

**PRIX DE THÈSE
DE LA SOCIÉTÉ DE PHARMACIE DE
BORDEAUX**

Le jeudi 7 octobre 2010 a eu lieu l'audition orale des candidats au " Prix de thèse de la Société de Pharmacie de Bordeaux ". Parmi les thèses de Doctorat d'État en Pharmacie soutenues à l'Université Victor-Segalen Bordeaux 2 entre le premier septembre 2008 et le 31 août 2009 et autorisées à être présentées au Prix de thèse de la Société, six ont été reçues et retenues par le Jury. Les étudiants ont exposé brillamment leur travail sur PowerPoint.

Après délibération, la récompense a été attribuée à Mademoiselle Flore Girardeau pour son travail intitulé " Le pharmacien face aux brûlures : conseils et traitements à l'officine en 2009 " (thèse dirigée par le Dr. Romain Weigert et présidée par le Dr. Christian Toussaint) et à Monsieur Vincent Viaud pour le travail suivant : " Développement de méthodes CLHP pour le dosage de l'azithromycine et d'un dérivé d'artémisine dans des co-formulations pour le traitement des fièvres de l'enfant en milieu tropical " (thèse dirigée et présidée par le Dr. Karen Gaudin).

Un chèque d'un montant de 500 euros a été remis aux lauréats. Les prix seront décernés officiellement lors de la Cérémonie de remise des Prix et des serments de Galien qui a lieu chaque année début juillet.

Nous adressons aux lauréats nos plus vifs compliments. On trouvera ci-après les résumés des thèses des candidats.



Secrétaire Catherine Chèze entourée de Flore Girardeau et Vincent Viaud.

• **Flore GIRARDEAU** — *Le Pharmacien face aux brûlures : conseils et traitements à l'officine en 2009*

Dans le cadre des mes études, j'ai effectué un stage hospitalier au centre François-Xavier Michelet du CHU de Bordeaux, spécialisé dans la prise en charge des grands brûlés et la chirurgie réparatrice. Ce stage fut très enrichissant, si bien que j'ai décidé de faire des brûlures mon sujet de thèse en l'adaptant au pharmacien.

La brûlure est un traumatisme fréquent : en effet, on estime à 400 000 le nombre de victimes de brûlures chaque année en France. Une brûlure est une destruction du revêtement cutané, voire des tissus sous-jacents, provoquée par un agent thermique, électrique, chimique ou plus rarement par une radiation. Les brûlures thermiques sont de loin les plus fréquentes résultant majoritairement d'accidents domestiques.

Il existe quatre profondeurs estimées en degrés.

- Le premier degré correspond à une atteinte des couches superficielles de l'épiderme. Il s'agit d'un érythème douloureux et chaud sans phlyctènes, décollements bulleux de la peau, plus connu sous le nom de « coup de soleil ». Sa cicatrisation est spontanée et sans séquelle.

- Le deuxième degré superficiel correspond à une atteinte de la jonction dermo-épidermique. Cette brûlure présente systématiquement des phlyctènes dont le plancher après excision est rouge et très sensible. La cicatrisation est spontanée en une à deux semaines et sans séquelle.
- Le deuxième degré profond est une destruction de l'épiderme au derme superficiel, épargnant le derme profond, et présente des phlyctènes plus petites dont le plancher rosé est peu sensible. La cicatrisation est longue voire incertaine et les séquelles sont indélébiles.
- Le troisième degré est une destruction totale de la peau se présentant comme une nécrose cutanée insensible, rigide, sèche, brune ou blanchâtre et sans phlyctène. La cicatrisation spontanée n'existe pas. Le tissu étant mort, il doit être éliminé. La cicatrisation ne sera possible que par autogreffe.

La cicatrisation est un phénomène naturel, très complexe, dont le processus dépend de nombreux facteurs (étiologie, localisation, infection...) et peut être totalement différente d'une personne à l'autre. Il faut donc accorder une attention toute particulière à la cicatrisation d'une brûlure.

En tant que professionnel de santé, le pharmacien se trouve souvent confronté au problème des brûlures. Il a un rôle limité mais peut intervenir à différents stades de son histoire : les premiers gestes à effectuer face à une brûlure, l'évaluation de la gravité, les moyens de traitement des brûlures superficielles et de leurs séquelles.

Le pharmacien doit connaître les premiers gestes d'urgence à effectuer face à une brûlure ; de son intervention pourra dépendre la profondeur et la sévérité de la plaie.

L'évaluation de la gravité est indispensable car de ce diagnostic dépend le type de prise en charge en unité spécialisée, par un médecin ou par automédication sur conseils d'un professionnel de santé. Il faut prendre en compte la surface de la brûlure, sa profondeur, le terrain, les circonstances de l'accident et bien évidemment l'âge de la victime. Mais attention, une évaluation de la profondeur peut être erronée : en effet, une brûlure du deuxième degré peut apparaître dans un premier temps comme relevant du premier degré. Une réévaluation ultérieure est souvent nécessaire.

Les brûlures du premier degré et deuxième degré superficiel ne nécessitant pas d'hospitalisation peuvent être soignées en ambulatoire. Cependant, dans le cas où la surface touchée est supérieure à 10 % de la surface corporelle totale, ou lorsque le visage, les orifices, les muqueuses ou les articulations sont atteints ou qu'il s'agit d'un nouveau né, le pharmacien aura le devoir d'adresser la victime à l'hôpital. Après les premiers gestes, le traitement consiste à soulager la douleur et favoriser la réparation cutanée. Le pharmacien conseillera des antalgiques contre la douleur puis des topiques à propriétés calmante, hydratante et parfois même antibactérienne pour prévenir toute infection. Des pansements seront également indiqués dans le but d'hydrater (tulle gras), soulager, protéger et/ou favoriser la cicatrisation de la brûlure.

Les séquelles cicatricielles de brûlures peuvent dégénérer en cicatrices hypertrophiques, chéloïdes ou rétractiles. Leur prise en charge est longue et contraignante. Pour lutter contre ce type de cicatrices ou en améliorer l'aspect, des moyens sont mis à la disposition des victimes de brûlures et peuvent être proposés et conseillés par le pharmacien d'officine. Il existe des vêtements compressifs pour grands brûlés fabriqués selon des critères précis et devant répondre à des normes particulières imposées par la Sécurité sociale. Les plaques en gel de silicone, destinées à être appliquées à même la peau, préviennent les cicatrices chéloïdes et hypertrophiques. ? Lorsqu'une articulation est atteinte, une attelle de posture est mise en place le plus tôt possible afin de prévenir et lutter contre une rétraction cutanée. Le pharmacien pourra également conseiller le patient en terme d'hygiène, d'hydratation, de traitement du prurit, de photoprotection. Il pourra aussi donner des conseils dermocosmétiques et de maquillage pour masquer ou corriger au mieux les cicatrices.

Enfin, le pharmacien d'officine guidera le patient brûlé dans ses démarches vers les professionnels et institutions pouvant intervenir dans le processus de rééducation.

L'histoire d'une brûlure est longue ; sa prise en charge fera appel à de nombreuses disciplines telles que la chirurgie, les soins locaux, la rééducation, la médecine thermale et ceci sans oublier de prendre en compte les problèmes psychologiques résultant du traumatisme.

En conclusion, il est important de souligner que la brûlure est un phénomène fréquent qui requiert toute l'attention du pharmacien souvent consulté en première intention.

Directeur de thèse : Dr. Romain WEIGERT
Président de thèse : Dr. Christian TOUSSAINT

• **Vincent VIAUD** — *Développement de méthodes CLHP pour le dosage de l'azithromycine et d'un dérivé d'artémisine dans des co-formulations pour le traitement des fièvres de l'enfant en milieu tropical.*

Introduction

Le paludisme et les infections respiratoires aiguës (IRA) tuent approximativement 10 000 enfants chaque jour, en majorité dans les pays tropicaux.

Rappelons que le paludisme a pour origine un parasite, *Plasmodium falciparum*, dont le vecteur est un moustique sévissant particulièrement dans les pays d'Afrique subsaharienne et d'Asie du Sud-Est tandis que les IRA sont principalement d'origine bactérienne (surtout *Streptococcus pneumoniae*). Ces deux maladies, dont le principal symptôme commun est la fièvre, sont cliniquement difficilement distinguables ; les erreurs de diagnostic sont donc fréquentes. De plus, la plupart des décès ont lieu dans des zones rurales avant l'arrivée d'une assistance médicale.

Afin de répondre à cette problématique et ainsi réduire ce terrible constat, une équipe de professionnels en santé publique internationale a initié un projet de développement de médicament pédiatrique d'urgence en s'inscrivant dans une démarche de développement durable. Ce traitement sera capable d'agir sur ces deux maladies et ainsi prévenir l'aggravation des symptômes dans l'attente d'un diagnostic, le tout administrable au niveau communautaire.

Ce projet, nommé ARIamal, consiste en la recherche d'une co-formulation d'administration rectale contenant un antibiotique, efficace contre la majorité des infections respiratoires aiguës et un dérivé d'artémisinine aux propriétés antimalariques.

L'UFR des Sciences pharmaceutiques de l'Université Victor Segalen Bordeaux 2 est impliquée dans ce projet au niveau du développement galénique et analytique. Ainsi, durant les années 2008 et 2009, deux co-formulations ont été principalement étudiées.

Ces co-formulations sont un suppositoire avec pour principes actifs l'artéméther (antipaludéen) et l'azithromycine (antibiotique), et une gélule rectale constituée d'artésunate (antipaludéen) et d'azithromycine.

Cette thèse expérimentale s'attache à décrire le développement et la validation analytique du dosage de ces deux co-formulations. Ces recherches ont pour objectif premier de permettre les études de stabilité des différentes co-formulations à l'essai, étape indispensable du développement pharmaceutique.

Développement des méthodes analytiques

Plusieurs méthodes ont été développées pour l'analyse simultanée ou séparée des couples à l'essai, artéméther/azithromycine et artésunate/azithromycine, dans leur forme pharmaceutique, respectivement un suppositoire et une gélule rectale.

Ces méthodes consistent en de la chromatographie liquide haute performance en phase inverse avec des phases stationnaires en gel de silice greffée ou carbone graphite poreux, des phases mobiles méthanoliques ou à l'acétonitrile avec un pH fixé par des solutions de tampon phosphate ou des modificateurs organiques (triéthylamine ou acide formique). Le mode de détection utilisé est soit l'ultraviolet à 210 ou 220 nm en raison du manque de chromophores des principes actifs, soit un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) en fonction de la compatibilité de la phase mobile.

Concernant la méthode artéméther/azithromycine, l'analyse de ces deux molécules fut initialement testée avec un système au carbone graphite poreux pour la séparation et un DEDL. Malheureusement aucune détection ne fut observée avec l'artéméther en raison d'un trop faible signal vis-à-vis de ce type de détecteur. La détection UV a alors été envisagée. Cependant, l'important bruit de fond induit par la phase mobile compatible avec la phase stationnaire, en détection UV, empêcha l'utilisation de carbone graphite poreux. Le développement de cette méthode a donc été poursuivi avec une détection UV et une phase stationnaire en gel de silice plus classique.

Les différents paramètres étudiés pour l'optimisation de cette méthode sont les suivants :

- influence de la longueur d'onde (UV) sur le signal du principe actif,
- recherche d'une composition de phase mobile (mélanges binaires méthanol ou acétonitrile / tampon phosphate aqueux, ou ternaires méthanol / acétonitrile / tampon phosphate aqueux),
- influence pH de la phase mobile,
- influence de la température de la colonne,
- influence de la phase stationnaires : XTerra MS octadécylée ou LUNA octylée.

Concernant la méthode artésunate/azithromycine, un système au carbone graphite poreux et DEDL a aussi été envisagé, mais cette méthode s'est avérée inapplicable à cause de la présence d'un biais négatif entre le dosage avec et sans la matrice (excipients de la gélule rectale) des principes actifs.

Le dosage de la gélule rectale a un pour cette raison été effectué en deux analyses : l'analyse de l'artésunate avec une colonne de silice greffée (octadécylée) et une détection UV ou DEDL d'une part, et l'analyse de l'azithromycine avec une colonne de silice greffée (octylée) et une détection UV d'autre part.

Toutes ces méthodes ont été validées selon le guide de International Conference of Harmonization Q2 (R1) et le guide de validation SFSTP (Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques) basé sur l'étude de la spécificité d'une part et la notion d'erreur totale et l'élaboration du profil d'exactitude, d'autre part, avec un pourcentage d'erreur absolue maximale λ fixé à 10 % et un seuil de sécurité β de 10 ou 20 %.

De plus, la capacité de ces méthodes à doser de manière univoque les principes actifs, en présence de nombreux produits de dégradation, a été démontrée grâce à des études de stabilité forcée menées sur 24 h à 50°C en milieux acides, aqueux, basiques ou oxydants. Ces études ont aussi permis d'évaluer la compatibilité des principes actifs et leur stabilité en diverses conditions stressantes.

Conclusion

Ces méthodes CLHP permettent le dosage conjoint de l'artéméther et de l'azithromycine dans des suppositoires, ainsi que le dosage, en deux analyses, de l'artésunate et de l'azithromycine dans des gélules rectales, le tout en présence de nombreux produits de dégradation.

Ainsi en accord avec les objectifs préétablis, elles permettront de suivre la dégradation des co-formulations galéniques dans le cadre de leur mise en stabilité, aux conditions climatiques des pays tropicaux destinés.

D'un point de vue global, le projet ARIamal se poursuit avec, d'une part, les recherches de faisabilité galénique, où le fruit de ces études de développement analytique constitue un précieux outil de décision, et d'autre part, les recherches en pharmacocinétique qui nécessiteront certainement des méthodes d'analyse plus spécifiques. Toutes ces recherches pourront aboutir à l'élaboration de nouvelles formulations pharmaceutiques, voire à un changement du principe actif antibiotique.

De ce fait, le développement analytique pour la réalisation de ce médicament, traitant la fièvre de l'enfant en milieu tropical, possède encore d'importantes perspectives d'expérimentations et de recherches.

Directeur et Président de thèse : Dr. Karen GAUDIN

• **Florence COULANGE** — *Recherche d'anomalies associées aux mutations du gène TET2 dans une cohorte de 24 patients atteints de leucémies aigües myéloïdes secondaires par rapport à un groupe témoin*

Introduction

Les leucémies aigües myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes caractérisées par un blocage de différenciation et par une augmentation de la prolifération ou d'une résistance à l'apoptose du clone malin. Ces deux événements sont issus de la coopération d'au moins deux groupes de mutations : le premier affectant des gènes qui codent pour des facteurs de transcription intervenant dans la différenciation des cellules souches, le second activant des gènes qui codent pour des récepteurs de tyrosine kinase responsables de la prolifération. Ces mutations, de plus en plus étudiées, jouent un rôle tant dans le diagnostic, le pronostic que dans la prise en charge thérapeutique et le suivi des LAM. L'intérêt de l'étude de ces anomalies génétiques a entraîné la création d'entités individualisées dans la dernière version de la classification OMS des LAM (2008).

La récente découverte du gène *TET2* sur le chromosome 4q24 a fait l'objet de nombreux travaux au cours de ces dernières années. Ceux-ci ont pu montrer que ce gène est muté dans 15 % des hémopathies myéloïdes mais n'est pas muté dans d'autres cancers humains. Selon les publications, *TET2* est muté dans 14 à 26 % des syndromes myélodysplasiques (SMD), 7 à 13 % des néoplasies myéloprolifératives (NMP), 22 à 42 % des leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC), 12 % des LAM *de novo* et 24 à 33 % des LAM secondaires. La fonction de *TET2* est aujourd'hui inconnue. Des résultats contradictoires ont été obtenus dans différentes études concernant l'éventuelle association d'anomalies de l'hémogramme avec des mutations de *TET2*, notamment le nombre de leucocytes qui pourrait être plus élevé dans les SMD et syndromes myéloprolifératifs (SMP) mutés *TET2*, la présence d'une monocytose dans les SMD, NMP et mastocytoses mutés *TET2*. Enfin, un groupe de travail a pu conclure sur le fait que dans les SMD et les LAM post-SMD, la mutation *TET2* reste un facteur pronostique favorable.

L'objectif principal de notre étude a été d'évaluer l'intérêt de la recherche de la mutation *TET2* au diagnostic de LAM secondaires.

Les objectifs secondaires ont été de rechercher la présence éventuelle d'associations significatives des mutations *TET2* avec des paramètres cytologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires au diagnostic de LAM secondaires.

Matériels et méthodes

Des prélèvements de moelle osseuse et sanguins avaient été collectés lors du diagnostic de patients atteints de LAM secondaires entre 2001 et 2009 suivis dans les services cliniques d'onco-hématologie de l'Hôpital Purpan à Toulouse. L'ADN avait été extrait à partir des cellules mononuclées de la moelle et conservé à -20°C en vue de travaux de recherche ultérieurs.

À partir d'une cohorte de 169 LAM secondaires séquencées pour le gène *TET2* (Olivier Kosmider et Michaela Fontenay, Hôpital Cochin), nous avons sélectionné les 24 patients mutés pour *TET2*. Nous les avons appariés à un groupe témoin sans mutation de *TET2* en prenant en compte le sexe, l'âge et le diagnostic FAB (French American British). Les données clinico-biologiques ont été collectées par nos soins. La recherche des mutations associées fréquemment retrouvées dans les LAM a été effectuée au sein du laboratoire d'Hématologie de l'Hôpital Purpan à Toulouse en utilisant la méthode HRM (High Resolution Melting) à l'exception des *CEBPA* (séquençage), de *NPM1* et *FLT3 ITD* réalisée par analyse de taille de fragments.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du programme SPSS10. Les valeurs qualitatives ont été comparées entre les deux groupes par un test de Chi 21. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les variables continues. Les valeurs de p sont calculées sur un mode bilatéral et le seuil de significativité retenu est $p < 0,05$.

Résultats

Au niveau de l'hémogramme, il n'existe pas de différence significative des différents paramètres (taux de globules blancs, plaquettes, hémoglobine, formule sanguine, blastose). Cependant, on observe une tendance à une valeur plus élevée des globules blancs, de l'hémoglobine et

de la blastose dans le groupe des patients mutés. L'étude sur le myélogramme de la dysmyélopoïèse de chacune des lignées (érythrocytaire, granuleuse et mégacaryocytaire) ne montre aucune différence entre les deux groupes étudiés. De même, aucune tendance ne semble se dégager des résultats de l'immunophénotypage. Le pronostic lié au caryotype séparé en trois catégories, risque faible, intermédiaire et haut risque, n'est pas lié de manière significative à la présence d'une mutation *TET2* associée.

Aucune différence notable entre les deux groupes ne peut être établie sur le statut mutationnel de *FLT3*, *NPM1*, *KIT* exon 17, *CEBPA*. En revanche, la mutation de *K-RAS* au niveau de l'exon 2 tend à être plus fréquent dans le groupe muté *TET2* ($p = 0,094$) alors que cette tendance n'est plus retrouvée si l'on considère uniquement les mutations sur l'exon 3. Cependant, globalement, il existe une fréquence plus importante de mutations de *K-RAS* chez les patients mutés *TET2* de manière significative ($p = 0,023$).

Conclusion

Nos résultats suggèrent qu'il existerait un lien particulier entre les mutations du gène *TET2* et celles de *K-RAS* qui sont présentes de manière significative à une fréquence plus élevée dans le groupe muté *TET2*. De plus, le fait que les patients mutés *TET2* soient pour 2/3 d'entre eux de sexe masculin, que leur hémoglobine et leurs leucocytes aient une tendance à avoir des valeurs plus élevées constituent autant d'éléments qui mériteraient une étude approfondie sur une cohorte de patients plus étendue.

Dans l'hypothèse où *TET2* jouerait un rôle dans le pronostic comme cela a été montré dans les SMD, il conviendrait d'inclure la recherche de ces mutations dans le bilan du diagnostic. La recherche des mutations *TET2* se fait actuellement par séquençage au sein de centres spécialisés. Si le résultat mutationnel de *TET2* venait à modifier les décisions thérapeutiques, il serait souhaitable de développer des méthodes de mise en évidence plus simples et plus rapides afin de ne pas retarder la prise en charge du patient.

Directeur de thèse : Pr. Éric DELABESSE

Président de thèse : Pr. Djavad MOSSALAYI

• **Anna LAFFARGUE** — *Analyse moléculaire d'épidémies à Pseudomonas aeruginosa résistantes à l'imipénème dans un centre de grands brûlés en Tunisie*

216 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été collectées entre 2005 et 2007 à l'Hôpital Aziza Othmana de Tunis, qui renferme le Centre des grands Brûlés de Tunisie. Ces souches ont été transmises au Laboratoire de microbiologie de Bordeaux 2 dirigé par le Pr. Quentin-Noury, par l'intermédiaire du médecin microbiologiste du laboratoire de Tunis, Lamia Thabet.

Plus de 60 % des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, première cause d'infection nosocomiale chez les grands brûlés, collectées se sont avérées résistantes à l'imipénème (IPM), proportion suffisante pour inquiéter les cliniciens du service. L'objectif de l'étude a été de déterminer les mécanismes de résistance aux β -lactamines de ces souches, notamment à l'IPM, et d'analyser les relations épidémiologiques existant entre ces souches IPM résistantes.

Pour cela, une analyse phénotypique a d'abord permis d'évaluer la sensibilité des souches aux antibiotiques par la méthode de diffusion des disques dans les antibiogrammes classiques, spécifiques, et le test à l'EDTA ; puis l'analyse moléculaire par PCR, et un typage des souches par AP-PCR et PFGE ont été effectués sur quelques souches IPM résistantes représentatives de chaque antibiotique.

Les 89 souches IPM résistantes non redondantes comprennent 84 souches provenant de 63 patients (en moyenne âgés de 31 ans, avec une surface corporelle brûlée moyenne de 39 % et restés hospitalisés en moyenne 60 jours) et 5 de l'environnement, classées en sept antibiotypes (ATB1 à ATB7).

Parmi elles, 43 souches produisent une carbapénémase de type VIM-2, enzyme inhibant spécifiquement les carbapénèmes dont l'IPM. Les souches restantes étaient résistantes par la perte de la porine D2 (permettant le passage de l'IPM dans la bactérie), seule ou combinée avec un autre mécanisme de résistance aux β -lactamines. Les souches produisant la VIM-2 (ATB1) ont été distribuées tout au long de la période d'étude.

Chacune des souches de l'ATB2 (phénotype associant un efflux et une perte de la porine D2) et de l'ATB3 (phénotype associant la production d'une pénicillinase, une céphalosporinase et la perte de la porine D2) sont apparues en même temps. L'analyse par AP-PCR a confirmé la clonalité de ces souches.

De la même façon, les souches de l'ATB4 (antibiotique associant la production de céphalosporinase et d'une perte de la porine D2), bien qu'isolées tout au long de la période d'étude, sont épidémiologiquement reliées.

Au contraire, les rares et dispersées souches de l'ATB5 (production de pénicillinase et perte de porine D2) n'étaient pas reliées entre elles.

Les souches de l'ATB 6 (antibiotique présentant seulement la perte de la porine D2) résistantes à l'IPM de façon isolée, sont également non reliées, mise à part quatre souches identiques deux à deux.

Une seule souche appartenait à l'ATB7 présentant un phénotype de BLSE et est une VEB-1, la première isolée et décrite en Tunisie.

Une épidémie prolongée de *Pseudomonas aeruginosa* produisant une VIM-2 et des infections croisées avec des souches résistantes à l'IPM et avec d'autres mécanismes de résistance aux β -lactamines se sont superposées. Les souches productrices de VIM-2 sont réparties tout au long de l'étude et l'analyse par PFGE a montré la présence d'au moins trois clones, un étant largement majoritaire. Ce travail a montré que sur fond endémique, il peut survenir d'autres épidémies avec des souches clonales regroupées dans le temps ou bien des cas groupés, émergeant de façon ponctuelle de temps à autre. Viennent se surajouter des souches non reliées responsables d'infections sporadiques au sein du service. Ainsi, les souches semblent évoluer selon des modes épidémiques différents, les souches épidémiques étant les plus résistantes, sans doute en raison de la pression de sélection médicamenteuse.

Cette étude permet de souligner que l'analyse de la résistance phénotypique et biomoléculaire est un outil épidémiologique précieux pour détecter les souches clonales concomitantes et surveiller leur dispersion individuelle.

Directeur de thèse : Dr. Véronique DUBOIS

Président de thèse : Pr. Claudine QUENTIN-NOURY

Héloïse RAGELLE – Nanoémulsion de fisétine à visée antitumorale

Les flavonoïdes sont des composés naturels largement présents dans le règne végétal possédant des potentialités pharmacologiques. Citons, dans le domaine de la cancérologie, des propriétés de prévention, des effets anti-angiogéniques et antivasculaires. Des recherches portant sur 24 flavonoïdes ont récemment mis en évidence les propriétés anti-angiogéniques *in vitro* et *in vivo* de la fisétine [1].

Cependant, la fisétine présente une hydrosolubilité très faible rendant son administration problématique. C'est pourquoi il est nécessaire de mettre au point une formulation permettant de s'affranchir des problèmes de solubilité afin de tenter d'optimiser l'action de la fisétine.

La formulation d'une nanoémulsion lipophile/hydrophile apparaît comme une stratégie efficace pour véhiculer des principes actifs hydrophobes. En effet, encapsulé dans des globules lipidiques de granulométrie très fine, le principe actif peut ainsi être administré par voie parentérale. Cette forme galénique est utilisée depuis un certain nombre d'années en nutrition parentale et de nombreuses publications retracent l'intérêt de ces systèmes en tant que véhicules de principes actifs hydrophobes [2].

C'est dans ce contexte que nous avons décidé de mettre au point une nanoémulsion de fisétine en vue de tenter d'améliorer sa biodisponibilité et ses effets thérapeutiques. Cette thèse reprend les étapes de conception et d'évaluation de la nanoémulsion : de la formulation galénique aux études *in vivo*.

Méthodes

Dans un premier temps, la solubilité de la fisétine dans différentes phases huileuses ainsi que dans des agents de surface a dû être déterminée afin de sélectionner les excipients entrant en jeu dans les essais de formulation. Les nanoémulsions formulées ont alors fait l'objet d'une caractérisation physicochimique ainsi que d'une étude de stabilité sur trente jours dans différentes conditions de température. Des tests *in vitro* sur des cellules endothéliales Eahy 926 ont ensuite été conduits afin d'observer les effets anti-angiogéniques de la fisétine sous forme nanoémulsionnée. Dans un deuxième temps, les paramètres pharmacocinétiques de la fisétine nanoémulsionnée après l'administration selon différentes voies

(intraveineuse, intrapéritonéale et orale) ont été déterminés chez la Souris C57BL/6 et comparés à ceux de la forme libre. Enfin, après la mise en place d'études de toxicité ayant permis de déterminer la dose maximale tolérée, l'effet anticancéreux de la fisétine nanoémulsionnée a été testé sur des souris porteuses du carcinome pulmonaire de Lewis.

Résultats et discussion

Formulation

La combinaison de deux agents de surface, le Tween 80[®] et le Labrasol[®], s'est avérée la plus efficace pour solubiliser la fisétine, jusqu'à 5 mg/mL. La phase interne de la nanoémulsion est ainsi composée de Miglyol 812N[®] / Labrasol[®] / Tween 80 / Lipoïd E80[®] 10 / 10 / 2,5 / 1,2 ajusté à pH 7 par NaOH 0,1 N q.s.p. 100 ml d'eau. Elle présente une granulométrie comprise entre 120 et 150 nm et un potentiel zêta négatif. Les études de stabilité à court terme sur trente jours ont montré que la nanoémulsion était stable à 4°C.

Cependant, une séparation de phase, attribuable au murissement d'Ostwald, survient au 30^e jour dans le cas de l'émulsion conservée à température ambiante.

Essais in vitro

L'étude de l'efficacité anti-angiogénique *in vitro* sur les cellules endothéliales Eahy a montré que la fisétine nanoémulsionnée entraîne une modification morphologique des cellules comparable à celle induite par la fisétine libre. Ce changement morphologique montre que la fisétine peut être relarguée de la forme galénique et exercer ses effets biologiques. Les changements morphologiques observés sont en partie expliqués par une stabilisation du cytosquelette via l'acétylation de la tubuline.

Étude pharmacocinétique chez la Souris C57BL/6

Par voie orale, de façon inattendue, aucune absorption de fisétine n'a pu être mise en évidence. Par voie intraveineuse, la forme nanoémulsionnée de fisétine n'a démontré aucune différence notable par rapport à la forme libre. Ceci peut être expliqué par le fait que les globules de la nanoémulsion, dès leur perfusion dans la circulation sanguine, subissent la capture par le système réticulo-endothélial entraînant leur élimination rapide hors du compartiment sanguin. Une toxicité, attribuable au Labrasol[®], a été observée lors de l'administration IV. Par voie intrapéritonéale, la nanoémulsion

permet une exposition systémique 45 fois supérieure à celle obtenue avec la forme libre. Ceci pourrait être expliqué par l'absence de précipitation du principe actif au point d'injection, phénomène observé lors de l'administration de la forme libre, mais également par l'absorption lente de la fisétine à partir de la cavité péritonéale favorisant ainsi la prolongation des concentrations plasmatiques.

Effet anticancéreux sur les souris porteuses de tumeurs Lewis Lung

Une étude de toxicité préalable a permis de déterminer trois niveaux de doses de fisétine (37,5, 25,0 et 12,5 mg/kg) à administrer par voie intrapéritonéale lors de l'étude d'efficacité. Au terme de cette étude, réalisée sur deux semaines, aucune différence significative entre le groupe contrôle recevant la nanoémulsion sans principe actif et les groupes expérimentaux n'a pu être observée. Une dose de fisétine de 37,5 mg/kg s'avère donc insuffisante pour le traitement tumoral.

Conclusion

Nos travaux ont permis de concevoir une nanoémulsion de fisétine et d'évaluer *in vitro* et *in vivo* ses effets biologiques. Cependant, la toxicité de l'un des excipients, le Labrasol[®], limite son utilisation *in vivo*.

Références

- 1 - Touil (Y.S.), Fellous (A.), Scherman (D.), Chabot (G.G.) – Flavonoid-induced morphological modifications of endothelial cells through microtubule stabilization. - *Nutr. Cancer.*, 2009, **61**(3), 310-321. <http://www.encognitive.com/files/Flavonoid-Induced%20Morphological%20Modifications%20of%20Endothelial%20Cells%20Through%20Microtubule%20Stabilization.pdf>
- 2 - Date (A.A.), Nagarsenker (M.S.) - Parenteral microemulsions: An overview. - *Int. J. Pharm.*, 2008, **355**(1-2), 19-30. <http://www.encognitive.com/files/Flavonoid-Induced%20Morphological%20Modifications%20of%20Endothelial%20Cells%20Through%20Microtubule%20Stabilization.pdf>

Directeur de thèse : Pr. Denis BROSSARD

Président de thèse : Pr. Luc GRISLAIN

Laura SOTTILÉ – Évaluation des pratiques de prise en charge des infections ostéoarticulaires de l'enfant immunocompétent

La prise en charge des infections ostéoarticulaires (IOA) de l'enfant fait intervenir plusieurs professionnels de santé. Pour uniformiser les pratiques, les pédiatres du CHU de Toulouse ont élaboré un protocole, s'intitulant « Prise en charge des infections ostéoarticulaires de l'enfant immunocompétent ». Le pharmacien, garant du bon usage du médicament, est partie prenante dans la rédaction du protocole.

Ce protocole a pour objectif de guider les différents professionnels de santé dans la prise en charge diagnostique et thérapeutique de ces infections. À ce titre et dans le cadre d'une démarche d'amélioration continue de la qualité, nous avons décidé d'évaluer, en collaboration avec les équipes médicales pédiatriques, les pratiques de prise en charge des IOA sur le plan thérapeutique mais également d'étendre cette évaluation aux examens diagnostiques. Cette évaluation devait permettre d'accompagner la mise en place du protocole et de recueillir les avis des utilisateurs sur son application.

Pour mener à bien cette étude, un groupe de travail a été constitué, comprenant un chirurgien, un pharmacien et un interne en pharmacie afin de déterminer la méthodologie de l'étude. La démarche a consisté, dans un premier temps, à effectuer un audit clinique ciblé basé sur une phase de recueil des données et une phase d'analyse de la conformité des pratiques en regard du référentiel de prise en charge des IOA. Les données ont été recueillies à l'aide d'une grille de recueil, validée par le groupe de travail. Elle comprend six niveaux d'évaluation : examen clinique, bilan préthérapeutique, antibiothérapie, administrations liées à la première prescription, suivi biologique et clinique, suivi ambulatoire de l'enfant. Toutes les non-conformités ont été étudiées avec le chirurgien pour la partie médicale et avec le concours du pharmacien pour le traitement antibiotique. L'analyse de la sensibilité des germes aux antibiotiques a été réalisée en collaboration avec l'équipe de bactériologie. Ensuite, nous avons réalisé une analyse approfondie des causes des dysfonctionnements liés à l'application du protocole pour proposer des actions d'amélioration.

Les IOA demeurent rares chez l'enfant mais représentent toujours une urgence diagnostique et thérapeutique. À l'issue des six mois d'étude, nous avons recensé 17 cas : 10 arthrites septiques et 7 ostéomyélites aiguës dont deux spondylodiscites.

Au terme de la démarche parmi les six niveaux d'évaluation, l'examen clinique, les administrations liées à la première prescription, le suivi biologique et clinique et le suivi ambulatoire de l'enfant sont conformes dans 100 % des cas.

Concernant le bilan préthérapeutique, si le bilan d'imagerie est constamment conforme, les prélèvements au lit du patient ne sont conformes que dans 8 cas (47 %) et le prélèvement au bloc ne l'a jamais été.

Concernant l'antibiothérapie, 11 enfants (65 /%) ont reçu un traitement IV et oral conforme au référentiel en terme de molécules, posologies et durée de traitement.

Cette phase de recueil de données a permis d'identifier l'ensemble des problèmes concernant la non application du protocole : ils portent sur les prélèvements réalisés au bloc opératoire, les prélèvements au lit du patient et l'antibiothérapie.

Pour effectuer une analyse approfondie des problèmes à l'origine de la non application du protocole des IOA, la méthode de résolution du problème a été utilisée. Nous avons premièrement hiérarchisé l'ensemble des problèmes au travers du diagramme de Pareto, puis nous nous sommes focalisés sur l'identification des causes à l'origine du principal problème. Le diagramme montre que 50 % des causes de non application du protocole relèvent du prélèvement au bloc opératoire. Or, le renoncement au diagnostic bactériologique représente une perte de chance pour l'enfant.

La suite de l'étude a consisté à trouver et prouver l'origine du dysfonctionnement lié au prélèvement au bloc opératoire avant d'agir sur lui. Pour analyser les causes de ce dysfonctionnement, nous avons construit un diagramme d'Ishikawa qui a été élaboré en tenant compte des réflexions des professionnels de santé concernés par le problème. Les principales causes relevées sont une connaissance insuffisante du contenu du protocole,

l'absence de fiche de prélèvement adaptée aux IOA et un désaccord des professionnels de santé sur l'intérêt de certains prélèvements à réaliser.

Cette évaluation des pratiques entre dans un contexte global d'amélioration de la qualité et de la sécurité du patient. Elle a été menée à son terme grâce à une étroite collaboration avec les équipes médicales et au suivi rigoureux de la démarche. L'analyse approfondie des causes à l'origine des dysfonctionnements nous a permis de proposer trois actions d'amélioration : agir sur la connaissance du protocole, élaborer un guide de prélèvement au bloc et faire évoluer le contenu du protocole. Les résultats obtenus soulignent l'importance de poursuivre l'évaluation de l'application de ce protocole afin de mesurer l'impact des actions d'amélioration visant à contribuer à une meilleure prise en charge de l'enfant.

Directeur de thèse : Dr. Martine VIE

Président de thèse : Pr. Brigitte SALLERIN
