

ANNEE 2003

N°74

**THESE**  
  
**pour le**  
  
**DIPLÔME D'ETAT**  
  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
  
**par**  
  
**Bertrand Tilly**

*Présentée et soutenue publiquement le 3 décembre 2003*

<p><b>L'ASPARAGINASE</b> <b>DANS LE TRAITEMENT DE LA LEUCEMIE AIGUE</b> <b>LYMPHOBLASTIQUE DE L'ENFANT</b></p>
--

**Président :** M. JUGE Marcel, Maître de Conférences en pharmacologie

**Membres du Jury :** M. MILPIED Noël, Professeur d'hématologie

M. THOMARE Patrick, Praticien hospitalier (responsable de  
l'Unité de Pharmacie Clinique Oncologique)

## **REMERCIEMENTS**

**Monsieur Marcel JUGE,**

Je vous remercie d'avoir accepté la présidence de cette thèse.

**Monsieur Noël MILPIED,**

Merci d'avoir accepté d'être le directeur de cette thèse.

**Monsieur Patrick THOMARE,**

Merci de m'avoir aidé et soutenu tout au long de la réalisation de cette thèse.



# **TABLE DES MATIERES**

# INTRODUCTION

## PREMIERE PARTIE : LA LEUCEMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE

### I. DEFINITION DE LA LEUCEMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE

### II. FACTEURS ETIOLOGIQUES

### III. CLASSIFICATION DES LAL

III.1. Classification morphologique

III.2. Classification immunologique des LAL de l'enfant (selon le European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL))

III.3. Classification génétique

### IV. DONNEES CLINIQUES

IV.1. Signes du syndrome d'insuffisance médullaire

IV.2. Signes du syndrome tumoral

### V. EXAMENS COMPLEMENTAIRES

V.1. Numération formule sanguine

V.2. Myélogramme

### VI. FACTEURS PRONOSTIQUES

### VII. PRINCIPES GENERAUX DES TRAITEMENTS

VII.1. L'induction

VII.2. L'intensification

VII.3. L'entretien

VII.4. La greffe de moelle osseuse

VII.5. Prévention des atteintes neuroméningées

## VIII. SURVEILLANCE

## DEUXIEME PARTIE : PHARMACOLOGIE DE L'ASPARAGINASE

### I. HISTORIQUE

### II. LES DIFFERENTES FORMES DE L'ENZYME

II.1. L'asparaginase issue d'*Escherichia coli*

II.2. L'asparaginase issue d'*Erwinia chrysanthemi*

II.3. La pegaspargase

### III. MECANISME D'ACTION

III.1. L'hydrolyse de l'asparagine

III.2. L'activité glutaminasique

### IV. EFFICACITE

### V. PHARMACOCINETIQUE DES TROIS FORMES

V.1. Méthodes d'études

V.2. L'effet de la dose sur l'activité sérique de l'asparaginase

V.3. Demi-vie apparente

V.4. L'effet de doses répétées sur l'activité

V.5. L'effet des différentes formes d'asparaginase

V.6. L'élimination de l'enzyme

## TROISIEME PARTIE : TOXICITE DE L'ASPARAGINASE

### I. INTRODUCTION

### II. L'HYPERSENSIBILITE

II.1. Les réactions allergiques

II.2. L'hypersensibilité silencieuse

II.3. Conséquences sur la pharmacocinétique de l'asparaginase

II.4. Conséquences de la présence d'anticorps anti-asparaginase et/ou d'une hypersensibilité clinique sur le devenir des patients

### III. PERTURBATIONS HEPATIQUES

### IV. TROUBLES DE L'HEMOSTASE

### V. ATTEINTES PANCREATIQUES

V.1. La pancréatite

V.2. Perturbations des sécrétions pancréatiques

### VI. NEUROTOXICITE

### VII. TOXICITE GASTRO-INTESTINALE

## QUATRIEME PARTIE : RAPPORT BENEFICE RISQUE DES TROIS FORMES

### I. PROTOCOLES D'ADMINISTRATIONS

- I.1. Schéma d'administration de l'*E. coli* et de l'*Erwinia* asparaginase
- I.2. Schéma d'administration de la pegaspargase

### II. IMMUNOGENICITE

- II.1. *E. coli* asparaginase
- II.2. *Erwinia* asparaginase
- II.3. Pegaspargase
- II.4. Recommandations pour la poursuite du traitement
  - II.4.1. La prémédication
  - II.4.2. Remplacement d'une forme par une autre

### III. COMPARAISON ENTRE L'*E. COLI* ET L'*ERWINIA* ASPARAGINASES

- III.1. Toxicité
- III.2. Efficacité
- III.3. Conclusion

### IV. COMPARAISON ENTRE L'*E. COLI* ASPARAGINASE ET LA PEGASPARGASE

- IV.1. Toxicité
- IV.2. Efficacité
- IV.3. Conclusion

# **INTRODUCTION**

Il n'y a encore pas si longtemps un enfant atteint de leucémie aiguë lymphoblastique avait très peu de chance de survie.

La recherche en matière de cancer a progressé depuis ces dernières années, permettant d'offrir de nouvelles perspectives d'avenir à tous ces enfants malades.

La polychimiothérapie s'est développée donnant de très bons résultats. Un des maillons essentiels de celle-ci est l'asparaginase dont les propriétés antileucémiques ont été découvertes au début des années 60.

Cette enzyme, dont l'efficacité antitumorale est incontestable, provoque malheureusement des effets secondaires qui représentent un frein à son utilisation et à la guérison des malades. C'est pourquoi les recherches se sont orientées afin de réduire cette toxicité et que de nouvelles formes d'asparaginase sont apparues.

Au cours de cette thèse, nous reviendrons tout d'abord sur ce qu'est la leucémie aiguë lymphoblastique, puis nous étudieront l'enzyme sur le plan pharmacologique et toxicologique. La dernière partie sera une comparaison des 3 formes disponibles de l'enzyme.

**PREMIERE PARTIE :**

**LA LEUCEMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE**



## I. DEFINITION DE LA LEUCEMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE

Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont des hémopathies malignes. Elles se caractérisent par la prolifération, dans la moelle osseuse, d'un clone cellulaire anormal, issu des lignées lymphocytaires, qui est bloqué à un stade précis de différenciation.

La LAL est le cancer le plus fréquemment rencontré : elle représente 30% d'entre eux. Elle a une incidence annuelle de 3 cas pour 100000 enfants âgés de moins de 15 ans.

Actuellement, grâce aux avancées majeures concernant le diagnostic, le développement de la polychimiothérapie et la prévention des atteintes neuroméningées, le taux de survie à 5 ans des enfants atteints de LAL est de 70 à 80%.<sup>57</sup>

## II. FACTEURS ETIOLOGIQUES <sup>78</sup>

Dans la plupart des cas (90%), les facteurs de risque des LAL de l'enfant restent inconnus, mais on a réussi à en isoler quelques-uns parmi lesquels on retrouve :

- le risque induit par certaines radiations ionisantes et solvants benzéniques.
- l'exposition à certains médicaments tels que les alkylants ou les inhibiteurs de topoisomérase II.
- une plus grande fréquence des leucémies aiguës dans certaines anomalies génétiques.
- l'augmentation du risque, au cours de la première année de vie, suggère l'intervention de facteurs environnementaux pendant la grossesse.

### III. CLASSIFICATION DES LAL

#### III.1. Classification morphologique

C'est au début des années 80 qu'une classification Franco-Américano-Britannique (FAB) a été mise en place pour distinguer trois sous-types de LAL basés sur la morphologie des lymphoblastes ; trois catégories de lymphoblastes (L1, L2, L3) ont été définies par le Groupe FAB (French-American-British)<sup>17</sup> :

- L1 (60 à 80% des cas): population de cellules relativement homogène avec 75% ou plus de petites cellules à noyau régulier, au nucléole petit et peu visible, à la chromatine finement dispersée et homogène, avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé (cytoplasme peu abondant).

- L2 (15 à 30% des cas): population de cellules hétérogène en ce qui concerne la taille, la chromatine et la forme du noyau : grandes cellules hétérogènes à noyau irrégulier, encoché, au nucléole plus volumineux, à la chromatine fine ou en mottes, avec un rapport nucléo-cytoplasmique moins élevé (le cytoplasme occupe 20% ou plus de la surface cellulaire).

- L3 (1 à 5% des cas): population de grandes cellules homogènes très basophiles, comportant de nombreuses vacuoles, à noyau régulier, au nucléole volumineux, avec un rapport nucléo-cytoplasmique moyen (le cytoplasme est plus abondant).

### III.2. Classification immunologique des LAL de l'enfant (selon le European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL))

Cette classification est basée sur un panel d'anticorps monoclonaux qui sont dirigés contre des antigènes spécifiques portés par les cellules leucémiques. Il est ainsi possible de classer les LAL en : <sup>16</sup>

- LAL T (15 à 20% des cas)
- LAL pré-pré B (70 à 75% des cas)
- LAL pré B (environ 10% des cas)
- LAL B (moins de 5% des cas)

### III.3. Classification génétique

Cette dernière classification est basée sur l'étude du caryotype des cellules leucémiques. En effet, dans 80 à 90% des cas, on observe des anomalies clonales en particulier au niveau du nombre ou de la structure des chromosomes.<sup>89</sup>

## IV. DONNEES CLINIQUES <sup>57</sup>

Le tableau clinique reflète d'une part le degré d'infiltration des organes hématopoïétiques par les cellules leucémiques, et d'autre part l'extension à d'autres organes extramédullaires. On observe des signes cliniques dus à une insuffisance médullaire et un syndrome tumoral.

### IV.1. Signes du syndrome d'insuffisance médullaire

Les symptômes de l'insuffisance médullaire ne sont pas spécifiques, mais on les retrouve dans la majorité. Cependant, leur intensité est très variable :

- Anémie responsable de pâleur, fatigue, malaise, tachycardie, dyspnée d'effort ou souffle systolique.
- Thrombopénie pouvant se manifester par des signes hémorragiques divers, en particulier, un purpura, des épistaxis ou des ecchymoses.
- Neutropénie pouvant être à l'origine d'une fièvre, de frissons et d'autres signes d'infection en sachant qu'un état fébrile est souvent présent chez les patients au début sans qu'il soit pour autant corrélé à une infection.

#### IV.2. Signes du syndrome tumoral

Le syndrome tumoral est provoqué par l'infiltration des organes extra-médullaires par les cellules leucémiques.

- Les signes de ce syndrome sont :
- une splénomégalie (dans plus de la moitié des cas).
  - une hépatomégalie (l'hépatosplénomégalie est observée chez  $\approx 66\%$  des enfants ; elle est habituellement asymptomatique).
  - des adénopathies périphériques ou profondes (50 à 70% des cas).
  - une néphromégalie bilatérale.
  - une infiltration neuro-méningée.
  - une infiltration testiculaire.
  - douleurs osseuses, surtout localisées au niveau des os longs et des articulations.

#### V. EXAMENS COMPLEMENTAIRES <sup>57</sup>

Les examens complémentaires permettent de poser définitivement le diagnostic et de pouvoir classer la LAL en vue d'adapter au mieux le traitement.

## V.1. Numération formule sanguine

Elle montre : - une anémie normochrome, normocytaire et arégénérative

- une leucocytose variable (hyperleucocytose à partir de 10000 lymphoblastes par mm<sup>3</sup>)

- une thrombopénie

## V.2. Myélogramme

Le comptage des lymphoblastes permet d'affirmer de diagnostic lorsque l'infiltration lymphoblastique médullaire est supérieure à 30%.

La morphologie des blastes permet de différencier le type de leucémie grâce à la classification FAB.

L'immunophénotypage permet de classer la leucémie selon l'EGIL.

Enfin, l'étude du caryotype permet de trouver les anomalies génétiques au niveau des cellules leucémiques

## VI. FACTEURS PRONOSTIQUES

La LAL de l'enfant est devenue aujourd'hui une maladie curable dans deux cas sur trois environ, grâce à un traitement reposant essentiellement sur une polychimiothérapie adaptée au mieux aux facteurs pronostiques :<sup>57</sup>

- l'âge : le pronostic est mauvais chez les enfants ayant moins d'un an. En effet, la maladie se présente fréquemment sous une forme hyperleucocytaire avec une atteinte méningée initiale et le traitement implique à cet âge une toxicité importante.

- chez l'enfant plus grand, on considère généralement le pronostic plus mauvais à partir de l'âge de 10-11 ans, sachant que chez l'adolescent à partir de 15 ans, le pronostic rejoint celui de l'adulte.
- le nombre initial de globules blancs : pronostic très défavorable quand la leucocytose est supérieure à 50 000/mm<sup>3</sup>.
- le syndrome tumoral : lorsqu'il est important le facteur pronostique est mauvais.
- le sexe : le facteur pronostique est plus mauvais chez le garçon notamment à cause des rechutes testiculaires et d'une incidence plus élevée de leucémie de type T.
- l'immunophénotype : les LAL de la lignée B, LAL pré-pré-B sont les plus fréquentes et de meilleur pronostic, tandis que les formes plus immatures sont rares et de mauvais pronostic. les LAL T sont de mauvais pronostic.
- l'étude cytogénétique permet aussi de mettre en évidence des anomalies chromosomiques qui peuvent être de mauvais pronostic, entre autres les translocations t(9;22), t(4;11) et t(1;19).
- une réponse précoce au traitement d'induction : la rapidité de mise en rémission apparaît comme un facteur prédictif essentiel pour la survenue de rechutes tardives. Si la rémission n'est pas atteinte, après 4 à 6 semaines de traitement d'induction, le taux de rechute augmente et celui de la survie diminue.

## VII. PRINCIPES GENERAUX DES TRAITEMENTS

Les protocoles de traitement actuels varient selon le type et la gravité de la LAL. Le traitement dure en moyenne 2 à 3 ans suivant les protocoles. Il est généralement divisé en 3 phases : l'induction, l'intensification et l'entretien.<sup>57, 78</sup>

## VII.1. L'induction

Elle est destinée à obtenir une rémission complète, c'est-à-dire obtenir un retour à des paramètres clinico-biologiques normaux : La numération doit être normale avec plus de 1000 polynucléaires neutrophiles et plus de 100 000 plaquettes/mm<sup>3</sup> et la moelle doit avoir une richesse normale et contenir moins de 5% de blastes.

La rémission est obtenue dans 75% des cas après la mise en œuvre d'une polychimiothérapie de 4 semaines associant vincristine et prednisolone. A ces 2 drogues de base peuvent être associées l'asparaginase et l'anthracycline.

## VII.2. L'intensification

Elle reprend généralement les drogues initialement utilisées au moment de l'induction. On peut y ajouter du méthotrexate, de la mercaptopurine, du cyclophosphamide et de l'étoposide.

## VII.3. L'entretien

Il repose le plus souvent sur l'association mercaptopurine (quotidien) et méthotrexate (hebdomadaire). On y associe ou non, suivant les protocoles, des réinductions mensuelles ou trimestrielles.

## VII.4. La greffe de moelle osseuse

Elle est généralement réalisée après une rechute et lorsque le malade est en deuxième rémission. On peut alors faire une allogreffe, c'est-à-dire une greffe à partir d'un membre de la famille compatible ou à partir d'un donneur HLA compatible. On peut aussi pratiquer une autogreffe en prélevant la moelle lors de la rémission. Cette moelle est alors traitée ou non avant d'être réinjectée au patient. Il est aussi possible, dans certains cas, de réaliser une greffe de moelle à la première rémission ce qui donne de meilleurs résultats qu'à la deuxième.

## VII.5. Prévention des atteintes neuroméningées

Lorsque la rémission est obtenue, le traitement prophylactique neuro-méningé doit être débuté : il comprend des injections intrathécales hebdomadaires de méthotrexate/corticoïde. On peut aussi traiter par irradiation de l'encéphale, mais cette pratique est de moins en moins utilisée.

## VIII. SURVEILLANCE<sup>57, 78</sup>

Une surveillance est réalisée pour vérifier que le traitement est adapté et efficace, mais aussi pour détecter d'éventuels effets secondaires qui seront traités par une thérapie de support : -numération formule sanguine tous les jours ou tous les deux jours.

-myélogramme au 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 28<sup>ème</sup> jour.

-l'apparition d'une fièvre de plus de 24 heures entraîne la réalisation des prélèvements habituels et la mise en route d'une antibiothérapie empirique à large spectre couvrant les bacilles gram négatif, associée à un traitement antifongique. En cas d'inefficacité sur le syndrome fébrile, le spectre est élargi aux staphylocoques, champignons et virus.

-une thrombopénie majeure, une hémorragie et/ou une CIVD (Coagulation Intravasculaire Disséminée) nécessitent des transfusions de plaquettes, de facteurs de la coagulation et éventuellement des injections d'héparine en perfusion continue à la dose de 1mg/kg/j.

**DEUXIEME PARTIE :**

**PHARMACOLOGIE DE L'ASPARAGINASE**

## I. HISTORIQUE

C'est en 1953 que Kidd décrit une activité du sérum de cochon d'Inde qui a permis la régression d'un lymphome transplanté chez une souris et des rats.<sup>44, 45</sup> En 1961, Broome découvre que cette activité antilymphome du sérum de cochon d'Inde est due à la L-asparaginase.<sup>21</sup> Trois ans plus tard, Campbell, Mashburn et Wriston montrent que la L-asparaginase issue de la bactérie *Escherichia coli* a le même potentiel antitumoral que celle isolée du sérum de cochon d'Inde.<sup>23, 58</sup> Après cette découverte, qui a permis une production massive et facile de la protéine, les études cliniques ont pu commencer. En 1966, un premier traitement d'asparaginase purifiée du sérum de cochon d'Inde, a été administré à un enfant de huit ans atteint de LAL avec de multiples rechutes. Une réponse clinique courte, mais définie, a été atteinte.<sup>30</sup> Par la suite, les études cliniques de phase I et II se sont concentrées sur la L-asparaginase issue de l'*E. coli*. Les taux de réponse chez les enfants et adultes atteints de LAL et en rechute ont varié de 30 à 65%, mais la durée de rémission était courte, en moyenne 60 jours.<sup>64</sup> Les taux de réponse et la tolérance à l'enzyme étaient plus élevés chez les enfants, c'est pourquoi les études postérieures ont surtout été réalisées chez les enfants.<sup>25, 28, 37, 46, 55, 81, 92</sup>

A la fin des années 60, l'asparaginase a été incorporée aux protocoles de traitement des rechutes de LAL.<sup>26, 41, 49, 55, 76, 82, 83</sup> Après avoir observé l'efficacité et la sûreté de l'enzyme chez ces malades, l'asparaginase a été introduite dans le traitement de première intention à la phase d'induction et aux phases d'intensifications.<sup>80</sup>

Actuellement, il existe trois formes d'asparaginase : l'*E. coli* asparaginase, l'*Erwinia* asparaginase et la pegaspargase (PEG).

## II. LES DIFFERENTES FORMES DE L'ENZYME

### II.1. L'asparaginase issue d'*Escherichia coli*

L'*Escherichia coli* (*E. coli*) est la première source bactérienne à avoir été utilisée pour produire l'asparaginase utilisée en clinique. Cette bactérie a produit deux types de L-asparaginases, EC-1 et EC-2, mais seule EC-2 avait une activité antitumorale. Son poids moléculaire est de 138000 à 141000 daltons. Elle est composée de quatre sous-unités identiques avec un site actif sur chacune d'entre-elles. Cette forme de l'enzyme est la plus couramment utilisée dans le monde. Aux Etats-Unis, la mise sur le marché et la commercialisation de cette enzyme ont été réalisées par Merck & Co sous le nom de Elspar<sup>o</sup>.<sup>9, 90</sup> En France, la spécialité est disponible sous le nom de Kidrolase<sup>o</sup> et est fabriquée par Aventis pharma.

## II.2. L'asparaginase issue d'*Erwinia chrysanthemi*

La deuxième forme d'asparaginase a été extraite d'une autre bactérie *Erwinia chrysanthemi* (*Erwinia*). Wade a montré la première activité antitumorale de l'*Erwinia* asparaginase équivalente à celle de l'*E. coli* asparaginase et c'est en 1970 que l'*Erwinia* asparaginase a été utilisée pour la première fois en alternative de la forme native. Son poids moléculaire est de 138000 daltons.<sup>15, 86</sup>

Elle est disponible aux Etats-Unis sous le nom d'*Erwinia* L-asparaginase<sup>o</sup> de Ogden BioServices Pharmaceutical Repository. Cette production est commercialisée au Canada et en Europe sous le nom d'Erwinase<sup>o</sup> et a été mise sur le marché par Speywood Pharmaceuticals Ltd. L'Erwinase<sup>o</sup> a été produite pour les malades allergiques aux productions issues d'*E. coli* ou lorsque l'efficacité de celle-ci n'était plus suffisante ainsi que pour disposer d'une forme de l'enzyme présentant une toxicité moins importante.

## II.3. La pegaspargase

La pegaspargase est la dernière forme disponible de l'enzyme. Il s'agit de l'asparaginase produite par l'*Escherichia coli* sur laquelle ont été greffé, par liaison covalente, des unités de monométhoxypolyéthylène glycol de poids moléculaire de 5000 daltons. C'est au milieu des années 70 que des équipes de chercheurs ont tenté de trouver une forme alternative de l'enzyme, moins immunogène tout en gardant ses

propriétés antitumorales. Abuchowski a réalisé de nombreuses expériences à la fin des années 70 qui ont montré qu'une liaison entre le polyéthylène glycol et diverses protéines animales pouvait diminuer leur caractère immunogène.<sup>2, 4, 5</sup> En 1979, une de ses expériences qui consistait à injecter de l'asparaginase liée au polyéthylène glycol, a montré non seulement une propriété antitumorale chez des souris atteintes de tumeurs, mais aussi des propriétés immunogéniques moins importantes. Il a aussi remarqué que cette forme présentait une plus grande stabilité, une demi-vie allongée et de ce fait une plus grande efficacité thérapeutique.<sup>3, 6</sup> Les premiers essais cliniques chez l'homme ont été réalisés en 1984.<sup>3</sup>

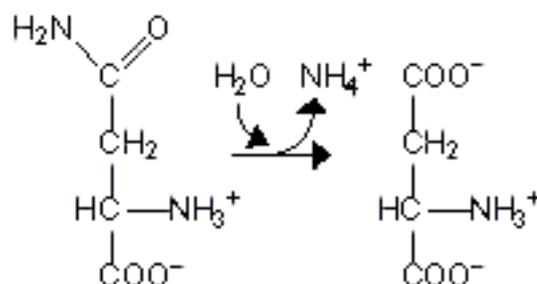
La pegaspargase est commercialisée par Rhone-Poulenc Rorer sous le nom de Oncaspar<sup>o</sup>. Elle est préconisée pour le traitement des malades atteints de LAL qui sont hypersensibles aux deux premières formes de l'enzyme.

### III. MECANISME D'ACTION

#### III.1. L'hydrolyse de l'asparagine

Les cellules néoplasiques n'ont pas la capacité de synthétiser l'asparagine dont elles ont besoin pour pouvoir fabriquer les protéines asparagine-dépendantes, tandis que les cellules normales le peuvent grâce à l'asparagine synthétase. L'asparaginase hydrolyse l'asparagine circulante en acide aspartique et en ammoniacque extracellulaire ce qui prive les cellules leucémiques de leur principale source. Cela provoque à terme la mort sélective des cellules leucémiques par diminution de la synthèse de leurs protéines et de leurs acides nucléiques.<sup>24</sup>

**Action de  
l'asparaginase sur  
l'asparagine :**



Asparagine

Acide aspartique + Ammoniac

### III.2. L'activité glutaminasique

Suivant leur origine, les différentes formes d'asparaginase n'ont pas le même degré de toxicité ni le même spectre d'activité. Ceci est dû à une autre propriété de l'enzyme, variable selon la forme, qui a aussi le pouvoir d'hydrolyser la L-glutamine en acide glutamique. Cette activité glutaminasique contribue à augmenter l'activité antitumorale de l'enzyme. L'acide glutamique issu de la dégradation de la glutamine contribue, quant à lui, à augmenter la toxicité clinique de l'asparaginase, notamment la neurotoxicité.<sup>59</sup>

Cette activité est mineure par rapport à l'activité L-asparaginase avec des taux maximaux d'hydrolyse entre 3 et 9% par rapport à sa première propriété.<sup>59</sup>

## IV. EFFICACITE

L'efficacité de la L-asparaginase dans le traitement de première intention chez les enfants atteints de LAL a été évaluée par un essai randomisé en 1983. Les résultats de cette étude ont été rapportés par Sallan. Les malades étudiés étaient atteints de LAL, nouvellement diagnostiquée. La L-asparaginase était administrée à la dose de 25000 UI/m<sup>2</sup> une fois par semaine, pendant une durée totale de 20 à 30 semaines, en association avec d'autres agents chimiothérapeutiques. L'espérance de survie a été améliorée chez les groupes de patients à risque élevé ou faible. Elle était de 71±9% sur 9,3 ans chez les malades traités entre autres par l'asparaginase contre 31±11% chez les autres.<sup>79</sup>

En 1987, une autre étude randomisée a été réalisée par le POG (Pediatric Oncology Group) pour évaluer l'efficacité de hautes doses d'asparaginase dans la phase d'intensification (25000 UI/m<sup>2</sup> par semaine en intramusculaire (IM) pendant 20 semaines) chez 552 patients dont 357 nouvellement diagnostiqués LAL. Cet essai a montré que la L-asparaginase améliorait la survie des patients qui la recevaient par rapport aux autres malades.<sup>62</sup>

En 1999, Asselin et al ont rapporté les résultats d'une étude réalisée chez 251 patients randomisés pour recevoir l'une des trois formes d'asparaginases. Cette étude

avait pour but d'évaluer in vitro et in vivo l'efficacité des différentes asparaginases. Les patients étaient nouvellement diagnostiqués LAL. In vivo, l'étude a comparé les pourcentages de cellules leucémiques dans la moelle avant l'administration d'asparaginase d'une part, et 5 jours après d'autre part. In vitro, un décompte des cellules leucémiques a été réalisé dans un milieu de culture avant l'ajout d'asparaginase et après 5 jours de contact. In vitro, les pourcentages moyens de cellules tuées étaient respectivement pour *L'E. coli* asparaginase, l'Erwinase<sup>o</sup> et la pegaspargase, 32, 39 et 36% et les pourcentages moyens de cellules leucémiques dans la moelle osseuses étaient 69, 74 et 65%. Ces résultats montrent l'efficacité équivalente des trois formes.<sup>11</sup>

## V. PHARMACOCINETIQUE DES TROIS FORMES

### V.1. Méthodes d'études

La méthode spectrophotométrique est utilisée pour mesurer la cinétique de l'asparaginase et ainsi permettre le calcul des différents paramètres cinétiques (taux de clairance, demi-vie, aire sous-courbe, concentration maximale).

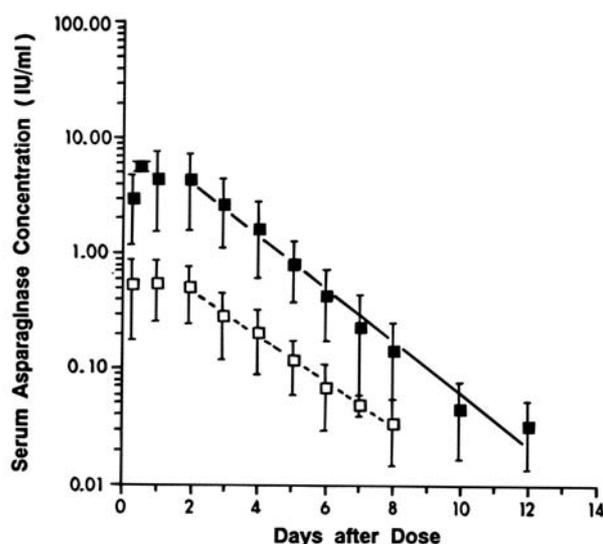
La chromatographie liquide haute performance permet de mesurer la concentration en asparagine dans le sérum déprotéïnisé des patients avec une limite de détection de 1 micromole par litre.<sup>12</sup>

Les taux d'anticorps anti-asparaginase sont mesurés par la méthode ELISA.<sup>12, 13</sup>

### V.2. L'effet de la dose sur l'activité sérique de l'asparaginase

Un essai clinique a étudié l'activité sérique de l'asparaginase chez 35 patients, parmi lesquels 17 avaient reçu une dose élevée d'*E. coli* asparaginase (25000 UI/m<sup>2</sup>) et 16 une dose faible (2500 UI/m<sup>2</sup>). Pour les deux groupes, le pic sérique est atteint après un délai de 24 à 48 heures. L'asparaginase est devenue indétectable dans le sérum après 10 jours pour le groupe ayant reçu la faible dose et 14 jours pour l'autre groupe. La demi-vie de l'enzyme pour les deux groupes n'était pas significativement différente :

1,24 ± 0,17 jours pour le groupe à faible dose et 1,35 ± 0,3 pour l'autre groupe. La demi-vie apparente est donc indépendante de la dose.<sup>13</sup>



**Concentrations sériques de l'asparaginase en fonction du temps suivant l'injection chez 17 patients qui ont reçu 25000 UI/m<sup>2</sup> (■) et 16 patients 2500 UI/m<sup>2</sup> (□).<sup>13</sup>**

### V.3. Demi-vie apparente

La demi-vie plasmatique de l'asparaginase reste la même quels que soit le sexe, l'âge, la surface corporelle, le diagnostic, l'étendue de la maladie, la fonction hépatique ou rénale <sup>13</sup>. Cependant les demi-vies sériques des trois formes d'asparaginase sont différentes et les durées de déplétion sérique en asparaginase sont en rapport avec les données sus-citées. Mesurées chez des patients naïfs ayant reçu des injections IM, ces différents paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sont représentés dans le tableau suivant :

#### **Propriétés pharmacologiques des trois différentes formes d'asparaginases <sup>9</sup> :**

Formes d'asparaginase	Erwinase <sup>o</sup>	<i>E. coli</i> asparaginase	Pegaspargase
Demi-vies ( jours )	0,65 ( ± 0,13 )	1,28 ( ± 0,35 )	5,73 ( ± 3,24 )
Durée de déplétion en asparaginase (	7 à 15	14 à 23	26 à 34

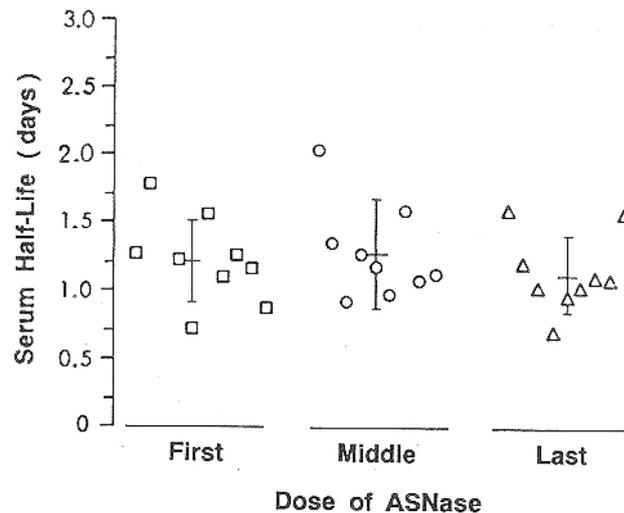
jours )			
---------	--	--	--

La demi-vie de l'*Erwinia* asparaginase est significativement plus courte que celle de la forme native. Au contraire, la demi-vie de la pegaspargase est plus longue que celle des deux autres formes de l'enzyme. Cela est dû probablement à son poids moléculaire plus élevé et donc à une diffusion plus lente ce qui permet une plus longue durée d'action.

La durée de déplétion en asparagine, suivant l'administration des différentes préparations d'asparaginase, est en relation directe avec les demi-vies des trois formes, c'est à dire la plus courte déplétion pour l'Erwinase<sup>o</sup> et la plus longue pour la pegaspargase.

#### V.4. L'effet de doses répétées sur l'activité

Selon le protocole du Dana-Farber Cancer institute 87-001, des doses des trois formes d'asparaginase ont été administrées à 9 patients dont le sérum a ensuite été analysé. Le traitement d'induction a consisté en une injection soit d'*E. coli* asparaginase ( 25000 UI/m<sup>2</sup> ), soit d'Erwinase<sup>o</sup> ( 25000 UI/m<sup>2</sup> ) ou de pegaspargase ( 25000 UI/m<sup>2</sup> ). Le traitement d'intensification a associé divers médicaments et une administration d'*E. coli* asparaginase en IM ( 25000 UI/m<sup>2</sup> ) toutes les semaines pendant au moins 20 semaines. Les demi-vies ont été calculées au début, au milieu (entre la troisième et la quinzième dose) et à la fin du traitement (entre la vingtième et la trentième dose). Aucune différence significative entre les demi-vies à ces trois moments du traitement n'a été constatée : 1,28 jours pour la première dose contre 1,21 pour la dose du milieu et 1,14 pour la dernière dose (P>0,3).<sup>13</sup>

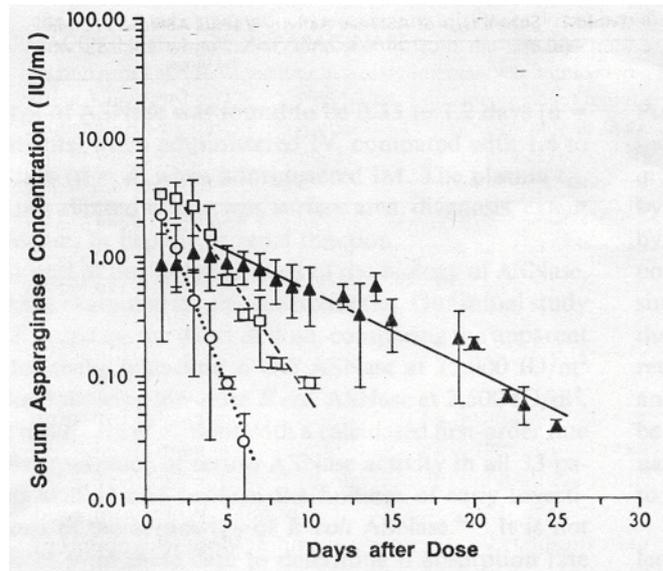


**Demi-vie sérique en jours de l'*E. coli* asparaginase en fonction de la répétition de doses. Dose administrée au jour 0 du traitement □, entre la troisième et la quinzième dose ○ et entre la vingtième et la trentième dose Δ.<sup>13</sup>**

#### V.5. L'effet des différentes formes d'asparaginase

Lors d'un essai, dix malades ont été étudiés avec les trois préparations d'asparaginase, à savoir l'*E. coli*, l'*Erwinia* et la pegaspargase. Asselin a comparé les niveaux sériques de L-asparaginase qui ont été mesurés pendant 28 jours. Voici ces résultats : après une dose IM de 25000 UI/m<sup>2</sup> d'Erwinase<sup>o</sup> ou d'*E. coli*, il a constaté que l'activité sérique était la plus élevée dans les 24 heures qui suivent l'injection ; l'activité enzymatique devient indétectable au 8<sup>ème</sup> jour pour l'Erwinase<sup>o</sup> et au 13<sup>ème</sup> pour l'*E. coli* asparaginase. Après une dose de 2500 UI/m<sup>2</sup> de pegaspargase en IM, l'activité est mesurable pendant 26 jours entiers avec des pics d'activité mesurés entre 72 et 96 heures après l'injection. On constate donc que le pic d'activité enzymatique de la pegaspargase arrive légèrement plus tard que pour les deux autres formes mais que ce retard est largement compensé par une plus longue présence dans le sérum<sup>13</sup>

Ces relations sont en rapport avec les différentes demi-vies des trois formes d'asparaginase. Plus la demi-vie est longue, plus l'activité sérique l'est aussi et par conséquent, plus la déplétion en asparagine est importante.



**Diminution de la concentration sérique de l'asparaginase en fonction du temps chez les patients après une injection d'une des trois formes de l'enzyme. (□) *E. coli* à 25000 UI/m<sup>2</sup>, n=10 ; (○) *Erwinia* 25000UI/m<sup>2</sup>, n=10 ; (▲) PEG 2500 UI/m<sup>2</sup>, n=10.<sup>13</sup>**

C'est en raison de cette différence de pharmacocinétique entre les 2 formes d'enzyme non modifiées et la pegaspargase que cette dernière n'est administrée que tous les 15 jours contre 3 fois par semaine pour les deux autres.

## V.6. L'élimination de l'enzyme

Les études menées par Asselin et al ont montré que la demi-vie de l'activité enzymatique était essentiellement la même que celle de la protéine asparaginase, ce qui démontre que l'activité diminue par clairance de l'asparaginase ou modification de l'enzyme en une forme qui n'est pas détectée par les réactions immunologiques. Aucune trace de la protéine n'a été décelée dans les urines des patients : cela exclut donc une clairance rénale dans les mécanismes d'élimination. L'élimination peut donc être réalisée, avec ou sans dégradation, par un autre organe, tel que le foie, par une excrétion biliaire ou une filtration plasmatique par le système réticulo-endothélial.<sup>13</sup>

**TROISIEME PARTIE :**

**TOXICITE DE L'ASPARAGINASE**

## I. INTRODUCTION

L'asparaginase est peu myélosuppressive, mais elle entraîne de nombreux effets secondaires qui peuvent aboutir à l'interruption du traitement. L'effet indésirable le plus fréquent, qui suivent surtout les administrations intraveineuses (IV), est l'hypersensibilité. Mais il existe aussi toute une variété d'effets indésirables qui découlent de l'inhibition de la synthèse protéique. Cela engendre des toxicités au niveau de nombreux organes ayant des taux élevés de synthèse protéique tels que le foie, le pancréas et les tissus hématopoïétiques. Les principaux effets secondaires sont l'anaphylaxie, la pancréatite, le diabète et les anomalies de la coagulation qui peuvent mener à une thrombose intracrânienne ou à une hémorragie.<sup>31</sup>

## II. L'HYPERSENSIBILITE

### II.1. Les réactions allergiques

Les réactions allergiques sont les premiers effets secondaires qui limitent l'utilisation de l'asparaginase. L'hypersensibilité clinique se développe chez 3 à 78% des malades traités avec les formes natives de l'enzyme selon le type d'injection, IM ou IV pour le pourcentage le plus élevé.<sup>29, 32, 54, 63</sup> On a observé l'apparition de réactions allergiques sévères chez 24% en moyenne des enfants traités par l'asparaginase.<sup>14</sup> Ces allergies sont d'intensité variable, allant d'une simple réaction localisée à une anaphylaxie empêchant toute poursuite du traitement par l'enzyme, voire même au décès. Des doses supérieures à 6000 UI/m<sup>2</sup>,<sup>43</sup> des traitements répétés,<sup>84</sup> et un seul agent plutôt qu'une combinaison, sont des facteurs de risque concernant l'apparition de réactions d'hypersensibilité provoquées par l'asparaginase. Les injections intramusculaires d'asparaginase provoquent des réactions moins importantes et moins fréquentes que les injections intraveineuses sans pour autant diminuer l'efficacité de l'enzyme. Avant que des recherches ne mettent en évidence la moins grande immunogénicité de l'injection IM, les premières injections d'asparaginase étaient

réalisées en IV, pratique actuellement de moins en moins utilisée, faisant de la voie IM la voie de référence.<sup>63</sup>

Les réactions d'hypersensibilité peuvent être classées par le National Cancer Institute Commun Toxicity Criteria en quatre différents grades qui sont détaillés dans le tableau suivant :

Grade 0	Pas de réactions
Grade 1	Réactions moyennes locales (< 10 cm, < 24 heures)
Grade 2	Urticaire
Grade 3	Bronchospasme, maladie sérique, réaction locale sévère (> 10 cm, > 24 heures)
Grade 4	Hypotension, anaphylaxie

Les 2 premiers grades peuvent être contrôlés par l'administration d'antihistaminiques (diphénhydramine par exemple) ou de prednisone, qui diminuent les réactions allergiques, voir même d'épinéphrine dans le cas de choc anaphylactique.<sup>19, 51</sup> Dès l'apparition du grade III, la forme d'asparaginase est remplacée par une autre.

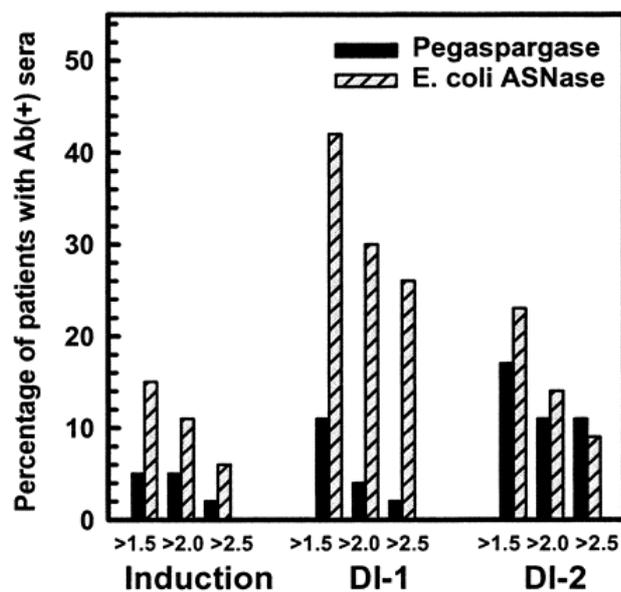
Des études ont permis de mettre en évidence des concentrations élevées d'anticorps anti-asparaginase précèdent les réactions d'hypersensibilités ultérieures, sans pour autant établir un rapport entre la sévérité des réactions allergiques et les niveaux d'anticorps. Les concentrations d'anticorps anti-asparaginase augmentent suite à une répétition de doses d'une forme de l'enzyme.<sup>90</sup> Cette concentration est donc une valeur prédictive de réactions d'hypersensibilités ultérieures et c'est pourquoi de plus en plus d'essais sont réalisés pour déterminer les concentrations d'IgG par méthode ELISA dans le sang des patients traités par l'asparaginase.<sup>48, 87</sup> Kurtzberg et al ont même proposé un dosage systématique et périodique des anticorps anti-asparaginase pour adapter au mieux les traitements.<sup>51</sup>

## II.2. L'hypersensibilité silencieuse

L'asparaginase induit donc par son caractère protéique des réactions allergiques, mais aussi un développement d'anticorps anti-asparaginase de type Ig G et une

augmentation des clairances de l'enzyme.<sup>27</sup> Le développement de ces anticorps circulants n'est pas forcément associé à une réaction allergique. Ce phénomène a été observé pour les trois formes d'asparaginase. Une étude menée par Woo et al en 2000, réalisée sur 154 enfants a permis de déterminer la relation entre la présence d'anticorps et les réactions cliniques d'hypersensibilités. Trente cinq enfants traités par l'*E. coli* asparaginase à la dose de 10000 UI/m<sup>2</sup> en IM avaient des anticorps anti-asparaginase dans leur sang et 55,6% d'entre eux présentaient des signes cliniques.<sup>91</sup> Très peu de réactions allergiques ont été observées chez les d'enfants en rechute de LAL traités par la pegaspargase, mais plus de 60% d'entre eux ont développé des anticorps circulants.<sup>35, 68</sup> C'est pourquoi ce phénomène se nomme l'hypersensibilité silencieuse. Elle peut être présente chez les malades ayant reçu des injections IV ou IM sans distinction. Chez les enfants et les adultes traités avec diverses préparations et posologies d'*E. coli* asparaginase, des anticorps anti-asparaginase circulants étaient retrouvés chez 58% des patients en moyenne (de 28 à 96% pour les extrêmes).

Les proportions moyennes d'anticorps anti-asparaginase sont variables selon la forme de l'enzyme utilisée mais aussi selon la phase du traitement (cf. figure 1). On remarque aussi dans cette étude menée par le Children's Cancer Group (CCG) que l'*E. coli* asparaginase est plus immunogène que la pegaspargase.<sup>14</sup>



**Figure 1. Pourcentage de patients ayant des proportions d'anticorps supérieures au contrôle négatif de 1,5, 2 et 2,5 fois dans l'étude CCG-1962.**<sup>14</sup>

Toutes les études dont l'objectif visait à évaluer le rapport entre le taux d'anticorps et l'efficacité, ont montré que l'hypersensibilité silencieuse était responsable d'une diminution de l'activité de l'asparaginase.<sup>14, 52</sup> Les taux de réponse aux traitements sont plus faibles chez les enfants ayant des concentrations sériques élevées en anticorps anti-asparaginase. C'est la conséquence d'une clairance plus rapide de l'asparaginase, de périodes d'épuisement plus courtes en asparagine dans le sang.<sup>52</sup>

### II.3. Conséquences sur la pharmacocinétique de l'asparaginase

Le développement de réactions d'hypersensibilité apparente modifie les propriétés pharmacocinétiques de l'asparaginase. On constate que ces réactions réduisent considérablement l'activité de l'asparaginase en diminuant sa demi-vie sérique. Une hypersensibilité provoquée par l'*E. coli* asparaginase diminue nettement son activité. Cette hypersensibilité diminue aussi l'activité de la pegaspargase si elle remplace la forme native par rapport aux valeurs prévues. Cependant l'élimination de la première forme d'asparaginase est beaucoup plus rapide que celle de la pegaspargase.<sup>9</sup> Le tableau 1 décrit les résultats de 10 patients après une réaction d'hypersensibilité provoquée par l'*E. coli* asparaginase qui continuent à recevoir l'enzyme native ou qui reçoivent la pegaspargase en remplacement.<sup>13</sup>

**Tableau 1 : Demi-vies de l'asparaginase chez les patients ayant manifestés une réaction d'hypersensibilité antérieure due à l'*E. coli* asparaginase :<sup>13</sup>**

<b>Formes d'asparaginase</b>	<b>Dose ( UI/m<sup>2</sup> )</b>	<b>Demi-vie ( jours )</b>
<i>E.coli</i> asparaginase	25000	Indétectable
Pegaspargase	2500	1,82 ± 0,3

L'*E. coli* asparaginase, dont la demi-vie est indétectable devient inutile puisque l'activité de l'enzyme est directement liée à sa demi-vie. La pegaspargase, quant à elle, garde une certaine activité mais très diminuée par rapport à la normale : la demi-vie passe de 5,73 à 1,82 jours.

La survenue d'une hypersensibilité apparente modifie donc la pharmacocinétique de l'asparaginase. On remarque aussi qu'une concentration élevée en anticorps anti-asparaginase, sans que des réactions cliniques ne soient observées, c'est à dire l'hypersensibilité silencieuse, altère aussi la pharmacocinétique de l'asparaginase. Ces modifications ont été évaluées chez 51 patients ayant reçu précédemment de l'*E. coli* asparaginase. Certains d'entre eux présentaient des niveaux élevés d'anticorps anti-asparaginase et ont reçu par la suite des injections de PEG-asparaginase en IM à la dose de 2500 UI/m<sup>2</sup> tous les 7 ou 14 jours. Les patients ayant de faibles concentrations d'anticorps ou naïfs vis à vis de l'asparaginase ont reçu les mêmes doses de pegaspargase tous les 14 jours. Chez ces derniers patients, la demi-vie moyenne de la PEG-ASP était de 7,05 jours par rapport à 2,59 jours chez les patients ayant des concentrations élevées (p=0,0003).<sup>52</sup>

**Tableau 2 : Relation entre les titres d'anticorps anti-asparaginase et les demi-vies de la pegaspargase :<sup>52</sup>**

Titres d'anticorps	Demi-vie de la pegaspargase
Titre élevé	2,59 jours
Titre faible	7,05 jours

La différence de demi-vie est importante bien qu'il n'y ait pas de signes cliniques d'hypersensibilité. C'est pourquoi, si aucun dosage n'est réalisé pour évaluer l'efficacité du traitement, celui-ci peut être poursuivi sans qu'il soit assez efficace.

Comme ce que montre le tableau 3 le nombre de jours de présence de la pegaspargase diminue lui aussi avec des titres élevés d'anticorps, qu'il y ait ou non des réactions d'hypersensibilité cliniques.<sup>53</sup> Cette diminution provoque une réduction de la durée de déplétion de l'asparagine sérique ce qui rend le traitement moins efficace.

**Tableau 3 : Durée de l'activité de la pegaspargase chez les patients précédemment traités avec l'*E. coli* asparaginase et/ou l'Erwinase<sup>o</sup>:<sup>53</sup>**

	Nombre de jours de présence de la PEG-ASP avec faibles titres d'Ac	Nombre de jours de présence de la PEG-ASP avec titres élevés d'Ac
<b>Patients hypersensibles</b>	13,3 + 0,6	4 + 1,4
<b>Patients non-hypersensibles</b>	12,2 + 1,4	6

Les patients hypersensibles présentent des taux d'anticorps supérieurs par rapport aux malades non hypersensibles. Cette présence d'anticorps est associée à une augmentation de la clairance de l'asparaginase et par conséquent à une diminution de la durée de déplétion en asparagine. Une étude a examiné ce phénomène chez des enfants atteints de LAL et traités par la pegaspargase à la dose de 2500 UI/m<sup>2</sup> toutes les deux semaines. Seuls les malades qui présentaient une hypersensibilité ont dû subir une injection hebdomadaire. Le nombre de patients présentant une déplétion complète en asparagine a été comparé à l'état des malades naïfs vis-à-vis de l'asparaginase, exposés et non-hypersensibles ou exposés hypersensibles.<sup>33</sup>

**Tableau 4 : Nombre de patients présentant une déplétion continue en L-asparagine après l'injection de pegaspargase :<sup>33</sup>**

	Groupe de patients					
	Patients naïfs		Patients exposés non-hypersensibles		Patients exposés hypersensibles	
<b>Administration</b>	A 7 jours	A 14 jours	A 7 jours	A 14 jours	A 7 jours	A 14 jours
<b>Tous les 14 J</b>	6/6 (100%)	6/6 (100%)	31/33 (94%)	28/33 (85%)	22/25 (88%)	9/17(57%)
<b>Tous les 7 J</b>	/	/	/	/	12/13 (92%)	/

## II.4. Conséquence de la présence d'anticorps anti-asparaginase et/ou d'une hypersensibilité clinique sur le devenir des patients

Récemment des études ont été menées pour déterminer si la présence d'anticorps, associées ou non à des réactions cliniques d'hypersensibilité pouvait influencer les taux de rémission ou de rechute. En effet, comme l'efficacité de l'enzyme diminue à cause de la présence d'anticorps, on peut supposer que le devenir du patient est compromis.

Une étude a été rapportée par Woo et al en 2000 : elle visait à comparer les taux de survie des patients recevant de l'*E. coli* qui présentaient des anticorps anti-asparaginase ou des réactions cliniques avec les patients qui n'en présentaient pas. Cent cinquante-quatre patients ont été étudiés pendant les phases d'induction et d'intensifications. L'Erwinase<sup>o</sup> était utilisée pour remplacer l'*E. coli* asparaginase chez les patients présentant des réactions cliniques. Trente-cinq pour cent et demi des patients ont présenté des anticorps et 55,6% d'entre eux ont eu des réactions allergiques. Le taux de survie à 4 ans était de 83% +/- 6% chez les malades ayant des anticorps et 76% +/- 5% chez les autres. De même il était de 82% +/- 6% chez les patients ayant développés des allergies et de 78% +/- 5% chez les autres. On constate donc que le taux de survie n'est pas modifié par la présence d'anticorps ou par l'apparition de réactions d'hypersensibilité clinique. Cela s'explique par le fait que toutes les réactions importantes nécessitent l'arrêt des injections d'*E. coli* asparaginase et la poursuite du traitement par l'Erwinase<sup>o</sup>.<sup>91</sup>

Ces diminutions de l'activité de l'enzyme, quelle que soit sa forme, provoquées par la présence élevée d'anticorps induisent des diminutions de taux de rémission chez les patients atteints de LAL.

En ce qui concerne le risque de rechute, Klug Albertsen et al ont montré en 2002 lors d'une étude qui portait sur des enfants en rechute de LAL et ayant reçu de l'Erwinase<sup>o</sup>, que le développement d'anticorps anti-asparaginase était indépendant du risque de rechute.<sup>47</sup>

Il apparaît donc clairement que la présence d'anticorps ou que la survenue de réactions d'hypersensibilité clinique n'entraînent aucune conséquence sur le devenir des

patients à conditions que tous les moyens soient mis en oeuvre afin de limiter les réactions allergiques et de remplacer une forme de l'enzyme, devenue immunogène et moins efficace, par une autre.

### III. PERTURBATIONS HEPATIQUES

Le foie est un organe dont le rôle est très important car il participe à de nombreuses fonctions dans l'organisme. Il synthétise la plupart des protéines sanguines ; il participe aux métabolisations et aux éliminations. Lorsque le foie ne fonctionne plus correctement, de nombreux paramètres sont perturbés avec l'apparition des symptômes associés. Ces perturbations au niveau des facteurs biologiques hépatiques sont présents chez la majorité des patients traités par l'asparaginase. Ces pourcentages de patients présentant des dysfonctionnements hépatiques sont variables dans la littérature. Cela s'explique certainement par les traitements associés qui sont eux aussi souvent hépatotoxiques et qui diffèrent selon les différents protocoles de traitement.

Les perturbations les plus fréquentes et directement liées au dysfonctionnement hépatique sont des diminutions sériques du fibrinogène et de l'albumine, deux protéines synthétisées par le foie. L'hypoalbuminémie peut être associée à des oedèmes périphériques.<sup>68</sup> Ces diminutions sont présentes chez 20 à 30 % des patients traités par l'asparaginase. Les concentrations sériques des enzymes du foie sont aussi modifiées : Les concentrations en ASAT (Aspartate Amino Transférase) et en ALAT (Alanine Amino Transférase), reflet de la cytolysse hépatique, augmentent tout comme la bilirubinémie. Généralement, on assiste à un retour à la normale 2 semaines environ après l'arrêt du traitement.<sup>74</sup>

En ce qui concerne le taux de cholestérol, l'asparaginase a été suspectée de l'augmenter ou de le diminuer, sans que de réelles études n'appuient l'une ou l'autre de ces 2 théories. Une étude rapportée en 1997 a, quant à elle, montré que l'asparaginase n'avait pas d'influence sur le taux de cholestérol : en effet, les taux avant et après l'injection d'asparaginase n'étaient pas modifiés. Le plus souvent, les taux élevés de cholestérol seraient dus au traitement par corticoïdes.<sup>72</sup>

#### IV. TROUBLES DE L'HEMOSTASE

Les troubles de l'hémostase sont principalement dues à la maladie elle-même et/ou aux traitements antileucémiques qui comportent beaucoup de médicaments ayant une certaine toxicité vis-à-vis des acteurs de l'hémostase. L'asparaginase en fait partie, elle engendre des dysfonctionnements au niveau du foie où a lieu la synthèse des protéines qui participent au phénomène de coagulation. On observe une diminution des concentrations sériques en facteurs II, VII, IX, X et du fibrinogène qui permettent la coagulation, du plasminogène qui intervient dans la fibrinolyse, de l'antithrombine III (AT III), ainsi que celles des protéines C et S qui contribuent à l'inhibition de la coagulation. De plus, on observe une augmentation de la thrombine. Il existe aussi des perturbations au niveau du temps de prothrombine et du temps de céphaline activé : tous 2 sont allongés.<sup>18, 36, 61, 65, 67</sup> Ces variations ne surviennent pas au même moment du traitement par l'asparaginase : c'est pourquoi on observe soit des thromboses ou des hémorragies.<sup>74</sup>

Les thromboses ou les hémorragies intracrâniennes avec des symptômes tels que céphalées, perturbations mentales, hémiparésies, voir coma sont les plus fréquentes, cependant on observe aussi des thromboses des extrémités avec des signes cliniques de douleurs locales, de gonflements et de décolorations de la peau. Ces complications sont observées chez 1 à 2% des enfants traités par l'asparaginase.<sup>74</sup>

Une étude prospective récente menée sur 127 enfants traités par l'asparaginase a montré que les hémorragies ou les thromboses sévères n'étaient pas aussi fréquentes que les variations importantes des paramètres de l'hémostase. Cette étude, parmi d'autre, a aussi montré que l'injection de plasma frais congelé, afin d'éviter ou de traiter les troubles de l'hémostase ne présentait pas d'intérêt.<sup>39, 42, 66</sup> Concernant l'administration d'AT III pour prévenir les événements thromboemboliques, son utilisation reste controversée. En effet, les derniers essais ont conclu à une certaine sûreté et efficacité mais sans que les résultats obtenus ne le démontrent clairement. C'est pourquoi, d'autres essais cliniques doivent être menés pour confirmer ces résultats.<sup>60</sup>

## V. ATTEINTES PANCREATIQUES

### V.1. La pancréatite

Le pancréas est lui aussi un organe touché suite à un traitement contenant de l'asparaginase. On observe l'apparition d'une pancréatite chez 4 à 7% des patients en moyenne, mais cela peut aller jusqu'à 15% d'après certaines études. Deux à cinq pour cent de ces pancréatites imposent l'interruption du traitement par l'asparaginase car le pronostic vital est menacé.<sup>23, 72</sup> Elles sont généralement accompagnées d'une hyperamylasémie, observée chez 10% des patients. Cependant, les malades atteints de pancréatites chylomicrons induites, conséquences des injections d'asparaginase, peuvent ne présenter aucune variation de leur concentration sérique en amylase. C'est pourquoi il faut faire attention aux signes cliniques d'anorexie, de nausées, de vomissements et de douleurs abdominales, seuls reflet de l'atteint pancréatique.<sup>72</sup> On a aussi observé des pancréatites fulminantes et fatales, qui heureusement restent exceptionnelles.<sup>40, 70, 77</sup>

### V.2. Perturbations des sécrétions pancréatiques

Les sécrétions d'insuline, issues des cellules endocrines du pancréas, et celles des enzymes digestives, produites par les cellules exocrines, sont modifiées par les injections d'asparaginase. On peut observer une augmentation de l'amylase et de la lipase sériques.<sup>7</sup>

Un diabète peut découler de la diminution de l'insuline produite. Pui et al ont réalisé une étude rétrospective sur 421 enfants traités par la L-asparaginase et ils ont découvert que des hyperglycémies apparaissaient chez 9,7% des patients. De plus, ils ont observé que les enfants à partir de 10 ans et ceux ayant des antécédents familiaux de diabète étaient plus touchés que les autres. C'est pourquoi, un suivi est obligatoire, notamment par une détermination régulière la glycosurie.<sup>75</sup>

## VI. NEUROTOXICITE

La toxicité neurologique peut s'exprimer par des symptômes très variés, autant par leur intensité que par leur caractéristique. On peut observer une somnolence, des vertiges, des malaises, des céphalées, des confusions, une agitation, des hallucinations, des changements d'humeur, une paresthésie, une dépression voir même un coma. Ces effets secondaires disparaissent rapidement à l'arrêt du traitement.<sup>68, 69, 70, 88</sup>

Cette toxicité peut être directement due au mécanisme d'action de l'asparaginase qui entraîne une augmentation de l'acide L-aspartique, une diminution de la L-asparagine et de la L-glutamine dans le cerveau et une augmentation du taux d'ammoniac sérique produit lors de la dégradation de l'asparagine. Ces trois phénomènes sont potentiellement neurotoxiques.<sup>73</sup>

## VII. TOXICITE GASTRO-INTESTINALE

Comme pour la majorité des médicaments anticancéreux, l'asparaginase provoque des effets secondaires, qui ne sont pas spécifiques tels que nausées, vomissements et anorexie.

**QUATRIEME PARTIE :**

**RAPPORT BENEFICE RISQUE DES TROIS  
FORMES**

## I. PROTOCOLE D'ADMINISTRATION DES FORMES

### I.1. Schéma d'administration de l'*E. coli* et de l'*Erwinia* asparaginase

Actuellement, l'administration de l'*E. coli* et de l'*Erwinia* asparaginase est réalisée par voie intramusculaire à la dose de 10000 UI/m<sup>2</sup> chez l'enfant. Les injections se font tous les jours pendant 6 à 21 jours lors du traitement d'attaque, 1 ou 2 fois par semaine lors du traitement d'entretien et tous les jours pendant 5 à 15 jours. Les injections intraveineuses sont possibles. Cependant, Nesbit en 1979 et aussi l'expérience clinique ont démontré que ce type d'administration entraînait plus de réactions allergiques que les injections intramusculaires, bien qu'avec ces dernières 6 à 18 % des enfants développeront des réactions allergiques. De plus, l'administration IM n'entraîne aucune diminution de l'efficacité de l'enzyme. Ce sont les raisons pour lesquelles actuellement, les injections intramusculaires sont préférées chez les enfants atteints de LAL.<sup>32, 63</sup>

Il n'y a aucune différence entre les fréquences d'administration de l'*E. coli* et de l'*Erwinia* asparaginase, bien que la demi-vie sérique de l'Erwinase<sup>o</sup> soit plus courte que celle de la forme native de l'enzyme et que la durée de déplétion de l'asparagine soit en rapport avec cette différence.<sup>13</sup> Une étude rapportée en 2001 a comparé la biodisponibilité et l'activité enzymatique de l'Erwinase<sup>o</sup> par rapport à l'*E. coli* asparaginase chez 27 enfants nouvellement diagnostiqués LAL randomisés pour recevoir l'une ou l'autre formes de l'enzymes en IM à la dose de 30000 UI/m<sup>2</sup>. Les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant pour les phases d'induction et de réinduction :

	<i>E. coli</i> asparaginase	Erwinase <sup>o</sup>
<b>Biodisponibilité moyenne</b>	45%	27%
<b>Activité enzymatique moyenne pendant l'induction</b>	272 UI/l	1748 UI/l

<b>Activité enzymatique moyenne pendant la réinduction</b>	147 UI/l	83 UI/l
--	----------	---------

La conclusion que l'on peut tirer de cette étude est la suivante : une quantité trop importante d'Erwinase<sup>o</sup> est administrée pendant la phase d'induction et pas assez lors de la réinduction tandis que l'*E. coli* asparaginase suffit dans les 2 phases.

Une autre étude a d'ailleurs mis en évidence ce point en proposant d'augmenter les doses d'Erwinase<sup>o</sup> tout en diminuant l'intervalle des injections ce qui aurait pour conséquence l'obtention d'une pharmacodynamie équivalente à celle de l'*E. Coli* asparaginase.<sup>85</sup> Se pose alors le problème de la toxicité qui pourrait augmenter en parallèle.

Ces injections d'Erwinase<sup>o</sup> sont basées uniquement sur celles de la première forme de l'enzyme et non sur ses propriétés pharmacocinétiques. Il faut donc réadapter les administrations pour obtenir des réponses optimales en pratique, sans pour autant voir apparaître plus d'effets secondaires.

## I.2. Schéma d'administration de la pegaspargase

Etant donnée la demi-vie plus longue de la pegaspargase par rapport aux 2 autres formes de l'enzyme, elle est administrée à la dose de 2500 UI/m<sup>2</sup> seulement, toutes les 2 semaines et par voie IM uniquement. Des études ont évalué d'autres protocoles d'administration pour la phase de réinduction, suite à une rechute de LAL. En 1995, une étude du Pediatric Oncology Group #9310 a comparé une injection de pegaspargase hebdomadaire à une injection toutes les deux semaines en combinaison avec la prednisone, la vincristine, la doxorubicine et une triple thérapie en intrathécale pour le traitement de réinduction chez les malades atteints de LAL.<sup>1</sup> Les taux de rémission sont plus élevés lorsque les injections sont hebdomadaires (cf. tableau suivant). De plus, les effets secondaires directement liés à la pegaspargase n'ont été ni plus importants ni plus fréquents dans le bras des patients recevant des doses hebdomadaires par rapport aux autres.

### Taux de rémission dans les rechutes de la LAL de l'enfant :

Administration de pegaspargase	Taux de rémission
Hebdomadaire	97%
Toutes les 2 semaines	82%
Dans les 2 cas	87%

Cette amélioration des taux de rémission est en relation directe avec les concentrations sériques plus élevées de l'enzyme dans le cadre d'une administration hebdomadaire. La déplétion en asparagine est donc plus importante et de ce fait l'élimination des cellules leucémiques l'est aussi.

## II. IMMUNOGENICITE DES TROIS FORMES

### II.1. *E. coli* asparaginase

L'*E. coli* asparaginase est sans aucun doute la forme de l'enzyme la plus immunogène. L'incidence des réactions d'hypersensibilité varie de 0 à 45%. Les injections intraveineuses sont les plus immunogènes et provoquent des réactions chez 4 à 45% des patients tandis que les injections intramusculaires en provoquent chez 0 à 25% d'entre eux. Les pourcentages de patients présentant des réactions allergiques sont très différents selon les études car ils dépendent beaucoup des traitements immunosuppresseifs associés tel que l'injection de corticoïdes. Les réactions apparaissent généralement au bout de la 10<sup>ème</sup> dose mais elles peuvent parfois survenir bien plus tôt.<sup>90, 19</sup> Une étude du POG (#8602) a étudié les réactions allergiques provoquées par l'*E. coli* asparaginase chez des enfants nouvellement diagnostiqués LAL. L'asparaginase a été administrée pendant 2 semaines lors de la phase d'induction, puis, après un arrêt de 3 semaines, les injections ont été réalisées toutes les semaines à la dose de 10000 UI/m<sup>2</sup> pendant 20 semaines lors de la phase de consolidation. Deux pour cent des malades ont présenté des réactions allergiques provoquées par

l'asparaginase lors de la phase d'induction contre 78% pendant la phase de consolidation.<sup>8</sup>

Les réactions peuvent être locales, locales et systémiques ou le plus souvent systémiques uniquement. Généralement, on observe un mélange de symptômes au moment de la réaction. Au site d'injection, on peut observer des manifestations locales telles qu'un érythème, une boursouffure, une urticaire ( réaction la plus fréquente), une éruption et un prurit anal. Les manifestations systémiques incluent une urticaire, un prurit, une éruption, une tachypnée, une difficulté respiratoire, une tachycardie et un manque de souffle.<sup>19</sup>

## II.2. Erwinase

Les réactions provoquées par l'*Erwinia* asparaginase sont sensiblement les mêmes que pour l'*E. coli* asparaginase. Généralement, elles apparaissent dans les 11 premières injections. L'incidence des réactions allergiques sévères dues à l'Erwinase<sup>o</sup> est d'environ 2% chez les enfants n'ayant jamais été exposés à l'une des formes d'asparaginase et elle augmente d'environ 18 à 23% chez les enfants avec des antécédents d'allergie provoqués par l'E. coli asparaginase pendant la phase initiale d'induction.<sup>19, 29, 56</sup>

On observe des réactions locales limitées, telles qu'un érythème, une boursouffure au site d'injection ainsi que des réactions systémiques incluant une urticaire (réaction la plus fréquente), une tachypnée, une respiration pénible, un manque de souffle, un prurit et une tachycardie.<sup>19</sup>

## II.3. Pegaspargase

La liaison du polyéthylène glycol à l'asparaginase n'enlève en rien son activité enzymatique, mais diminue son immunogénicité.<sup>3, 71</sup> La pegaspargase peut ainsi être administrée chez des enfants atteints de LAL ayant eu ou non des réactions d'hypersensibilité antérieures avec les 2 premières formes d'asparaginase.<sup>35</sup>

## II.4. Recommandations pour la poursuite du traitement

### II.4.1. La prémédication

Dans les cas d'allergies modérées, de grade 1 ou 2, provoquées par l'asparaginase, il y a une possibilité de prémédication par de la diphenhydramine et/ou par des corticostéroïdes qui limitent ces réactions et permettent ainsi la poursuite du traitement. Malheureusement la clairance du médicament est significativement diminuée.<sup>19, 90</sup>

Une étude réalisée sur 22 patients atteints de LAL et traités initialement par l'*E. coli* asparaginase a montré que la poursuite du traitement était possible grâce à la prémédication. Parmi ceux-ci, 50 % environ (n=12) ont pu continuer à recevoir l'*E. coli* asparaginase. Malheureusement, des réactions allergiques trop importantes pour être contenues par la prémédication ont contraint l'arrêt des injections de la forme native de l'enzyme. Finalement, dans la majorité des cas, la prémédication n'empêche cependant pas le développement de réactions allergiques et il semble donc que la meilleure solution, suite à la survenue de telles réactions, soit le remplacement de la forme de l'enzyme par une autre, d'autant plus que l'efficacité de l'enzyme est diminuée dans ce cas de figure.<sup>90</sup>

### II.4.2. Remplacement d'une forme par une autre

Etant donné que l'asparaginase est un agent anti-leucémique efficace, il apparaît intéressant de pouvoir continuer son administration même lorsque la prémédication devient insuffisante pour contenir les réactions d'hypersensibilité ou lorsque celles-ci sont de grade III ou IV et mettent en danger le pronostic vital des patients. Il est possible actuellement, grâce aux trois formes disponibles de l'enzyme, de remplacer l'une d'elles par une autre si nécessaire. L'*E. coli* asparaginase peut être remplacée par l'Erwinase<sup>o</sup> car l'enzyme issue d'*Erwinia carotovora* ne présente aucune réaction croisée avec la forme native.<sup>13, 19, 86</sup> Cependant, il faut préciser que 25% des malades ayant développés des réactions d'hypersensibilité à L'*E. coli* asparaginase réagissent finalement à l'*Erwinia* asparaginase.<sup>54, 90</sup> De plus, on ne peut pas prédire les réactions provoquées par l'Erwinase<sup>o</sup> en fonction de celles observées précédemment avec

l'*E. coli* asparaginase. Ainsi une étude a montré que trois malades ayant réagi à l'*E. coli* asparaginase après plus de 15 doses ne pouvaient seulement tolérer que quelques doses d'*Erwinia* asparaginase. Au contraire, trois malades qui avaient réagi à la troisième ou à la cinquième dose d'*E. coli* asparaginase ont toléré 6 à 14 doses ultérieures d'*Erwinia* asparaginase.<sup>19</sup>

Lorsque l'Erwinase<sup>o</sup> ne peut plus être utilisée à cause des effets secondaires qu'elle provoque ou lorsqu'elle devient inefficace, on a alors la possibilité de remplacer cette forme par la pegaspargase qui possède une immunogénicité réduite.

Les résultats d'une étude menée de 1988 à 1992 par le POG #8866 et #9310 ont montré que la PEG-ASP pouvait être donnée avec sûreté à une majorité de patients ayant des antécédents de réactions d'hypersensibilité provoquées soit par l'*E. coli* ASP et/ou à l'Erwinase<sup>o</sup>. Cela permet donc la poursuite du traitement par l'asparaginase comme partie intégrante de la chimiothérapie. Soixante-quatorze enfants atteints de LAL ont été étudiés dans cette étude. Ils ont reçu de la L-asparaginase native en première intention. Trente-cinq d'entre eux ont été randomisés pour recevoir soit la pegaspargase (2500 UI/m<sup>2</sup> en IM tous les 15 jours ) soit l'*E. coli* asparaginase (10000 UI/m<sup>2</sup> en IM 3 fois par semaine) en association avec un régime standard d'induction. Les 39 autres patients avec des antécédents d'hypersensibilité à l'asparaginase ont directement été assignés au traitement par la pegaspargase. Le taux de rémission complète était de 40% dans les trois groupes. Deux patients précédemment non allergiques à l'asparaginase ont du changer de groupe, passant du traitement par l'*E. coli* asparaginase à celui de la pegaspargase. Ils ont par la suite atteint la rémission complète. Les réactions secondaires non allergiques étaient similaires entre les trois groupes.<sup>50</sup>

### III. COMPARAISON ENTRE L'*E. COLI* ET L'*ERWINIA* ASPARAGINASES

#### III.1. Toxicité

Une étude menée dans 28 centres de pédiatrie en Belgique, en France et au Portugal a comparé les différentes toxicités provoquées par l'*E. coli* et l'*Erwinia* asparaginase, aux doses de 10000 UI/m<sup>2</sup> deux fois par semaine, chez des enfants d'âge médian de 6,9 ans atteints de LAL ou de lymphome. Les résultats montrent que l'*E. coli* asparaginase est plus toxique que l'*Erwinase*<sup>o</sup> parce qu'elle induit plus de troubles de la coagulation, de neurotoxicité et de convulsions. Les fréquences de neurotoxicité de grade III ou IV (2,5 %) et de convulsions (1,7 %) restent tout de même modérées en comparaison aux taux de rechute et de mortalité.<sup>31</sup>

En ce qui concerne la toxicité hépatique, la survenue d'un diabète insulino-dépendant, de pancréatite et d'infections sévères, il n'y a aucune différence significative entre les deux formes de l'enzyme. Il en va de même pour les allergies dont l'incidence des grades III et IV reste basse (environ 2,5 %).<sup>31</sup>

Les réactions secondaires sont rassemblées dans le tableau suivant :<sup>31</sup>

	<b><i>E coli</i> asparaginase Nombre. (%) de patients sur un total de 354 (100%)</b>	<b><i>Erwinia</i> asparaginase Nombre. (%) de patients sur un total de 346 (100%)</b>
<b>Allergie</b>	9 (2.5)	9 (2.6)
<b>Troubles de la coagulation</b>	107 (30.2)	41 (11.8)
<b>Neurotoxicité</b>	9 (2.5)	5 (1.4)
<b>Convulsions</b>	6 (1.7)	1 (0.3)
<b>Pancréatite</b>	1 (0.3)	3 (0.9)
<b>Diabète insulino-dépendant</b>	5 (1.4)	2 (0.6)
<b>Toxicité hépatique</b>	16 (4.5)	13 (3.8)
<b>Infection</b>	18 (5.1)	16 (4.6)
<b>Décès</b>	1 (0.3)	2 (0.6)

### III.2. Efficacité

Le même essai, décrit précédemment, a aussi évalué l'efficacité des deux formes d'asparaginases dans le traitement de leucémies ou de lymphomes. Quatre malades atteints de leucémie (1,2%) n'ont pas pu atteindre la rémission complète à l'achèvement du protocole dans le bras de l'*E. coli* asparaginase contre douze (3,8%) dans le bras de l'*Erwinia* asparaginase. Le taux de rechute était approximativement 1,5 fois plus élevé dans le bras de l'*Erwinia* asparaginase, sans tenir compte du site, chez les patients atteints de leucémie. Les taux de mortalité en rémission complète étaient similaires : 11 patients (3,2%) contre 8 (2,4%). La survie était plus courte dans le bras de l'*Erwinia* asparaginase (59,8%) que dans celui de l'*E. coli* asparaginase (73,4%).<sup>31</sup>

L'efficacité clinique de l'*E. coli* asparaginase est donc supérieure à celle de l'*Erwinia* asparaginase à la posologie de 10000 UI/m<sup>2</sup>. De plus le type d'asparaginase affecte non seulement la réponse précoce au traitement mais aussi le risque de rechute, et la survie. Cette différence d'efficacité s'explique en partie par des propriétés pharmacocinétiques variables selon les deux formes : une demi-vie significativement plus courte de l'*Erwinia*, 0,65 contre 1,24 jours pour l'*E. coli* asparaginase<sup>13</sup>, une déplétion en asparagine pendant la réinduction atteinte chez 26% des patients recevant l'Erwinase<sup>o</sup> contre 90% recevant l'*E. coli* asparaginase, et un temps de rétablissement des niveaux sériques d'asparagine de 4 jours pour l'Erwinase<sup>o</sup> contre 11 jours pour l'*E. coli* asparaginase.<sup>20</sup>

Pour effacer ces différences, une étude suggère que l'augmentation de la dose et la réduction de l'intervalle de temps entre les administrations d'*Erwinia* asparaginase aient pour résultat une pharmacocinétique similaire.<sup>85</sup> Mais cela ne prouve en rien que les résultats sur l'issue clinique soient comparables.

### III.3. Conclusion

Il n'y pas de différence majeure d'efficacité ou de toxicité entre l'*E. coli* asparaginase et l'Erwinase<sup>o</sup>. La toxicité est légèrement plus importante pour la forme native mais son efficacité est plus grande que celle de l'Erwinase<sup>o</sup> aux mêmes doses d'utilisation. Cela semble être dû à la demi-vie plus longue de

l'*E. coli* asparaginase. Cette différence pourrait être « gommée » par une augmentation de la fréquence d'administration et des doses d'Erwinase°, mais une étude doit être menée pour valider le meilleur protocole.

L'Erwinase est donc réservée aux malades présentant des phénomènes d'immunogénicité, apparente ou non, provoqués par la première forme de l'enzyme. Ce remplacement est très important car il permet la continuité du traitement sans pour autant modifier l'issue clinique des malades.

#### IV. COMPARAISON ENTRE L'*E. COLI* ASPARAGINASE ET LA PEGASPARGASE

##### IV.1. Toxicité

De nombreux essais cliniques ont montré que l'incidence et le type d'événements toxiques sont très similaires entre la pegaspargase et l'*E. coli* asparaginase.<sup>10, 14, 34</sup> Mais il existe tout de même des différences entre les deux formes.

La toxicité la plus fréquente de la pegaspargase et de L'*E. coli* asparaginase est la coagulopathie. Elle concerne, pour les deux types d'asparaginase, les mêmes modifications : une diminution de l'AT III, des facteurs de la coagulation, du fibrinogène, du plasminogène, des protéines C et S.<sup>1, 35</sup> Une différence subsiste entre les deux formes de l'enzyme : la fréquence de thromboses et d'hémorragies reste rare (1 à 2%) avec l'utilisation de la pegaspargase.<sup>36</sup>

Les réactions d'hypersensibilité sont retrouvées chez 21% des patients traités par la PEG. Cette fréquence est inférieure à celle observée avec l'enzyme native (jusqu'à 35%). On a aussi démontré qu'il n'y avait pas de relation entre les réactions allergiques provoquées par les deux formes de l'enzyme non modifiée et celles de la PEG. Les réactions cliniques sont du même type pour les deux formes, c'est-à-dire une urticaire, des boursouffures et des éruptions cutanées.<sup>22, 36</sup>

L'hépatotoxicité est aussi fréquente chez les patients traités par la PEG que par l'*E. coli* asparaginase. Chez les malades traités par la PEG, elle est le plus souvent accompagnée d'une hyperbilirubinémie (50%) et moins souvent d'une augmentation des transaminases (21%) et d'une hypoalbuminémie (7%). L'hépatotoxicité significative semble beaucoup moins fréquente avec l'utilisation de la PEG.<sup>36</sup>

Les pancréatites sont présentes chez environ 7% des patients traités par la PEG avec les signes cliniques classiques de cette atteinte : nausées, vomissements et anorexie. Les signes biologiques sont modifiés avec une augmentation de la lipase et de l'amylase sérique.<sup>1, 10, 36, 38</sup> Les pancréatites induites par l'utilisation de l'*E. coli* asparaginase sont quant à elles observées chez 16% des patients soit plus du double qu'avec la pegaspargase.<sup>22</sup>

L'hyperglycémie directement liée au dysfonctionnement pancréatique et à la diminution de la production d'insuline semble plus fréquente chez les malades traités par la PEG. On atteint 71% avec la pegaspargase contre 9,7% maximum observés dans une étude rapportée par Pui et Al portant sur l'utilisation de l'*E. coli* asparaginase. L'hypothèse avancée est la plus longue demi-vie de la PEG qui pourrait entraîner une baisse plus durable de l'insulinémie et de ce fait, une augmentation de la glycémie.<sup>36, 75</sup>

## IV.2. Efficacité

L'efficacité équivalente d'une administration unique d'*E. coli* asparaginase et de la pegaspargase a été démontrée in vivo et in vitro.<sup>11</sup> Dans le cadre d'un traitement comprenant plusieurs injections d'asparaginase, le fait que la demi-vie de la PEG soit environ 5 fois supérieure à celle de l'enzyme native n'a pas d'incidence puisque la fréquence de ses injections est adaptée : on passe de trois injections par semaine pour l'*E. coli* asparaginase à une administration toutes les deux semaines pour la PEG.

Par contre, l'efficacité n'est plus comparable quand les patients présentent des taux élevés d'anticorps anti-asparaginase. En effet, chez les malades traités par l'*E. coli* asparaginase et qui ont des concentrations sériques élevées en anticorps, on observe une diminution de l'efficacité de l'enzyme sans pour autant que des signes cliniques d'allergie soient toujours présents. L'apparition d'anticorps provoquée par le caractère protéique de l'asparaginase n'est pas la même pour les deux formes de l'enzyme. On a

observé dans une étude du CCG que le pourcentage de patients ayant des anticorps anti-asparaginase était plus important dans le bras de l'enzyme native que dans celui de la pegaspargase et cela aux trois phases d'induction, de première et de deuxième intention. On remarque que l'activité de l'*E. coli* asparaginase diminue avec ces pourcentages élevés en mesurant la déplétion en asparagine, qui devient alors insuffisante. De plus, les anticorps ne semblent pas neutraliser la pegaspargase ou augmenter sa clairance lorsque celle-ci est administrée à des patients n'ayant jamais reçu d'asparaginase contrairement à ce qui est observé avec l'enzyme native (voir tableau 1). Deux hypothèses peuvent être avancées : soit il y a moins d'interactions entre les anticorps et pegaspargase dans le sérum des patients, soit la fixation anticorps-PEG a lieu loin du site d'action de l'enzyme.<sup>14</sup>

**Tableau 1 : Fraction des échantillons ayant une activité asparaginasique supérieure à 0,1 UI/mL :**

	<b>Coefficient</b>	<b>Induction</b>	<b>Intensification 1</b>	<b>Intensification 2</b>
<b>Asparaginase native</b>	Inférieur à 1,5	79/89 (89%)	54/58 (93%)	55/59 (93%)
	Entre 1,5 et 2	3/3 (100%)	4/8 (50%)	6/7 (86%)
	Supérieur à 2	5/8 (63%)	10/20 (50%)	7/11 (64%)
<b>Pegaspargase</b>	Inférieur à 1,5	95/98 (97%)	67/69 (97%)	63/65 (95%)
	Entre 1,5 et 2	0/0	5/5 (100%)	5/5 (100%)
	Supérieur à 2	3/3 (100%)	2/2 (100%)	9/9 (100%)

Les coefficients sont obtenus par rapports à des contrôles négatifs.

On a aussi observé dans cette étude que la clairance des lymphoblastes était plus rapide avec la PEG qu'avec l'*E. coli* asparaginase.

La pegaspargase est donc aussi efficace que l'enzyme native. Contrairement à l'*E. coli* asparaginase, elle est même plus active, dans certaines conditions de

concentrations élevées d'anticorps anti-asparaginase, et permet une déplétion adéquate en asparagine.

### IV.3. Conclusion

Les différences majeures entre la pegaspargase et l'*E. coli* asparaginase résident au niveau de leur demi-vie et de leur pouvoir immunogène. L'enzyme native provoque des réactions allergiques avec une incidence élevée, ce qui représente le problème majeur pour la continuité du traitement. L'avantage de la PEG est que les réactions allergiques qu'elle provoque ne sont pas en relation avec celles de la forme native ; donc le traitement par l'asparaginase peut être poursuivi en cas d'allergie sévère à la forme native. Un autre avantage de la PEG est sa demi-vie 5 fois plus longue que l'*E. coli* asparaginase dont la demi-vie est d'environ un jour ce qui oblige à une fréquence d'administration de 3 fois par semaine alors que la PEG ne nécessite qu'une seule injection toutes les 2 semaines, ce qui améliore la qualité de vie des patients. Ces arguments en faveur de la PEG pourraient inciter son utilisation en première intention à la place de l'*E. coli* asparaginase, mais cette forme doit rester une forme de secours dans le cas où les 2 formes non modifiées de l'enzyme provoqueraient trop d'effets secondaires ou ne seraient plus assez efficaces.

## **CONCLUSION**

L'asparaginase est devenue un constituant majeur du traitement des leucémies aiguës lymphoblastique de l'enfant. Elle a non seulement une très grande efficacité et permet d'obtenir des taux de rémission supérieurs. De plus elle possède une toxicité limitée par rapport aux autres traitements antileucémiques. Elle est peu myélosuppressive et ne présente pas de réactions croisées avec les autres médicaments utilisés dans les différents protocoles.

Un autre avantage de cette enzyme est qu'il existe sous trois formes d'efficacité et de toxicités très similaires. Cela permet de changer d'une forme pour une autre lorsque l'asparaginase provoque trop d'effets secondaires ou qu'elle n'est plus assez efficace pour obtenir une déplétion adéquate en asparagine.

L'*E. coli* asparaginase a considérablement augmenté les chances de guérison des malades mais on s'est rendu compte avec son développement qu'il entraînait souvent des effets secondaires tels que les réactions d'hypersensibilité qui ne permettaient de poursuivre le traitement. L'Erwinase<sup>o</sup> a permis dans un deuxième temps de pouvoir continuer les injections étant donné qu'elle ne présentait pas systématiquement de réactions croisées avec la première forme de l'enzyme. L'Erwinase a donné de plus mauvais résultat que l'*E. coli* asparaginase en terme d'efficacité mais cela semble être dû à des fréquences et des doses d'administration calquées sur celle de l'enzyme native qui ne conviennent pas.

Les effets secondaires observés avec l'Erwinase<sup>o</sup> sont les mêmes qu'avec la première forme de l'enzyme et les praticiens se sont retrouvés dans la même situation, ne pouvant continuer le traitement sans que le pronostic vital des patients ne soit menacé. Là encore une troisième forme de l'enzyme, la pegaspargase, enzyme modifiée de la première, a permis de poursuivre le traitement.

Cette dernière forme est sans doute la plus intéressante car sa demi-vie est beaucoup plus longue que les 2 premières et son caractère immunogène est faible. Elle reste tout de même une forme de substitution au cas où les 2 premières formes ne pourraient plus être utilisées.

Comme tout traitement le premier problème est d'avoir le plus de bénéfice tout en ayant le minimum de risque. Pour obtenir les meilleurs résultats pour le traitement

des LAL de l'enfant, il semble maintenant que des dosages systématiques de la déplétion en asparagine soient réalisés. De plus étant donné qu'une forme de l'asparaginase peut devenir inefficace chez les patients devenant répondeurs silencieux, sans qu'il n'y ait forcément de réactions cliniques, il devrait aussi y avoir des dosages des taux d'anticorps anti-asparaginase.

Des études doivent être conduites pour optimiser les fréquences et doses d'administration notamment pour l'Erwinase mais aussi pour obtenir des monitorages clinico-biologiques pour évaluer l'efficacité du traitement et en maîtriser le risque iatrogène.

## BIBLIOGRAPHIE :

1. Abshire T, Pollock B, Billett A, Bradley P, Buchanan G. Weekly polyethylene glycol conjugated (PEG) L-asparaginase (ASP) produces superior induction remission rates in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia (rALL): a Pediatric Oncology Group (POG) study 9310. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1995;14:344.
2. Abuchowski A, Davis F, Davis S. Immunosuppressive properties and circulating life of A chromobacter glutaminase-asparaginase covalently attached to polyethylene glycol in man. *Cancer Treat Rep* 1981;65:1077-91.
3. Abuchowski A, Kazo G, Verhoest C. Cancer therapy with chemical modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol L-asparaginase conjugates. *Cancer Biochem Biophys* 1984;7:175-186.
4. Abuchowski A, McCoy J, Palczuk N, van Es T, Davis F. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulation life of bovine liver catalase. *J Biol Chem* 1977;252:3582-86.
5. Abuchowski A, van Es T, Palczuk N, Davis F. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J Biol Chem* 1977;252:3578-81.
6. Abuchowski A, van Es T, Palczuk N, McCoy J, Davis F. Treatment of L5178Y tumor-bearing BDF1 mice with a nonimmunogenic L-glutaminase-L-asparaginase. *Cancer Treat Rep* 1979;67:1127-32.
7. Alvarez OA, Zimmerman G. Pegaspargase-induced pancreatitis. *Med Pediatr Oncol.* 2000 Mar;34(3):200-5.
8. Amylon M, Carroll A, Link M, Katz J, JJS. Second malignancies in children treated with teniposide (VM-26) for T-cell lymphoid malignancy: a role for asparaginase? (a Pediatric Oncology Group (POG) study). *Blood* 1992;80:206a.

9. Asselin BL. The three asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia. *Adv Exp Med Biol.* 1999;457:621-9.
10. Asselin BL, Gelber R, Sallan S: Relative toxicity of *E. coli* L-asparaginase (ASP) and pegaspargase (PEG) in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 1995;86:695a.
11. Asselin BL, Kreissman S, Coppola DJ, Bernal SD, Leavitt PR, Gelber RD, Sallan SE, Cohen HJ. Prognostic significance of early response to a single dose of asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1999 Jan-Feb. ;21(1):6-12.
12. Asselin BL, Lorenson My, Within JC, Coppola DJ, Kende AS, Blakley RL and Cohen HJ. Measurement of serum L-asparaginase in the presence of an L-asparaginase inhibitor. *Cancer Res* 1991, 51 : 6568-73.
13. Asselin BL, Whitin JC, Coppola DJ, Rupp IP, Sallan SE, Cohen HJ. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. *J Clin Oncol.* 1993 Sep;11(9):1780-6.
14. Avramis VI, Sencer S, Periclou AP, Sather H, Bostrom BC, Cohen LJ, Ettinger AG, Ettinger LJ, Franklin J, Gaynon PS, Hilden JM, Lange B, Majlessipour F, Mathew P, Needle M, Neglia J, Reaman G, Holcenberg JS, Stork L. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood.* 2002 Mar 15;99(6):1986-94.
15. Beard ME, Crowther D, Galton DA, Guyer RJ, Fairley GH, Kay HE, Knapton PJ, Malpas JS, Scott RB. L-asparaginase in treatment of acute leukaemia and lymphosarcoma. *Br Med J.* 1970 Jan 24;1(690):191-5.
16. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995 Oct;9(10):1783-6.

17. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galion DAG, Gralnick HR, Sultan C. The French-American-British (FAB) cooperative group. The morphological classification of acute lympho-blastic leukemia: Concordance among observers and clinical correlations. *Br J Hematol* 1981; 47: 553-61.
18. Bezeaud A, Drouet L, Leverger G, Griffin JH, Guillin MC. Effect of L-asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia on plasma vitamin K-dependent coagulation factors and inhibitors. *J Pediatr.* 1986 May;108:698-701.
19. Billett A, Carls A, Gelber R, Sallan S. Allergic reactions to Erwinia asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia who had previous allergic reactions to Escherichia coli asparaginase. *Cancer* 1992;70:201-6.
20. Boos J, Werber G, Ahlke E, Schulze-Westhoff P, Nowak-Gottl U, Wurthwein G, Verspohl EJ, Ritter J, Jurgens H. Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *Eur J Cancer.* 1996 Aug;32A(9):1544-50.
21. Broome J. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature* 1961;191:1114-15.
22. Cairo MS. Adverse reactions of L-asparaginase. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1982;4: 335-9.
23. Campbell H, Mashburn L. L-Asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*. Some substrate specificity characteristics. *Biochemistry* 1969;9:3768-75.
24. Capizzi RL, Bertino JR, Skeel RT, Creasey WA, Zanes R, Olayon C, Peterson RG, Handschumacher RE. L-asparaginase: clinical, biochemical, pharmacological, and immunological studies. *Ann Intern Med.* 1971 Jun;74(6):893-901.
25. Capizzi RL, Poole M, Cooper M. Treatment of poor risk acute leukemia with sequential high-dose ara-C and asparaginase. *Blood* 1984;63:694-700.

26. Chessells JM, Cornbleet M. Combination chemotherapy for bone marrow relapse in childhood lymphoblastic leukaemia (ALL). *Med Pediatr Oncol*. 1979;6(4):359-65.
27. Cheung N, Chau I, Coccia P. Antibody response to *Escherichia coli*. L-asparaginase. Prognostic significance and clinical utility of antibody measurement. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1986;8:99-104.
28. Clarkson B, Krakoff I, Burchenal J, Karnofsky D, Golbey R, Dowling M, Oettgen H, Lipton A. Clinical results of treatment with *E. coli* L-asparaginase in adults with leukemia, lymphoma, and solid tumors. *Cancer*. 1970 Feb;25(2):279-305.
29. Clavell LA, Gelber RD, Cohen HJ, Hitchcock-Bryan S, Cassady JR, Tarbell NJ, Blattner SR, Tantravahi R, Leavitt P, Sallan SE. Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1986 Sep 11;315(11):657-63.
30. Dolowy W, Henson D, Cornet J, Sellin H. Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase. *Cancer* 1966;19:1813-9.
31. Duval M, Suci S, Ferster A, Rialland X, Nelken B, Lutz P, Benoit Y, Robert A, Manel AM, Vilmer E, Otten J, Philippe N. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood*. 2002 Apr 15;99(8):2734-9.
32. Ertel I, Nesbit M, Hammond D, Weiner J, Sather H. Effective dose of Lasparaginase for induction of remission in previously treated children with acute lymphocytic leukemia: a report from Children's Cancer Study Group. *Cancer Res* 1979;39:3893-6.
33. Ettinger LJ, Asselin B, Poplack D, Kurtzberg J. Toxicity profile of PEG-L-asparaginase in native L-asparaginase-hypersensitive and non-hypersensitive patients (pts) with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Presented at International Society of Pediatric Oncology (SIOP) 25th Meeting, 1993.

34. Ettinger LJ, Ettinger AG, Avramis VI, Gaynon PS. Acute lymphoblastic leukemia - A guide to asparaginase and pegaspargase therapy. *Biodrugs* 1997; 7: 30-39.
35. Ettinger LJ, Kurtzberg J, Voute P, Jurgens H, Halpern SL. Open-label, multicenter study of polyethylene glycol-L-asparaginase for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1995 Mar;75:1176-81.
36. Ettinger LJ, Lerner ED, Manghani MV. Toxicity study of pegaspargase. *Indian Pediatr.* 2000 Jun;37(6):631-6.
37. Gahrton G, Engstedt L, Franzen S, Gullbring B, Holm G, Hoglund S, Killander A, Killander D, Lockner D, Mellstedt H, Palmblad J, Reizenstein P, Skarberg KO, Swedberg B, Uden AM. Induction of remission with L-Asparaginase, cyclophosphamide, cytosine arabinoside, and prednisolone in adult patients with acute leukemia. *Cancer.* 1974 Aug;34(2):472-9.
38. Graham ML, Asselin BL, Herndon JE 2nd, Casey JR, Chaffee S, Ciocci GH, Daeschner CW, Davis AR, Gold S, Halperin EC, Laughlin MJ, Martin PL, Olson JF, Kurtzberg J. Toxicity, pharmacology and feasibility of administration of PEG-L-asparaginase as consolidation therapy in patients undergoing bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1998 May;21(9):879-85.
39. Halton JM, Mitchell LG, Vegh P, Eves M, Andrew ME. Fresh frozen plasma has no beneficial effect on the hemostatic system in children receiving L-asparaginase. *Am J Hematol.* 1994 Nov;47(3):157-61.
40. Haskell CM, Canellos GP, Leventhal BG, Carbone PP, Block JB, Serpick AA, Selawry OS. L-asparaginase: therapeutic and toxic effects in patients with neoplastic disease. *N Engl J Med.* 1969 Nov 6;281(19):1028-34.
41. Herson J, Starling KA, Dymont PG, Humphrey GB, Pullen J, Vats T. Vincristine and prednisone vs vincristine, L-asparaginase, and prednisone for second remission induction of acute lymphocytic leukemia in children. *Med Pediatr Oncol.* 1979;6(4):317-23.

42. Hongo T, Okada S, Ohzeki T, Ohta H, Nishimura S, Hamamoto K, Yagi K, Misu H, Eguchi N, Suzuki N, Horibe K, Ueda K. Low plasma levels of hemostatic proteins during the induction phase in children with acute lymphoblastic leukemia: A retrospective study by the JACLS. Japan Association of Childhood Leukemia Study. *Pediatr Int.* 2002 Jun;44(3):293-9.
43. Jaffe N, Traggis D, Das L. Favorable remission induction rate with twice week doses of L-asparaginase. *Cancer Res* 1971;33:1-4.
44. Kidd J. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *J Exp Med* 1953;98:565-82.
45. Kidd J. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. II. Studies on the nature of the active serum constituent; histological mechanism of the regression; tests for effects of guinea pig serum on lymphoma cells, in vitro discussion. *J Exp Med* 1953;98:583-606.
46. Killander D, Dohlwitz A, Engstedt L, Franzen S, Gahrton G, Gullbring B, Holm G, Holmgren A, Hoglund S, Killander A, Lockner D, Mellstedt H, Moe PJ, Palmblad J, Reizenstein P, Skarberg KO, Swedberg B, Uden AM, Wadman B, Wide L, Ahstrom L. Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. *Cancer.* 1976 Jan;37(1):220-8.
47. Klug Albertsen B, Schmiegelow K, Schroder H, Carlsen NT, Rosthoj S, Avramis VI, Jakobsen P. Anti-*Erwinia* asparaginase antibodies during treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia and their relationship to outcome: a case-control study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002 Aug;50(2):117-20.
48. Korholz D, Wahn U, Jurgens H, Wahn V. [Allergic reactions in treatment with L-asparaginase. Significance of specific IgE antibodies] *Monatsschr Kinderheilkd.* 1990 Jan;138(1):23-5.

49. Kung FH, Nythan WL, Cuttner J, Falkson G, Lanzkowsky P, Del Duca V, Nawabi IU, Koch K, Pluess H, Freeman A, Burgert EO, Leone LA, Ruymann F, Patterson RB, Degnan T, Hakami N, Pajak TF, Holland J. Vincristine, prednisone and L-asparaginase in the induction of remission in children with acute lymphoblastic leukemia following relapse. *Cancer*. 1978 Feb;41(2):428-34.
50. Kurtzberg J. International multicenter study of PEG-L-asparaginase for reinduction therapy for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992;80:206a.
51. Kurtzberg J, Asselin B, Graham M, Fisherman J, et al. L-Asparaginase therapy in the 90's: new insights into pharmacology should guide future applications. *Proc Am Soc Pediatr Hematol Oncol* 1993;2:18-19.
52. Kurtzberg J, Asselin B, Poplack D, et al. Antibodies to asparaginase alter pharmacokinetics and decrease enzyme activity in patients on asparaginase therapy. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1993;34:304.
53. Kurtzberg J, Asselin B, Poplack D, et al. PEG-L-asparaginase (PEG-ASP) pharmacology in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1994;13:114.
54. Land V, Schuster J, Pullen J, et al. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1989;8:215.
55. Leventhal B, Henderson E. Therapy of acute leukemia with drug combinations which include asparaginase. *Cancer* 1971;28:825-29.
56. Liu Y-P, Chabner B. Enzyme therapy: L-asparaginase. In *Pharmacologic Principles of Cancer Treatment*. Chabner B, editor. Philadelphia: Saunders, 1982, 435.
57. Margolin JF, Poplack DG. Acute lymphoblastic leukemia. In: *Principles and practice of pediatric oncology / ed par Pizzo PA et Poplack DG (3ème édition)*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. 425-29.

58. Mashburn L, Wriston J. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys 1964;105:451.
59. Miller H, Slaser J, Balis M. Amino acid levels following L-asparaginase amidohydrolase (EC.3.5.1.1.) therapy. Cancer Res 1969;29:183-87.
60. Mitchell L, Andrew M, Hanna K, Abshire T, Halton J, Wu J, Anderson R, Cherrick I, Desai S, Mahoney D, McCusker P, Chait P, Abdolell M, de Veber G, Mikulis D. Trend to efficacy and safety using antithrombin concentrate in prevention of thrombosis in children receiving l-asparaginase for acute lymphoblastic leukemia. Results of the PAARKA study. Thromb Haemost. 2003 Aug;90(2):235-44.
61. Mitchell L, Hoogendoorn H, Giles AR, Vegh P, Andrew M: Increased endogenous thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukemia: Risk of thrombotic complications in L-asparaginase-induced antithrombin III deficiency. Blood 83:386, 1994.
62. Nachman J, Sather HN, Gaynon PS, Lukens JN, Wolff L, Trigg ME. Augmented Berlin-Frankfurt-Munster therapy abrogates the adverse prognostic significance of slow early response to induction chemotherapy for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia and unfavorable presenting features: a report from the Children's Cancer Group. J Clin Oncol. 1997 Jun;15(6):2222-30.
63. Nesbit M, Chard R, Evans A, Karon M, Hammond G. Evaluation of intramuscular versus intravenous administration of L-asparaginase in childhood leukemia. Am J Pediatr Hematol Oncol 1979;1:9-13.
64. Nesbit M, Ertel I, Hammond G. L-asparaginase as a single agent in acute lymphocytic leukemia: survey of studies from Children's Cancer Study Group. Cancer Treatment Reports 1981;65(Suppl 4):101-7.
65. Nowak-Gottl U, Ahlke E, Schulze-Westhoff P, Boos J. Changes in coagulation and fibrinolysis in childhood ALL: a two-step dose reduction of one *E. coli* asparaginase preparation. Br J Haematol. 1996 Oct;95(1):123-6.

66. Nowak-Gottl U, Rath B, Binder M, Hassel JU, Wolff J, Husemann S, Ritter J. Inefficacy of fresh frozen plasma in the treatment of L-asparaginase-induced coagulation factor deficiencies during ALL induction therapy. *Haematologica*. 1995 Sep-Oct;80(5):451-3.
67. Nowak-Gottl U, Werber G, Ziemann D, Ahlke E, Boos J. Influence of two different *Escherichia coli* asparaginase preparations on fibrinolytic proteins in childhood ALL. *Haematologica*. 1996 Mar-Apr;81(2):127-31.
68. Oettgen H, Stephenson P, Schwartz M, et al. Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man. *Cancer* 1979;25:253-78.
69. Ohnuma T, Holland J, Freeman A, Sinks L. Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man. *Cancer Res* 1970;30:2297-304.
70. Ohnuma T, Rosner F, Levy R, et al. Treatment of adult leukemia with Lasparaginase (NSC-109229). *Cancer Chemother Rep* 1971;55:269.
71. Park Y, Abuchowski A, Davis S. Pharmacology of *Escherichia coli*-L-asparaginase polyethylene glycol adduct. *Anticancer Res* 1981;1:373-75.
72. Parsons SK, Skapek SX, Neufeld EJ, Kuhlman C, Young ML, Donnelly M, Brunzell JD, Otvos JD, Sallan SE, Rifai N. Asparaginase-associated lipid abnormalities in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1997 Mar 15;89(6):1886-95.
73. Pochedly C. Neurotoxicity due to CNS therapy for leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1972;3:101-15.
74. Priest JR, Ramsay NK, Steinherz PG, Tubergen DG, Cairo MS, Sitarz AL, Bishop AJ, White L, Trigg ME, Levitt CJ, Cich JA, Coccia PF. A syndrome of thrombosis and hemorrhage complicating L-asparaginase therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr*. 1982 Jun;100(6):984-9.
75. Pui CH, Burghen GA, Bowman WP, Aur RJ. Risk factors for hyperglycemia in children with leukemia receiving L-asparaginase and prednisone. *J Pediatr*. 1981 Jul;99(1):46-50.

76. Rausen A, Glidewell O, Holland J, et al. Superiority of L-asparaginase combination chemotherapy in advanced acute lymphocytic leukemia of childhood. *Cancer Clin Trials* 1979;1:137-44.
77. Riccardi R, Holcenberg J, Glaubiger D, Wood J, Poplack D. L-Asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of Rhesus monkeys and humans. *Cancer Res* 1981;41:4554.
78. Rio B. Traitements des leucémies aiguës. In : *Thérapeutique du cancer* / ed par Morère JF, Mornex F, Piccart M, Nabholz JM. Paris : Springer, 2001. p 884, 893.
79. Sallan S, Gelber R, Kimball V, Donnelly M, Cohen H. More is better! Update of Dana-Farber Cancer Institute/Children's Hospital childhood acute lymphoblastic leukemia trials. *Haematol Blood Transfus* 1990;33:459-66.
80. Sallan S, Hitchcock-Bryan S, Gelber R, Cassady J, et al. Influence of intensive asparaginase in the treatment of childhood non-t-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1983;43:5601-7.
81. Shetty P, Kurkure P, Dasgupta A. Intermediate dose methotrexate and sequential L-asparaginase for treatment of refractory acute lymphocytic leukemia. *Indian J Cancer* 1984;21:46-9.
82. Sutow WW, Garcia F, Starling KA, Williams TE, Lane DM, Gehan EA. L-asparaginase therapy in children with advanced leukemia. The Southwest Cancer Chemotherapy Study Group. *Cancer*. 1971 Oct;28(4):819-24.
83. Tan C, Haghbin M, Gee T, Clarkson B, Murphy M. Combination therapy involving L-asparaginase in acute leukemia. *Bibl Haematol* 1973;39:1074-84.
84. Trueworthy R, Sutow W, Pullen J. Repeated use of L-asparaginase in multidrug therapy of childhood leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1978;4:91-7.

85. Vieira Pinheiro JP, Ahlke E, Nowak-Gottl U, Hempel G, Muller HJ, Lumkemann K, Schrappe M, Rath B, Fleischhack G, Mann G, Boos J. Pharmacokinetic dose adjustment of Erwinia asparaginase in protocol II of the paediatric ALL/NHL-BFM treatment protocols. *Br J Haematol.* 1999 Feb;104(2):313-20.
86. Wade H, Elsworth R, Herbert D, Keppie J, Sargeant K. A new L-asparaginase with antitumor activity. *Lancet* 1968;2:776-77.
87. Wang B, Hak LJ, Relling MV, Pui CH, Woo MH, Storm MC. ELISA to evaluate plasma anti-asparaginase IgG concentrations in patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Immunol Methods.* 2000 May 26;239(1-2):75-83.
88. Whitecar JJ, Bodey G, Harris J, Freireich E. Current concepts: L-asparaginase. *N Engl J Med* 1969;282:732.
89. Williams DL, Harber J, Murphy SB, Look A, Kalwinski D. Chromosomal translocations play a unique role in influencing prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1986; 68: 205-12.
90. Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Evans WE, Sandlund JT, Rivera GK, Wang B, Pui CH, Relling MV. Anti-asparaginase antibodies following *E. coli* asparaginase therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1998 Oct;12(10):1527-33.
91. Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Sandlund JT, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Harrison PL, Wang B, Evans WE, Pui CH, Relling MV. Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 2000 Apr;18(7):1525-32.
92. Woodruff R, Lister T, Paxton A. Combination chemotherapy for haematological relapse in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Am J Hematol* 1978;4:173-77.