents alkylants	Carboplatine, cyclophosphamide, bendamustine, ...

Tableau 1 : Les classes de chimiothérapie. La carboplatine est un agent alkylant, faisant partie de la famille des sels de platine.

2.2 Les chimiothérapies sont responsables de nombreux effets indésirables

Les chimiothérapies anticancéreuses sont des traitements toxiques. Toutes les cellules à fort potentiel prolifératif de l'organisme sont affectées par ces traitements. Ainsi, les cellules cancéreuses sont touchées tout comme certaines cellules saines, dont celles de la moelle osseuse, des ongles, des cheveux et de l'appareil digestif. D'autres organes sont donc impactés pouvant engendrer des dysfonctions d'organes. Les toxicités engendrées peuvent être communes et spécifiques d'une classe d'anticancéreux. Parmi les autres effets secondaires observés, on peut citer l'insuffisance rénale, l'hypertension, des manifestations neurologiques et respiratoires, la stomatite et la mucosite (15).

En premier lieu, les effets gastro-intestinaux sont fréquents, avec une perte d'appétit, nausées et vomissements, diarrhée. Ces deux derniers sont la plupart du temps pris en charge par traitements médicamenteux à base d'antiémétiques (ondansétron, aprépitant) et d'antidiarrhéiques (lopéramide).

Concernant, la perte des phanères et des cheveux, le blocage du cycle cellulaire en est à l'origine.

Les chimiothérapies anticancéreuses ciblent également la moelle osseuse, provoquant des anomalies de numérations des cellules sanguines (16), telles que des thrombopénies, on parle de thrombopénie induite par chimiothérapie (CIT). La cinétique et le nadir (le point le plus bas de la numération plaquettaire) des CIT dépendent largement du mécanisme d'action du médicament (Tableau 2). Ainsi, une surveillance régulière de la numération plaquettaire et une évaluation des risques hémorragiques conditionnent les traitements.

Molécules	Risque de thrombopénie	Adaptation de la posologie
Carboplatine	<50. 10 ³ chez 25% des patients	Ne pas administrer si <100.10 ³ à la date prévue
Topotecan	Très fréquent	Ne pas administrer si <100.10 ³ à la date prévue
Gemcitabine	Non négligeable	75% de la dose si entre 50.10 ³ et 100.10 ³ lors du nadir Arrêt si <25.10 ³ lors du nadir
Cisplatine	Rare	Décalage de l'administration si <100.10 ³

Tableau 2 : Corrélation entre le risque thrombopénique avec le type de chimiothérapie. Le carboplatine induit fréquemment des thrombopénies, entraînant un décalage du cycle de chimiothérapie. Selon le Référentiel en Oncologie thoracique, Auvergne-Rhône-Alpes.

Pour guider le clinicien dans ses prescriptions, l'ASCO (American Society of Clinical Oncology) a publié en 2018 des recommandations en définissant plusieurs degrés de sévérité de la thrombopénie : grade 1 (75-100.10³ plaquettes/ μ L), grade 2 (50-75.10³ plaquettes/ μ L), grade 3 (25-50.10³ plaquettes/ μ L) et grade 4 (<25.10³ plaquettes/ μ L). Le risque de survenue d'hémorragie est considéré comme étant minime lorsque la numération plaquettaire est stable au-delà de 50.10³

plaquettes/ μL . Par contre, une numération inférieure à $10 \cdot 10^3$ plaquettes/ μL est potentiellement dangereuse pour le patient et peut engendrer des saignements spontanés (Tableau 3). D'un point de vue thérapeutique, l'interruption du traitement anticancéreux ou une diminution de dose est alors envisagée afin de permettre à la moelle osseuse de se régénérer, la contrepartie néfaste étant un risque de progression de la maladie ou une rechute.

Grades	Numération (plaquettes/ μL)	Clinique
Grade 1	$75-100 \cdot 10^3$	Pas de saignement
Grade 2	$50-75 \cdot 10^3$	Saignement pétéchial
Grade 3	$25-50 \cdot 10^3$	Perte de sang légère
Grade 4	$<25 \cdot 10^3$	Perte de sang importante, nécessité de transfusion
Grade 5	-	Perte de sang invalidante, hémorragie rétinienne ou cérébrale, décès

Tableau 3 : Les grades de thrombopénie, selon l'American Society of Clinical Oncology.

Les épisodes de thrombopénie profonde et durable sont dépendants de la chimiothérapie utilisée, associée au type de cancer. En 2021, une étude rétrospective réalisée aux Etats-Unis sur plus de 15 500 patients a recensé 28% de CIT chez les patients ayant développés des hémopathies malignes, 21,4% chez ceux traités contre un mélanome, 13,5% chez des patients atteints de cancer colorectal et 9,6% chez des patients atteints de cancer du sein (17). Cette myélotoxicité peut toucher à différents degrés les trois lignées cellulaires qui sont les lignées érythrocytaire, leucocytaire et plaquettaire. Les CIT peuvent donc être associées à une anémie et une neutropénie, on parlera alors de pancytopenie. D'un point de vue morphologique, la décellularisation de la moelle osseuse provoque également **de fortes perturbations du microenvironnement vasculaire** (18), un élément essentiel pour le bon fonctionnement des MK et une libération optimale des plaquettes (Tableau 4). En effet, il a été démontré que le 5-fluorouracil, antimétabolite, provoque une forte dilatation des sinusoides médullaires, associée à une diminution de la cellularité médullaire. Le cyclophosphamide, agent alkylant, est connu pour causer des dommages endothéliaux. Le traitement entraîne, sur les cellules endothéliales, un gonflement cytoplasmique, une dilatation de l'espace périnucléaire et du réticulum endoplasmique rugueux et ainsi une perturbation de la barrière endothéliale (18).

Altération vasculaire	Observé suite à une irradiation	Observé suite à une chimiothérapie
Dilatation	Oui	Oui
Hémorragie	Oui	Oui
Rupture du sinusoids	Oui	Oui
Forme inhabituelle	Oui	Non connu
Mort cellulaire	Oui	Non connu
Diminution de la perméabilité ou perte de la membrane plasmique	Oui	Oui

Tableau 4 : Impact de la chimiothérapie sur la microvascularisation des sinusoids. La chimiothérapie provoque une dilatation, des ruptures de vaisseaux sanguins et des hémorragies. Selon Hassausiahi *et al.*, 2017.

2.3 Exemple d'un agent alkylant : carboplatine

Les sels de platine, tel que le carboplatine, représentent une sous-famille des agents alkylants (Figure 11). Le carboplatine est indiqué dans le traitement des tumeurs solides (cancer de l'ovaire, cancer bronchopulmonaire à petites cellules et carcinome épidermoïde des voies aérodigestives supérieures) (19). Il s'agit d'un agent alkylant à base de platine.

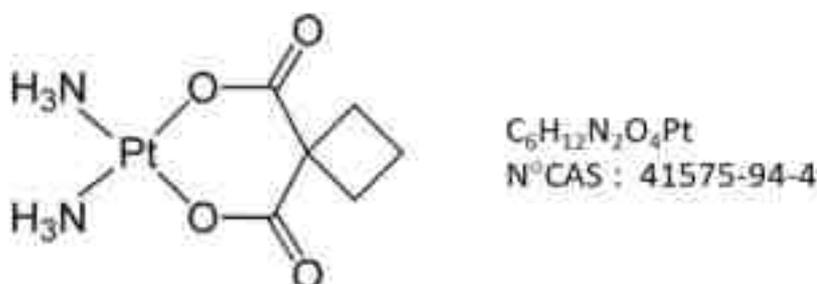


Figure 11 : Structure chimique du carboplatine, Diamine(cyclobutane-1,1-dicarboxylato(2-)-O,O')platinum.

Le carboplatine pénètre dans la cellule par l'intermédiaire d'un transporteur, le transporteur du cuivre hCTR1 (human Copper Transport Protein 1), présent chez l'Homme et chez la souris (92% d'homologie de séquence) (20). Une fois dans le cytoplasme, le carboplatine subit des modifications structurales. La forme active du carboplatine, diaquaplatine, a la particularité de se fixer sur l'ADN par des liaisons alkyles, générant ainsi des ponts inter- ou intra-brins dans l'ADN. Elle se fixe essentiellement sur l'azote N7 des guanines. Cette déformation de l'ADN bloque l'activité de l'ARN polymérase et la transcription de l'ADN en ARN, bloquant la synthèse protéique. De plus, les adduits bloquent les ADN polymérases, inhibant la réplication de l'ADN. Ces mécanismes provoquent la mort de la cellule (21) (Figure 12). Des analyses de données de séquençage de l'ARN ont permis de montrer qu'un traitement au carboplatine induit une diminution significative des cellules en phase G2M, passant

de 35% pour les cellules non traitées à 14% pour les cellules traitées (22). La demi-vie d'élimination plasmatique totale du carboplatine est de 5 jours. Néanmoins, les études pharmacocinétiques ont montré que 70% de platine administré est éliminé 12 heures après l'administration. Ainsi, la quantité de carboplatine ultrafiltrable est très importante. Il existe une liaison aux protéines plasmatiques, lente et progressive, avec 87% du carboplatine restant lié aux protéines plasmatiques après 24 heures. Le carboplatine n'est pas métabolisée, il est retrouvé sous sa forme initiale dans les urines.

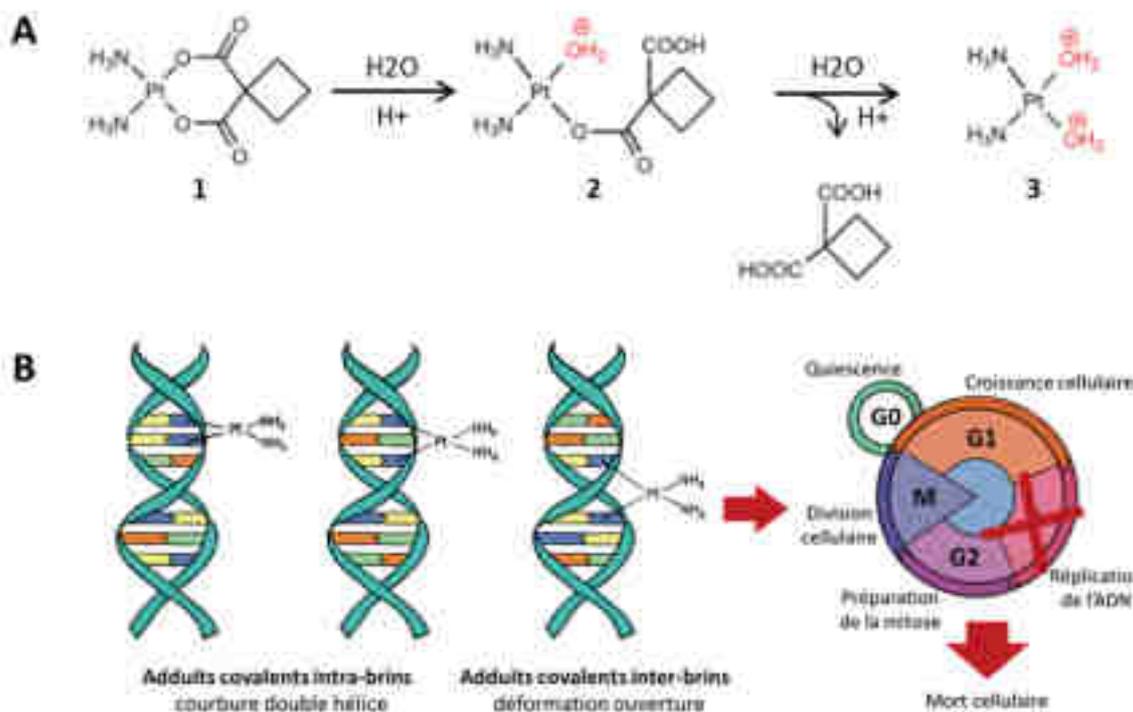


Figure 12 : Mécanisme d'action du carboplatine (A) Modification chimique intracellulaire du carboplatine. En présence de molécule d'eau, le cycle s'ouvre et reste ouvert par protonation du carboxylate en milieu acide (non représenté ici). La structure 3 (diaquaplatine) est la forme active. **(B) Formation d'adduits sur le brin d'ADN.** Ils bloquent le cycle cellulaire en empêchant la réplication de l'ADN. La cellule reste en phase G1, engendrant la mort cellulaire.

2.4 Exemple d'un antimétabolite : gemcitabine

La gemcitabine est un antimétabolite, analogue de la cytidine (nucléoside pyrimidique). Il s'agit d'une substance qui interfère avec plusieurs étapes de la synthèse d'ADN (Figure 13A). En monothérapie, la gemcitabine est indiquée dans le traitement d'adénocarcinome du pancréas avancé ou métastatique. Cette molécule peut être associée au cisplatine dans le cancer bronchique non à petites cellules, au carboplatine dans le cadre d'un carcinome épithélial de l'ovaire ou encore avec le paclitaxel dans le cancer du sein inopérable (23). La gemcitabine pénètre dans la cellule par l'intermédiaire des transporteurs humains de nucléotides (hNT), tels que les transporteurs hENT1-2 ou hCNT1-2-3. La gemcitabine n'est pas constitutivement active. Elle est métabolisée, en intracellulaire, par la déoxycytidine kinase (dCK) en nucléosides diphosphate (dFdCDP) et triphosphate (dFdCTP) actifs.

L'effet cytotoxique est dû à un double mécanisme. Le dFdCDP est un inhibiteur de la ribonucléotide réductase, inhibant la synthèse de déoxyribonucléotides di- ou triphosphates nécessaires à former l'ADN ou le réparer. Cela implique une diminution de la concentration intracellulaire en dCTP. Le dFdCTP va être incorporer dans l'ADN ou l'ARN, selon un processus de compétition avec la dCTP. Après incorporation dans l'ADN, un dernier nucléotide est ajouté à la suite du dFdCTP, qui entraîne l'arrêt de l'élongation de l'ADN. Cette position particulière du métabolite de la gemcitabine dans la chaîne néo-synthétisée d'ADN prévient de la reconnaissance et de la réparation du brin. Il s'ensuit une rupture du brin d'ADN. Au niveau de l'ARN, le dFdCTP induit une inhibition de sa synthèse, et donc une inhibition de synthèse protéique. Ainsi, la gemcitabine provoque un arrêt de la répllication de l'ADN, bloquant la cellule en phase S. La cellule entre dans un processus d'apoptose. A côté de ce mécanisme cytotoxique, la gemcitabine peut subir une déamination, via la déoxycytidine déaminase (dCDA) afin de former le dFdU (Figure 13B). Ce métabolite est inactif et est excrété des cellules pour être éliminé par voie urinaire (99%). La demi-vie d'élimination de la gemcitabine est de 42 à 94 minutes sous forme de dFdU. Les deux métabolites actifs ne sont pas retrouvés dans le plasma ou l'urine des patients (24).

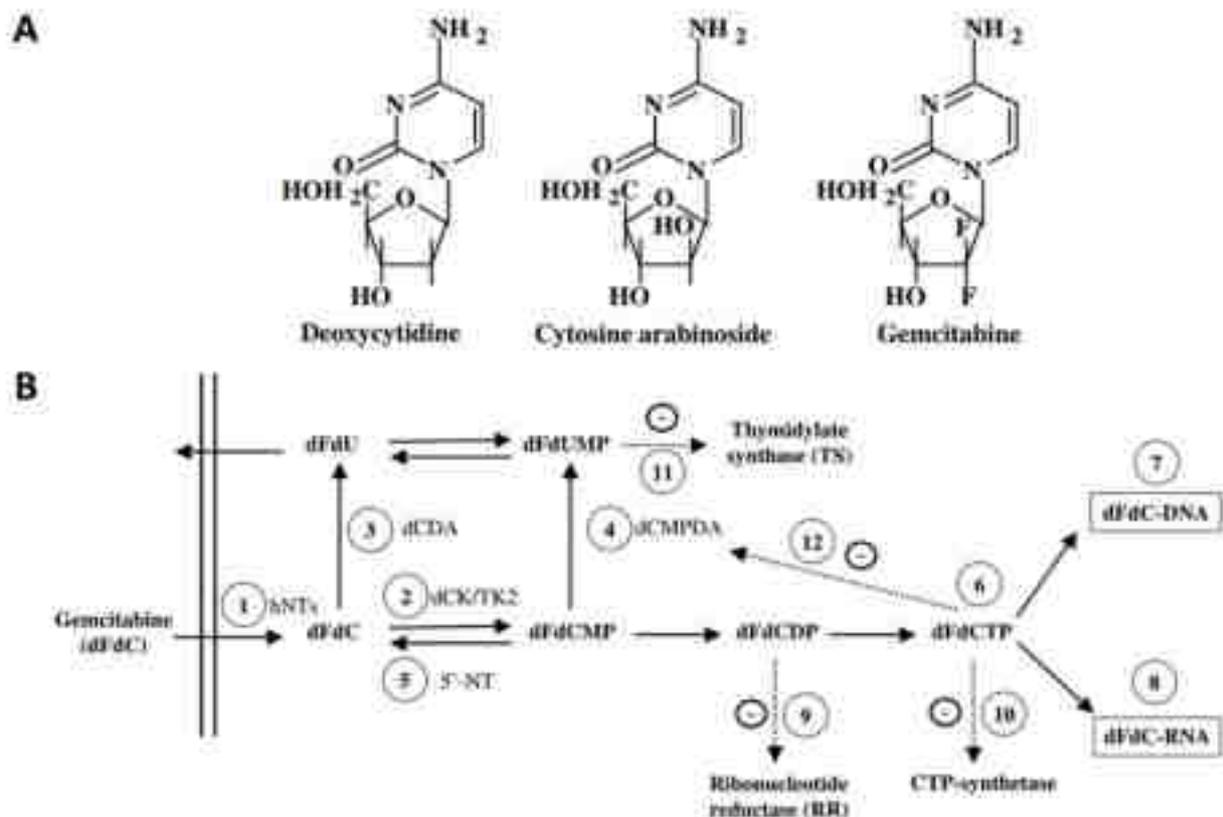


Figure 13 : Mécanisme d'action de la gemcitabine (A) Structure de la deoxycytidine, cytosine arabinoside et gemcitabine. (B) Mécanisme d'action de la gemcitabine. 1. transport par les hNTs ; 2. phosphorylation; 3 et 4, déamination; 5. déphosphorylation; 6. accumulation de triphosphate; 7. incorporation dans l'ADN; 8. incorporation dans l'ARN; 9. inhibition de la ribonucléotide réductase (RR); 10. inhibition de la CTP-synthetase; 11. inhibition de la thymidylate synthase (TS); 12. inhibition de la déoxycytidine monophosphate déaminase (dCMPDA). Abréviations : dCK, déoxycytidine kinase; TK2, thymidine kinase 2; dCDA, déoxycytidine déaminase; 5'-NT, 5'-nucléotidase. Issu de Mini *et al.*, 2006

Les cellules souches hématopoïétiques, étant des cellules à fort potentiel de prolifération, constituent des cibles préférentielles pour le carboplatine, provoquant ainsi une forte myélotoxicité à l'origine de la thrombopénie.

3 La prise en charge des CIT

Le traitement de première intention repose sur le décalage ou l'arrêt du cycle de chimiothérapie. En seconde intention, le traitement est basé sur des transfusions de concentré plaquettaire. Néanmoins, les seuils de transfusion prophylactique sont modulés en fonction de différents facteurs de risques (Tableau 5, discussion avec C. Humbrecht, directrice médicale de l'EFS). Ainsi, chez un patient stable, sans saignements, une transfusion préventive n'est prescrite que lorsque la numération plaquettaire est inférieure à $10 \cdot 10^3$ plaquettes/ μl . Ce seuil est revu à la hausse en cas de complication (lésions, fièvre) ou en prévention de gestes invasifs.

Le seuil de transfusion prophylactique doit être modulé en fonction des facteurs de risque suivants :	
A	<ul style="list-style-type: none"> 10 G.L. si aucun facteur de risque :
B	<ul style="list-style-type: none"> 20 G.L. : si fièvre ≥ 38.5 °C, infection, hypertension artérielle, mucite de grade ≥ 2, lésion à potentiel hémorragique, cinétique de décroissance rapide de la NP en 72 heures :
C	<ul style="list-style-type: none"> 50 G.L. : <ul style="list-style-type: none"> si CIVD-fibrinolyse : si geste invasif : ponction lombaire, biopsie médullaire, cathéter central, endoscopie digestive et biopsie, endoscopie bronchique et lavage broncho-alvéolaire ou brosse, ponction biopsie hépatique, ponction transbronchique, avulsions dentaires :
AE	<ul style="list-style-type: none"> si traitement anticoagulant :
AE	Chez le patient thrombopénique (inférieure à 20 G.L.) sous antiagrégant : <ul style="list-style-type: none"> le traitement antiplaquettaire prescrit en prévention cardio-vasculaire primaire ne semble pas justifié ; le traitement antiplaquettaire peut ne pas être poursuivi lorsque son indication est liée à une atteinte cérébro-vasculaire ; les transfusions prophylactiques sont effectuées avec les mêmes recommandations en s'assurant que la NP post-transfusionnelle reste inférieure à 50 G.L.

Tableau 5 : Recommandations transfusionnelles en fonction des facteurs de risque, selon la Haute Autorité de Santé.

3.1 La transfusion de concentré plaquettaire

Le concentré plaquettaire est un produit sanguin labile (PSL), c'est-à-dire un produit issu du don du sang dans le but d'être transfusé à un patient dans le besoin. En France, les PSL (concentrés de globules rouges, de plaquettes et plasma frais congelé) sont préparés et fournis aux établissements de santé par l'Etablissement Français du Sang. Les concentrés de plaquettes sont préparés à partir de don de sang total ou à partir d'un don en aphérèse, durant lequel les plaquettes sont séparées des autres cellules sanguines afin de restituer le reste au donneur. Afin de ne pas avoir de formation d'agglomérat, les concentrés sont maintenus en agitation constante entre 20 et 24°C. La durée de conservation est de 7

jours, au-delà de laquelle la sécurité microbiologique n'est plus assurée. Le PSL est délivré à un patient sur prescription médicale en veillant à la compatibilité immunologique par analyse immunohématologique. Les PSL sont soumis à l'hémovigilance, correspondant à l'ensemble des procédures de surveillance, d'évaluation et de préventions des incidents et effets indésirables survenant chez les donneurs ou les receveurs des PSL. L'hémovigilance, gérée par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, comprend le suivi des receveurs, mais aussi des donneurs. Ce suivi se base sur les signalements des professionnels de santé concernant un incident ou un évènement indésirable grave chez le donneur ou chez le receveur, et sur les informations données par le donneur post-don, susceptibles de remettre en cause la sécurité du PSL. De plus, tout évènement, incident grave intervenant sur la chaîne transfusionnelle doit être signalé. Le traçage et le signalement permettent de retirer les lots ou de prévenir/traiter si des risques se présentent.

Ces dernières années, l'accent a également été mis sur la nécessité de ne pas « sur-transfuser » les patients. En effet, les transfusions multiples peuvent induire des complications d'ordre immuno-allergiques, avec notamment l'apparition d'allo-immunisation anti-HLA ou d'immunisation contre des antigènes plaquettaires. Les plaquettes transfusées sont alors rapidement éliminées par le système immunitaire dans la rate et le foie, rendant le patient réfractaire aux transfusions sanguines. D'un point de vue économique, il est important de souligner que la demande transfusionnelle croît fortement en raison de l'augmentation d'incidence des cancers, du vieillissement des patients et du recours à des traitements plus agressifs créant parfois des tensions logistiques dans les Etablissements Français de Sang. Dans ce contexte, le développement de nouvelles voies thérapeutiques, et notamment des **agonistes du récepteur de la thrombopoïétine (TPO) qui stimulent la différenciation des MK**, pourraient favoriser la prise en charge thérapeutique des CIT.

3.2 Autres stratégies

3.2.1 L'oprelvekin

L'interleukine 11 recombinante (oprelvekin, Neumega®) est autorisée par la Food and Drug Administration (FDA, USA) dans la prévention et le traitement des thrombopénies induites par chimiothérapie chez des patients adultes recevant une chimiothérapie myélosuppressive dans le cadre de cancer non-myéloïde. Physiologiquement, l'interleukine 11 est produite par les cellules du stroma et participe à la maturation et la production des plaquettes. L'oprelvekin est injecté 6 à 24 heures après la chimiothérapie, à une dose de 50µg/kg, tous les jours durant maximum 21 jours. Les injections sont répétées jusqu'à ce que la numération plaquettaire du patient soit supérieure à 50000 plaquettes/µL.

Approuvé en 1997, il diminue le besoin de transfusion plaquettaire mais est associé à de nombreux effets indésirables (choc anaphylactique, insuffisance cardiaque, fibrillation atriale,

essoufflement, œdème périphérique). Neumega® n'a jamais été autorisé en Europe par l'European Medicines Agency (EMA) et en France.

3.2.2 Les anti-fibrinolytiques

Des anti-fibrinolytiques peuvent également être utilisés. Ils exercent une action antihémorragique par inhibition de l'activité fibrinolytique de la plasmine. Les anti-fibrinolytiques améliorent l'hémostase mais ne vont pas augmenter la numération plaquettaire. L'acide tranexamique (Exacyl®) est indiqué, en France, dans les accidents hémorragiques dus à une fibrinolyse générale ou locale et en prévention de celles-ci.

3.3 La potentielle utilisation des analogues/agonistes de la TPO

3.3.1 Les analogues de première génération

Les deux premiers analogues de la TPO sont le recombinant humain de la TPO (rhTPO) et le recombinant humain du facteur de croissance et de développement des mégacaryocytes (PEG-rhMGDF). Le rhTPO possède la même séquence d'acide aminé que la TPO endogène, contrairement au PEG-rhMGDF qui est une protéine non-glycosylée contenant une séquence tronquée de la TPO, couplée à du polyéthylène glycol. Ces deux analogues ont montré une augmentation de la numération plaquettaire après administration. Néanmoins, des cas de thrombopénies avec déplétion en TPO ont été démontré avec le PEG-rhMGDF. Il est associé à une production d'anticorps dirigés contre le PEG-rhMGDF, capable de reconnaître la TPO endogène due à l'homologie de séquence entre le PEG-rhMGDF et la TPO. Il y a une réaction croisée, neutralisant la TPO et le PEG-rhMGDF (11). Ainsi, cet analogue de première génération a été retiré du marché à cause d'effets indésirables importants induits par la formation de ces anticorps anti-TPO. Dans les pays asiatiques et particulièrement en Chine, le rhTPO est en essai clinique dans le traitement des CIT, et a montré son efficacité à engendrer une meilleure récupération plaquettaire (25).

Afin de pallier ces effets indésirables, des agonistes des récepteurs de la TPO ont été développés. Ce sont de petites molécules chimiques (eltrombopag, avatrombopag, lusutrombopag, hetrombopag) ou des protéines (romiplostim) capables de se lier aux sites activables du récepteur de la TPO (c-Mpl).

3.3.2 L'eltrombopag dans la prise en charge des CIT

L'eltrombopag (Revolade®) est un agoniste du récepteur c-Mpl (Figure 14). Il s'agit d'une molécule chimique qui interagit avec le domaine transmembranaire du récepteur, mais initie une cascade de signalisation différente de la TPO endogène. En effet, l'eltrombopag entraîne l'activation des voies STAT et MAPK (26). Les autres voies restent inactivées. Revolade® est indiqué dans le traitement des patients adultes et pédiatriques atteints d'une thrombopénie immunologique, réfractaire aux traitements

de première intention. Il est indiqué dans le cadre de thrombopénie chez l'adulte infecté par le virus de l'hépatite C. Il est également indiqué chez des patients atteints d'une aplasie médullaire acquise sévère, réfractaires à un traitement immunosuppresseur antérieur ou lourdement prétraités et non éligibles à une greffe de CSH (27).

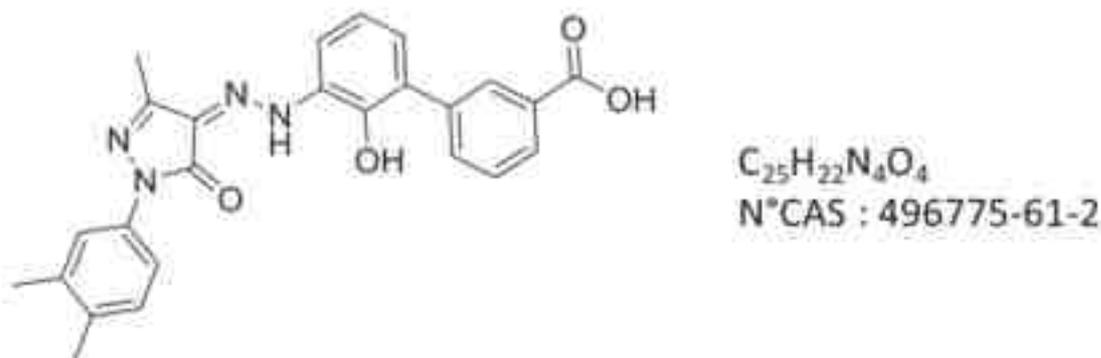


Figure 14 : Structure de l'eltrombopag, 3-[3-[[2-(3,4-diméthylphényl)-5-méthyl-3-oxo-1H-pyrazol-4-yl]diazényl]-2-hydroxyphényl]benzoïc acid. Il s'agit d'une molécule de 442,5g/mol, agoniste du récepteur c-Mpl.

Dans la cadre de la CIT, l'efficacité et la tolérance de l'eltrombopag a été évalué dans deux essais cliniques de phase II. Un premier essai de phase II, randomisé, en double aveugle, compare un placebo à l'eltrombopag chez des patients traités par carboplatine/paclitaxel dans le cadre de tumeur solide (clinical trial n°NCT00102726) (28). Cet essai ne montre pas d'efficacité de l'eltrombopag à réduire le nadir dans les différents cycles de chimiothérapie, et quel que soit la dose d'eltrombopag. Un deuxième essai de phase II, randomisé, est réalisé chez des patients atteints de tumeurs solides et traités par gemcitabine ou gemcitabine/carboplatine/cisplatine (clinical trial n°NCT01147809) (29). Là aussi, l'essai ne montre pas d'amélioration significative du nadir en comparaison au placebo.

A la vue de ces résultats, l'eltrombopag ne semble pas une alternative intéressante dans le traitement et la prévention de la CIT.

3.3.3 L'avatrombopag dans les CIT

L'avatrombopag (DOPTelet®) est un agoniste du récepteur c-Mpl, ayant le même site de fixation et un mécanisme d'action identique à l'eltrombopag (Figure 15) (30). En France, l'avatrombopag possède un service médical rendu (SMR) et une amélioration du service médical rendu (ASMR) insuffisant dans la prise en charge de thrombopénie immunitaire primaire, également appelée PTI, chronique réfractaire aux autres traitements et de thrombopénie sévère chez des adultes atteints d'hépatites chroniques pour lesquels une intervention invasive est programmée (31). Ainsi, cette molécule est non remboursée par la collectivité.

Le romiplostim ne possède aucune homologie de séquence avec celle de la TPO endogène et se lie sur le récepteur c-Mpl, exerçant ainsi un effet agoniste compétitif et augmentant la numération plaquettaire (33). Il entraîne l'activation des mêmes voies de signalisation que la TPO endogène. De plus, le romiplostim possède un immunorégulateur. Le FcIgG1 est capable d'interagir avec le récepteur Fcγ, stimulant la production de lymphocytes T régulateurs (Treg) et modifiant la maturation cellulaire et la présentation d'antigène. Ainsi, le romiplostim est capable d'activer les Treg et de contrôler la réponse immunitaire (34).

3.3.4.2 Indication

En clinique, le romiplostim (NPLATE[®]) dispose d'une AMM en France pour les patients présentant une PTI après échec de la splénectomie et réfractaires aux autres traitements (par exemple corticoïdes, immunoglobulines) (35). Il s'agit d'un médicament injectable en sous-cutanée, une fois par semaine. De façon général, le traitement commence avec une dose de 1 µg/kg de poids corporel puis elle est augmentée de 1 µg/kg par semaine jusqu'à obtenir une numération plaquettaire supérieure à $50 \times 10^9/L$. De plus, NPLATE[®] dispose d'une recommandation temporaire d'utilisation dans le traitement du syndrome myélodysplasique (SMD) avec une thrombopénie chez les patients ayant moins de 5% de blastes médullaires. La posologie initiale est de 750µg par semaine, adaptée ensuite selon la numération plaquettaire. NPLATE[®] est un médicament de liste I soumis à des prescriptions hospitalières et réservé aux spécialistes en hématologie, en médecine interne, ou aux médecins compétents en maladie du sang. Il nécessite une surveillance particulière pendant le traitement puisqu'un certain nombre d'effets secondaires ont été signalés.

Aujourd'hui, le romiplostim n'est pas recommandé dans les autres causes de thrombopénie et particulièrement les myélodysplasies, du fait du risque d'évolution leucémique. Son intérêt dans la prise en charge de CIT est en cours d'investigation.

3.3.4.3 Le romiplostim dans la CIT

Dans le cadre des CIT, la tolérance et l'efficacité du romiplostim sont évaluées dans une dizaine d'essais cliniques, pour des cancers bien particuliers. Parmi ceux-là, un essai de phase II (clinical trial n°NCT02052882) a été réalisé aux Etats-Unis chez 60 patients présentant une tumeur solide locale ou métastatique, et présentant une CIT après chimiothérapie myélosuppressive (36). La numération plaquettaire des patients enrôlés dans l'essai est inférieure à 100.10^9 plaquettes/L durant les quatre dernières semaines, après réduction des doses ou annulation du dernier cycle de chimiothérapie. Le romiplostim est administrée à une dose de 2,0 µg/kg puis augmentée chaque semaine de 1,0 µg/kg pendant 3 semaines jusqu'à obtenir une numération supérieure à 100.10^9 plaquettes/L. Au moment de la première injection de romiplostim, la numération plaquettaire moyenne est de $63.10^9/L$. Après 3 semaines de traitement, la numération plaquettaire est corrigée chez 93% des patients (14/15), en

comparaison au groupe contrôle (12%). La numération moyenne est de 141.10^9 plaquettes/L après 2 semaines de traitement, formant un plateau. En prenant en compte les 52 patients traités au romiplostim, 85% (44/52) ont obtenu une correction de la numération plaquettaire. En préventif, le romiplostim est efficace à maintenir la numération lors des cycles de chimiothérapies, avec 6,8% des patients présentant une réduction de dose. En préventif, la dose moyenne de romiplostim est de $2,6\mu\text{g}/\text{kg}$, et en curatif de $3,3\mu\text{g}/\text{kg}$. Cette étude révèle donc l'efficacité du romiplostim à restaurer et maintenir la numération plaquettaire chez des patients traités par chimiothérapie.

A ce jour, trois essais cliniques de phase III sont en cours. Le romiplostim est étudié chez des patients présentant une CIT avec différents types de cancers. Le premier essai traite du cancer des poumons à non-petite cellule, cancer des ovaires ou cancer du sein. Un autre essai est réalisé chez des patients présentant un cancer gastro-intestinal, pancréatique ou colorectal. Les sujets du dernier essai sont des patients atteints par un lymphome.

3.3.4.4 Les effets indésirables

Un certain nombre d'effets indésirables sont associés au traitement. Parmi les plus fréquents (>10%), nous pouvons citer des céphalées et des hypersensibilités (rash, urticaire, angioœdème). Des études plus récentes suggèrent également des risques thrombotiques et des événements de myélofibrose à plus long terme. Par exemple, la myélofibrose et la thrombose ont été constatées chez 0,1% des patients.

Plusieurs cas de myélofibrose par traitement au romiplostim ont été recensés après plusieurs mois de traitement. Armin Rashidi et Michele R. Rouillet citent un cas de myélofibrose suite à un traitement de 9 mois par romiplostim (37). L'analyse de la moelle osseuse montre une diminution de 80% de la cellularité mais une augmentation du nombre de MK. La stimulation constante des MK par le traitement entraîne une augmentation des interactions MK-fibroblaste et de la sécrétion de cytokines, engendrant une fibrose médiée par la réticuline. Classiquement, la myélofibrose est réversible à l'arrêt du traitement ou par diminution de la dose. Cet effet indésirable pose le problème des administrations répétées de romiplostim chez de jeunes patients, avec la crainte d'une perturbation de la production des cellules sanguines à long terme (35).

Dans la cadre de l'essai de phase II (clinical trial n°NCT02052882), 10,2% des patients traités par romiplostim ont développés une thrombose veineuse profonde. La thrombose pourrait s'expliquer par une production accrue de plaquettes dites « jeunes » décrites pour être hyper-réactives. Ces plaquettes sont nommées plaquettes réticulées. Chez l'Homme, elles sont caractérisées comme une proportion pro-coagulante de la population totale et entraînent une augmentation des thromboses chez les patients. Au laboratoire, il est possible de mesurer la proportion de jeunes plaquettes par cytométrie en flux en évaluant le niveau d'expression des molécules du CMH I (38).

A ce jour, peu d'informations sont disponibles sur l'impact *in vivo* du traitement au romiplostim sur le développement du MK dans son environnement naturel, en particulier dans des contextes pathologiques où la chimiothérapie entraîne de profondes altérations de la moelle osseuse. Par exemple, on ne sait pas si la stimulation par le romiplostim est suivie d'une maturation complète des MK et quel est son impact sur la localisation des MK dans le microenvironnement vasculaire. La moelle osseuse des patients n'étant pas facilement accessible, les études cliniques sont souvent limitées à l'étude de la numération plaquettaire et des myélogrammes (ponction de « grumeaux » de moelle osseuse). Les études pré-cliniques sur modèle murin donnent accès à la moelle osseuse et permettent des analyses détaillées de la mégacaryopoïèse *in situ*.

Mise en place d'un modèle préclinique de prise en charge de la CIT par le romiplostim

Master M2, Effet du romiplostim sur la thrombopénie induite par chimiothérapie

1 Analyse bibliographique

La souris est un excellent modèle d'étude *in vivo* et *in situ* pour l'étude des comportements et de l'ultrastructure mégacaryocytaire et plaquettaire humains.

Des expériences préliminaires réalisées au laboratoire ont permis d'identifier la dose de carboplatine permettant de générer une CIT reproductible et profonde chez la souris. Ainsi, suite à un traitement par le carboplatine à 75mg/kg, le nadir des plaquettes se situe au 8e jour après la CIT ($250 \cdot 10^3$ plaquettes/ μ l) et revient à la normale au 18e jour (qu'on appelle la phase de récupération) (Figure 17A). D'après Morowski M *et al.*, le modèle murin présente un risque hémorragique par temps de saignement augmenté, à partir d'une numération plaquettaire inférieure à $300 \cdot 10^3/\mu$ L (39).

Au laboratoire, le romiplostim est classiquement utilisé pour stimuler la mégacaryopoïèse chez la souris saine (Figure 17B). A titre d'exemple, Leon *et al.* ont montré que des injections sous-cutanées de romiplostim à une posologie de 100 μ g/kg de poids corporel dans une souris saine multiplie par quatre la production de plaquettes au bout de 8 jours (40). Cette étude fournit également des informations précieuses sur les MK : une augmentation de leur nombre d'un facteur cinq, accompagné d'un retard dans leur maturation (Figure 17C). A plus long terme, et de façon similaire à l'Homme, cette étude démontre l'apparition d'une myélofibrose (35).

Dans une autre étude, l'équipe de G. Molineux a mesuré simultanément la numération plaquettaire et la concentration plasmatique de TPO dans des souris traitées au carboplatine à 62,5mg/kg suivie d'une irradiation de la totalité de l'organisme avec une source de ^{137}Cs à 5Gy (thérapie mixte par chimiothérapie/irradiation) (41). Cette étude confirme la relation inverse entre la numération plaquettaire et la concentration de TPO. La mesure simultanée de la numération plaquettaire et de la concentration en TPO endogène montre une période durant laquelle la numération diminue sans augmentation de la TPO. Cela a permis d'identifier une fenêtre de temps idéale pour l'administration de romiplostim, correspondant aux 5 premiers jours après chimiothérapie, avant que la concentration de TPO endogène n'augmente. Cette fenêtre est pertinente par rapport à la demi-vie d'élimination du romiplostim chez l'Homme, comprise entre 1 et 34 jours (médiane à 3,5 jours) (35). Plus précisément, le romiplostim (dose de 100 à 300 μ g/kg) a permis de réduire de manière significative la phase de récupération et le nadir plaquettaire un jour après le traitement (Figure 17D).

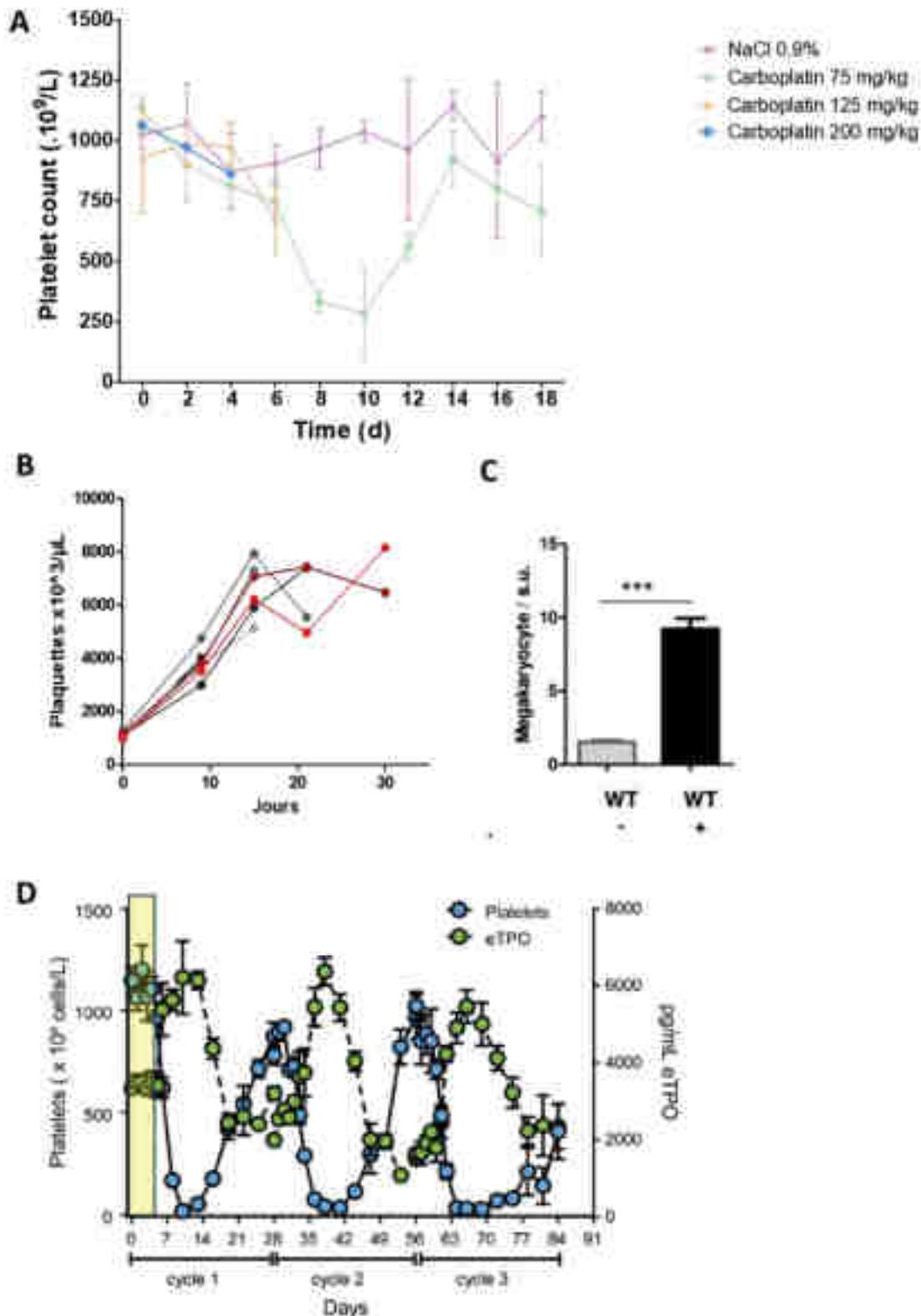


Figure 17 : Données pré-cliniques B6 à la CTT et au romiplostim. (A) Résultats préliminaire du laboratoire montrant une étude « dose-réponse » de thrombopénie induite par carboplatine. Une forte diminution de la numération est observée avec un traitement à 75mg/kg de carboplatine. Des injections à plus fortes concentrations ont causé l'arrêt des expérimentations animales pour bien-être animal. (B) Une administration de romiplostim à 100µg/kg chez la souris entraîne une augmentation de la numération plaquettaire (stage de DFASP2, Jérôme Santer, UMR_S1255) (C) Stimulation de la mégacaryopoïèse par le romiplostim. Le romiplostim entraîne une augmentation du nombre de MK dans la moelle. Adapté de Léon C *et al.*, 2012. (D) Relation inverse entre la numération plaquettaire et la concentration en TPO dans un modèle murin de 3 cycles de chimiothérapie et irradiation. La concentration de TPO est maximale au nadir plaquettaire. La fenêtre thérapeutique (encadré jaune) de romiplostim correspond à la période avant l'augmentation de la TPO. Issu et adapté de McElroy PL *et al.*, 2015.

2 Objectifs

Le travail que j'ai effectué s'inscrit dans un projet de recherche qui vise à faire progresser les connaissances sur la formation des plaquettes sanguines, en particulier dans des contextes pathologiques où la chimiothérapie entraîne de profondes altérations de la moelle osseuse. Plus précisément, mon projet cherche à évaluer comment le romiplostim restaure la numération plaquettaire dans un contexte de traitement par le carboplatine. L'essentiel de cette étude a été réalisée sur des moelles osseuses et le sang de souris *wild-type* (WT).

Le travail s'articule autour de trois axes visant à :

1) *Mettre en place le modèle murin de prise en charge de la CIT par le romiplostim.* Sur la base des données de la littérature et du laboratoire (paragraphe 1.4.1), j'ai participé au développement du modèle de CIT, en présence ou non de romiplostim. En suivant la numération plaquettaire, nous avons pu identifier les périodes de régénération de la thrombopoïèse 1) lorsqu'elle est naturellement induite en compensation à la destruction des CSH par le carboplatine, nous parlerons de **thrombopoïèse réactionnelle** (condition carboplatine) et 2) lorsqu'elle est stimulée pharmacologiquement par le traitement de romiplostim, on parlera alors de **thrombopoïèse stimulée** (condition carboplatine + romiplostim). La production de plaquettes et la mégacaryopoïèse seront étudiées au cours de ces deux différentes phases.

2) *Déterminer l'impact du romiplostim sur la moelle osseuse en CIT.* Dans un premier temps, je me suis attaché à caractériser les perturbations de la moelle osseuse liées au traitement par le carboplatine, comprenant la cellularité et la dilatation des sinusoides. Nous avons ensuite comparé les changements morphologiques des MK pendant les périodes de régénération survenant pendant les thrombopoïèses réactionnelle et stimulée, en analysant leur contenu en DMS et l'aspect du noyau (reflet de la maturation), et leurs interactions avec les sinusoides (reflet de l'intravasation). Pour cela, j'ai utilisé deux approches d'imagerie, i) la microscopie confocale dans le but d'obtenir une vision *globale* du tissu et des interactions du MK avec son microenvironnement et ii) la microscopie électronique qui dispose de la résolution nécessaire pour détailler les anomalies morphologiques des MK et de ses zones de contact avec les sinusoides.

3) *Caractériser les conséquences fonctionnelles et structurelles sur les plaquettes sanguines.* Dans cette troisième partie de l'étude, j'ai voulu savoir si les défauts des MK affectent la qualité des plaquettes au niveau de leur structure (taille, maturité) et de leur capacité à s'agréger.

3 Matériels et méthodes

3.1 Axe 1 : mise en place du modèle murin

3.1.1 Modèle de souris et expérimentation animale

Des souris mâles, de fond génétique C57BL/6J, ont été utilisées à l'âge adulte entre 10 et 15 semaines (Charles River Laboratory). La CIT est induite par injection intrapéritonéale de carboplatine (CARBOPLATINE ARROW 10MG/ML) à une dose 75mg/kg. L'augmentation de la production de plaquettes sanguines a été induite par une stimulation au romiplostim (NPLATE® 250µg, Amgen) en injection rétro-orbitaire à 100µg/kg, 2 heures suivant l'administration de carboplatine. Quatre groupes d'études sont mis en place :

- i) Groupe « contrôle » par injection de NaCl 0,9% ;
- ii) Groupe « carboplatine » par injection de carboplatine ;
- iii) Groupe « CaRomi » par injection de carboplatine et de romiplostim ;
- iv) Groupe « romiplostim », en contrôle de son bon fonctionnement.

L'animalerie de l'EFS héberge les animaux selon l'agrément E67-482-10. Les expérimentations animales sont réalisées de façon réglementée, suivant les modalités décrites dans la saisine de référence : n°APAFIS #39532-2022111516126717.

3.1.2 Suivi de la numération plaquettaire et définition des phases de régénération

L'efficacité du traitement est évaluée par le suivi de la numération plaquettaire. Elle est réalisée, tous les 3 jours, par un prélèvement caudal de sang anticoagulé par l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 12mM et passage dans un compteur cellulaire (compteur Element HT5). Le compteur permet d'obtenir une numération de formule sanguine (NFS) complète, ainsi que la taille des plaquettes (MPV pour *Median platelet volume*).

3.1.3 Dosage de la TPO

Préparation du sérum. Le dosage de la TPO est réalisé sur le sérum des souris. Le sang prélevé à l'aorte dans un tube « sec », sans anticoagulant, est placé à 37°C pendant 2 heures. Le surnageant obtenu après coagulation est centrifugé à 8273 puis 4964 RCF. Le sérum est ensuite congelé à -80°C.

Dosage. La TPO est dosée par une méthode d'immunoabsorption enzymatique (Quantikine ELISA Mouse Thrombopoietin, Biotechne) utilisant le peroxyde d'hydrogène comme substrat de la peroxydase de raifort. L'absorbance est mesurée par un lecteur de plaque (Tecan Infinite200) à 450nm. Une gamme d'étalonnage permet de calculer la concentration de TPO (en pg/mL).

3.2 Axe 2 : étude morphologique de la moelle et des mégacaryocytes

Prélèvement et préparation de la moelle osseuse. La mise à mort des souris est réalisée par dislocation cervicale par une personne habilitée (normes européennes 2010/63/UE). Les fémurs et tibias sont rapidement disséqués et nettoyés. Les os sont ensuite traités selon deux protocoles différents : i) fixation des fémurs au paraformaldéhyde 4% (PFA) pour les études d'immunofluorescence ; ii) fixation des tibias au glutaraldéhyde 2% (Electron Microscopy Sciences EMS, USA) et paraformaldéhyde 2% (Polyscience, inc., Warrington) pour les observations de microscopie électronique à transmission (MET). Les os fixés sont décalcifiés dans une solution de 0,171M d'EDTA (EDTA, Euromedex, pH = 7,5) renouvelée tous les 2 jours pendant 10 jours.

3.2.1 Etude de la moelle osseuse par microscopie confocale

Enrobage et coupe. Après fixation au PFA 4% et décalcification, les os sont lavés en PBS. Ils sont enrobés dans de l'agarose 4% (Agarose LM3 Low Melting Point, Euromedex). Des coupes épaisses, de 250 μ m, sont réalisées au vibratome (Leica VT1200S) et déposées sur une lamelle en verre (Glass Coverslips, 25x75mm, EMS).

Immunomarquage. Les échantillons sont incubés 30min à température ambiante avec une solution de blocage (Tween 0,05%, BSA 0,1%, Tris Buffered Saline) suivi d'un lavage au Tris Buffered Saline (Sigma-Aldrich). Les sinusoides sont marquées par un anticorps dirigé contre la Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4, R&D Systems, AF1443), à 0,5 μ g/mL, permettant de visualiser les cellules endothéliales des sinusoides. Les MK sont repérés à l'aide d'un anticorps anti-GPIIb β (RAM1 Alexa 647, UMRS_1255), Le Hoechst 33342 (Hoechst 33342 trihychloride trihydrate 10mg/mL, Invitrogen) 10 μ g/mL, est un agent intercalant de l'ADN, permettant de visualiser le noyau. Du liquide de montage est déposé sur les coupes puis recouvert d'une chambre d'incubation (CoverWell Incubation Chambers 20 μ L, EMS).

Analyse. Les lames sont observées au microscope confocal (LEICA SP8). Afin d'avoir une vision globale du tissu, des piles d'images en z-stack sont acquises à l'objectif x40, par pas de 1 μ m entre chaque prise de vue (x = 512 pixels, y = 512 pixels). Pour analyser plus particulièrement les MK (taille, forme), les images sont acquises à l'objectif x63, zoom numérique 3, avec des pas de 0,3 μ m (x = 512 pixels, y = 512 pixels). Les images sont analysées par le logiciel d'analyse LAS X, LEICA. La quantification est réalisée sur 5 images choisies aléatoirement, issues d'au moins 3 souris différentes. Le volume analysé est de 0,002mm³. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (Standard Error of the Mean) ou médiane, n=3 souris.

3.2.2 Etude des mégacaryocytes par MET

Préparation des échantillons pour la MET. Une fois décalcifiés, les os sont lavés avec du tampon cacodylate (arsenic 0,5M, sucrose 2%, MgCl₂, CaCl₂, osmolarité 305 mosmol, pH 7,3, Merck) puis post-

fixés au tétroxyde d'osmium 1% (Merck). Après plusieurs lavages en tampon cacodylate, les échantillons sont pré-contrastés à l'aide de l'acétate d'uranyle 4% (LADD Research Industries) et déshydratés dans des bains d'éthanol de teneur croissante 70, 95 et 100%. Ensuite, ils sont incubés dans de l'oxyde de propylène (Sigma), suivi de bains dans les mélanges oxyde de propylène-Epon 25% et 50% (LADD Research Industries) puis dans l'Epon pur. Un dernier bain d'Epon pur est réalisé avant de déposer les échantillons dans des moules d'inclusion et recouverts de résine pour une polymérisation à 70°C durant, au minimum, 48 heures.

Etude histologique. Afin d'évaluer l'état général de la moelle, des sections semi-fines de 250nm sont réalisées, colorées au bleu de toluidine (bleu de toluidine 1%, borax 1%, eau distillée) et analysées à x100 au microscope optique.

Etude ultrastructurale. L'analyse ultrastructurale est réalisée sur des sections de 100nm d'épaisseur, coupées à l'aide d'un ultramicrotome (Leica EM) et déposées sur des grilles de cuivre (T200-cu, EMS). Avant l'observation au MET, les sections sont contrastées avec des métaux lourds d'acétate d'uranyle 4% et de citrate de plomb (Ultrastain 2 Leica EM).

Observation et quantification. L'observation en MET permet de préciser l'impact des traitements sur toutes les cellules médullaires, en particulier les mégacaryocytes (Jeol 2100-Plus, 120kV). Les acquisitions sont réalisées à des grossissements compris entre x600 et x8000. Le maillage des grilles permet de réaliser une quantification par unité de surface, un carré correspondant à 12 945µm². Les MK sont identifiables par leur grande taille, leur noyau polylobé et le DMS. Le nombre total de MK et les stades de maturation, sont comptés sur les coupes provenant de deux à trois souris par condition expérimentale.

3.3 Axe 3 : analyses structurales et fonctionnelles des plaquettes sanguines

3.3.1 Analyse phénotypique des plaquettes par cytométrie en flux

Le phénotype des plaquettes issues des différents groupes d'analyse est suivi dans le temps par cytométrie en flux, à des jours cinétiques d'intérêts : J-8, 10, 14, 20 post-injection. Pour cela, 20 µl de sang sont prélevés à la queue de chaque souris, par du personnel habilité. Il est prélevé sur une solution citrate-dextrose 21mM (ACD).

L'âge des plaquettes est déterminé à l'aide du marqueur thiazole orange (n°CAS 107091-89-4, Sigma-Aldrich), un agent intercalant de l'ADN, ARN, se liant à l'ARN présent en plus grande quantité dans les plaquettes jeunes. Le sang est analysé à l'aide d'un cytomètre en flux (FortessaTM X-20) piloté par le logiciel BD FACSDiva. Les plaquettes sont différenciées des autres cellules sanguines par leur taille (FSC, Forward Scatter) et leur granulosité (SSC, Side Scatter). La fluorescence de 10 000 plaquettes est analysée et les résultats sont exprimés en pourcentage d'évènements positifs.

3.3.2 Etude fonctionnelle des plaquettes sanguines

L'activation plaquettaire est évaluée par un test d'agrégation plaquettaire.

Préparation des plaquettes lavées. Le sang est prélevé par ponction aortique sur un anticoagulant (1 volume d'ACD/ 6 volumes de sang). Le sang provenant de 3 souris est regroupé et centrifugé pendant 50 secondes à 2300g afin de préparer le plasma riche en plaquettes (PRP), ce dernier étant ensuite centrifugé pendant 2,5 minutes à 2200g pour culoter les plaquettes sanguines. Les plaquettes sont re-suspendues dans une solution de lavage (tampon Tyrode-albumine 0,35% + 10U héparine/mL + 5 μ M PGI2) puis subissent deux cycles de lavage-centrifugation (1900g pendant 2,5 minutes en présence de PGI2) avant d'être reprises dans une solution finale contenant 0.02U/mL d'apyrase à une concentration de $300 \cdot 10^3$ plaquettes/ μ L. L'ajout d'albumine, d'héparine et de PGI2 pendant les étapes de lavage permet d'empêcher l'activation des plaquettes.

Test d'agrégation. L'agrégation plaquettaire est mesurée à 37°C par turbidimétrie dans un agrégomètre (APACT 4004, LABitec). Le principe de la méthode repose sur la transmission lumineuse, qui est minimale lorsque les plaquettes au repos forment une suspension homogène et maximale lorsqu'elles sont agrégées. Pour chaque condition, 270 μ L de plaquettes lavées sont placés sous agitation douce puis incubés soit avec de l'ADP (5 μ M) ou du CRP (2,5 μ M) en présence de fibrinogène (0,05 mg/mL) dans un volume final de 300 μ L. L'ADP et le collagène permettent d'activer les plaquettes et l'ajout de fibrinogène permet aux plaquettes d'agréger entre elles après qu'elles aient été activées. C'est une technicienne de l'Établissement Français du Sang qui s'est chargée du lavage des plaquettes et du test d'agrégation.

Analyse des plaquettes par MEB. Afin d'analyser la forme des plaquettes, elles sont fixées au glutaraldéhyde 2,5%. Les échantillons sont déposés sur des lamelles recouvertes de poly-L-lysine (Sigma-Aldrich), déshydratés par des bains de concentrations croissantes d'éthanol (70, 80, 95, 100%) et dessiqués à hexamethyldisilane (HDMS, Merck). Les lamelles sont montées sur un porte échantillon et métallisées par pulvérisation d'une fine couche d'un mélange platine-palladium. Les échantillons sont observés au microscope Helios NanoLab dual beam (FEI). Les acquisitions sont réalisées à un grossissement de x15000.

Analyse ultrastructurale des plaquettes. Les plaquettes sont fixées et incluses pour MET selon le protocole cité précédemment.

3.4 Analyse statistique.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM avec le nombre n représentant le nombre d'expériences indépendantes réalisées. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel

PrismGraphpad (La Jolla, CA, USA). La distribution normale des valeurs étudiées est testée par un test de Shapiro-Wilk. En fonction de la distribution Gaussienne, nous avons réalisé un test de Kruskal-Wallis (non-Gaussien) (Figure 20Aii et iii, Bii et iii) et un test T de Student (Gaussien) (Figure 21A). Des P-valeurs inférieures à 0,05 sont considérées comme statistiquement significatives. *P<0,05 ; **P<0,01 ; ***P<0,001 ; ****P<0,0001.

4 Résultats

4.1 Le romiplostim prévient la thrombopénie induite par le carboplatine

Le modèle murin que nous avons utilisé consiste à l'injection de carboplatine à 75mg/kg, suivie ou non, d'une injection de romiplostim 100µg/kg. En contrôle, nous avons injecté du sérum physiologique (NaCl 0,9%) (Figure 18A).

Caractérisation des cinétiques de régénération. La numération plaquettaire normale des souris est d'environ $1400 \cdot 10^9$ plaquettes/L de sang (courbes grises, Figures 18B). Le carboplatine provoque une chute importante du nombre de plaquettes à $180 \cdot 10^9$ plaquettes/L le 9^{ème} jour, suivie d'une augmentation progressive pour atteindre une valeur normale le 17^{ème} jour (courbe verte, Figure 18Bi). Ainsi, la thrombopoïèse réactionnelle survient entre les jours 9 et 17, phase pendant laquelle la moelle se régénère naturellement en réaction à la myélosuppression. L'augmentation journalière du compte plaquettaire au cours de cette phase est de $116 \pm 11 \cdot 10^9$ /L/jour. Le romiplostim, lorsqu'il est administré seul, entraîne une forte augmentation de la numération plaquettaire, jusqu'à atteindre $5000 \cdot 10^9$ plaquettes/L au 7^{ème} post-injection (courbe bleue, Figure 18Bii). Injecté deux heures après le carboplatine, il prévient complètement la thrombopénie et induit même une augmentation de la numération plaquettaire à $3400 \cdot 10^9$ plaquettes/L le 9^{ème} jour après l'injection (courbe rouge, Figure 18Biii). Cette phase de forte stimulation de la thrombopoïèse survient entre les jours 5 et 9, phase pendant laquelle la production journalière de plaquettes est augmentée de 3 fois en comparaison au carboplatine seul ($370 \pm 31 \cdot 10^9$ /L/jour, $p < 0,001$). Par conséquent, pour la suite de l'étude, nous avons sélectionné le jour 14 pour analyser la moelle osseuse dans des conditions de régénération réactionnelle (carboplatine seul) et le jour 6 dans le cadre d'une régénération stimulée (carboplatine + romiplostim).

L'analyse de la formule sanguine révèle que les autres cellules sanguines (érythrocytes et PNN) ne sont pas impactées par les différents traitements (Figure 18C).

Evolution de la concentration plasmatique de TPO. La production plaquettaire est sous l'influence de la TPO. En condition physiologique, la concentration de TPO est de $4844,80 \pm 1599,39$ pg/ml de sang et, comme attendue, elle est inversement *proportionnelle* au nombre de plaquettes sanguines dans les groupes d'animaux traités avec le romiplostim seul ou combiné avec le

carboplatine (Figures 18Dii et 18Diii). De manière inattendue, cette corrélation inverse n'est pas observée chez les souris traitées avec le carboplatine seul (Figure 18Di). Les mécanismes en cause ne sont pas clairs, mais pourraient faire intervenir l'apoptose des cellules hépatiques (productrices de TPO) par la chimiothérapie et/ou une contribution d'autres cytokines (42).

Quoi qu'il en soit, ces premières données valident notre modèle préclinique en montrant que le romiplostim est capable de prévenir la thrombopénie induite par le carboplatine. Cependant, elles n'offrent aucune information sur l'état général de la moelle osseuse et des mégacaryocytes, les cellules pourvoyeuses des plaquettes sanguines.

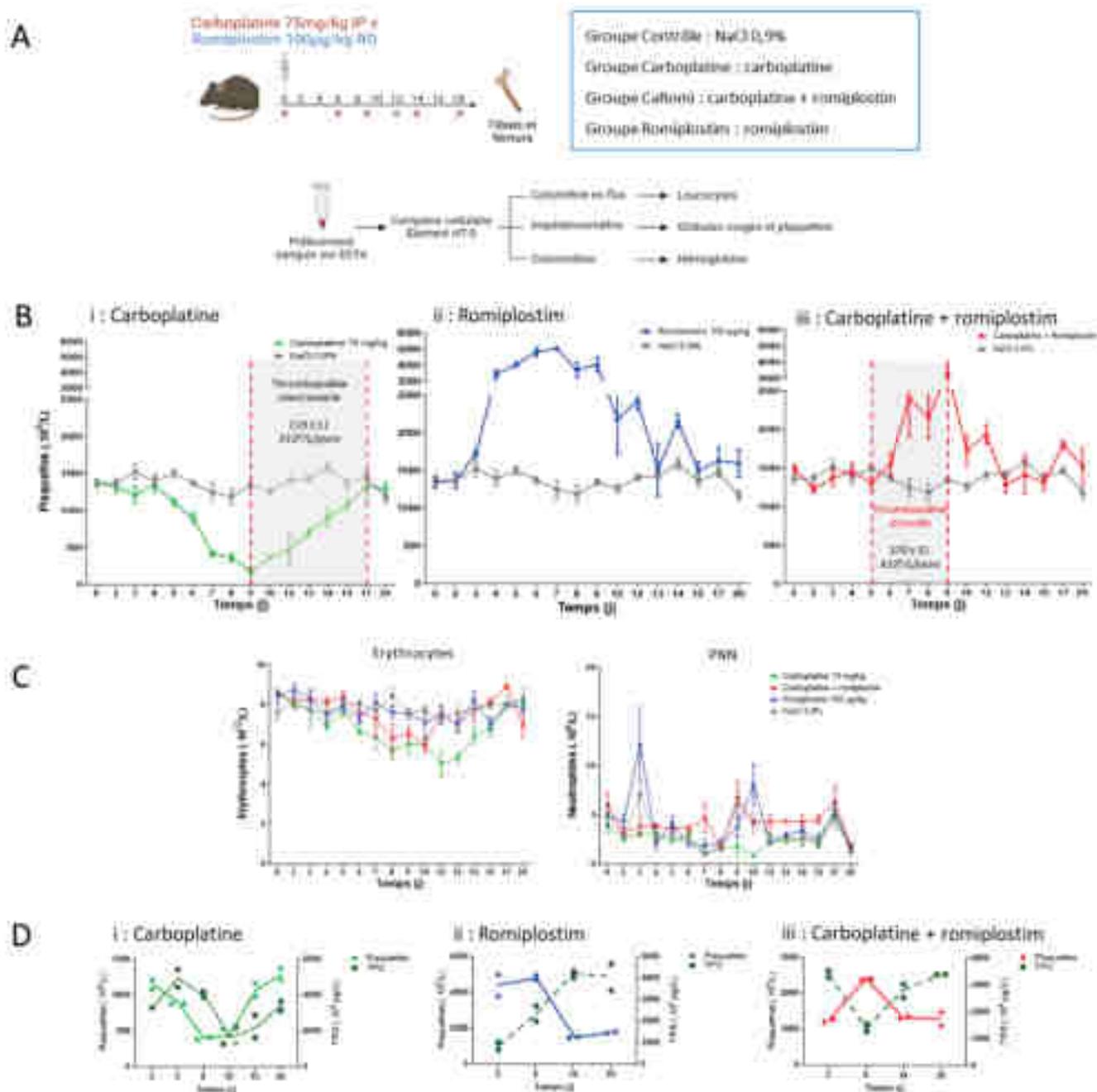


Figure 18 : Le romiplostin est efficace à prévenir la CTT. (A) Modèle préclinique et méthode utilisée pour mesurer la formule sanguine. Le carboplatine est injecté à 75mg/kg, suivi ou non d'une injection de romiplostin à 100µg/kg. Le compteur cellulaire Element HT-5 permet d'obtenir une NFS complète. **(B) Suivi de la numération plaquettaire** des souris traitées (i) au carboplatine à 75mg/kg, (ii) au romiplostin seul (100 µg/kg) et (iii) par carboplatine + romiplostin. Le romiplostin prévient la thrombopénie induite par la chimiothérapie la CTT. **(C) Formules sanguines** montrant l'absence d'effet des traitements sur la numération érythrocytaire et des polymorphonucléaires neutrophiles. **(D) Evolution de la concentration plasmatique de la TPO.** La relation inverse entre la concentration de TPO et la numération plaquettaire existe dans les groupes romiplostin (ii) et CaRomu (iii), mais fait défaut dans la condition carboplatine (i). Les valeurs sont exprimées moyenne ± SEM (n=3 souris/condition expérimentale).

4.2 Le carboplatine provoque une décellularisation de la moelle qui fragilise les sinusoides

Dans cette partie de l'étude, nous nous sommes intéressés aux changements qualitatifs de la moelle osseuse des souris traitées au carboplatine survenant vers le 6^{ème} jour, c'est-à-dire lors de la baisse du compte plaquettaire de 50% (demi-nadir plaquettaire). Les colorations de coupes semi-fines en bleu de toluidine permettent de mettre en évidence une dilatation anormale des sinusoides, avec un retour à la normale le 20^{ème} jour post-traitement (Figure 19B). De façon similaire, les images de microscopie confocale réalisées avec un anticorps dirigé contre la FABP4, protéine cytoplasmique des cellules endothéliales, montre une augmentation importante de la lumière des sinusoides (Figure 19C). Afin de compléter ces approches d'imagerie, nous avons utilisé la MET fournissant plus de détails sur l'organisation cellulaire du tissu. Les images Figure 19Di et 19Diii décrivent l'aspect des sinusoides témoins présentant une ultrastructure normale des cellules endothéliales et des péricytes. Cela contraste fortement avec les images de la moelle de souris après traitement, avec un fort amincissement de la paroi des sinusoides et des cellules endothéliales fortement étirées et pourvues de noyaux aplatis (flèches, Figures 19Di versus 19Dii), laissant penser à des parois fragilisées. Les péricytes qui soutiennent l'endothélium apparaissent très endommagés et la décellularisation est bien visible dans la moelle de ces souris, ce qui peut expliquer la dilatation des sinusoides (Figure 19Dii). Néanmoins, il est intéressant de noter que les cellules endothéliales restent jointives, sans ruptures évidentes et avec des jonctions inter-endothéliales visibles (pointe de flèche, Figure 19Dv et iv). Pour finir, on note la présence de nombreux adipocytes au cours de la régénération médullaire (images non montrées). L'ensemble de ces effets est également observé en présence de romiplostim.

Prises ensemble, ces observations permettent de dresser un portrait global des multiples anomalies causées par le carboplatine sur la moelle osseuse, en montrant notamment la forte déstructuration de la paroi des sinusoides. Il s'agit maintenant de savoir si, et comment, la mégacaryopoïèse est affectée dans les conditions expérimentales de CIT.

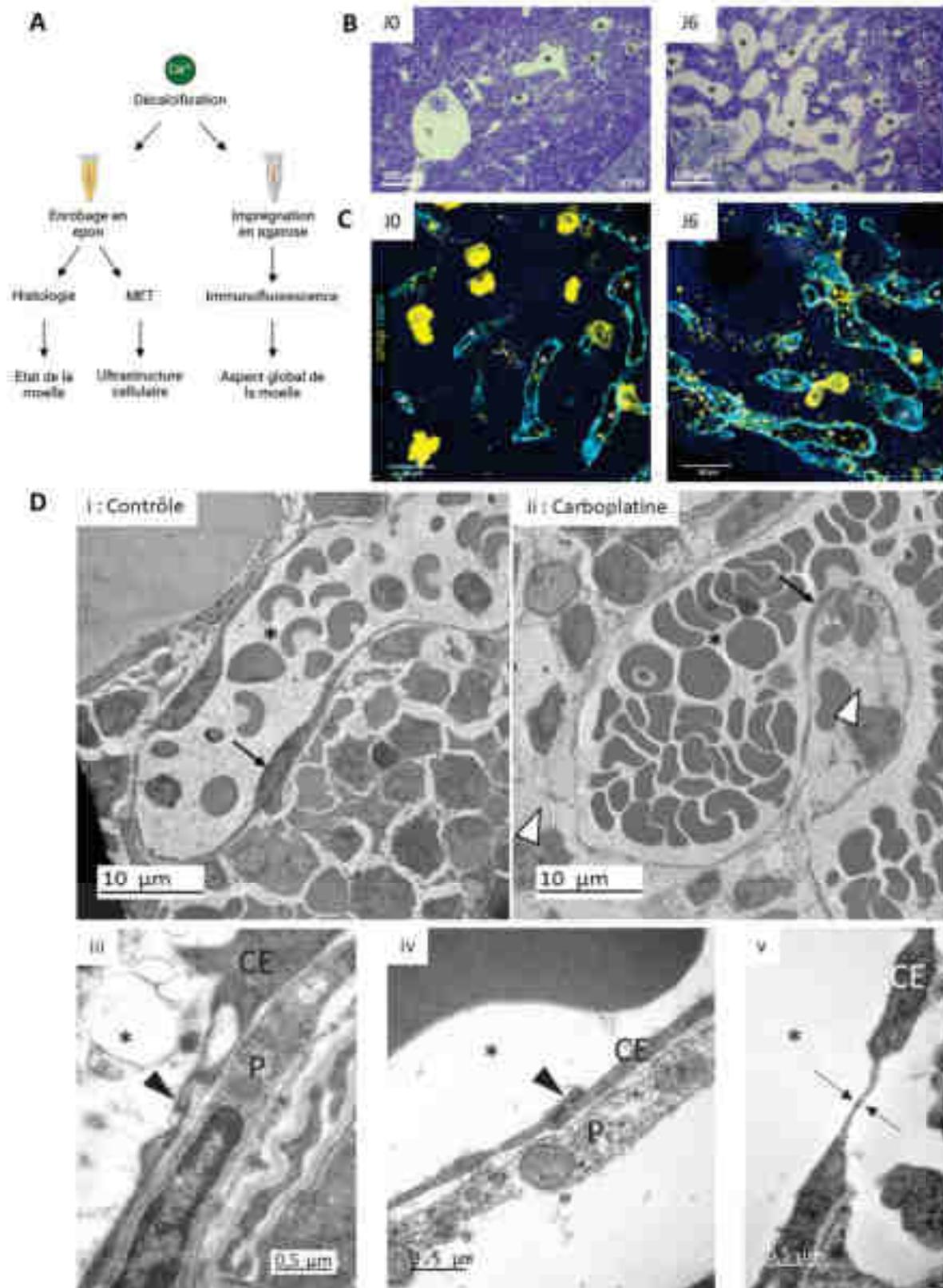


Figure 19 : Un traitement par carboplatine entraîne une décellularisation et une dilatation des sinusoides. (A) Schéma de la stratégie expérimentale. (B) Images d'histologie de moelle murine traitée par carboplatine 75mg/kg à J0 et J6. Une forte dilatation est observable au jour 6. (C) Images de microscopie confocale de fluorescence après immunomarquage avec des anticorps anti-FABP4 (endothélium en cyan) et anti-GPIIb/IIIa (MK en jaune). Le DAPI marque les noyaux. La dilatation des sinusoides est visible à J6. (D) Ultrastructure des sinusoides de souris WT (i et iii) et traitées au carboplatine à J6 (ii, iv et v). Après traitement au carboplatine, les cellules endothéliales (CE) sont étirées, possèdent des noyaux aplatis (flèche), sont jointives (tête de flèche) et extrêmement amincies, sans rupture apparente (double flèches). Les péricytes (P) ont un cytoplasme d'aspect délavé faisant penser à une cellule morte. On note également une importante décellularisation (flèche blanche). *, lumière des sinusoides ; S, sinus central. Les images sont représentatives de 3 souris WT et traitées.

4.3 Caractérisation globale de la mégacaryopoïèse dans la phase de régénération

Dans cette partie de l'étude, nous avons cherché à préciser l'impact des traitements sur la capacité de la moelle i) à produire et ii) à faire maturer les mégacaryocytes. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'immunomarquage de coupes de moelle en utilisant des anticorps dirigés contre FABP4 et GPIIb β (marqueur membranaire spécifique de la lignée mégacaryocytaire) afin de visualiser respectivement l'endothélium des sinusoides et les mégacaryocytes. A titre d'exemple, les **Figures 20Ai et 20Bi** montrent des images représentatives des immunomarquages et de leurs quantifications (valeurs en bas à droite).

Caractérisation des mégacaryocytes dans les souris traitées au carboplatine. Au cours de la cinétique de thrombopénie, le carboplatine entraîne une forte diminution du nombre de MK jusqu'à atteindre une baisse de 80% du nombre de MK au 6^{ème} jour post-injection. Ceci correspond à la phase myélosuppressive. Un effet rebond du nombre de MK est ensuite observé, qui se traduit avec un retour à la normal du nombre de MK au 14^{ème} jour, correspondant à la thrombopoïèse réactionnelle. Il est intéressant de noter que le diamètre des MK est augmenté de façon significative (environ 23%) au cours de cette étape, suggérant une perturbation de la maturation des MK. La situation revient à la normale au 20^{ème} jour (**Figures 20Aii et Bii**).

Caractérisation des mégacaryocytes au cours de la thrombopoïèse stimulée. Un traitement par le romiplostim provoque une augmentation immédiate du nombre de MK (environ 2 fois) (**Figure 20Aiii**). Cette dernière traduit la phase de thrombopoïèse stimulée. Ces MK nouvellement formés sont également plus grands en comparaison de la situation contrôle (**Figure 20Biii**). Après le 10^{ème} jour, le nombre et la taille des MK diminuent progressivement pour atteindre des valeurs normales au 20^{ème} jour (**Figures 20Aiii et Biii**).

Pour finir, il est important de souligner que l'aspect des MK observés aux deux stades de thrombopoïèse est très différent. En particulier, au cours de la stimulation par le romiplostim, on note la présence d'une grande quantité de MK, de tailles et formes très hétérogènes, reflétant probablement de fortes perturbations de la mégacaryopoïèse (**Figure 20C**). Nous avons voulu savoir à quel point l'ultrastructure des MK était affectée.

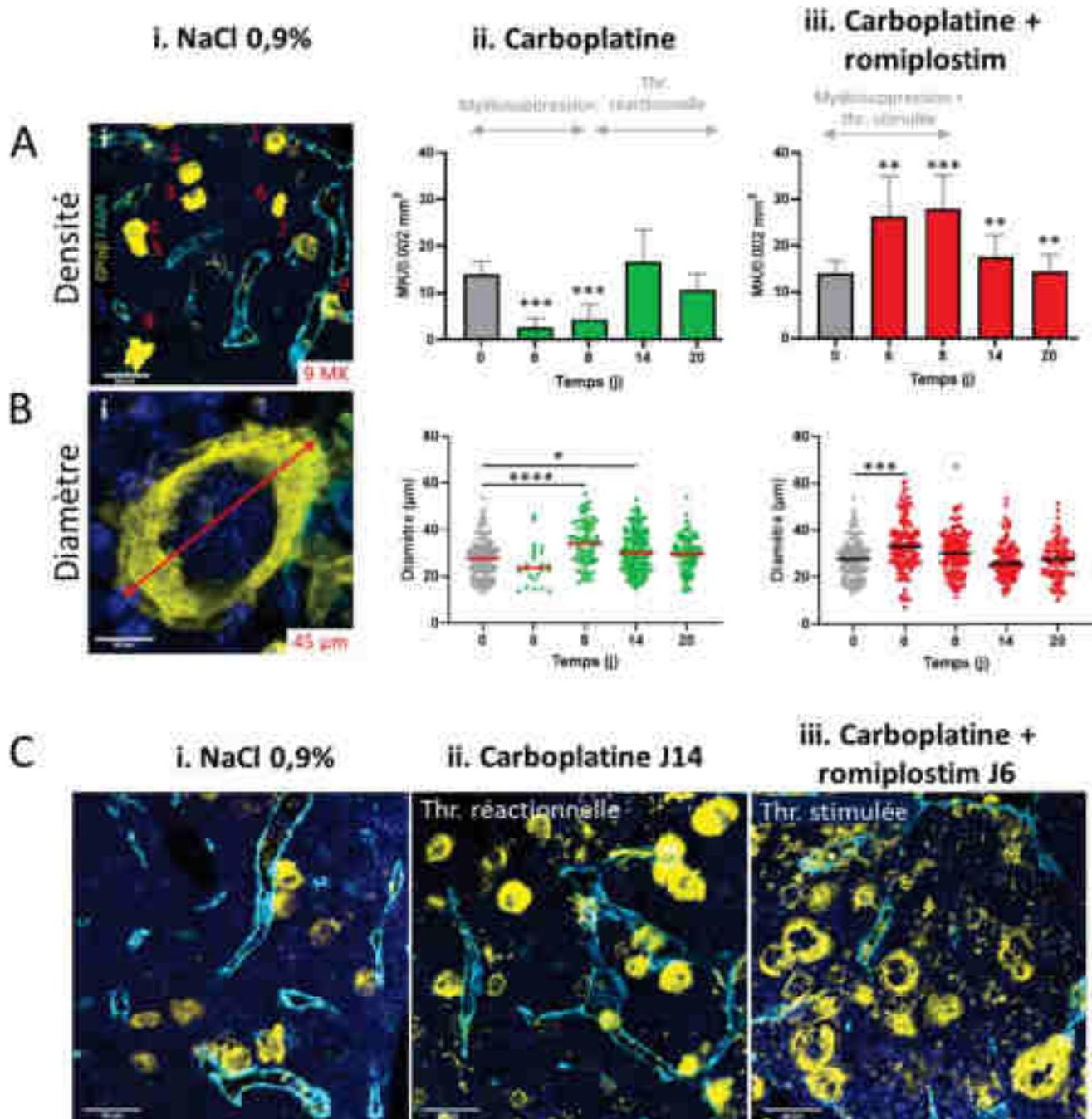


Figure 20 : Analyse par microscopie confocale de la mégacaryopoïèse. (A et B) Quantification de la densité de MK et mesure des diamètres des MK au cours des phases de myélosuppression, de thrombopoïèse réactionnelle et stimulée. Le nombre et le diamètre de MK sont constants en condition contrôle. En condition carboplatine, le nombre de MK chute au jour 6 puis augmente au jour 14 (phase de thrombopoïèse réactionnelle). Le romiplostim stimule la production des MK entre les jours 6 et 8. En condition carboplatine, on observe une augmentation de la taille des MK au jour 8 correspondant au nadir. Le romiplostim entraîne une augmentation de la taille des MK plus précocement (au jour 6) puis un retour à la normale. Image d'un MK mature (45,42µm), x63, zoom 4. (C) Aspect de la moelle lors des phases de thrombopoïèse. En comparaison à la condition NaCl 0,9% (i), une quantité plus importante de MK est présente au jour 14 post-injection de carboplatine (ii). Une régénération forcée par le romiplostim (iii) entraîne une plus grande production de MK de tailles très hétérogènes. (A) Moyenne ± SEM ; (B) Médiane, 24<total MK analysés<158, sur 3 expériences individuelles. *P<0,05 ; **P<0,01 ; *P<0,001 et ****P<0,0001, comparaison avec les valeurs témoins NaCl 0,9%.**

4.4 Les mégacaryocytes produits après stimulation au romiplostim sont immatures et libèrent des fragments hétérogènes

Pour rappel, il est possible de distinguer par MET trois stades de maturation *in situ* sur des coupes de moelle osseuse. Cette classification repose sur des critères de taille de la cellule, l'aspect du noyau et la présence de DMS. Ainsi, les mégacaryocytes de stade III correspondent aux mégacaryocytes les plus matures, renfermant un noyau polylobé, une zone périphérique (PZ) continue et un DMS (qui constitue le réservoir de membrane plasmique des futures plaquettes) pleinement développé (Figure 21Bi). Nous avons focalisé notre étude sur les phases de thrombopoïèse réactionnelle et stimulée.

Maturation des mégacaryocytes au cours de la thrombopoïèse réactionnelle. Les différents stades de maturation ne sont pas présents dans les mêmes proportions que dans les souris contrôles, avec une proportion de MK de stade III augmentée de 1,2 fois au cours de la phase de régénération (Figure 21A). D'un point de vue ultrastructural, la zone périphérique de ces MK, formant normalement une couronne cytoplasmique régulière dans les MK témoins, apparaît ici beaucoup plus large (7,5 vs 2 μm) et morcelée. De nombreuses protrusions sont présentes à la surface de ces MK leur donnant un aspect atypique étoilé (Figure 21Bii). Ces protrusions sont capables de déformer et perforer l'endothélium (43), pour autant, nous n'avons pas réussi à détecter d'événements de passage complet de proplaquettes.

Maturation des mégacaryocytes au cours de la thrombopoïèse stimulée. La quantification des stades de maturation révèle que la proportion de MK de stade III est diminuée de 2,1 fois dans la phase de thrombopoïèse stimulée ($p < 0,001$) (Figure 21A). On constate néanmoins d'importantes anomalies dans ces MK. Ils apparaissent géants (diamètre $> 50\mu\text{m}$), avec un noyau hyperlobé, et des défauts de structuration du DMS. Celui-ci est moins développé et ne délimite pas les territoires cytoplasmiques normalement présents dans les mégacaryocytes témoins (Figure 21Biii). Lorsque ces MK sont apposés aux sinusoides, ils ont tendance à s'étaler sur le vaisseau sanguin et émettent, dans la lumière, de nombreux prolongements cytoplasmiques de tailles et formes très diverses, certains ressemblant à des microvésicules (Figure 21Cii). Cela tranche avec la situation contrôle où les MK, de forme arrondie, étendent des prolongements uniques de grandes tailles, appelés proplaquettes. De façon surprenante, on note également la présence de MK entiers dans la microcirculation médullaire (Figure 21Cii), un événement quasi-inexistant dans la condition témoin (Figure 21Cii vs i). L'ensemble de ces observations indique donc que les traitements modifient profondément la structuration des MK et leur intravasation dans la circulation sanguine. Il est possible que ces altérations se répercutent sur la biogénèse des plaquettes.

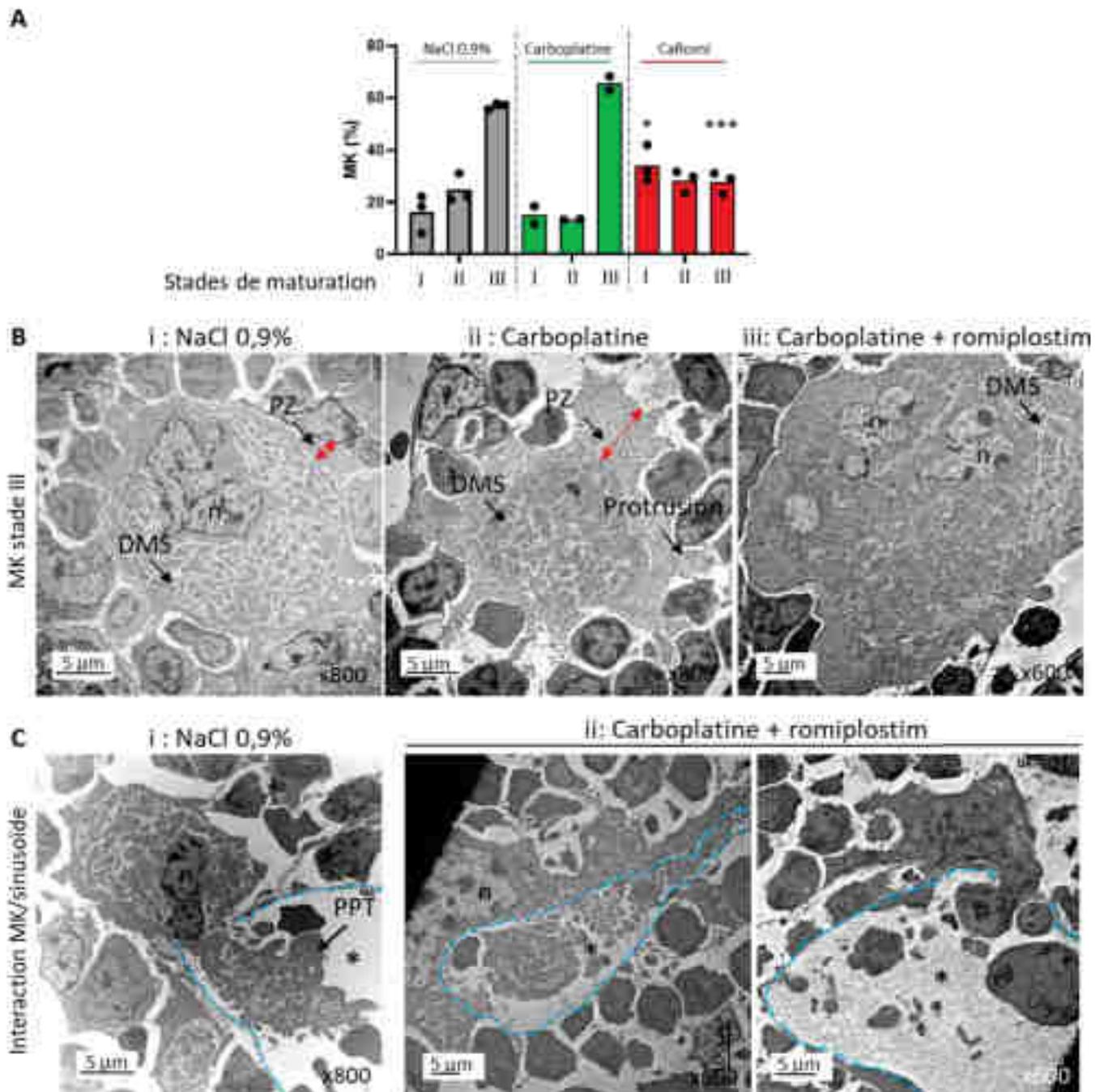


Figure 21 : Etude ultrastructurale de l'impact du romiplostim sur la maturation des MK. (A) Répartition des stades de maturation des MK. Les stades de maturation sont quantifiés selon sur les critères morphologiques présentés dans la Figure 2B. Le romiplostim entraîne une augmentation des MK de stade I (34%) et une diminution des stades III (27,8%). Moyenne \pm SEM, 108<total MK analysés<374, 3 souris indépendantes, * $P<0,05$ et *** $P<0,001$ comparaison avec les valeurs témoins NaCl 0,9%. **(B) Images représentatives des MK.** En condition physiologique, un MK de stade III se caractérise par une grande taille, avec un cytoplasme rempli de DMS et une zone périphérique (PZ) fine et continue (double flèche rouge). Suite au traitement par carboplatine, le MK a une forme plus étoilée, une PZ plus épaisse et une multitude de protrusions. Suite au traitement par carboplatine + romiplostim, les MK sont géants et leur DMS est moins développé. **(C) Intravasation des MK.** En condition normale, le MK normal est apposé au sinussoïde et émet, au travers de la cellule, une proplaquette (PPT). Après traitement carboplatine + romiplostim, les MK s'étalent sur les vaisseaux et se délitent dans la lumière du sinussoïde. Comme illustré (ii, image de droite), le noyau de MK se retrouve parfois dans la lumière du sinussoïde, suggérant que des MK entiers pourraient se retrouver dans la circulation. *, lumière du sinussoïde ; la ligne bleue délimite la paroi des sinussoïdes. Images provenant de l'analyse de 2 à 3 souris/condition expérimentale.

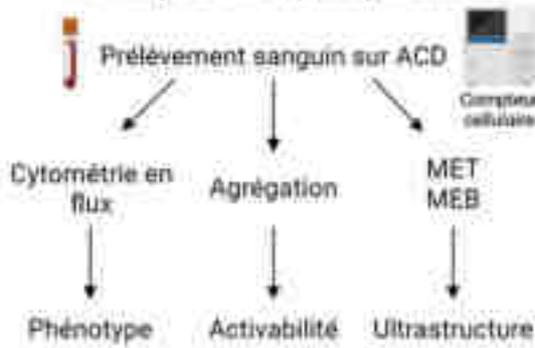
4.5 Production de plaquettes immatures au cours des thrombopoïèses réactionnelle et stimulée

Dans la suite logique du schéma de la mégacaryopoïèse, nous nous sommes intéressés au produit final : les plaquettes sanguines. Nous avons tout d'abord évalué la taille des plaquettes par cytométrie en flux. En condition physiologique, le MPV est de $4,8 \pm 0,3\text{fL}$ (Figure 22B). De façon intéressante, nous observons une augmentation du MPV dans les deux phases de régénération, atteignant un maximum de $6,7\text{fL}$ au cours des phases de thrombopoïèse réactionnelle et stimulée (Figure 22B). De façon similaire, l'analyse simple des plaquettes par microscopie électronique à balayage confirme la présence de plaquettes discoïdes de grandes tailles dans le sang de ces souris (Figure 22Bii).

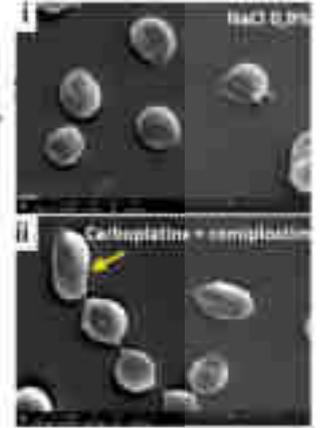
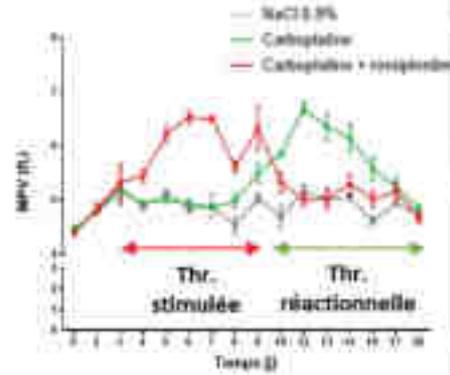
Des études dans le laboratoire ont démontrées que les plaquettes de grandes tailles sont jeunes et immatures (44). La mesure du pourcentage de plaquettes immatures est réalisée par cytométrie en flux en utilisant la sonde TO qui se lie à l'ARN présent dans les plaquettes immatures. La détection des plaquettes en cytométrie se base sur leur taille par le Forward Scatter (FSC) et leur granularité par le Side Scatter (SSC). La proportion de plaquettes jeunes est obtenue en ciblant la population qui fluoresce le plus dans le TO, appelé « TO bright », dans la population exprimant la GPIIb/IIIa. En condition contrôle, 8% des plaquettes sont qualifiées comme étant immatures. Cette proportion s'élève respectivement à 34,7% et 46,8% en cas de thrombopoïèse réactionnelle et stimulée (Figure 22Ciii). En parallèle, nous avons analysé leur ultrastructure par MET qui révèle la présence de réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, organites non présents dans des plaquettes matures (Figure 22Cv vs iv).

Les plaquettes immatures sont décrites pour être hyperactivables (45). Pour évaluer ce point, nous avons réalisé des tests fonctionnels d'agrégation. Les tests d'agrégation consistent à stimuler une suspension de plaquettes avec différents agonistes en présence de fibrinogène. Nous avons évalué les réponses à l'ADP $5\mu\text{M}$ (Figure 22D) et au collagène $2,5\mu\text{M}$ (non montré) qui sont les agonistes physiologiques les plus importants. L'analyse des courbes d'agrégation ne démontrent pas de défaut majeur dans la formation des thrombi, mais ne permettent pas d'exclure un défaut spécifiquement des plaquettes immatures (Figure 22D). Pour cette raison, nous avons fixé les agrégats et avons analysé leur capacité d'agréger. Il apparaît qu'elles restent discoïdes et n'étendent pas de pseudopodes comme le font les plaquettes de tailles normales (Figure 22Da et b). Ces résultats suggèrent une réactivité diminuée des plaquettes jeunes. Pour autant, d'autres tests fonctionnels (exemples : sécrétion du contenu granulaire, expression de glycoprotéines, survie plaquettaire) sont encore requis avant de tirer une conclusion définitive sur l'activabilité de ces grandes plaquettes.

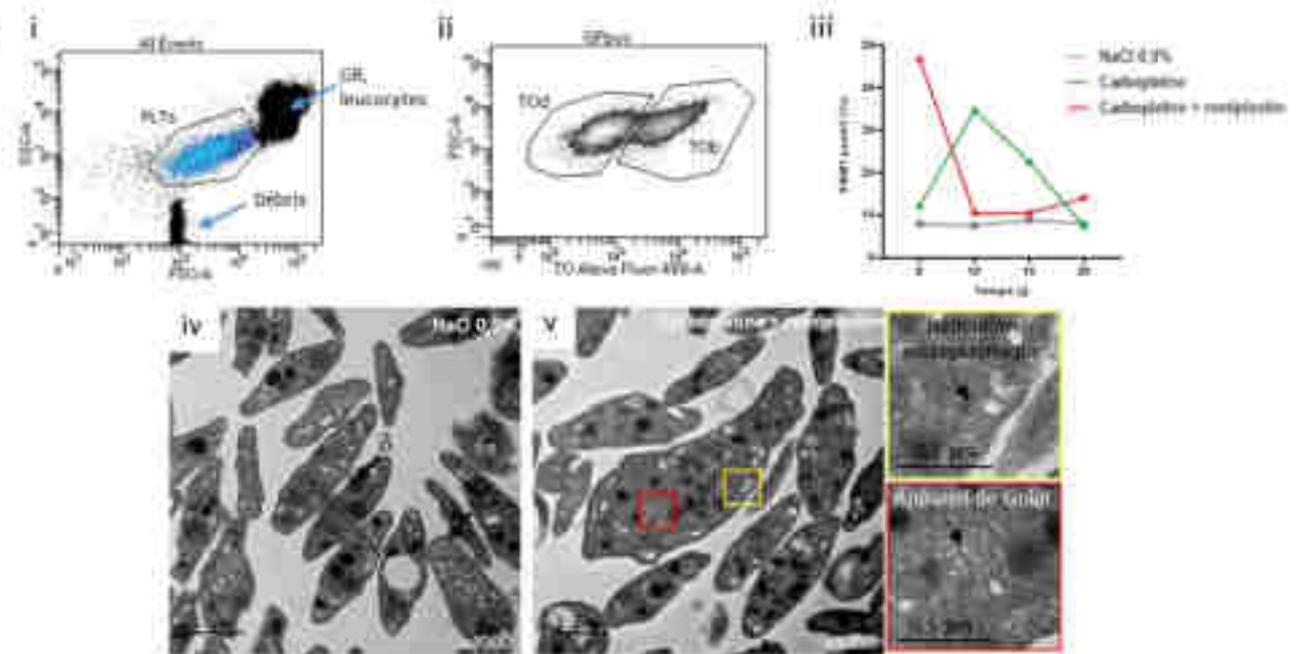
A Analyse des plaquettes



B



C



D

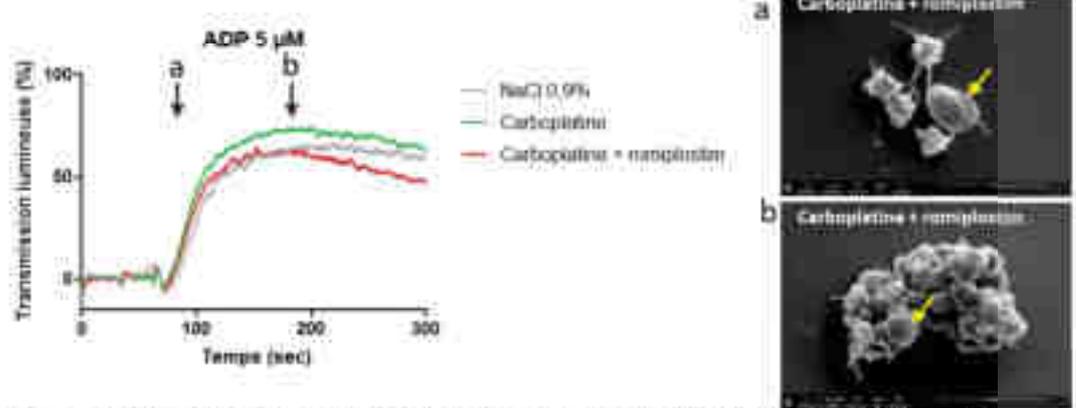


Figure 22 : La prise en charge de la CTT par le romiplostin entraîne la production de plaquettes immatures. (A) Schéma de la stratégie expérimentale. (B) L'évolution de la taille des plaquettes obtenue sur le compteur cellulaire. La taille des plaquettes (VPM) augmente au cours de la phase de thrombopoïèse réactionnelle et stimulée. (i et ii) Analyse des plaquettes par microscopie électronique à balayage (MEB) montrant la production de plaquettes de grandes tailles après stimulation avec le romiplostin (flèche jaune). (C) Les grandes plaquettes sont immatures. (i-iii) Analyse par cytométrie en flux. (i) Sélection de la population plaquettaire selon la taille et la granulosité. (ii) Les plaquettes de grandes tailles fluorescent plus en TO que les anciennes (TO-). (iv-v) Analyse par MET montrant la présence de réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi dans les grandes plaquettes. (D) Test fonctionnel des plaquettes. On ne note pas de différences dans l'aggrégation plaquettaire (stimulée par l'ADP 5 μM) entre les différents traitements. Les plaquettes sont fixées au moment du changement de forme (a) et du maximum d'aggrégation (b). L'observation des agrégats par MEB indique la présence de plaquettes de grande taille qui n'ont pas changé de forme.

5 Bilan de l'étude

A l'aide d'un modèle préclinique de thrombopénie induite par le carboplatine, nous avons pu montrer que 1) le carboplatine fragilise les sinusoides, lieu de libération des plaquettes sanguines, 2) les mégacaryocytes néoformés par la stimulation au romiplostim présentent des caractéristiques d'immatunité, se fragmentent en proplaquettes de façon désordonnée et sont capables d'entrer entièrement dans la circulation sanguine (Figure 23) et 3) près de la moitié des plaquettes générées est immature. Ainsi, l'ensemble de nos observations soulève la question de la sécurité d'une prise en charge des CIT par le romiplostim.

En résumé, chez la souris, le romiplostim semble être un traitement efficace de la CIT. Cependant, notre étude souligne également la présence d'un certain nombre d'événements secondaires tels que la présence de mégacaryocytes entiers intravasculaires et d'éléments plaquettaires de taille très hétérogène. Ceci nous conduit aujourd'hui à émettre l'hypothèse que ces événements pourraient être impliqués dans les effets indésirables, tels que les thromboses veineuses constatées lors des essais cliniques en phase II. Ainsi, il reste encore de nombreuses zones d'ombre concernant la prise en charge des CIT par le romiplostim et de nombreuses pistes doivent encore être explorées afin de garantir la sécurité des patients.

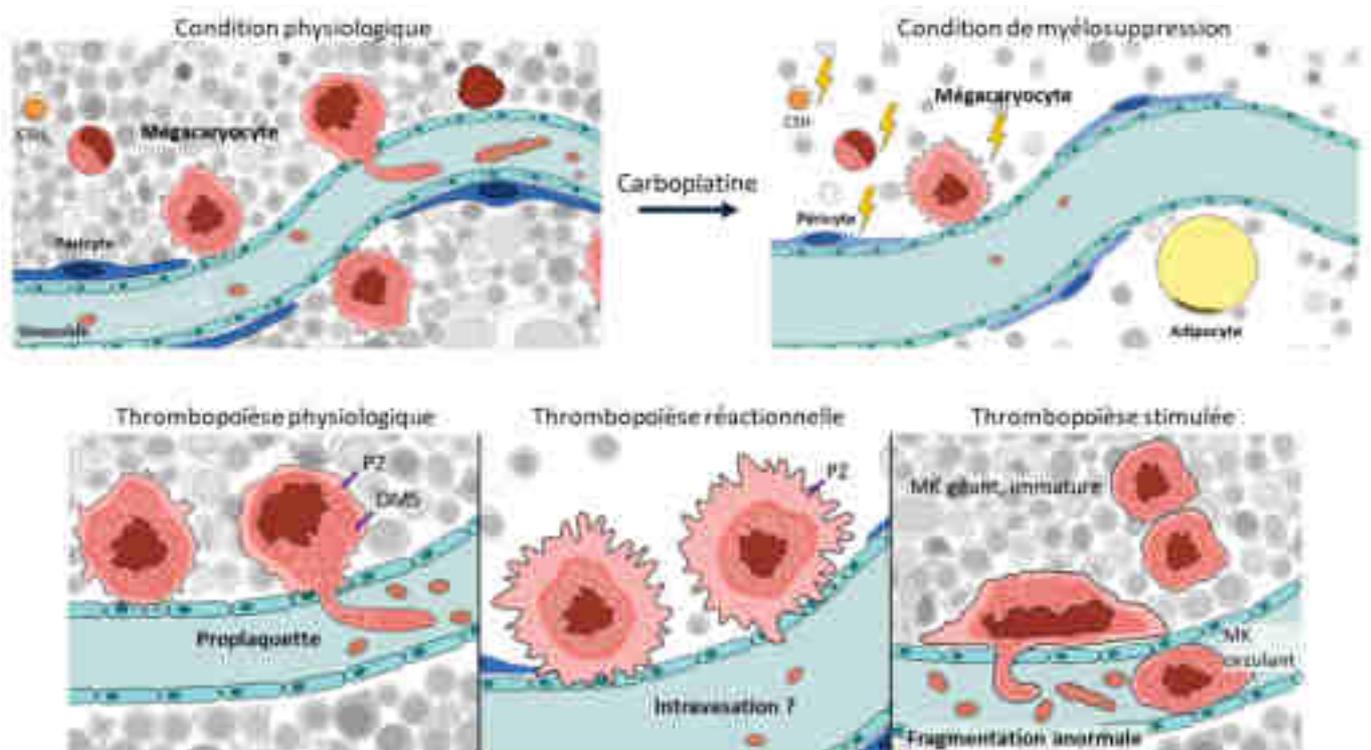


Figure 23 : Mégacaryopoïèse et thrombopoïèse. En condition physiologique, les MK étendent des proplaquettes afin de former les plaquettes. La myélosuppression provoquée par le carboplatine engendre une fragilisation des sinusoides pouvant modifier la libération des plaquettes. La thrombopoïèse stimulée induit une fragmentation anormale des MK géants et l'intravasation de MK.

Conclusion générale et perspectives

1 Discussion

Une meilleure prise en charge des thrombopénies au cours des chimiothérapies est un véritable enjeu de santé publique et sanitaire, les besoins étant importants et grandissants.

1.1 Génération de MK atypique au cours de la thrombopoïèse réactionnelle

L'une des observations les plus curieuses de ce travail est l'aspect des MK lorsqu'ils sont produits en réponse au traitement au carboplatine. Ils sont de grandes tailles et présentent une zone périphérique épaisse et irrégulière. De façon remarquable, une multitude de longues protrusions s'étendent depuis la périphérie de ces cellules, leur donnant un aspect de cellule étoilée. On sait que la zone périphérique des MK est riche en cytosquelette d'actomyosine et joue un rôle prépondérant dans le processus d'intravasation (8). En effet, au cours de leur passage transendothélial, les MK forment des protrusions invasives, identifiées comme étant des podosomes, capables de perforer l'endothélium en créant des pores transendothéliaux qui permettent le passage de proplaquettes (43) (46). Dans le cas de notre étude, on peut se demander comment ces MK d'aspect atypique interagissent et traversent les sinusoides. A ce stade, notre étude ne nous permet pas de tirer une conclusion sur le processus d'intravasation car nous n'avons pas été en mesure de détecter suffisamment d'évènements de passage transendothélial. La suite de ce travail sera donc de mieux caractériser ces structures particulières (composition, taille et organisation de leur cytosquelette) et d'étudier leurs propriétés fonctionnelles (invasives et adhésives) afin de mieux comprendre leur contribution dans la biogénèse des plaquettes dans un contexte de CIT.

1.2 Le traitement par romiplostim impacte la maturation des MK

Nos images en immunofluorescence et MET révèlent un défaut de maturation des MK suite à la stimulation au romiplostim avec, en particulier, la présence de MK géants immatures. Ce résultat inattendu pourrait être expliqué par une forte accélération du processus de différenciation/maturation des MK *in vivo*, ne permettant pas une maturation optimale des MK. Ceci est en accord avec la présence de plaquettes immatures dans le sang périphérique, un autre reflet d'une moelle osseuse hyperactive. Il est intéressant de souligner l'existence de voies biaisées vers la mégacaryopoïèse. En plus des cellules souches, une population de progéniteurs hématopoïétiques unipotents biaisés vers la mégacaryopoïèse a été récemment identifiée chez la souris (47). Elle peut directement donner naissance à des MK en s'affranchissant des stades de progéniteurs intermédiaires (Figure 24). Elle n'est active qu'en cas de besoin aigu, et on peut se demander si tel est le cas dans notre modèle de CIT en présence de romiplostim.

Haas *et al.* ont rapporté l'existence de progéniteurs ressemblant à des mégacaryocytes, les SL-MKP (stem-like megakaryocyte committed progenitors). Les SL-MKP partagent des caractéristiques des CSH avec un état de quiescence à l'état physiologique (47). Néanmoins ces cellules possèdent un potentiel de différenciation vers la lignée mégacaryocytaire. En cas de thrombopénie aiguë, ils se

différencient directement en MKP, permettant une maturation rapide du MK. Sanjuan-Pla *et al.* ont mis en évidence la présence de cellules exprimant le facteur de Willebrand et dépendant de la TPO dans le compartiment des CSH de modèle murin (48). On parle de CSH-LT (CSH à long terme) basées sur les plaquettes. De la même manière, ces cellules se différencient directement en MKP.

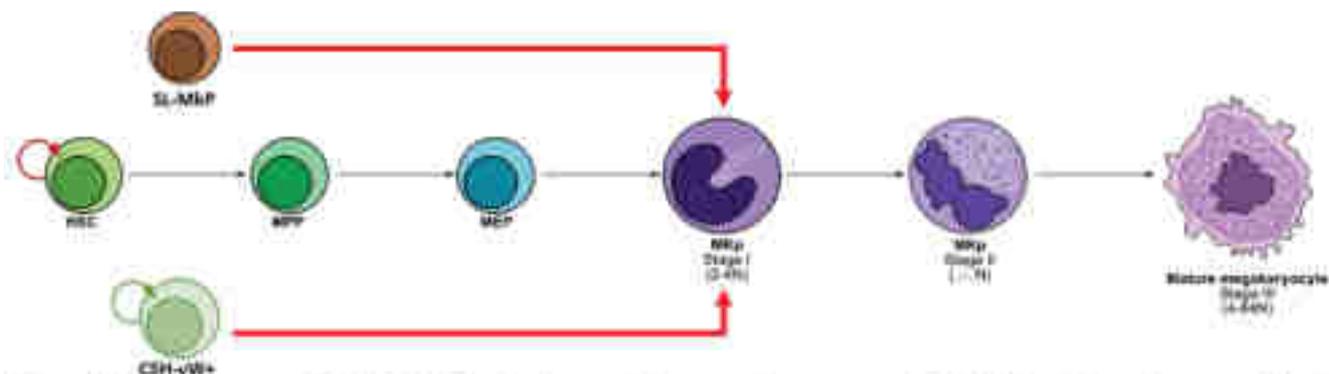


Figure 24 : La mégacaryopoïèse hâtive. Il existe des progéniteurs possédant un potentiel de différenciation unique vers la lignée mégacaryocytaire, avec un état de quiescence, en parle de SL-MkP (Hans *et al.*). Une population de cellule souche hématopoïétique exprime le Facteur de Willebrand et se différencie en MKp, ce sont les CSH-VW+ (Sanjuan-Pla *et al.*).

1.3 Le traitement par romiplostim provoque une fragmentation anormale des MK

Le traitement par le romiplostim s'accompagne également d'un nombre anormalement augmenté de fragments et de débris cellulaires dans la circulation sanguine, indiquant une fragmentation anormale des proplaquettes. De façon remarquable, des MK entiers sont également présents dans la circulation sanguine, un phénomène qui a déjà été décrit dans des cas de thromboses liées à un contexte inflammatoire ou infectieux (49). Ces événements sont très rarement visualisés à l'état physiologique et, pour l'heure, nous n'en comprenons pas la signification. La suite de ce travail sera d'étudier le devenir de ces structures en analysant notamment les poumons de ces animaux et d'évaluer la présence de noyaux nus polylobés susceptible d'obstruer la microcirculation des poumons (50). Ces résultats sont également à mettre en regard avec l'étude de Nishimura et collaborateurs qui suggèrent que la production de plaquettes par la formation de proplaquettes et fragmentation cytoplasmique est insuffisante en condition thrombopénique. Il propose un mécanisme de rupture du MK, induite par l'IL-1 α , qui permet d'augmenter rapidement la numération plaquettaire. Dans un modèle murin *in vivo*, il est démontré qu'une injection d'IL-1 α entraîne ce mécanisme de « rupture » du MK, avec une augmentation rapide de la numération plaquettaire. Le MK est capable de se déliter et ainsi de déverser les plaquettes directement dans la circulation. Cela est essentiellement observé dans un contexte inflammatoire, lorsque la concentration d'interleukine IL-1 α est élevée (42). Ce qui fait tout l'intérêt de cette étude est que cette cytokine est connue pour être libérée par les cellules endothéliales lorsqu'elles sont endommagées (51). Ceci n'est pas sans rappeler notre autre observation d'une fragilisation de la paroi endothéliale des sinusoides après induction de la CIT. Par ailleurs, l'étirement de l'endothélium pourrait modifier les propriétés physiques des jonctions inter-endothéliales (52) et impacter la voie de passage

des MK (voie transcellulaire ou/et paracellulaire). Afin d'évaluer tous ces aspects, des études *in vivo* d'imagerie intravitale sont envisagées pour observer, en temps réel, la capacité des MK à traverser et étendre des proplaquettes au niveau de l'interface MK-sinusoïdes. Cela nous apportera également des notions de cinétique de la libération des fragments et donnera des pistes pour comprendre pourquoi il est possible d'observer si facilement des MK circulants en MET.

1.4 Importance physiopathologique des études

La compréhension des mécanismes de stimulation aiguë de la mégacaryopoïèse et de leur processus de libération de plaquettes au cours de la CIT pourraient apporter des éclaircissements sur les effets secondaires associés à la prise en charge des CIT. Ainsi, nos résultats mettent en évidence, chez la souris, la présence de plaquettes immatures, de microparticules et de MK circulants, associés à la numération plaquettaire élevée. Si de tels résultats étaient observés chez l'Homme, ils pourraient expliquer, en partie, les cas de thromboses observés chez certains patients (45) (53) (54).

Par ailleurs, on sait que le cancer est, lui aussi, associé à un risque de thrombose veineuse profonde et artériel augmenté. La thrombose médiée par le cancer peut être causée par différents mécanismes. Parmi eux, le plus connu est la libération de vésicules extracellulaires par les cellules tumorales. Les vésicules extracellulaires sont « des particules naturellement libérées par les cellules, enfermées dans une bicouche lipidique, incapables de se répliquer », selon la Société Internationale des Vésicules Extracellulaires. Ces vésicules, d'environ 1000nm de diamètre, circulent dans les différents fluides biologiques (sang, urine...). Leur activité pro-coagulante est due à la présence de facteur tissulaire (TF), de molécules inflammatoires à la surface membranaire et dans leur cytoplasme. Il a été démontré une plus forte concentration plasmatique en vésicules extracellulaires positives au TF chez des patients atteints de cancer colorectal, de la prostate, du cerveau, du pancréas et des poumons. La présence de ces vésicules TF+ est associée à un risque de thrombose veineuse profonde augmentée (55).

Plusieurs études ont mis la leucocytose et la libération de *neutrophil extracellular traps* (NETs) par les PNN en cause, due à une libération de G-CSF par les plaquettes et cellules endothéliales activées. Les NETs servent de supports aux futures plaquettes et accélèrent la formation du thrombus (56).

Dans certains cas de cancer gastro-intestinal, poumon, foie et ovaire, des thrombocytoses ont été observées. Elles sont provoquées par une augmentation de la synthèse de TPO par les hépatocytes, causées par la libération d'IL-6 par les cellules tumorales (56). Une numération plaquettaire élevée est connue pour engendrer un risque de thrombose veineuse et artériel augmenté. De plus, les plaquettes jouent un rôle important dans le développement de métastase en favorisant l'extravasation et l'adhésion de cellules cancéreuses circulantes, en les protégeant de la destruction et en facilitant l'angiogenèse (57). Il a été démontré une relation entre mauvais pronostic et thrombocytose chez des patients atteints d'un cancer

gastrique (58). Ainsi, la thrombocytose est associée à l'augmentation de l'invasion tumorale et l'apparition d'un cancer non-curatif.

Ainsi, la question d'un traitement par romiplostim en prévention de la CIT se pose. Associer un risque thrombotique dû au cancer avec celui engendré par le romiplostim peut être à risque pour le patient. Le rapport bénéfice/risque serait à évaluer chez chaque patient, avant de débiter le traitement par romiplostim.

1.5 La polymédication chez les patients cancéreux

La polymédication se définit, selon l'OMS, comme l'administration de nombreux médicaments de façon simultanée ou par l'administration d'un nombre excessif de médicaments. Le plus souvent, il s'agit de patients âgés, atteints de plusieurs pathologies et maladies chroniques. On parle de polypathologie ou de multimorbidité. Cela entraîne la prescription de multiples médicaments, la polymédication est ainsi légitime. Mais il faut ajouter l'automédication. Cette pratique entraîne une forte augmentation du risque iatrogène chez le patient et notamment chez la personne âgée, avec une augmentation du risque d'effets indésirables, d'interactions médicamenteuses. La fréquence de polymédication augmente avec l'âge, il est estimé que 30 à 40% des patients de plus de 75 ans prennent plus de 10 médicaments par jour (59). C'est pourquoi la polymédication est un enjeu majeur de santé publique, avec une population vieillissante.

Les patients atteints de cancer, traités par chimiothérapies représentent une population vulnérable à l'iatrogénie médicamenteuse. Ces patients sont susceptibles d'être plus sensibles aux effets secondaires et aux interactions médicamenteuses, induit par leur pathologie sous-jacente mais également dû à l'effet cytotoxique de la chimiothérapie sur les organes. Par exemple, un cytotoxique peut perturber le fonctionnement des cellules hépatiques, diminuant la métabolisation des autres médicaments administrés (60). A ce jour, peu d'étude s'intéressent à la polymédication des patients cancéreux, âgés et jeunes. Il serait intéressant d'étudier les conséquences cliniques d'une diminution du nombre de prescription chez ces patients, en comparaison à une polymédication classique.

2 Conclusion générale

Le romiplostim est un agent médicamenteux stimulant la production de plaquettes sanguines. Actuellement indiqué dans le cadre de PTI, il semble être une alternative intéressante dans la prise en charge des CIT. Cet évènement est caractérisé par une diminution importante de la numération plaquettaire, qui entraîne une forte augmentation du risque de saignements, et pose la question de la poursuite ou non du traitement par chimiothérapie.

Les études cliniques ont montré une efficacité du romiplostim à restaurer une numération plaquettaire supérieure à 150000 plaquettes/ μ L de sang chez des patients atteints de CIT durable. Il entraîne une diminution des décalages de cycle et de recours à la transfusion de concentré plaquettaire. Le romiplostim est généralement bien toléré mais il semble associé à une augmentation de la fréquence de survenue de thrombose veineuse profonde et/ou artérielle chez les patients.

Le retour aux études précliniques, dans un modèle murin de CIT, nous a permis d'identifier la survenue d'effets secondaires, non répertoriés dans la littérature. La fragmentation anormale des MK lors d'un traitement par romiplostim entraîne la libération d'éléments cellulaires non plaquettaires. Ils pourraient potentiellement être à l'origine d'une augmentation du risque de thrombose veineuse et artérielle.

En conclusion, le romiplostim représente une avancée dans la gestion des CIT. C'est une option thérapeutique efficace pour augmenter et maintenir la numération plaquettaire, et optimiser le traitement anticancéreux. Néanmoins, la sécurité des patients doit être assurée, des études complémentaires doivent être réalisées avant l'autorisation de cette nouvelle indication.

Bibliographie

1. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mai 2019;20(5):303-20.
2. Asghar A, Narayan RK, Kumar A, Naaz S. The transcortical vessel is replacement of cortical capillary or a separate identity in diaphyseal vascularity. *Anat Cell Biol.* 1 mars 2020;53(1):107-10.
3. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The Bone Marrow Vascular Niche: Home of HSC Differentiation and Mobilization. *Physiology.* oct 2005;20(5):349-56.
4. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature.* janv 2012;481(7382):457-62.
5. Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood.* 15 oct 2008;112(8):3164-74.
6. Mattia G, Vulcano F, Milazzo L, Barca A, Macioce G, Giampaolo A, et al. Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood.* 1 févr 2002;99(3):888-97.
7. Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, Geerts W, Proamer F, Rinckel JY, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood.* 6 févr 2014;123(6):921-30.
8. Boscher J, Guinard I, Eckly A, Lanza F, Léon C. Blood platelet formation at a glance. *J Cell Sci.* 15 oct 2020;133(20):jcs244731.
9. Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, Florindo C, Teepe M, Titeux M, et al. c-Mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature.* juin 1994;369(6481):571-4.
10. Hitchcock IS, Kaushansky K. Thrombopoietin from beginning to end. *Br J Haematol.* avr 2014;165(2):259-68.
11. Stasi R, Bosworth J, Rhodes E, Shannon MS, Willis F, Gordon-Smith EC. Thrombopoietic agents. *Blood Rev.* juill 2010;24(4-5):179-90.
12. Murone M, Carpenter DA, De Sauvage FJ. Hematopoietic Deficiencies in c-mpl and TPO Knockout Mice. *STEM CELLS.* janv 1998;16(1):1-6.
13. Boneu B, Cazenave JP. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la trombose. 2^e éd. BOEHRINGER INGELHEIM; 1997. 281 p.
14. Morrison WB. Cancer Chemotherapy: An Annotated History: A History of Cancer Chemotherapy. *J Vet Intern Med.* nov 2010;24(6):1249-62.
15. Hauner K, Maisch P, Retz M. Nebenwirkungen der Chemotherapie. *Urol.* avr 2017;56(4):472-9.
16. Bartucci M, Dattilo R, Martinetti D, Todaro M, Zapparelli G, Di Virgilio A, et al. Prevention of Chemotherapy-Induced Anemia and Thrombocytopenia by Constant Administration of Stem Cell Factor. *Clin Cancer Res.* 1 oct 2011;17(19):6185-91.
17. Shaw JL, Nielson CM, Park JK, Marongiu A, Soff GA. The incidence of thrombocytopenia in adult patients receiving chemotherapy for solid tumors or hematologic malignancies. *Eur J Haematol.* mai 2021;106(5):662-72.

18. Hassanshahi M, Hassanshahi A, Khabbazi S, Su YW, Xian CJ. Bone marrow sinusoidal endothelium: damage and potential regeneration following cancer radiotherapy or chemotherapy. *Angiogenesis*. nov 2017;20(4):427-42.
19. Arrow Generiques. Carboplatine ARROW, Monographie de produit incluant les renseignements sur le médicament pour le patient. 2017.
20. Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. Contribution of the Major Copper Influx Transporter CTR1 to the Cellular Accumulation of Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin. *Mol Pharmacol*. oct 2006;70(4):1390-4.
21. Zhang C, Xu C, Gao X, Yao Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics*. 2022;12(5):2115-32.
22. Björn N, Jakobsen I, Lotfi K, Gréen H. Single-Cell RNA Sequencing of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Treated with Gemcitabine and Carboplatin. *Genes*. 14 mai 2020;11(5):549.
23. Pfizer Holding France. Gemcitabine HOSPIRA, Monographie de produit incluant les renseignements sur le médicament pour le patient. 2024.
24. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol*. mai 2006;17:v7-12.
25. Kuter DJ. Treatment of chemotherapy-induced thrombocytopenia in patients with non-hematologic malignancies. *Haematologica*. 19 mai 2022;107(6):1243-63.
26. Bastian TW, Duck KA, Michalopoulos GC, Chen MJ, Liu Z -J., Connor JR, et al. Eltrombopag, a thrombopoietin mimetic, crosses the blood–brain barrier and impairs iron-dependent hippocampal neuron dendrite development. *J Thromb Haemost*. mars 2017;15(3):565-74.
27. Novartis Europharm Limited. Revolade, Monographie de produit incluant les renseignements sur le médicament pour le patient. 2010.
28. Kellum A, Jagiello-Gruszfeld A, Bondarenko IN, Patwardhan R, Messam C, Mostafa Kamel Y. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose ranging study to assess the efficacy and safety of eltrombopag in patients receiving carboplatin/paclitaxel for advanced solid tumors. *Curr Med Res Opin*. oct 2010;26(10):2339-46.
29. Winer ES, Safran H, Karaszewska B, Bauer S, Khan D, Doerfel S, et al. Eltrombopag for thrombocytopenia in patients with advanced solid tumors receiving gemcitabine-based chemotherapy: a randomized, placebo-controlled phase 2 study. *Int J Hematol*. déc 2017;106(6):765-76.
30. Kuter DJ. The structure, function, and clinical use of the thrombopoietin receptor agonist avatrombopag. *Blood Rev*. mai 2022;53:100909.
31. Dova Pharmaceuticals. Doptelet, Monographie de produit incluant les renseignements sur le médicament pour le patient. 2019.
32. Al-Samkari H, Kolb-Sielecki J, Safina SZ, Xue X, Jamieson BD. Avatrombopag for chemotherapy-induced thrombocytopenia in patients with non-haematological malignancies: an international, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. mars 2022;9(3):e179-89.

33. Bussel JB, Soff G, Balduzzi A, Cooper N, Lawrence T, Semple JW. A Review of Romiplostim Mechanism of Action and Clinical Applicability. *Drug Des Devel Ther.* mai 2021;Volume 15:2243-68.
34. Schifferli A. Immunomodulation in Primary Immune Thrombocytopenia: A Possible Role of the Fc Fragment of Romiplostim? *Front Immunol.* 2019;10.
35. AMGEN C. Nplate, Monographie de produit incluant les renseignements sur le médicament pour le patient. 2021.
36. Soff GA, Miao Y, Bendheim G, Batista J, Mones JV, Parameswaran R, et al. Romiplostim Treatment of Chemotherapy-Induced Thrombocytopenia. *J Clin Oncol.* 1 nov 2019;37(31):2892-8.
37. Rashidi A, Roullet MR. Romiplostim-induced myelofibrosis. *Blood.* 19 sept 2013;122(12):2001-2001.
38. Angénioux C. Cell surface expression of HLA I molecules as a marker of young platelets.
39. Morowski M, Vögtle T, Kraft P, Kleinschnitz C, Stoll G, Nieswandt B. Only severe thrombocytopenia results in bleeding and defective thrombus formation in mice. *Blood.* 13 juin 2013;121(24):4938-47.
40. Léon C, Evert K, Dombrowski F, Pertuy F, Eckly A, Laeuffer P, et al. Romiplostim administration shows reduced megakaryocyte response-capacity and increased myelofibrosis in a mouse model of MYH9-RD. *Blood.* 5 avr 2012;119(14):3333-41.
41. McElroy PL, Wei P, Buck K, Sinclair AM, Eschenberg M, Sasu B, et al. Romiplostim promotes platelet recovery in a mouse model of multicycle chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Exp Hematol.* juin 2015;43(6):479-87.
42. Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi H, et al. IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J Cell Biol.* 11 mai 2015;209(3):453-66.
43. Eckly A, Scandola C, Oprescu A, Michel D, Rinckel J, Proamer F, et al. Megakaryocytes use in vivo podosome-like structures working collectively to penetrate the endothelial barrier of bone marrow sinusoids. *J Thromb Haemost.* nov 2020;18(11):2987-3001.
44. Angénioux C, Maître B, Eckly A, Lanza F, Gachet C. Time-Dependent Decay of mRNA and Ribosomal RNA during Platelet Aging and Its Correlation with Translation Activity. *PLOS ONE.* 2016;
45. Angénioux C, Couvidou A, Brouard N, Eckly A, Dupuis A, Mangin PH, et al. Discriminating young platelets on human leukocyte antigen-I expression highlights their extremely high reactivity potential. *Res Pract Thromb Haemost.* janv 2023;7(1):100006.
46. Linder S, Cervero P, Eddy R, Condeelis J. Mechanisms and roles of podosomes and invadopodia. *Nat Rev Mol Cell Biol.* févr 2023;24(2):86-106.
47. Haas S, Hansson J, Klimmeck D, Loeffler D, Velten L, Uckelmann H, et al. Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors. *Cell Stem Cell.* oct 2015;17(4):422-34.
48. Sanjuan-Pla A, Macaulay IC, Jensen CT, Woll PS, Luis TC, Mead A, et al. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature.* oct 2013;502(7470):232-6.

49. Frydman GH, Ellett F, Jorgensen J, Marand AL, Zukerberg L, Selig MK, et al. Megakaryocytes respond during sepsis and display innate immune cell behaviors. *Front Immunol.* 2 mars 2023;14:1083339.
50. Zhu A, Real F, Capron C, Rosenberg AR, Silvin A, Dunsmore G, et al. Infection of lung megakaryocytes and platelets by SARS-CoV-2 anticipate fatal COVID-19. *Cell Mol Life Sci.* juill 2022;79(7):365.
51. Schunk SJ, Triem S, Schmit D, Zewinger S, Sarakpi T, Becker E, et al. Interleukin-1 α Is a Central Regulator of Leukocyte-Endothelial Adhesion in Myocardial Infarction and in Chronic Kidney Disease. *Circulation.* 14 sept 2021;144(11):893-908.
52. Claesson-Welsh L, Dejana E, McDonald DM. Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends Mol Med.* avr 2021;27(4):314-31.
53. Pearson TC. The risk of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Semin Oncol.* juin 2002;29(3 Suppl 10):16-21.
54. Italiano JE, Mairuhu AT, Flaumenhaft R. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes: *Curr Opin Hematol.* nov 2010;17(6):578-84.
55. Kim AS, Khorana AA, McCrae KR. Mechanisms and biomarkers of cancer-associated thrombosis. *Transl Res.* nov 2020;225:33-53.
56. Hisada Y, Mackman N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. *Blood.* 28 sept 2017;130(13):1499-506.
57. Haemmerle M, Stone RL, Menter DG, Afshar-Kharghan V, Sood AK. The Platelet Lifeline to Cancer: Challenges and Opportunities. *Cancer Cell.* juin 2018;33(6):965-83.
58. Ikeda M, Furukawa H, Imamura H, Shimizu J, Ishida H, Masutani S, et al. Poor prognosis associated with thrombocytosis in patients with gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* avr 2002;9(3):287-91.
59. Carrier H, Zaytseva A, Bocquier A, Verger P, Barlet M, Chaput H, et al. Polymédication et pathologies chroniques multiples : opinions et pratiques des médecins généralistes. Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques (Drees); 2017 oct p. 1-8. (Etudes et Résultats). Report No.: 1036.
60. LeBlanc TW, McNeil MJ, Kamal AH, Currow DC, Abernethy AP. Polypharmacy in patients with advanced cancer and the role of medication discontinuation. *Lancet Oncol.* juill 2015;16(7):e333-41.

Nom : Santer

Prénom : Jérôme

Titre de la thèse :

EFFET DU ROMIPLOSTIM SUR LA THROMBOPENIE INDUITE PAR LA CHIMIOOTHERAPIE

Mots-clés :

MEGACARYOCYTE - PLAQUETTES - ROMIPLOSTIM –
THROMBOPENIE -CHIMIOOTHERAPIE

Résumé : Les **plaquettes sanguines** sont produites par les **mégacaryocytes**, des cellules géantes de la moelle osseuse qui se différencient sous l'influence de la thrombopoïétine. Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans l'hémostase primaire, processus permettant le colmatage et la réparation de lésion vasculaire. Un nombre insuffisant de plaquettes, c'est-à-dire une thrombopénie, peut être la cause de saignements et représente un risque majeur pour le patient suivant des traitements anticancéreux par chimiothérapie. On parle de **thrombopénies induites par chimiothérapies (CIT)**. A ce jour, il n'existe que deux solutions thérapeutiques : le décalage de cycle de chimiothérapie et/ou la transfusion de concentrés plaquettaires. Ainsi il est important de développer de nouvelles approches thérapeutiques des CIT. Parmi elles, le **romiplostim**, une protéine de fusion analogue de la TPO, apparaît aujourd'hui comme un médicament potentiel pour améliorer la prise en charge des patients. Il fait actuellement l'objet d'essais cliniques en phase III dans cette nouvelle indication. Toutefois, des interrogations subsistent concernant notamment son impact sur les mégacaryocytes médullaires, en particulier dans des contextes pathologiques où la chimiothérapie entraîne une perturbation importante de la moelle osseuse. L'objectif de cette thèse est 1) de présenter une revue de la littérature concernant les CIT et le rôle connu du romiplostim dans cette pathologie et 2) d'apporter un nouvel éclairage sur les potentiels effets secondaires de ce composé par l'analyse médullaire d'un modèle murin de CIT.

Directeur de thèse : Docteur ECKLY-MICHEL Anita