

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2011

Thèse N°

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

Présenté et soutenu publiquement le
4 octobre 2011

Par

Latifa MALKI

Née le 03 novembre 1982 à Fez

**THESE POUR L'OBTENTION
DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Validation analytique d'une méthode de dosage plasmatique du
bortezomib par spectrométrie de masse (Q-TRAP 5500)**

Directeur de thèse

Pr Dominique BREILH

Jury :

Mme D. BREILH, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier
Mme M.C. SAUX, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier
Mr J.M. SCHMITTER, Professeur des Universités
Mr F. COMBY, Maître des Conférences
Mr G. MARIT, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier
Mr F. XUEREB, Assistant Hospitalo-Universitaire

Présidente
Membre
Membre
Membre
Membre
Membre

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Dominique BREILH

Professeur des Universités

Pharmacien Praticien Hospitalier

Chef de service de Pharmacie à Usage d'Intérieur de l'Hôpital Haut-Lévêque

Je vous remercie d'avoir accepté avec un grand enthousiasme d'être la tutrice de mon cursus de « Pharmacie spécialisée ». Vous avez immédiatement illuminée ma pensée de vos idées ingénieuses et ambitieuses.

Interne dans votre service, j'ai eu la chance de bénéficier de votre expérience et de vos enseignements. Vous m'avez donné l'opportunité de réaliser mon projet combinant entre l'activité hospitalière et universitaire.

Vous m'avez fait l'honneur de me confier ce sujet et de présider cette thèse. C'est avec beaucoup de gratitude que je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée.

Que cette thèse soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Professeur Marie-Claude SAUX

Professeur des Universités

Pharmacien Praticien Hospitalier

Responsable du Pôle Produits de santé du CHU de Bordeaux

C'est un honneur que vous me faites en acceptant de siéger à mon jury de thèse.

Vos qualités professionnelles et humaines font de vous un exemple à suivre. Vous avez toujours su trouver les mots et l'énergie pour me soutenir dans les moments difficiles. Je vous en suis très reconnaissante.

Soyez assurée de ma vive admiration et de ma très respectueuse considération.

A Monsieur le professeur Jean-Marie SCHMITTER

Professeur des Universités

Directeur de recherche du laboratoire de Spectrométrie de Masse à la Plateforme Fonctionnelle Génomique (PGF)

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre structure de recherche. Vous avez mis à ma disposition tous les moyens scientifiques et techniques nécessaires à la réalisation de ce projet. Vous avez toujours pris le temps de me conseiller autant scientifiquement que humainement. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Francis COMBY

Maitre des conférences à la Faculté de Pharmacie à Limoges

Je vous remercie d'avoir accepté avec gentillesse d'être membre de mon jury. Vous avez mis tout en œuvre pour réaliser ce travail de rapporteur. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère et respectueuse.

A Monsieur le Professeur Gerald MARIT

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier au centre François Magendie à l'Hôpital du Haut-Lévêque

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Votre aide et vos conseils ont été précieux pour son élaboration.

Trouvez ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Fabien XUEREB

Pharmacien Assistant Hospitalo-Universitaire

Tes conseils avisés, ta disponibilité au quotidien et ton soutien moral ont été d'une aide précieuse. Tu as su m'apporter la rigueur pour mieux aboutir ce travail. Que cette thèse soit le témoignage de ma profonde reconnaissance et de mon amitié.

A Corinne BURÉ,

Tu m'as suivi tout le long de ce travail et tu m'as tout appris sur la spectrométrie de masse. Reçois l'expression de mon amitié la plus sincère.

A mes parents,

Pour votre affection et vos encouragements permanents, qui m'ont permis d'accéder à ce titre.

Que cette thèse soit le témoignage de ma toute gratitude et tout mon amour.

A mon frère Simohamed,

Pour ton amour et tes sourires au quotidien à la maison.

A Abderrahmane, Asmae, Salma, Carotte, Ghali, Nounou, Anem, Aurélie, Petra, Armelle, pour être toujours là quand il faut.

A Katell, Laetitia, Luc et Stéphane, pour votre disponibilité, votre accueil chaleureux et votre aide précieuse à chaque fois que j'en ai eu besoin.

A Aude et à Michele, pour votre délicatesse votre gentillesse et votre sérénité remarquable.

A l'ensemble de la Pharmacie de Haut-Lévêque.

A l'ensemble du laboratoire de la Pharmacie de Haut-Lévêque (Sarah, Jean-Marc, Vincent, Mr Boubakar BA) et mes co-internes (Rachel et Soizic), pour tous les bons moments passés ensemble et votre aide tout le long de mon internat.

A l'ensemble de l'équipe de Mr Marc BONEU à la PGF à Bordeaux 2 (Stéphane, Jean-Williams et Anne-Marie), pour votre gentillesse et vos conseils scientifiques et humains.

A l'ensemble de l'équipe de Mr Alain GADEAU à l'INSERM à Pessac (Claude, Isabelle, Marie-Ange, Yu et Candice), pour votre soutien.

Enfin, à tous ceux que j'ai pu oublier....

Liste des tableaux

Tableau I : Critères diagnostiques du myélome multiple en Aquitaine 2010 selon le RCA.....	22
Tableau II : Critères de rechute du myélome multiple en Aquitaine 2010 selon le RCA.....	22
Tableau III : Critères de mise en place de stratégies thérapeutiques selon le RCA.....	23
Tableau IV : Critères de réponse et de progression du myélome multiple selon Kyle et al., (version française)	30
Tableau V : Effets indésirables les plus fréquents rapportés par les sujets de l'étude APEX traités par le bortezomib dexaméthasone.....	42
Tableau VI : Ajustements posologiques recommandés du bortezomib en fonction de la toxicité.....	44
Tableau VII : Ajustements posologiques recommandés du bortezomib selon l'ONCOMIP.....	45
Tableau VIII: Caractéristiques des méthodes utilisées dans le dosage du bortezomib en milieu plasmatique.....	48
Tableau IX : Colonnes utilisées.....	52
Tableau X : Exactitude et précision en inter-journalier.....	72
Tableau XI : Caractéristiques des patients prélevés	77

Liste des figures

Figure n°1 : Cytocentrifugat de plasmocytes myélomateux triés par le marqueur CD138+ (coloration May-Grüwald Giemsa).....	12
Figure n°2 : Structure de la molécule d'immunoglobuline.....	13
Figure n°3 : Pic monoclonal dans le myélome multiple.....	14
Figure n°4 : Traitement des patients de moins de 65 ans en première ligne.....	27
Figure n°5 : Structure chimique du bortezomib.....	34
Figure n°6 : Schéma général d'une source électrospray (Micromass)....	53
Figure n°7 : Représentation schématique du processus électrochimique de l'électrospray pour la formation des ions positifs (figure modifiée d'après Kebarle 2000)	54
Figure n°8 : Limite de stabilité du cône de Taylor au-delà de laquelle des gouttelettes primaires sont émises (figure modifiée d'après Kebarle 2000)	55
Figure n°9 : Schéma récapitulatif des deux modèles pour l'obtention d'ions en phase gazeuse par ESI, (a) modèle d'Iribarne et Thoson, (b) modèle de Dole.	56
Figure n°10 : Schéma du spectromètre de masse Q-TRAP 5500. DP : Declustering Potential ; EP : Entrance potential ; CEP : Cell Entrance Potential ; CXP : Cell Exit Potential	58
Figure n°11 : Photographie du spectromètre de masse Q-TRAP 5500 à la plateforme génomique fonctionnelle (PGF) à Bordeaux).....	59
Figure n°12 : Les différents modes de fragmentation SM/SM.....	62

Figure n°13 : Couplage LC-SM/SM (Plateforme Génomique Fonctionnelle, Bordeaux 2011).	63
Figure n°14 : Protocole expérimental de la SPE sur StrataX C18.....	65
Figure n°15 : Spectre SM du bortezomib.....	69
Figure n°16 : Spectres SM/SM du carbutamide et du bortezomib.....	70
Figure n°17 : Spectres LC-SM/SM du bortezomib et du carbutamide avec les colonnes Kinetex C18 et Atlantis C18.....	72
Figure n°18 : Spectres LC-SM/SM du bortezomib et du carbutamide avec la colonne Luna C8.....	73
Figure n°19 : Droite de calibration obtenue au J2 de la validation analytique.....	74

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	1
Liste des tableaux	4
Liste des figures.....	5
TABLE DES MATIERES	7
Chapitre 1 : INTRODUCTION	10
I. Le myélome multiple	12
A. Formation de la protéine monoclonale.....	13
B. Epidémiologie	16
C. Physiopathologie.....	17
D. Diagnostic	20
E. Classification	21
F. Traitement de première ligne et suivi	23
G. Critères de réponse et progression	29
H. Traitement des myélomes en rechute	29
II. Propriétés pharmacologiques, pharmacocinétiques et pharmacie clinique du bortézomib	34
A. Propriétés physico-chimiques	34
B. Propriétés pharmacodynamiques.....	35
C. Propriétés pharmacocinétiques	36
1. Propriétés pharmacocinétiques générales	36
2. Populations particulières	36
3. Variabilité interindividuelles	37
4. Interactions médicamenteuses.....	38

D. Effets indésirables et surdosage	41
E. Posologies et modalités d'administration	42
III. Revue bibliographique des méthodes utilisées dans le dosage du bortezomib au niveau plasmatique	46
IV. Objectif de l'étude	49
Chapitre 2 : Partie expérimentale :	50
Mise au point et validation d'une méthode de dosage au niveau plasmatique du bortezomib par LC-MS/MS.....	50
I. Matériels et méthodes	51
A. Chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	51
1. Principe	51
2. Composants de la chaîne chromatographique.....	51
B. Spectrométrie de masse (SM)	53
1. Source électrospray ESI	53
a. Formation des gouttelettes	53
b. Générer des ions en phase gaz.....	55
2. Analyseur Q-TRAP	57
a. Principe de la trappe ionique	57
b. Q-TRAP.....	57
c. Fragmentations en mode MS ²	60
C. Couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse....	62
D. Traitement de l'échantillon	63
1. Précipitation des protéines.....	63
2. Extraction liquide-solide (SPE).....	64
E. Validation d'une méthode analytique pour un milieu biologique.....	65
II. Résultats.....	69

A. Mise au point et validation de la méthode de dosage plasmatique	69
1. Mise au point de la méthode de dosage	69
2. Validation de la méthode de dosage plasmatique.....	73
B. Application clinique : quantification des concentrations plasmatiques du bortezomib chez deux patients atteints de MM	77
Chapitre 3 : DISCUSSION	78
Chapitre 4 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	83

Chapitre 1 : INTRODUCTION

Le Myélome multiple (MM) est la deuxième hémopathie maligne la plus répandue (10%) après le lymphome non-Hodgkinien. L'incidence croit avec l'âge. Cependant, la tendance continue à une augmentation du nombre de cas diagnostiqués avant 50 ans. En 2005, la survie relative à 5 ans était environ de 40% [1].

L'arrivée de nouvelles molécules, surnommées les « thérapies ciblées », a permis d'améliorer la survie médiane. Le bortezomib est le premier représentant d'une nouvelle classe d'agents pharmacologiques très prometteurs, les inhibiteurs du protéasome. Il a eu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2005 en France. Il est indiqué dans le traitement du MM chez les patients qui ont fait une rechute après leur thérapie de première intention et sont réfractaires à leur dernier traitement [2]. Le bortezomib est un médicament aujourd'hui incontournable dans le traitement du MM. Néanmoins, plusieurs points restent à élucider dans la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de ce médicament. Le bortezomib est administré par voie veineuse et va devoir être administré par voie sous-cutanée dans un avenir très proche [3, 4]. Le suivi du taux plasmatique du bortezomib permettra de mieux comprendre les relations entre la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de ce médicament qu'il soit administré par voie intraveineuse ou sous-cutanée.

A notre connaissance, il n'existe pas de méthode analytique publiée et validée de dosage plasmatique des dérivés boronés, notamment le bortezomib. Il existe de brèves descriptions de dosage plasmatique du bortezomib dans les publications autour de sa pharmacocinétique [5]. D'où l'intérêt de développer et valider une méthode de dosage du bortezomib dans le plasma selon les normes «Food and Drug Administration» (FDA). Nous procédons à la validation pour assurer la fiabilité et la reproductibilité de la méthode en déterminant les paramètres spécifiques suivants : limite de détection (LOD), limite de quantification (LOQ), linéarité, répétabilités intra- et inter-journalière (exactitude, précision), spécificité et sélectivité.

I. Le myélome multiple

Le myélome multiple est une tumeur maligne affectant les plasmocytes de la moelle osseuse. Les plasmocytes malins (Figure 1), ou cellules myélomateuses, s'accumulent dans la moelle osseuse [6]. Plusieurs mécanismes interviennent au niveau de la moelle osseuse, dont l'induction de l'angiogenèse, la diminution des cellules immunitaires et le développement de cytokines pro-inflammatoires. Les manifestations cliniques les plus fréquentes de la maladie sont l'anémie, l'hypercalcémie, les métastases osseuses et l'insuffisance rénale [7].

Les plasmocytomes sont des tumeurs composées de plasmocytes, qui peuvent se développer en intra- ou extra-médullaire de l'os ou des tissus mous. Lorsque les plasmocytomes sont multiples, nous pouvons parler de MM.

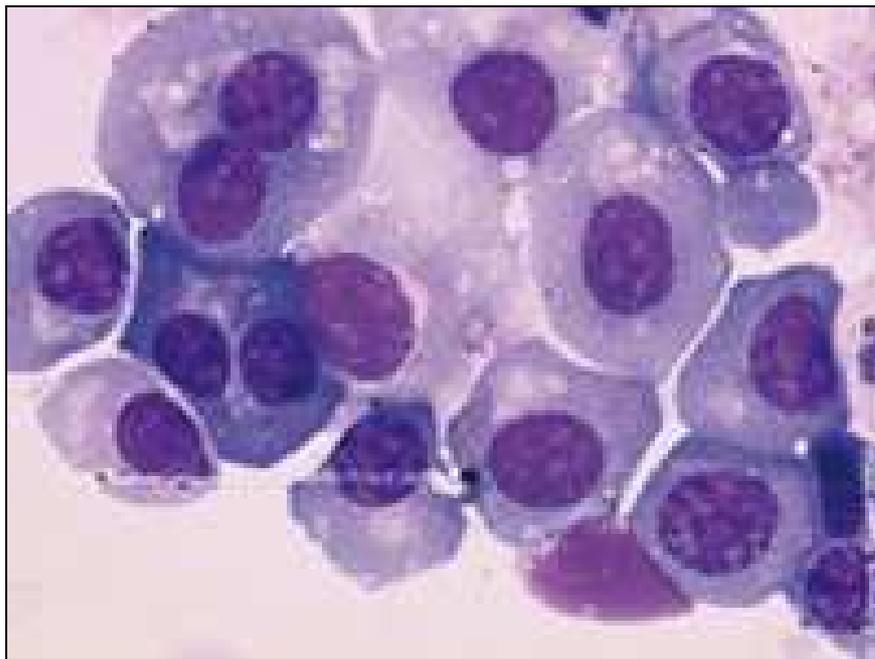


Figure n°1 : Cytocentrifugat de plasmocytes myélomateux triés par le marqueur CD138+ (coloration May-Grüwald Giemsa) [6].

A. Formation de la protéine monoclonale

La protéine monoclonale est une immunoglobuline ou un fragment d'immunoglobuline. La figure 2 représente la structure normale d'une molécule d'immunoglobuline [8]. Dans les plasmocytes myélomateux, une ou plusieurs mutations des gènes impliqués dans la formation des immunoglobulines peuvent être observées. Les protéines monoclonales qui en résultent ont ainsi une séquence d'acides aminés et une structure anormales. Il s'ensuit généralement la perte de fonction anticorps de l'immunoglobuline.

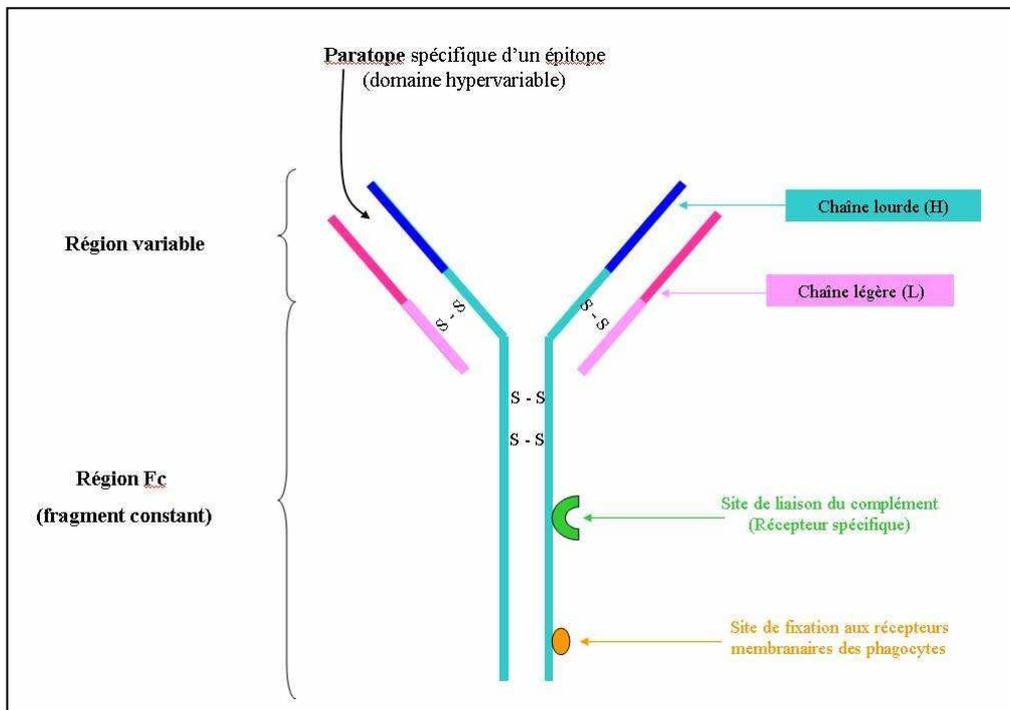


Figure n°2 : Structure de la molécule d'immunoglobuline [8].

Chaque plasmocyte est spécifique d'une seule immunoglobuline. De manière physiologique, l'organisme produit normalement des immunoglobulines de nature différentes : immunoglobuline G (IgG), A (IgA), D (IgD), E (IgE), M (IgM). Dans le myélome, l'anticorps fabriqué en excès par les plasmocytes «malades» peut appartenir aux IgG, aux IgA ou exceptionnellement aux IgD ou aux IgE. Mais ce n'est

parfois qu'un fragment d'anticorps, il s'agit alors de myélome à chaînes légères d'anticorps.

La quantité de protéines monoclonales produite par les cellules myélomateuses varie considérablement d'un patient à l'autre. Lors de l'évaluation d'un myélome, il est primordial de savoir si les cellules myélomateuses du patient produisent beaucoup, peu ou ne sécrètent pas de protéine. Cette protéine monoclonale est parfois appelée protéine myélomateuse, para-protéine ou pic monoclonal. Cette dernière dénomination est liée à l'aspect du tracé électrophorétique, technique de routine utilisée pour séparer et identifier les protéines (Figure 3) [9, 10].

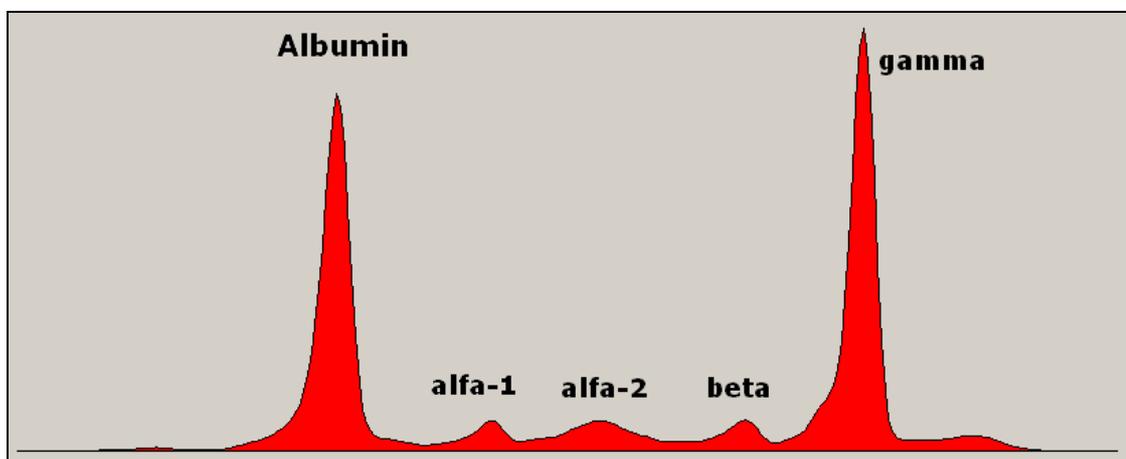


Figure n°3 : Pic monoclonal dans le myélome multiple [10].

L'augmentation de la production d'une immunoglobuline anormale a plusieurs conséquences :

- La protéine monoclonale produite en excès s'accumule dans le sang et/ou est excrétée dans les urines en pic monoclonal.
- Les molécules monoclonales ont la capacité d'interagir entre elles et/ou avec d'autres tissus tels que les cellules sanguines, les parois vasculaires et d'autres composants sanguins. Ces interactions peuvent entraîner une réduction du flux sanguin, causant un syndrome d'hyperviscosité.

- Dans près d'un tiers des cas, les chaînes légères sont produites en excès par rapport aux chaînes lourdes. Ces chaînes légères en excès forment les protéines de Bence Jones. Ces protéines ont un poids moléculaire de 22 000 daltons et sont suffisamment petites pour être filtrées par les reins.

- Les protéines monoclonales anormales peuvent également présenter des propriétés spécifiques incluant :

- La fixation à certains facteurs de coagulation, entraînant un risque accru d'hémorragies ou de thromboses.
- La fixation à certaines hormones ou minéraux circulants, entraînant toute une variété d'anomalies endocriniennes ou métaboliques.

- Les protéines de Bence Jones libres peuvent également interagir entre elles et/ou avec d'autres tissus (tout comme les immunoglobulines complètes). Les conséquences de ces interactions sont :

- Une amylose : maladie dans laquelle les chaînes légères de Bence Jones s'associent pour former une structure plissée, symétrique, capable de déposer dans les tissus de l'organisme, et plus particulièrement les reins, les nerfs et le myocarde.
- La maladie des dépôts de chaînes légères : les chaînes légères se déposent de manière plus désordonnée, en particulier dans les petits vaisseaux oculaires et rénaux.
- La maladie monoclonale de dépôt d'immunoglobuline (MMID) avec une possibilité de dépôts qui englobent des fragments de chaînes lourdes et de chaînes légères.

Il est important de souligner que les examens biologiques effectués en routine peuvent être perturbés du fait de l'adhésivité ou de l'hyperviscosité des prélèvements sanguins, modifiant le fonctionnement normal des automates de biologie de routine [11].

B. Epidémiologie

Environ 5 000 nouveaux cas de MM sont diagnostiqués en France chaque année dont 54% chez l'homme [12, 13]. Le MM représente moins de 2% de l'ensemble des cancers et 10 à 12% des hémopathies malignes. L'âge médian au diagnostic est de 70 ans chez les hommes et de 74 ans chez les femmes. Le MM peut également toucher les sujets plus jeunes puisque 2,8% des cas sont diagnostiqués avant 48 ans [14]. En 2005, la survie relative à 5 ans était environ de 40% [14]. Le MM est, en règle générale, précédé d'une gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) qui ne représente pas une urgence en soit mais qui doit être surveillée. Les MGUS sont 100 fois plus fréquentes que le MM et leur évolution vers un MM est de 1 % par an [15].

L'incidence du MM varie d'un pays à l'autre, avec une incidence très faible en Asie (< 1/100 000 en Chine), et très élevée chez les afro-américains. Par exemple, dans la région de Los Angeles (Californie), l'incidence est de 9,8/100 000 chez les hommes afro-américains contre 4,3/100 000 chez les Caucasiens. Le ratio hommes/femmes est de 3/2. L'incidence croît avec l'âge. Cependant, la tendance continue à une augmentation du nombre de cas diagnostiqués avant 50 ans doit faire rechercher des causes environnementales. Plusieurs études récentes ont évalué les causes ou les prédispositions au myélome, à la MGUS et aux troubles connexes. Les pompiers et individus qui occupent des emplois exposant à des substances toxiques ainsi que les personnes obèses ont un risque élevé de développer un MM. Manger des fruits de mer contaminés par des métaux lourds ou des produits chimiques peut également être un facteur de risque pour le MM [16]. D'autres problèmes de santé, notamment les troubles du système immunitaire et les infections peuvent être des facteurs sous-jacents ou déclencheurs. Plusieurs travaux sont axés sur les facteurs de risque du myélome à travers les études de profils génomiques [9, 12, 17, 18].

C. Physiopathologie

La croissance non contrôlée des cellules myélomateuses a de nombreuses conséquences. Il s'agit notamment de lésions osseuses, d'insuffisance médullaire, d'augmentation du volume plasmatique et de la viscosité, d'inhibition de la production d'immunoglobulines normales, et d'insuffisance rénale. Néanmoins, la maladie peut rester asymptomatique pendant des années. A la phase symptomatique de la maladie, le signe clinique révélateur le plus fréquent est représenté par les douleurs osseuses [19].

- Atteinte de l'os et de la moelle

o Lésions osseuses

Depuis la première description du myélome en 1844, la présence de la protéine anormale a été reliée aux atteintes osseuses [19]. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette résorption osseuse n'ont été élucidés que récemment. La première avancée majeure a été l'observation au niveau des sites de résorption osseuse, d'un excès combiné de plasmocytes malins et d'ostéoclastes. Ces mécanismes ont été mis en évidence par l'observation des cellules myélomateuses. En effet, ces cellules myélomateuses produisent des facteurs activant l'ostéoclastogénèse. De plus, la caractérisation de cytokines in situ telles que l'IL-1 β , l'IL-6 ou les TNF α et β , de chimiokines comme MIP-1 α , et des interactions cellulaires impliquant diverses intégrines, tous impliqués dans la production et l'activation d'un plus grand nombre d'ostéoclastes a permis de mieux comprendre ces mécanismes. Plus récemment, une molécule RANK ligand (RANKL) a été identifiée comme un médiateur essentiel de l'activation ostéoclastique.

A côté de l'activation ostéoclastique, une seconde caractéristique des atteintes osseuses du myélome est l'inhibition des ostéoblastes. A l'état physiologique, le couplage des ostéoclastes et des ostéoblastes permet un remodelage osseux régulier. Les mécanismes responsables de ce découplage dans le myélome sont en cours d'investigation.

Récemment, il a été montré que certains hypocholestérolémiants, tels que les statines (inhibiteurs de réductase HMG-CoA), pouvaient activer les ostéoblastes [20]. Des études cliniques sont en cours. De plus, il a été suggéré que le bortezomib et la lenalidomide pourraient promouvoir l'ostéo-formation, en plus d'avoir un effet anti-myélome direct [21, 22].

L'anémie est une caractéristique du myélome. Bien que l'envahissement médullaire par les plasmocytes malins joue probablement un rôle direct, une inhibition spécifique de l'érythropoïétine par des cytokines du microenvironnement et par des phénomènes d'interactions cellulaires directes représente une explication certainement plus fonctionnelle. Les causes exactes de l'anémie liée au myélome font actuellement l'objet d'études menées par plusieurs équipes de recherche. Les symptômes de l'anémie s'atténuent généralement en fonction de l'efficacité du traitement anti-myélome. L'érythropoïétine (Epo) recombinante devrait être utilisée avec prudence compte tenu des récents rapports qui lient l'Epo à la croissance des tumeurs et à la réduction de la survie chez les patients atteints de cancer, et de l'identification de récepteurs Epo sur les cellules du myélome [23].

○ Infections

La prédisposition aux infections est sans doute la seconde caractéristique clinique principale du myélome, après les lésions osseuses. Les mécanismes n'en sont pas totalement élucidés. La présence de cellules myélomateuses dans la moelle osseuse entraîne l'inhibition des fonctions immunitaires normales, comme la production d'anticorps (reflétée par l'hypogammaglobulinémie), l'inhibition des fonctions T, ou l'activation aberrante de la fonction monocyte/macrophage. Certaines données suggèrent que les macrophages activés sécrèteraient un facteur capable d'activer les cellules myélomateuses, mais aussi d'inhiber la production physiologique des immunoglobulines ainsi que les fonctions T normales.

En raison de la prédisposition des patients atteints de MM aux infections, les infections virales du tissu nerveux sont très courantes, particulièrement le virus varicelle-zona (zona), l'herpès (boutons de fièvre), le virus Epstein-barr (mononucléose) ou le cytomegalovirus, pouvant provoquer la paralysie de Bell (paralysie faciale partielle) ou d'autres complications. Les patients atteints du myélome sont particulièrement

susceptibles aux infections virales, ainsi qu'aux infections à bactéries encapsulées comme le pneumocoque. Cependant, du fait des fréquentes neutropénies (liées au myélome ou aux traitements) et des cathéters implantables, tout type d'infection peut être observé dans le myélome, incluant les infections bactériennes et fongiques. Les infections ne doivent pas être ignorées quelle que soit leur ampleur. Un examen rapide est nécessaire pour évaluer les stratégies antibiotiques ou antivirales à utiliser.

- **Production anormale des Ig**

Les plasmocytes myélomateux peuvent s'accumuler dans la moelle osseuse et/ou dans de nombreux autres tissus, pouvant entraîner toute une gamme de complications. L'augmentation de la production d'une immunoglobuline anormale a plusieurs conséquences.

o **Syndrome d'hyperviscosité**

Les molécules monoclonales ont la capacité d'interagir entre elles et/ou avec d'autres tissus tels que les cellules sanguines, les parois vasculaires et d'autres composants sanguins. Ces interactions peuvent entraîner une réduction du flux sanguin, causant un syndrome d'hyperviscosité.

o **Insuffisance rénale**

L'insuffisance rénale est une complication fréquente du myélome. Les proportions myélomateuses peuvent aggraver le rein par différents mécanismes, allant de l'atteinte tubulaire dues à l'accumulation de grandes quantités de protéine anormale, aux effets liés aux dépôts amyloïdes, ou aux atteintes spécifiquement tubulaires liés au syndrome de Fanconi. Ce syndrome se caractérise par une fuite urinaire d'acides aminés et de phosphate pouvant contribuer à la maladie osseuse.

La fonction rénale peut être encore aggravée par différentes conditions, telles l'hypercalcémie ou l'hyperuricémie, les infections, ou les effets médicamenteux toxiques liés à l'administration de certains antibiotiques néphrotoxiques, aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens, ou aux produits de contraste utilisés en radiologie. Le maintien d'une bonne hydratation est une mesure préventive importante chez les patients présentant un myélome [24].

- **Effets neurologiques**

Le tissu nerveux est fréquemment touché chez les patients atteints de myélome, soit par un effet anticorps direct des protéines monoclonales contre les structures nerveuses (par exemple anticorps anti-myéline), ou de dépôt de fibrilles amyloïdes le long des axes nerveux. Ces effets entraînent des neuropathies périphériques qui doivent être différenciées des autres causes de neuropathies comme le diabète sucré ou les troubles nerveux primaires tels que la sclérose en plaque, la maladie de parkinson et plusieurs autres [25].

D. Diagnostic

Le MM doit être évoqué devant une vitesse de sédimentation (VS) élevée avec protéine C réactive (CRP) normale. Il peut aussi se révéler par des symptômes (douleurs osseuses le plus souvent), voire dans le cadre d'une urgence (fractures pathologiques, compression médullaire, insuffisance rénale aiguë, hypercalcémie maligne, infections) ou par une anémie non expliquée. Dans 20% des cas, il est asymptomatique et découvert lors d'un examen sanguin ou d'imagerie osseuse [26].

Le diagnostic de MM implique les examens suivants :

- Hémogramme avec frottis sanguin, créatininémie et calcémie.
- **Myélogramme** est l'examen le plus important dans le diagnostic du MM. Il faut le préférer à la biopsie médullaire qui est rarement nécessaire. Le myélogramme permet de mettre en évidence une infiltration plasmocytaire quantitativement ($\geq 10\%$) et/ou qualitativement anormale.
- **Etude immunochimique** : réponse sur l'électrophorèse et l'immunofixation des protéines sériques et urinaires. Les objectifs de cette étude sont la détection, la caractérisation et la quantification d'une immunoglobuline (Ig) monoclonale. L'électrophorèse permet, dans la majorité des cas, une évaluation correcte, suffisante pour le suivi, du taux de l'Ig monoclonale. Une électrophorèse des protides sériques doit être réalisée ainsi qu'une électrophorèse des protides

urinaires avec recherche Bence-Jones. Le dosage pondéral de celle-ci par néphélémétrie ou immuno-diffusion radiale, peu fiable, ne doit pas être effectué. L'importance de la diminution du taux des Ig polyclonales normales est très habituellement appréciable par la seule électrophorèse. Un dosage des classes d'Ig (hors celle de l'Ig monoclonale) est souvent réalisé, même s'il n'est pas indispensable. Le dosage des chaînes légères libres sériques est un nouvel examen surtout utile, à ce jour, pour le suivi des formes oligo ou non sécrétantes de la maladie.

- Bilan radiologique du squelette axial : recherche les lésions le plus souvent lytiques. Il comprend les radiographies suivantes : crâne de face (F) et de profil (P), rachis cervical, dorsal et lombaire F+P, bassin F, thorax F+P et grils costaux, humérus et fémurs F. La scintigraphie osseuse, moins performante que les radiographies standards, n'est pas indiquée [27].

E. Classification

Les critères de diagnostic et de mise en route du traitement ont été définis par « l'International Myeloma Working Group » (IMWG) [28, 29].

Le Réseau de Cancérologie d'Aquitaine (RCA) a résumé les critères diagnostiques dans le tableau I ainsi que les critères de rechute dans le tableau II.

Le diagnostic de MM asymptomatique justifie, à titre pronostique, une imagerie en résonance magnétique nucléaire (IRM) du rachis, recherchant d'éventuelles lésions infra-radiologiques. L'intérêt d'une tomographie à émission de positons (TEP) dans cette indication n'est pas documenté. L'apport pronostique du dosage des chaînes légères libres n'est pas établi.

- Devant un MM symptomatique :
 - Une IRM n'est justifiée que lorsqu'il existe une suspicion clinique de complication à type de compression médullaire ou radiculaire.

Tableau I : Critères diagnostiques du myélome multiple en Aquitaine en 2010 selon le RCA [30].

Critères diagnostique IMWG <i>(Kyle, Leukemia 2009)</i>	Plasmocytome solitaire 1 + 2 + tous les 3	MGUS 1 + 2 + tous les 3	Myélome « smoldering » 1 et/ou 2 + tous les 3	Myélome symptomatique 1 + 2 + un des 3
1. Plasmocytose	< 5 %	< 10 %	≥ 10 %	≥ 10 %
2. Pic sérique (IgG, IgA)	0	< 30 g	≥ 30 g	présent
3. Calcium	N	N	N	> 2,65 mmol
3. Rein	N	N	N	> 177 μmol
3. Anémie	N	N	N	< 10 g ou 2 g < normal
3. Os	1 IRM nég	N	N	geodes fractures patho.

Tableau II : Critères de rechute du myélome multiple en Aquitaine en 2010 selon le RCA [30].

Dans tous les cas apparition / aggravation :
<ul style="list-style-type: none"> – de signes d’insuffisance médullaire, – de lésions osseuses, – d’une insuffisance rénale, – d’une hypercalcémie.
Patients en rémission complète : réapparition confirmée :
<ul style="list-style-type: none"> – du pic sérique ou urinaire, – d’une plasmocytose médullaire > 5%.
Patients en rémission partielle : augmentation de plus de 25% à 2 contrôles successifs :
<ul style="list-style-type: none"> – de la plasmocytose médullaire (augmentation en valeur absolue d’au moins 10%), – du plus bas composant monoclonal observé (augmentation en valeur absolue d’au moins 5 g/l si pic sérique ou 200 mg/24h si Bence-Jones).

○ Sont requis, à titre pronostique :

- Dosage de **β₂-microglobuline sérique (β₂m), LDH, C-réactive protéine et albuminémie**. Une nouvelle classification pronostique, l’Index Pronostique International, a été publiée à partir des dosages de la β₂m et de l’albumine sérique [13, 20].

- **Etude cytogénétique** des plasmocytes purifiés, avec recherche des anomalies suivantes : translocation 4 ; 14 [**t(4;14)**(p16;q32)], délétion totale ou partielle du chromosome 13 [del(13)], délétion 17p [**del(17p)**] [29]. Le développement récent des techniques d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur cellules interphasiques a rendu possible l'analyse de cellules plasmocytaires non proliférantes. L'impact pronostique de certaines de ces anomalies chromosomiques est de démonstration récente. Les translocations **t(4;14)**, t(14;16) et **del17p** sont associées à un mauvais pronostic avec une survie significativement plus courte. Les patients porteurs d'une de ces anomalies chromosomiques nécessitent un traitement spécifique qui reste à définir. La recherche des anomalies cytogénétiques au diagnostic est devenue un élément incontournable dans la définition du pronostic, et donc dans la mise en place de la stratégie thérapeutique du myélome multiple [31]. En Aquitaine, les anomalies cytogénétiques recherchées sur la moelle actuellement sont t(11,14), t(14,16) et plus particulièrement la **del 17p** et **t(4,14)**.

F. Traitement de première ligne et suivi

Les MM asymptomatiques ne doivent pas être traités d'emblée [13, 20]. Les MM symptomatiques doivent être traités. Le réseau de cancérologie d'Aquitaine a résumé les critères de mise en place du traitement du myélome comme suit :

Tableau III : Critères de mise en place de stratégies thérapeutiques selon le RCA [30].

Plasmocytome solitaire : <ul style="list-style-type: none"> - traitement local, - surveillance.
MGUS ou myélome « smoldering » : <ul style="list-style-type: none"> - abstention, - surveillance.
Myélome multiple symptomatique : <ul style="list-style-type: none"> - traitement, - variable selon : <ul style="list-style-type: none"> - âge < ou > 65 ans, - réponse et facteurs pronostiques.

○ **Avant 65 ans :**

Le traitement intensif suivi d'autogreffe est recommandé chez le sujet jeune [32, 33].
Le schéma de référence associe :

Un traitement d'induction VD par bortezomib (Velcade®) et de fortes doses de corticoïdes (dexaméthasone orale). Le bortezomib seul ou en association avec la dexaméthasone a montré son efficacité dans le MM en première ligne [34-37]. Harrousseau et ses collègues ont comparé l'association VD à celle composée de vincristine, adriamycine et dexaméthasone (VAD) dans la phase d'induction pré-greffe [38]. La très bonne réponse partielle (TBRP) en post-induction a été supérieure avec le VD comparé au VAD, 38% contre 15% respectivement. Ceci se traduisait par un TBRP en post-transplantation supérieur, 54% contre 37% respectivement. L'amélioration de la survie a été modeste, 36 mois contre 30 mois, respectivement. Néanmoins, le point noir de l'association VD est le risque précoce de neurotoxicité. Des études récentes montrent qu'en réduisant l'administration du bortezomib à une fois par semaine, nous pouvons obtenir une efficacité similaire et une diminution significative du risque de neurotoxicité [39]. Cette association peut être à ce jour considéré comme une référence, ayant démontré sa supériorité sur l'induction historique VAD (vincristine, adriamycine en perfusion continue et dexaméthasone) [40]. La chimiothérapie de type VAD doit maintenant être abandonnée. D'autres traitements d'induction utilisant de nouveaux médicaments en association (thalidomide, bortezomib, lenalidomide) sont possibles.

- Le prélèvement de cellules souches du sang périphérique (CSP), après mobilisation par endoxan et/ou G-CSF.
- Un traitement par melphalan : 200 mg/m² suivi de la réinjection des CSP.

Deux traitements intensifs successifs pourraient avoir un intérêt chez les patients en réponse insuffisante à l'issue du traitement d'induction et d'un premier traitement intensif [41]. Le protocole VD suivi d'une première autogreffe puis d'une deuxième autogreffe si la réponse clinique est inférieure à 90% est abandonné au profit de 3 cycles de VTD (bortezomib, thalidomide et dexaméthasone) suivis d'une autogreffe et une consolidation. L'intérêt des traitements intensifs est surtout démontré pour les

malades les plus jeunes. L'existence de pathologies associées peut faire préférer une chimiothérapie conventionnelle, surtout lorsque le malade a plus de 60 ans.

En 2011, le traitement de référence chez le sujet jeune est le suivant : Velcade-Thalidomide-Dexaméthasone (VTD*) en 3 cycles, une collection après le 3^{ème} cycle sous Endoxan (3 g/m²), suivi d'une intensification avec autogreffe conditionnée par Melphalan (200 mg/m²) puis de consolidation par 2 cycles de VTD (**figure 4**). La prescription de VTD, suivie d'une intensification avec autogreffe, est une situation hors autorisation de mise sur le marché (AMM) hors protocole thérapeutique temporaire (PTT), dont l'argumentaire doit être porté au dossier médical du patient, selon l'article 7 point 3 du chapitre III de l'annexe du Contrat de Bon usage (décret n°2008-1121 du 31 octobre 2008).

*La définition du schéma thérapeutique VTD :

- Velcade® (1.0 mg/m² IV ; J1, J4, J8, J11)
- Thalidomide (100.000 mg PO; J1,J2,J3,J4, J5, J6, J7, J8, J9, J10, J11, J12, J13, J14, J15, J16, J17, J18, J19, J20, J21)
- Dexaméthasone (40.000 mg PO; J1, J4, J8, J11).

Une étude randomisée de phase III est en cours comparant un traitement à doses conventionnelles associant Bortezomib, Lenalidomide et Dexaméthasone (protocole **VRD**) à un traitement à hautes doses avec greffe de cellules souches périphérique dans la prise en charge initiale du myélome de moins de 65 ans. Il s'agit du protocole de « l'Intergroupe Francophone du myélome » **IFM 2009**. L'objectif du protocole **IFM 2009** est donc de comparer les résultats d'un traitement à doses conventionnelles optimal à ceux d'un traitement à hautes doses optimal.

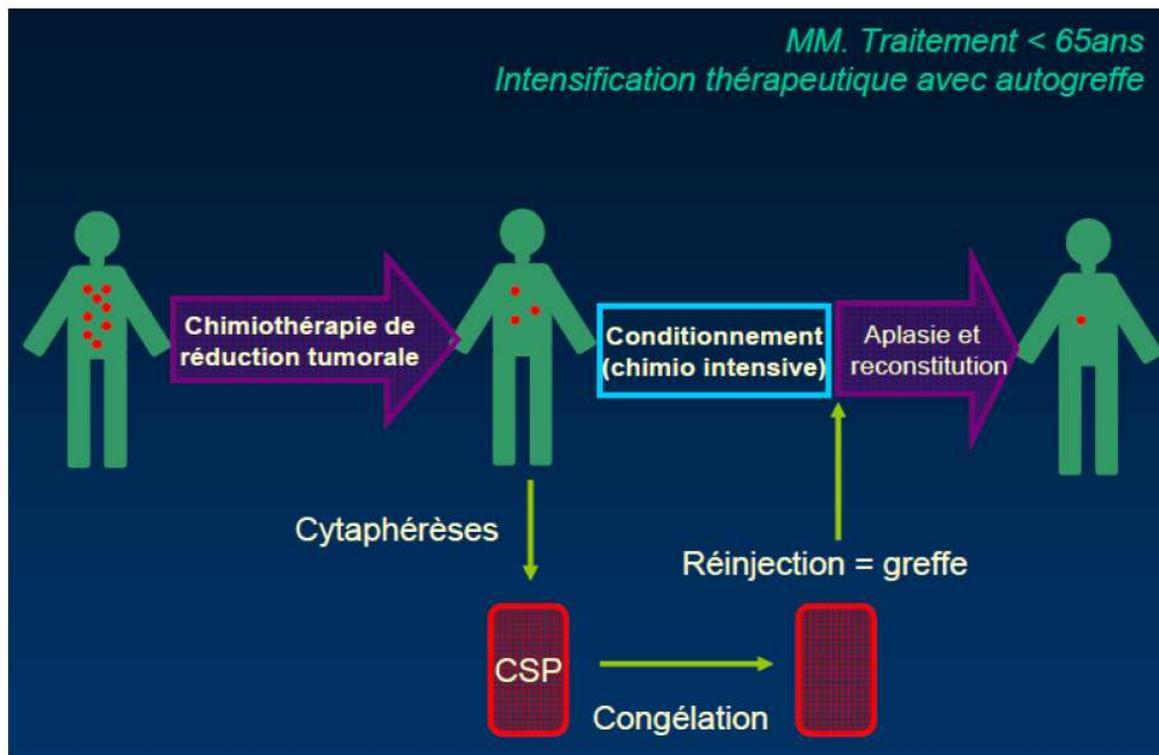


Figure n°4 : Traitement des patients de moins de 65 ans en première ligne [30].

○ **Après 65 ans :**

Les patients de plus de 65 ans sont traités par une chimiothérapie conventionnelle associant melphalan, prédnisone et thalidomide (MPT) ou melphalan, prédnisone et bortezomib (Velcade®) (MPV) [42-45]. Ces traitements ont démontré leur supériorité sur l'association historique melphalan-prédnisone (MP). Dans une étude de phase 3 sur 682 patients, l'association MPV a montré un taux de réponse significativement supérieur à l'association MP (71% versus 35%, $p < 0.001$) [46]. La durée avant la progression de la maladie et la survie chez les patients de plus de 65 ans non traités ont été significativement supérieures avec l'association MPV qu'avec MP [47]. Les combinaisons MPT et MPV ont une autorisation européenne dans le MM lors du diagnostic chez les patients non éligibles pour le traitement intensif. La chimiothérapie MP peut rester indiquée pour une minorité de patients présentant des co-morbidités sévères empêchant la prescription de MPT ou MPV. D'autres associations sont en cours d'évaluation, notamment melphalan, prédnisone et lenalidomide (Revlimid®) puis lenalidomide en entretien (MPR-R). Les

polychimiothérapies à base d'alkylants utilisés dans le passé (VMCP, VMBCP, VMCP/VBAP...) doivent être abandonnées comme traitement de première ligne.

En Aquitaine, le protocole MPV peut être administré sous forme de deux schémas. Le schéma MPV hebdomadaire (1 cycle de 42 jours et 8 cycles de 35 jours) étant moins puissant que le schéma vista (4 cycles de 42 jours** et 5 cycles de 35 jours***).

**La définition du schéma thérapeutique MPV, cycle de 42 jours :

- Alkeran (2.000 mg PO; 9.000 mg/m² J1,J2,J3,J4)
- Prédnisone (PO; 60.000 mg/m² J1, J2, J3, J4)
- Primperan (10 mg IV; 10.000 mg J1, J4, J8, J11, J22, J25, J29, J32)
- Bortezomib (1 mg/ml IV; 1.300 mg/m² J1, J4, J8, J11, J22, J25, J29, J32).

***La définition du schéma thérapeutique MPV, cycle de 35 jours :

- Alkeran (idem)
 - Prédnisone (idem)
 - Primperan (10 mg IV; 10.000 mg J1, J4, J8, J11, J22)
 - Bortezomib (1 mg/ml IV; 1.300 mg/m² J1, J8, J15, J22).
- Chez les patients dont la maladie a pu être stabilisée par le traitement initial (phase de plateau), la règle est d'interrompre tout traitement anti-tumoral. Un traitement d'entretien par interféron n'est habituellement plus proposé. Un traitement de consolidation par 2 cycles de VTD jusqu'au plateau, ou pour une durée n'excédant pas 1 an pourrait être justifié chez des patients n'ayant pas obtenu au moins une très bonne réponse partielle à l'issue du traitement d'entretien après chimiothérapie conventionnelle. L'intérêt d'un traitement d'entretien par le lenalidomide est en cours d'étude.
- Un traitement par biphosphonate (BP), pour la prévention des évènements osseux, peut être proposé à tous les patients ayant une atteinte osseuse, en association à la chimiothérapie. Il peut être interrompu lorsque le traitement initial a

permis d'obtenir une bonne rémission. Il devra être repris à la rechute. La description récente d'ostéonécrose des mâchoires (ONM) avec les amino-biphosphonates est à l'origine de nouvelles recommandations [48, 49]. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé, en collaboration avec un groupe d'experts comprenant des cliniciens, des stomatologues, des chirurgiens maxillo-faciaux et des chirurgiens dentistes a élaboré des recommandations concernant trois situations. Il s'agit de « patients candidats à un traitement par BP », de « patients traités par BP sans évidence d'ONM » et enfin de « patients traités par BP atteints d'une ONM avérée ». Chez les patients devant recevoir un BP dans le cadre de pathologies malignes, il est indispensable :

- De réaliser un bilan bucco-dentaire.
- De réaliser un bilan radiologique : le panoramique dentaire devra être complété par des clichés rétroalvéolaires voire un dental scanner en cas de doute concernant un foyer infectieux.

Il est préférable de ne débiter le traitement par BP, si l'état clinique du patient le permet, qu'une fois la situation dentaire assainie [11].

- L'érythropoïétine recombinante peut être prescrite à certains patients, en association à la chimiothérapie, pour traiter ou prévenir l'anémie. Néanmoins, il faut savoir que des affections vasculaires thrombotiques ont été mentionnées chez les patients traités par des médicaments contenant de l'érythropoïétine (EPO). Ce risque doit être soigneusement discuté, notamment chez des patients cancéreux présentant un risque accru d'affections vasculaires thrombotiques [50].

Le traitement symptomatique reste essentiel dans la prise en charge urgente des infections, traitement de la douleur, prévention de l'insuffisance rénale [51]. La radiothérapie consiste à faire perdre aux cellules « dégénérées » leur capacité de division et d'empêcher ainsi que la tumeur continue de croître. A la différence de nombreuses tumeurs, dans le MM les cellules saines irradiées sont capables de réparer les dommages causés par l'irradiation de sorte que l'action des rayons s'exerce davantage sur la tumeur que sur les organes sains du voisinage. Dans le cas du MM, la radiothérapie est surtout utilisée dans le traitement des douleurs osseuses.

En outre, elle peut prévenir les fractures de la trame osseuse. Les fractures existantes peuvent être stabilisées par radiographie. Les effets secondaires aigus comme les inflammations sont rares. Selon la région irradiée d'autres effets secondaires peuvent se produire ; ils doivent être discutés individuellement avec le radiooncologue responsable [51, 52].

G. Critères de réponse et progression

Les critères de réponse et progression ont été définis par l'International Myeloma Working Group et ont fait l'objet d'une mise à jour récente [29, 53]. Le groupe de travail de l'HAS 2010 a réalisé la traduction (tableau IV).

H. Traitement des myélomes en rechute

Il existe différentes options de traitement du MM en rechute et la décision est prise au cas par cas. Chaque dossier médical est étudié attentivement lors de réunions multidisciplinaires.

- Abstention thérapeutique avec surveillance, dans les formes lentement évolutives (smoldering relapse des auteurs anglo-saxons).
- Chimiothérapie intensive, melphalan à haute dose suivie d'autogreffe de CSP.
- Bortezomib seul ou associé à la dexaméthasone ou une chimiothérapie (melphalan-prédnisone-bortezomib, anthracycline-bortezomib). Le bortezomib en monothérapie a une autorisation européenne dans l'indication MM en rechute, y compris pour la première rechute [54, 55]

Tableau IV : Critères de réponse et de progression du myélome selon Kyle et al, 2009 (version française).

Réponse complète - <i>Complete response (CR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Immunofixation du sérum et des urines négative ▶ et disparition de tout plasmocytome des tissus mous ▶ et moins de 5 % d'infiltration plasmocytaire au myélogramme
Réponse complète stricte - <i>Stringent complete response (sCR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Réponse complète comme décrite ci-dessus ▶ associée à un ratio de chaînes légères libres (<i>ratio FLC – free light chain</i>) normal ▶ et à l'absence de cellule clonale au myélogramme par immunohistochimie ou par immunofluorescence
Très bonne réponse partielle (TBRP) - <i>Very good partial response (VGPR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Immunoglobuline monoclonale détectable dans le sang et les urines en immunofixation mais non détectable par électrophorèse ▶ ou réduction de ≥ 90 % de l'immunoglobuline monoclonale sérique et l'immunoglobuline monoclonale dans les urines < 100 mg par 24 h
Réponse partielle (RP) - <i>Partial response (PR)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Réduction ≥ 50 % de l'immunoglobuline monoclonale sérique ▶ et réduction ≥ 90 % de l'immunoglobuline monoclonale dans les urines ou < 200 mg par 24 h ▶ Si l'immunoglobuline monoclonale n'est pas mesurable, une réduction ≥ 50 % de la différence entre le niveau des chaînes légères impliquées et non impliquées est nécessaire à la place du critère sur l'immunoglobuline monoclonale. ▶ Si l'immunoglobuline monoclonale et le niveau des chaînes légères ne sont pas mesurables, une réduction ≥ 50 % de l'infiltration plasmocytaire au myélogramme est nécessaire sous réserve que le pourcentage de base était ≥ 30 %. ▶ En plus des critères ci-dessus, une réduction de la taille des plasmocytomes des tissus mous de ≥ 50 % est nécessaire, si présents avant traitement.

Suite du tableau V.

Maladie stable - <i>Stable disease (SD)</i>	Ne répond pas aux critères des CR, sCR, VGPR, PR ou PD
Maladie en progression - <i>Progressive disease (PD)</i>	<p>Augmentation de 25 % par rapport à la valeur de réponse la plus basse pour au moins un des points suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ immunoglobuline monoclonale sérique (l'augmentation absolue doit être $\geq 0,5$ g/100 mL) ▶ immunoglobuline monoclonale dans les urines (l'augmentation absolue doit être ≥ 200 mg par 24 h) ▶ pour les patients dont l'immunoglobuline monoclonale n'est pas mesurable dans le sang ou les urines : la différence entre le niveaux des chaînes légères impliquées et non impliquées (l'augmentation absolue doit être > 100 mg/L) ▶ pourcentage d'infiltration plasmocytaire (le % absolu doit être ≥ 10 %) <p>Développement de nouvelles lésions osseuses ou de plasmocytomes des tissus mous ou augmentation de la taille d'une lésion osseuse ou des tissus mous préexistants</p> <p>Développement d'une hypercalcémie (calcémie corrigée $> 11,5$ mg/100 mL) ne pouvant être attribué à une autre cause</p>

- Lenalidomide associé à la dexaméthasone. Cette association a une autorisation européenne dans l'indication MM en rechute, y compris pour la première rechute [56, 57].

- Thalidomide seul ou associé à la dexaméthasone ou à une chimiothérapie [58, 59].

Il n'y a pas actuellement de traitement standard pour une rechute ou une progression de MM. Dans les études phase III randomisées avec bortezomib et lenalidomide, le bras contrôle reste la dexaméthasone seule, mais ce traitement n'est pas considéré, en Europe, comme un standard.

La décision thérapeutique dépend de plusieurs paramètres :

- Age du malade (+/- 65 ans).

- Traitements antérieurement reçus.
- Durée de la première rémission (traitement antérieur reconduit si la rechute survient après 1 ou 2 ans et abandonné si la rechute survient en moins d'un an).
- Circonstances de la rechute (sous traitement ou après arrêt du traitement).
- Disponibilité de cellules souches hématopoïétiques.
- Etat général, co-morbidités.

Les traitements adjuvants et symptomatiques restent essentiels. Le dosage de la 25-hydroxyvitamine D (D2 + D3) est réalisé afin de rechercher une insuffisance/carence vitaminique D justifiant un traitement spécifique (le MM et ses traitements étant un facteur de risque de fragilisation osseuse). Une supplémentation vitamino-calcique éventuelle doit être étroitement surveillée en raison du risque d'hypercalcémie. Un traitement antithrombotique prophylactique doit être instauré en cas de risque lié au patient et/ou à la nature des traitements (dose élevée de dexaméthasone, ou de chimiothérapie). Et plus particulièrement, lors de l'utilisation d'un médicament de la famille des IMiD[®], le risque de survenue d'événements thromboemboliques artériels et veineux est accru.

- **Place de l'autogreffe en rechute :**

- Pour les patients de plus de 65 ans : l'autogreffe n'est pas recommandée.
- Pour les patients de moins de 65 ans : l'autogreffe en première rechute peut être envisagée dans les conditions suivantes :
 - Patients qui, bien que ne présentant pas de contre-indication à l'autogreffe, n'en ont pas bénéficié en première ligne. Dans ce cas, la survie est la même que chez les malades ayant reçu une autogreffe en première intention.
 - Rechute plus d'un an après une première autogreffe.

- L'autogreffe ne doit être réalisée que si le nombre de cellules souches hématopoïétiques CD34+ est supérieur à $2 \times 10^6 / \text{kg}$.

- **Place de l'allogreffe en rechute :**

L'allogreffe peut être proposée si le patient a un donneur HLA identique (familial ou donneur de fichier). Les techniques de conditionnement atténué doivent être préférées au conditionnement myéloablatif qui entraîne une lourde mortalité chez les malades en rechute (50 à 65 ans) après un traitement intensif (autogreffe). L'allogreffe à conditionnement atténué peut être proposée jusqu'à 65 ans, et uniquement si le traitement préalable a permis de réduire la masse tumorale.

- **Les traitements conventionnels en rechute :**

En première rechute, le bortezomib, le lenalidomide ou la thalidomide peuvent être utilisés, seuls ou en association avec la dexaméthasone et/ou la chimiothérapie. Les associations thalidomide ou lenalidomide et dexaméthasone (ou plus complexes) induisent un risque de thrombose veineuse profonde et justifient un traitement anti-thrombotique prophylactique.

Le thalidomide, le bortezomib et le lenalidomide donnent environ 30% de réponses chez des patients lourdement prétraités et sont souvent utilisés à ce stade. Le choix dépend notamment des traitements antérieurs (efficacité, toxicité). Le bortezomib présente moins de toxicité rénale que les médicaments de la famille des IMiD[®] (thalidomide). D'autres associations avec les corticoïdes, les anthracyclines, les alkylants sont possibles. En Aquitaine, il n'y a pas de protocole standard. Chaque dossier est discuté en RCP pour adapter au mieux le traitement. Il faut privilégier l'inclusion dans les protocoles ([www .e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr), onglet Les essais cliniques / Registre des essais cliniques). Pour les patients hors protocoles, différentes associations sont possibles, selon les associations reçues en première ligne de traitement et le délai de survenue de la rechute : Reprise de la chimiothérapie initiale, ou dexaméthasone associée à Thalidomide[®] ou Velcade[®] ou Révlimid[®] ou bien autres médicaments développés dans le MM comme la Bendamustine (AMM) [30].

II. Propriétés pharmacologiques, pharmacocinétiques et pharmacie clinique du bortézomib

A. Propriétés physico-chimiques

Le bortézomib (BTZ), [N-(2,3-pyrazine)carbonyle-L-phénylalanine-L-leucine acide borique] (figure 5), est un acide boronique dipeptidique de petit poids moléculaire (384.243 Da) [10]. Il a été développé par le laboratoire Millenium Pharmaceuticals sous le code PS-341 et testé dans les hémopathies malignes et les tumeurs solides [60]. Le bortézomib a eu l'AMM en France en 2005 sous le nom de spécialité Velcade®. La solubilité du monomère du bortézomib est de 3,3 à 3,8 mg/ml pour un intervalle de pH allant de 2 à 6,5. Il est caractérisé par deux fonctions NH peu basiques et contient une fonction B-OH au pouvoir chélateur.

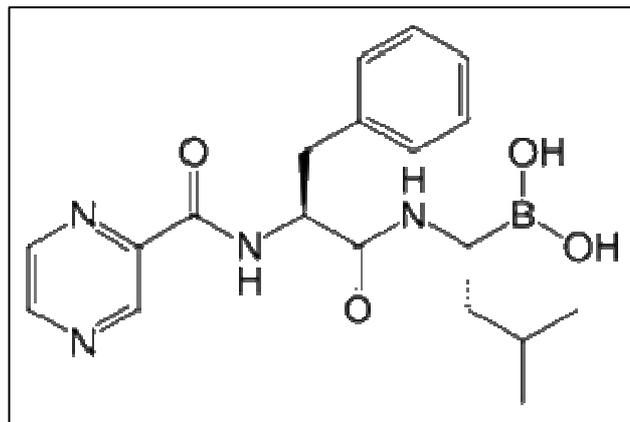


Figure n°5 : Structure chimique du Bortézomib [61].

Le BTZ se présente sous forme de poudre lyophilisée sous forme d'ester boronique de mannitol. En l'absence de conservateurs, la manipulation du BTZ doit être réalisée selon une technique d'asepsie stricte. Une fois reconstitué, l'ester de mannitol est en équilibre avec son produit d'hydrolyse, l'acide boronique monomérique. Après reconstitution avec 3,5 ml de chlorure de sodium injectable 0,9% (dissolution complète en moins de 2 minutes), chaque flacon de BTZ 3,5 mg permet d'obtenir une solution

d'une concentration de 1 mg/ml. La solution reconstituée est claire et incolore, avec un pH final de 4 à 7. Elle doit être inspectée visuellement avant l'administration, pour vérifier l'absence de particules et un changement de couleur. En cas de changement de couleur ou si des particules sont observées, le produit reconstitué doit être rejeté [62].

B. Propriétés pharmacodynamiques

Le BTZ est un inhibiteur réversible et sélectif du protéasome 26S [2]. Il est puissant puisque sa constante d'inhibition est très faible ($K_i \sim 0.62 \text{ nM}$) [63]. A des concentrations de 10 μM , le BTZ n'exerce aucune inhibition sur une large variété de récepteurs et de protéases sélectionnés, et il est plus de 1500 fois plus sélectif pour le protéasome que pour l'enzyme présentant l'affinité la plus proche. Cette inhibition requière la formation de liaison « dative » entre le N-terminal de la thréonine du site « chymotripsique » et l'atome du bore [64]. La cinétique de l'inhibition du protéasome a été évaluée *in vitro*, et il a été montré que le bortezomib se dissociait du protéasome avec une demi-vie de 20 minutes, démontrant ainsi que l'inhibition du protéasome par le BTZ est réversible [65].

Le protéasome 26S est une enzyme qui a pour rôle de dégrader les protéines qui ont été conjuguées à l'ubiquitine. Ces protéines sont essentielles au niveau, entre autres, du maintien de l'intégrité cellulaire, de la croissance tumorale, du chimiotactisme, de l'angiogenèse et de l'apoptose. Or, en inhibant le protéasome 26S, le BTZ prévient la dégradation de ces protéines, ce qui entraîne une diminution de la croissance tumorale et l'apoptose de la cellule cancéreuse [2, 66, 67].

Les données d'études *in vitro*, *ex vivo* et sur modèles animaux avec le BTZ suggèrent une augmentation de la différenciation et de l'activité ostéoblastique et une inhibition de la fonction ostéoclastique. Ces effets ont été observés chez des patients atteints de myélome multiple avec ostéolyse avancée et traités par le BTZ [65].

C. Propriétés pharmacocinétiques

1. Propriétés pharmacocinétiques générales

Après administration en bolus intraveineux d'une dose de 1,0 mg/m² et 1,3 mg/m² à 11 patients ayant un MM et une clairance rénale supérieure à 50 ml/min, les pics plasmatiques moyens après la première injection de BTZ étaient compris entre 57 et 112 ng/ml respectivement. Après les injections suivantes, les pics plasmatiques moyens observés variaient de 67 à 106 ng/ml à la dose de 1,0 mg/m² et de 89 à 120 ng/ml à la dose de 1,3 mg/m² [68].

Il est important de préciser que la pharmacocinétique du BTZ n'a pas été entièrement élucidée. Plus de 90% du BTZ sont éliminés du compartiment plasmatique dans les 15 minutes suivant son administration intraveineuse [67]. Il se distribue de façon importante avec un volume de distribution de plus de 500 litres [67, 69]. Le volume de distribution moyen (V_d) du BTZ varie de 1659 L à 3294 L après injection unique ou injections répétées de 1,0 mg/m² ou 1,3 mg/m² chez les patients ayant un MM [68]. Il est métabolisé principalement par déboronation oxydative au niveau des cytochromes P450(CYP) 3A4 et 2C19 et plus faiblement au niveau des CYP2D6, 2C9 et 1A2 [2]. Des études *in vitro* sur microsomes hépatiques humains et sur des iso-enzymes du cytochrome P450 issus de l'ADNc humain indiquent que le BTZ est métabolisé en premier lieu par les voies oxydatives via les enzymes du cytochrome P450, 3A4, 2C19 et 1A2 [68]. Les métabolites ainsi formés sont ensuite hydroxylés [2, 67]. Ces derniers sont inactifs en tant qu'inhibiteurs du protéasome [70]. La demi-vie ($T_{1/2}$) d'élimination moyenne du BTZ varie entre 9 et 15 heures [2]. La $T_{1/2}$ biologique est d'environ 24 heures [54], ce qui entraîne une durée d'action de 72 heures au niveau de l'inhibition du protéasome [67]. La demi-vie d'élimination moyenne du BTZ après administration multiples variait de 40 à 193 heures. Le BTZ est éliminé plus rapidement après la première injection par rapport aux injections suivantes [68].

2. Populations particulières

- **Insuffisants rénaux :**

Il ne semble pas y avoir une relation entre l'inhibition du protéasome et la fonction rénale. Une étude pharmacocinétique menée chez les patients présentant divers

degrés d'insuffisance rénale classés en fonction de leurs valeurs de clairance de la créatinine et ayant reçus par voie intraveineuse des doses de 0,7 à 1,3 mg/m² de Velcade deux fois par semaine montre que l'exposition au BTZ (dose normalisée ASC et Cmax) est comparable entre tous les groupes [67].

- **Insuffisants hépatiques :**

L'effet d'une insuffisance hépatique sur la pharmacocinétique du BTZ a été évalué au cours d'une étude de phase I pendant le premier cycle de traitement, incluant 61 patients atteints de tumeurs solides primaires et présentant des degrés d'insuffisance hépatique, traités par des doses de BTZ allant de 0,5 à 1,3 mg/m². En comparaison avec les patients présentant une fonction hépatique normale, une insuffisance légère n'a pas entraîné d'altération de l'ASC du BTZ normalisée en fonction de la dose. Cependant, les valeurs moyennes de l'ASC normalisée en fonction de la dose ont été augmentées d'environ 60% chez les patients présentant une insuffisance hépatique modérée ou sévère. Une dose initiale plus faible est donc recommandée chez les patients souffrant d'insuffisance hépatique modérée ou sévère, et ceux-ci doivent être étroitement surveillés [68].

- **Grossesse et allaitement :**

Le potentiel tératogène du BTZ n'a pas été complètement étudié. Il n'existe pas de données cliniques sur l'utilisation pendant la grossesse. Les hommes et femmes en période d'activité génitale doivent avoir une contraception efficace durant le traitement et pendant les 3 mois qui suivent le traitement par BTZ. Si le BTZ est utilisé au cours de la grossesse ou si la patiente tombe enceinte au cours d'un traitement par ce médicament, il est nécessaire que celle-ci soit informée des risques potentiels pour le fœtus.

Il n'a pas été établi si le BTZ est excrété dans le lait humain. Compte tenu du risque d'effets indésirables graves chez les nourrissons allaités, l'allaitement doit être interrompu au cours du traitement [65].

3. Variabilité interindividuelles

Les CYP constituent une « superfamille » d'enzymes impliquées dans le métabolisme et l'élimination des médicaments. Cette « superfamille » est divisée en familles et sous

familles en fonction de leurs séquences en acides aminés. Elles peuvent être localisées dans le foie ou au niveau d'autres organes tels que l'intestin. D'un point de vue identification, CYP3A4 signifie qu'il s'agit d'une enzyme qui appartient à la famille 3 et à la sous-famille A et qui est codée par le gène 4. La plupart des médicaments sont métabolisés par seulement 5 isoenzymes : 3A4, 1A2, 2C9, 2C19 et 2D6 [71]. Le CYP3A4 est localisé dans le foie et l'intestin. Les CYP3A4 et 1A2 ne seraient pas caractérisés par un polymorphisme génétique. Le CYP3A4 est inductible et son activité varie de 1 à 30 fois dans le foie et de 1 à 11 fois dans l'intestin, suivant les individus. De nombreux médicaments sont des inducteurs ou des inhibiteurs du CYP3A4. Le CYP1A2 est inductible par la fumée de cigarettes [71].

En revanche, les enzymes de la sous-famille CYP2C sont caractérisées par un polymorphisme génétique. Dans le cas des CYP2C9 et 2C19, ce polymorphisme a des conséquences cliniques : risque de toxicité et baisse d'efficacité pour certains médicaments [72]. Les études de population montrent que les individus peuvent être classés en « métaboliseurs lents » et « métaboliseurs normaux ». Les métaboliseurs lents représentent seulement 3 à 5% des caucasiens et près de 12 à 23% dans les populations asiatiques [72, 73]. Les différents génotypes du CYP2C19 sont classés en 3 groupes : métaboliseurs normaux homozygotes, métaboliseurs normaux hétérozygotes et métaboliseurs lents [74].

Le CYP2D6 est localisé dans le foie. Il n'est pas inductible. Il est également caractérisé par un polymorphisme génétique. La prévalence des métaboliseurs rapides est 1% dans la population germanique, 7% dans l'hispanique et 2-5% dans la population noire. De nombreux médicaments sont inhibiteurs du CYP2D6 [71]. Les médicaments substrats des CYP3A4, 2D6, 2C9 et 2C19 sont susceptibles d'être impliqués dans des interactions médicamenteuses.

4. Interactions médicamenteuses

Nous savons que le CYP3A4, le P450 est le plus abondant dans le foie humain et il est prédominant dans le métabolisme hépatique du BTZ. Il est judicieux d'engager des études cliniques afin d'évaluer les interactions potentielles qui peuvent se produire lors de co-administrations avec d'autres médicaments, dont plusieurs peuvent être des inhibiteurs du CYP3A4 [75]. La co-administration du BTZ avec des inhibiteurs

puissants du CYP450 comme le kétoconazole doit susciter une attention particulière à la dose prescrite du BTZ [75]. Cependant, la clairance du BTZ chez l'homme pour une dose de 1.0 mg/m² est approximativement 0.4 L/h/kg, ce qui représente le tiers du flux sanguin hépatique ; en plus, les interactions impliquant le CYP3A4 ne devraient pas être observées chez les patients. Des essais cliniques étudiant la co-administration du kétoconazole et du bortezomib ont été entrepris [76, 77]. Une étude d'interaction basée sur les données de 12 patients évaluant l'effet du kétoconazole, un puissant inhibiteur du CYP3A4, a montré une augmentation moyenne de l'AUC du BTZ de 35% (IC90% [1,032 à 1,772]). Par conséquent, les patients qui reçoivent du BTZ en association avec des inhibiteurs puissants du CYP3A4 (ex : kétoconazole, ritonavir) doivent être étroitement surveillés [65].

Les polymorphismes concernant la famille CYP2C, notamment le CYP2C19, sont connus et la population des métaboliseurs lents avec une capacité « S-mephenytoin 4'-hydroxylation » diminuée a été identifiée [78]. Le CYP2C19 est absent approximativement dans 15 à 30% de la population asiatique, ce qui nécessite des précautions lors d'administration du BTZ chez les patients asiatiques [75, 79]. Le fait que cinq isoformes du CYP450 majeures participent au métabolisme hépatique du BTZ doit attirer notre attention vis-à-vis du risque d'interactions médicamenteuses lors de l'administration de modulateurs ou de substrats du CYP3A4 ou bien de la présence de polymorphismes des isoformes [75].

En l'absence de données d'études d'interaction recherchant l'effet des inducteurs du CYP3A4 sur la pharmacocinétique du BTZ, les patients qui reçoivent du BTZ en association avec des inducteurs puissants du CYP3A4 (ex : rifampicine) doivent être étroitement surveillés [65].

Une étude d'interaction évaluant l'effet de melphalan-prédnisone sur le bortezomib a montré une augmentation de 17% de son AUC, à partir des données de 21 patients. Ceci n'est pas considéré comme cliniquement pertinent [65].

Au cours des essais cliniques, des hypoglycémies et hyperglycémies ont été respectivement peu fréquemment et fréquemment rapportées chez des patients diabétiques recevant des hypoglycémifiants oraux. Les patients sous antidiabétiques

oraux recevant le BTZ peuvent nécessiter une surveillance étroite de leur glycémie, et une adaptation de la dose de leurs antidiabétiques [65].

Il n'y a pas de données sur l'interaction entre le BTZ et les antirétroviraux mais des précautions sont recommandées. Les inhibiteurs non nucléosidique de la transcriptase inverse (Inducteurs du CYP) diminuent la concentration du BTZ, tandis que les inhibiteurs de protéase (inhibiteurs du CYP) l'augmente [80]. La découverte d'un myélome multiple chez un patient infecté par le VIH est un phénomène assez rare. L'association de ces deux pathologies complique la prise en charge, mais le traitement antirétroviral semble influencer l'évolution de la tumeur plasmocytaire. Chez un patient infecté par le VIH depuis 1997, il a été découvert un myélome multiple en 1998. Son infection à VIH est contrôlée sur le plan immunovirologique. Néanmoins, les infections opportunistes, les effets indésirables des médicaments et les interactions médicamenteuses compliquent l'évolution et nécessitent plusieurs modifications de traitement. Malgré ces événements et l'absence de traitement spécifique depuis 2002, le myélome est stabilisé au niveau clinique, radiologique et électrophorétique. Ce cas illustre la difficulté de prise en charge de deux pathologies immunosuppressives. Cet exemple rappelle également la difficulté de l'utilisation des traitements antirétroviraux. Il est difficile de trouver un compromis satisfaisant entre l'efficacité clinique et le maintien de la qualité de vie du patient. L'évolution favorable du myélome, malgré l'absence prolongée de traitement spécifique, soulève aussi quelques interrogations : certains antirétroviraux pourraient avoir d'autres cibles que les enzymes virales et posséder une activité antitumorale significative [81].

Le BTZ est un inhibiteur faible des CYP1A2, 2C9, 2D6, 3A4 et 2C19 [2]. A ce jour, aucune étude publiée sur les interactions avec le BTZ. Par contre, la prudence est de mise lorsque le BTZ est administré en concomitance avec d'autres médicaments qui induisent ou inhibent ces mêmes isoenzymes (par ex., érythromycine, kétoconazole, corticostéroïdes, phénytoïne, etc.) [2, 82].

Une surveillance du ratio normalisé international doit être envisagée lors d'un traitement associant un anticoagulant oral (Fluindione) et le BTZ. Il est nécessaire d'informer les médecins, les pharmaciens et les patients de cette interaction potentielle afin d'en assurer une gestion optimale [83].

D. Effets indésirables et surdosage

Le tableau V décrit les effets indésirables les plus souvent rapportés chez les sujets ayant reçu le BTZ à une dose de 1,3 mg/m² dans l'étude APEX [84]. Il présente également les effets indésirables rapportés par les sujets traités par la dexaméthasone.

Les effets indésirables très fréquents d'après le CNIL 2010 sont les suivants :

- Infections : zona (y compris diffus)
- Affections hématologiques et du système lymphatique : thrombocytopénie, neutropénie et anémie.
- Troubles du métabolisme et de la nutrition : diminution de l'appétit.
- Affections du système nerveux : neuropathies périphériques, neuropathies sensitives périphériques, paresthésies, céphalées.
- Affections respiratoires : dyspnées.
- Affections gastro-intestinales : vomissements, diarrhées, nausées, constipation.
- Affections de la peau : éruption cutanée.
- Affections musculo-squelettiques : myalgie.
- Troubles généraux : fatigue, pyrexie [65].

Chez les patients, des surdosages à des doses deux fois supérieures à la dose recommandée ont été associés à une survenue brutale d'hypotension symptomatique et à des thrombopénies d'évolution fatales. Il n'y a pas d'antidote spécifique connu en cas de surdosage par BTZ. Dans l'éventualité d'un surdosage, les signes vitaux du patient doivent être surveillés et des traitements de soutien doivent être administrés afin de maintenir la pression artérielle (solutés de remplissage, agents inotropes et vasopresseurs) et la température corporelle [68].

Tableau V : Effets indésirables les plus fréquents rapportés par les sujets de l'étude APEX par le bortezomib dexaméthasone [87].

Effet indésirable	Incidence (%)					
	Bortezomib (n = 331)			Dexaméthasone (n = 332)		
	Toute gravité	Gravité de grade 3	Gravité de grade 4	Toute gravité	Gravité de grade 3	Gravité de grade 4
Diarrhées	57	7	<1	21	2	0
Nausées	57	2	0	14	0	0
Fatigue	42	5	<1	32	4	0
Constipation	42	2	0	15	1	0
Neuropathie périphérique	36	7	1	9	<1	<1
Trombocytopénie	35	26	4	11	5	1
Vomissements	35	3	0	6	1	0
Pyrexie	35	2	0	16	1	<1
Anémie	26	9	1	22	10	1
Céphalée	26	1	0	13	1	0
Anorexie	23	3	0	4	<1	0
Paresthésie	21	2	0	8	0	0
Dyspnée	20	5	<1	17	3	1
Toux	21	1	0	11	<1	0
Neutropénie	19	12	2	2	1	0
Insomnie	18	<1	0	27	2	0
Rash	18	1	0	6	0	0
Dlr osseuse	16	4	0	15	3	0
Dlr abdominale	16	2	0	4	<1	0
Dlr membres inférieurs	15	2	0	7	1	0

Légende : Dlr : douleur

Note : Les valeurs statistiquement significatives apparaissent en foncé dans le tableau.

E. Posologies et modalités d'administration

- **Posologies en monothérapie :**

La posologie initiale recommandée de BTZ est de 1,3 mg/m², 2 fois par semaine pendant 2 semaines (jours 1, 4, 8 et 11), suivi d'un intervalle libre de 10 jours sans traitement (jours 12 – 21), période de 3 semaines considérée comme un cycle de traitement. Au moins 72 heures doivent s'écouler entre deux doses consécutives de BTZ après deux doses consécutives de BTZ [85].

Les patients en réponse complète confirmée doivent recevoir 2 cycles supplémentaires de BTZ après confirmation de la réponse. Il est également recommandé pour les patients répondeurs mais n'obtenant pas une rémission complète un total de 8 cycles de traitement. Les données sur la réadministration de BTZ restent limitées.

Une étude pharmacocinétique et pharmacodynamique a comparé les doses de BTZ à 1.0 mg/m² et 1.3 mg/m² chez 21 patients chacune. Elle a montré qu'à la suite d'administrations répétées du BTZ, la diminution de la clairance plasmatique était associée à l'augmentation de l'exposition systémique. Le BTZ est actif et bien toléré aux deux doses avec un retour d'activité du protéasome à l'état initial entre les administrations successives [86].

- **Posologies en association :**

Le Velcade[®] est administré en association au Melphalan par voie orale et à la prédnisone par voie orale sur neuf cycles thérapeutiques de 6 semaines. Au cours des cycles 1 à 4, le Velcade est administré deux fois par semaine (aux jours 1, 4, 8, 11, 22, 25, 29 et 32). Au cours des cycles 5 à 9, le Velcade[®] est administré deux fois par semaine (aux jours 1, 8, 22 et 29). Melphalan et prédnisone doivent être administrés par voie orale les jours 1, 2, 3 et 4 de la première semaine de chaque cycle [62].

- **Ajustement de la posologie :**

Le traitement par Velcade[®] doit être interrompu en cas d'apparition d'une toxicité non hématologique de grade 3 ou d'une toxicité hématologique de grade 4, à l'exception des neuropathies (Tableau VI) [62].

- Après disparition des symptômes liés à la toxicité, le traitement par Velcade[®] peut être réintroduit à une dose réduite de 25% (1,3 mg/m² réduit à 1,0 mg/m² ; 1,0 mg/m² réduit à 0,7 mg/m²).

- En cas de persistance ou de récurrence de la toxicité à la dose inférieure, l'arrêt de Velcade[®] doit être envisagé, sauf si les bénéfices du traitement l'emportent nettement sur les risques.

- Les patients présentant une neuropathie sévère préexistante peuvent être traités par Velcade[®] uniquement après une évaluation soignée du rapport risque/bénéfice.

Tableau VI : Ajustements posologiques recommandés du bortézomib en fonction de la toxicité [87].

Effet secondaire ou toxicité	Ajustement posologique recommandé du bortézomib
Neuropathie périphérique	
Grade 1 (paresthésie et/ou perte de réflexes sans douleur ou perte de fonction)	Aucun ajustement requis
Grade 1 avec douleur ou grade 2 (perturbant la fonction, mais non les activités de la vie quotidienne)	Diminuer le bortézomib 1,0 mg/m ²
Grade 2 avec douleur ou grade 3 (interfère avec les activités quotidiennes)	Interrompre le bortézomib jusqu'à résolution des symptômes et reprendre le bortézomib à 0,7 mg/m ² 1 fois par semaine pour 2 semaines
Grade 4 (perte de sensation permanente avec perte de fonction)	Cesser le bortézomib
Toxicité hématologique	
Grade 1 à 3	Aucun ajustement requis
Grade 4 (plaquettes \leftarrow 25,0 x 10 ⁹ /L ou neutrophiles $<$ 0,5 x 10 ⁹ /L ou hémoglobine \leftarrow 65 g/L)	Interrompre le bortézomib jusqu'à résolution de la toxicité et diminuer la dose de 25 %
Toxicité non hématologique (p. ex. diarrhée, nausées, fatigue) sauf neuropathie périphérique	
Grades 1 et 2	Aucun ajustement requis
Grades 3 et 4	Interrompre le bortézomib jusqu'à résolution de la toxicité et diminuer la dose de 25 %

En 2011, le réseau régional de cancérologie «ONCOMIP» résume les ajustements posologiques du BTZ dans le tableau VII [88].

**Tableau VII : Ajustements posologiques recommandés du bortézomib
selon l'ONCOMIP [88].**

Velcade :	
Dose initiale	1,3 mg/m ² J1 J4 J8 J11.
Adaptation quantitative	dose réduite à 1 mg/m ² voir 0,7 mg/m ² .
Adaptation temporelle	dose administrée à J1 J8 J15 J22.
Produit hématotoxique et neurotoxique.	
Prophylaxie par Bactrim forte 1 cp 3x/semaine et Zelitrex 1 cpx2/j.	
Début d'un cycle	si PNN >1000 et Pq >70000.
Velcade en cours de cycle	si PNN >750 et Pq >30000.
Toxicité de grade 3 ou 4 non hématologique :	
	attendre la réduction des symptômes au grade 1 puis diminuer au palier inférieur.
Si 3 doses de Velcade non administrés lors d'un cycle :	
	diminuer au palier inférieur lors du cycle suivant (1 ou 0,7 mg/m ²).

- **Administration :**

La solution de Velcade® reconstituée est administrée par injection intraveineuse en bolus de 3 à 5 secondes dans un cathéter intraveineux périphérique ou central, suivie par un rinçage avec une solution de chlorure de sodium injectable à 0,9%.

Une nouvelle modalité d'administration a été présentée lors du 52^{ème} congrès annuel de la société américaine d'hématologie (ASH). Les résultats d'une étude de phase III randomisée, multicentrique, internationale et incluant 222 patients de 53 centres dans 10 pays différents ont reçu le Velcade®, soit par voie sous-cutanée (SC), soit par voie intraveineuse (IV). Ils ont démontré l'efficacité, l'innocuité et l'impact sur la qualité de vie du patient recevant le Velcade® par voie SC. La voie d'administration sous-cutanée devrait obtenir l'AMM en France très prochainement.

La solution reconstituée de Velcade® doit être utilisée immédiatement. Toutefois, des études ont montré que la solution de Velcade® reconstituée était physiquement et chimiquement stable à 25°C dans le flacon d'origine et/ou la seringue d'administration pour une durée maximale de 8 heures après reconstitution (Fiche de Bon Usage). Une étude a démontré la stabilité de la solution du bortézomib reconstitué dans son flacon et en seringue stockée dans réfrigérateur pendant 5 jours à 4°C et même 15 jours dans son flacon initial [89, 90].

III.Revue bibliographique des méthodes utilisées dans le dosage du bortezomib au niveau plasmatique

Les différentes méthodes de dosage plasmatiques du bortezomib décrites dans la littérature sont résumées dans le tableau (VIII) [70, 75, 91-93]. Il est important de souligner qu'aucune de ces méthodes n'est validée selon les normes **FDA** [5].

Ces différentes méthodes présentent des points communs : traitement de l'échantillon plasmatique par précipitation liquide, mode de détection ESI positif et enfin méthode de quantification basée sur une seule transition d'ions. Notre méthode utilise le mode ESI positif. Cependant, les échantillons plasmatiques sont traités par extraction solide-liquide qui constitue un mode d'extraction plus spécifique et donc plus productif.

les phases mobiles utilisées sont principalement l'eau 0.1% Acide formique et l'acétonitrile (ACN) 0.1% Acide formique sauf pour Labutti et al., qui utilisent un tampon formiate d'ammonium 10 mM et du méthanol [92, 93].

Nous avons utilisé deux transitions une transition pour l'identification et une transition pour la quantification. Il s'agit du mode « Multiple Reaction Monitoring » (MRM), le mode le plus adapté à la quantification et le plus spécifique. Nous avons cherché également à raccourcir le temps d'analyse (T = 12 min) par rapport aux méthodes existantes (T = 95, 90, 20 min) [70, 92, 93].

Les concentrations plasmatiques rencontrées chez les patients traités par le bortezomib ont été ciblées pour le développement et la validation de la méthode. Les concentrations maximales relevées dans les études pharmacocinétiques pour une dose de bortezomib (1.300 mg/m²) sont compris entre 41.0 et 241.9 ng/ml [4, 86]. Nous avons ainsi construit une gamme d'étalonnage allant de 0 à 300 ng/ml. Notre gamme est plus adaptée que celle choisie par Papandreou et al., s'arrêtant à 100 ng/ml.

L'étalonnage est une étape incontournable dans la bioanalyse permettant de réduire le risque relatif aux différentes étapes de traitement de l'échantillon biologique. L'étalonnage interne est le mode le plus juste. Nous avons choisi ce mode

d'étalonnage nous apportant davantage d'exactitude et de justesse par rapport à d'autres méthodes établies sans l'étape de l'étalonnage [70, 92]. Nous avons choisi le carbutamide $C_{11}H_{17}N_3O_3S$ (MM = 271.3388), comme étalon interne [75, 93, 94].

Tableau VIII : Caractéristiques des méthodes utilisées dans le dosage du Bortézomib en milieu plasmatique.

Auteurs	Papandrou et al.	Uttamsingh et al.	Pekol et al.	Labutti et al.	Hsieh et al.
Technique	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS
Colonne	C18 (3.5 µm, 2.0*10.0 mm)	C18 (2.1*30.0 mm)	C18 (3 µm, 3.8*150.0 mm)	C18 (5 µm , 2.0*100.0 mm)	C18 (5 µm, 2.0*150.0 mm)
Phase mobile Gradient	A= eau 0.1% Acide formique (Ac F) B=ACN/ eau (90/10) 0.1% Ac F	A= Eau 0.1% Acide formique B= ACN 0.1% AcF Gradient : 90% A à 100%B	A= Eau 0.1% Acide formique B= ACN /eau (90/10) 0.1% Ac F Gradient : 100% A à 100%B	A= tampon Ammonium formiate 10 mM B= Méthanol Gradient : 85% A à 80%B	A= eau 0.1% Acide formique B= ACN /eau (90/10) 0.1% Ac F
Débit	500 µl/min	400 µl/min	350 µl/min	400 µl/min	250 µl/min
LOQ	0.5 ng/ml	ND	ND	ND	ND
Gamme	0.5, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0, 100.0 ng/ml	1, 2, 5, 10, 20, 40 and 50 µM	ND	ND	ND
Temps d'analyse	ND (2.5 min gradient)	ND	95 min	ND (20 min gradient)	90 min
Etalon interne	Bortézomib C ¹³	carbutamide	Non utilisé	Non utilisé	Terbutaline, kétoprofène, quinidine, doxorubicine

IV.Objectif de l'étude

Le MM représente 10 à 12% des hémopathies malignes. Son incidence dans la population est en augmentation. Le bortezomib occupe une place importante dans le traitement du MM. Ce médicament fait partie des thérapies ciblées et innovantes qui nécessite un suivi adapté notamment au niveau de son excrétion rénale, mais également au niveau des interactions médicamenteuses ainsi que son profile de tolérance [86].

Pour cela il est nécessaire d'avoir à disposition une méthode de dosage validée selon les normes FDA et optimisée par rapport que celles décrites dans la littérature.

Chapitre 2 : Partie expérimentale :

**Mise au point et validation d'une méthode de dosage au
niveau plasmatique du bortezomib par LC-MS/MS**

I. Matériels et méthodes

A. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

1. Principe

La CLHP permet de séparer les composants d'un mélange complexe d'après leurs caractéristiques physico-chimiques et d'obtenir des seuils de sensibilités faibles. La séparation par chromatographie de partage en phase inverse. Dans ce cas, plus le solvant est polaire, moins il entraîne les substances organiques peu polaires : ces dernières sont davantage retenues par la phase stationnaire faiblement polaire. L'élution des analytes peut se faire en mode isocratique ou en gradient d'élution. Le gradient d'élution se fait le plus souvent en mode binaire. Un solvant aqueux (eau ou tampon) est mélangé à un solvant organique (acétonitrile ou méthanol) de telle sorte que le pourcentage de la phase organique augmente avec le temps.

2. Composants de la chaîne chromatographique

- **Phase mobile**

Cette phase est souvent composée de plusieurs solvants (acétonitrile, eau) et de sels (tampons). Plusieurs phases mobiles ont été testées notamment l'eau 0,1% acide formique (phase A1) / acétonitrile 0,1% Acide formique (phase B1) et le tampon formiate d'ammonium (Sigma Aldrich, France) 10 mM à 3 pH différents (pH = 4, 6, 8) (phase A2, A3, A4) / acétonitrile (phase B2). Plusieurs gradients ont été essayés afin de déterminer le gradient optimal pour chaque colonne.

- **Pompe**

Une ou plusieurs pompes sont utilisées pour la circulation de la phase dite « mobile ». La pompe doit amener la phase mobile avec une grande précision de débit, condition essentielle à une bonne reproductibilité des temps de rétention. Le modèle utilisé est une pompe quaternaire permettant un mélange précis à basse pression. Un système de dégazage en ligne permet d'éliminer d'éventuelles bulles.

- **Injecteur**

L'injection se fait avec de faibles volumes d'échantillon (généralement 5 à 40 µl) pour éviter sa dispersion dans le système chromatographique et un étalement sur le chromatogramme. Un modèle à boucle permettant de garantir des injections faibles (5 µl) et une excellente reproductibilité (en mode « full loop ») est à disposition.

- **Colonne**

Après l'injecteur est placée une colonne chromatographique qu'on appelle phase « stationnaire » et qui permet la séparation. Ces phases sont formées par silanisation des groupements hydroxyle de la silice. Les colonnes devant recevoir la phase stationnaire sont généralement en acier inoxydable. Plusieurs phases stationnaires composées de chaînes carbonées de 18 et 8 atomes de carbonées (C18 et C8) ont été testées. Les dimensions sont variables. Une longueur élevée permet d'améliorer la séparation, mais au détriment du temps d'analyse et de la souplesse d'utilisation. Actuellement, les nouvelles technologies permettent d'obtenir de bonnes séparations sur des colonnes relativement courtes, de 100 voire 50 mm. Plusieurs colonnes dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau IX ont été testées. Un four à colonne CROCO-CII® (Cluzeau, France) a été utilisé.

Tableau IX : Colonnes utilisées.

Colonne	Atlantis	Kinetex	Luna
Phase stationnaire	C18, silice	C18, silice poreuse	C8, silice
Dimensions (longueur x diamètre)	30 mm x 2.1 mm	100 mm x 2.1 mm	50 mm x 1.0 mm
Fournisseur	Waters	Phenomenex	Phenomenex
Débit	300 µl/min	300 µl/min	60 µl/min

B. Spectrométrie de masse (SM)

1. Source électrospray ESI

L'électrospray a été considéré longtemps considéré comme un mode d'ionisation dédié à l'analyse des protéines, mais rapidement son utilisation a été élargie non seulement à l'analyse d'autres polymères et biopolymères, mais également à l'analyse de petites molécules polaires. Il est surtout très vite apparu que l'électrospray est la méthode de choix pour réaliser un couplage avec la chromatographie liquide.

a. Formation des gouttelettes

L'électrospray est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit (couramment 1 à 100 $\mu\text{l}/\text{min}$). Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel (DP) de 3 à 6 kV entre ce capillaire et la contre-électrode, séparés de 0,3 à 2 cm (figure 6).

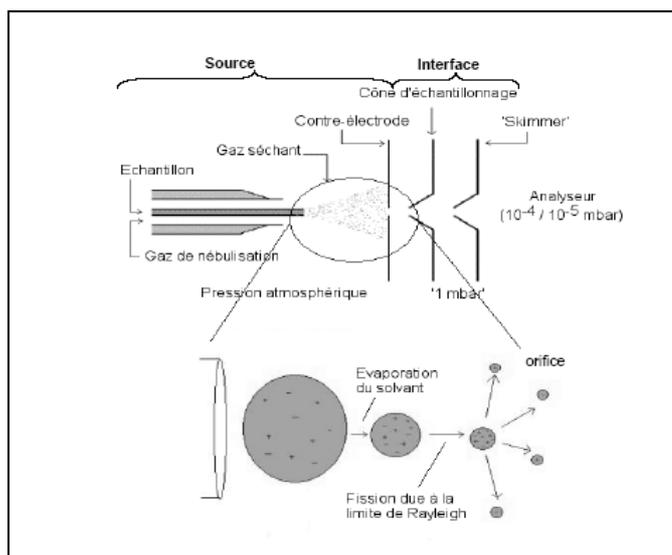


Figure n°6 : Schéma général d'une source électrospray (Micromass) [95].

La source d'ionisation par électronébulisation peut être considérée comme une cellule électrolytique. En effet, le champ électrique que subit le liquide impose un mouvement électrochimique des ions (figure 7). Par exemple, en mode positif, les cations vont vers la surface à l'inverse des anions qui migrent vers le capillaire métallique.

L'émission continue des gouttelettes fortement surchargées positivement qui forment le spray génère un excès de charges négatives qui est contrebalancé par une réaction d'oxydation à l'interface capillaire/liquide.

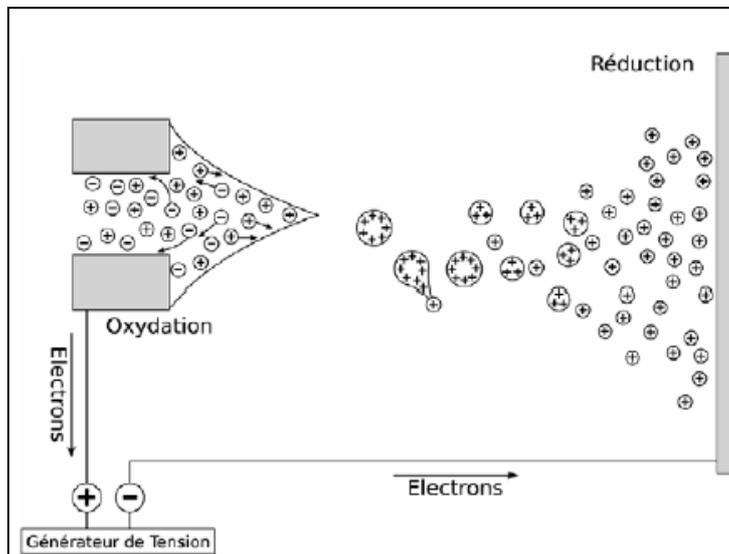


Figure n°7 : Représentation schématique du processus électrochimique de l'électrospray pour la formation des ions positifs (figure modifiée d'après Kebarle 2000) [95].

Lorsqu'un potentiel, par exemple positif, est appliqué à la solution au niveau du capillaire, l'interface air/liquide se polarise et forme quasiment un cône. Lorsque l'équilibre entre les forces électrostatiques et la tension de surface du liquide est atteint, on parle alors de cône de Taylor (figure 8).

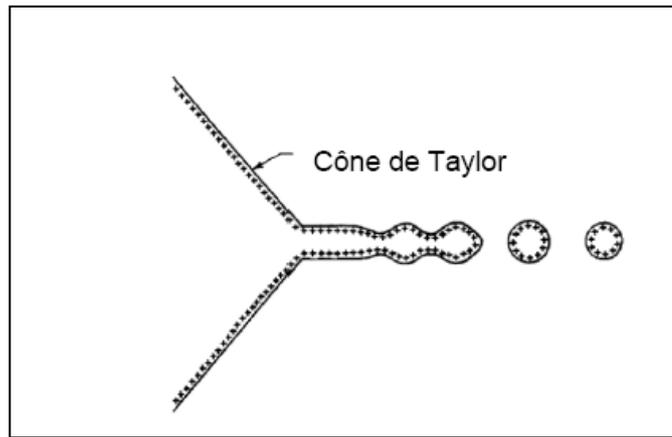


Figure n°8 : Limite de stabilité du cône de Taylor au-delà de laquelle des gouttelettes primaires sont émises (figure modifiée d'après Kebarle 2000) [95].

L'induction du processus d'électronébulisation nécessite l'application d'un champ électrique minimal : cette valeur critique de champ électrique engendre la déstabilisation du cône de Taylor et l'émission des gouttelettes chargées. Lorsque ces valeurs critiques sont atteintes, le cône de Taylor se déforme et génère des gouttelettes dites primaires possédant un excès de charges dépendant du mode de polarité. Ces gouttelettes contiennent les composants (analytes, électrolytes...) de la solution introduite dans le capillaire.

b. Générer des ions en phase gaz

A ce stade de formation des gouttelettes primaires, les ions unimoléculaires qui nous intéressent sont encore fortement solvatés. Sous l'action d'un courant d'azote concomitant à la production des gouttelettes, de la température de la source ou d'un gaz séchant à contre courant, le solvant va s'évaporer et les gouttes vont rétrécir jusqu'à ce que la tension de surface du liquide ne supporte plus les répulsions coulombiennes induites par les charges réparties à la surface. Ce point de rupture est appelé limite de Rayleigh. Cette limite de stabilité de la goutte correspond à son rayon minimum en fonction de l'excès de charges qu'elle contient. A la limite de Rayleigh, la goutte devient instable et explose en gouttelettes de taille plus petite et de densité de charge moins élevée. Ce procédé se poursuit en cascade jusqu'à libération des ions unimoléculaires en phase gazeuse. Après de multiples cycles d'évaporation-fission coulombienne de la goutte primaire, les ions sont générés en phase gazeuse et guidés par le champ électrique jusqu'à la contre-électrode. Deux modèles théoriques

présentés dans la figure 9 permettent d'expliquer le passage des ions solvatés vers la phase gazeuse :

- Modèle d'Iribarne et Thomson (Iribarne et Thomson, 1976)

Appelé modèle de l'évaporation ionique (Ion Evaporation Model ou IEM), lorsque le rayon des gouttelettes filles atteint un certain rayon inférieur à la limite de Rayleigh (< 10 nm par exemple), le champ électrique est suffisamment important pour que des ions solvatés soient émis dans la phase gazeuse (figure 9a).

Un consensus semble atteint pour considérer que l'ionisation des molécules de hautes masses s'effectue selon le modèle CRM alors que le mécanisme dominant pour les petites molécules est l'IEM [95].

- Modèle de Dole

Appelé modèle de la charge résiduelle (« Charge Residue Model » ou CRM), plusieurs fissions successives aboutissent à des gouttelettes très petites (de rayon 1 nm environ) contenant une ou plusieurs charges élémentaires mais une seule molécule d'analyte. Après évaporation du solvant, les charges se localisent sur les sites permettant de générer l'ion le plus stable en phase gazeuse (figure 9b).

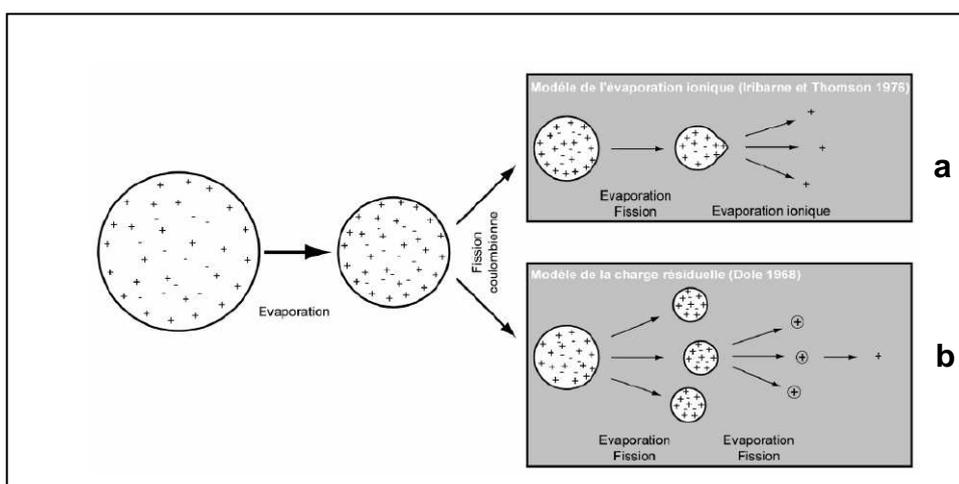


Figure n°9 : Schéma récapitulatif des deux modèles pour l'obtention d'ions en phase gazeuse par ESI, (a) modèle d'Iribarne et Thomson, (b) modèle de Dole [95].

2. Analyseur Q-TRAP

a. Principe de la trappe ionique

Paul et Steinwedel inventeurs de l'analyseur à quadripôle, ont décrit en 1960 un « ion trap » (Paul, 1960 ; Todd, 1991). Il a été modifié pour en faire un spectromètre de masse. Il est constitué d'une électrode circulaire en forme de diabol, couverte de deux calottes sphériques, appelées « électrodes chapeau ». Conceptuellement, on peut voir la trappe ionique comme un quadripôle circulaire, dont la barre intérieure est réduite à un point fictif, la barre extérieure est devenue un cercle et les deux barres supérieure et inférieure une calotte. La superposition de tensions continues et alternatives permet d'obtenir une sorte de « quadripôle à trois dimensions » dans lequel les ions sont piégés ou « trappés ».

Des chercheurs de la société FINNIGAN ont breveté en 1983 une variante de cette technique qui a connu un important développement commercial. Depuis, les performances de ces appareils ont été fortement accrues, de manière à permettre une gamme de masses plus large et des expériences de type MS/MS. Cette technique consiste à produire les ions directement dans la trappe par impact électronique. Les ions sont produits par un flux d'électrons de courte durée et piégés dans la trappe au moyen de radiofréquences uniquement. Une tension est appliquée à l'électrode circulaire et les calottes sont mises à terre. Puis, par un balayage du potentiel V_{RF} (amplitude de la radiofréquence), les ions sont expulsés de la trappe d'après leur masse croissante. Les ions se repoussent mutuellement et de ce fait ont tendance à accroître le volume qu'ils occupent par un accroissement du rayon de la trajectoire. Ce fait impose de garder dans l'analyseur une pression de gaz inerte, de manière à constamment « freiner » les ions pour qu'ils restent dans une trajectoire de petite dimension. On utilise de l'azote de manière à réduire les fragmentations induites par collisions [95].

b. Q-TRAP

Le Q-TRAP est considéré comme un triple quadripôle comme le montre la figure 10, sauf que le troisième quadripôle (Q3) est une trappe ionique. Le premier et le troisième quadripôle (Q1 et Q3) sont des analyseurs. Le quadripôle (q2) est une cellule de collision, constituée d'un quadripôle à radiofréquence seulement. Les

spectromètres de masse quadripolaires sont symbolisés par un Q majuscule tandis que le quadripôle à radiofréquence uniquement est symbolisé par un q minuscule. Dans le quadripôle central, nous pouvons introduire un gaz de collision à une pression telle qu'un ion entrant dans le quadripôle subira une ou plusieurs collisions.

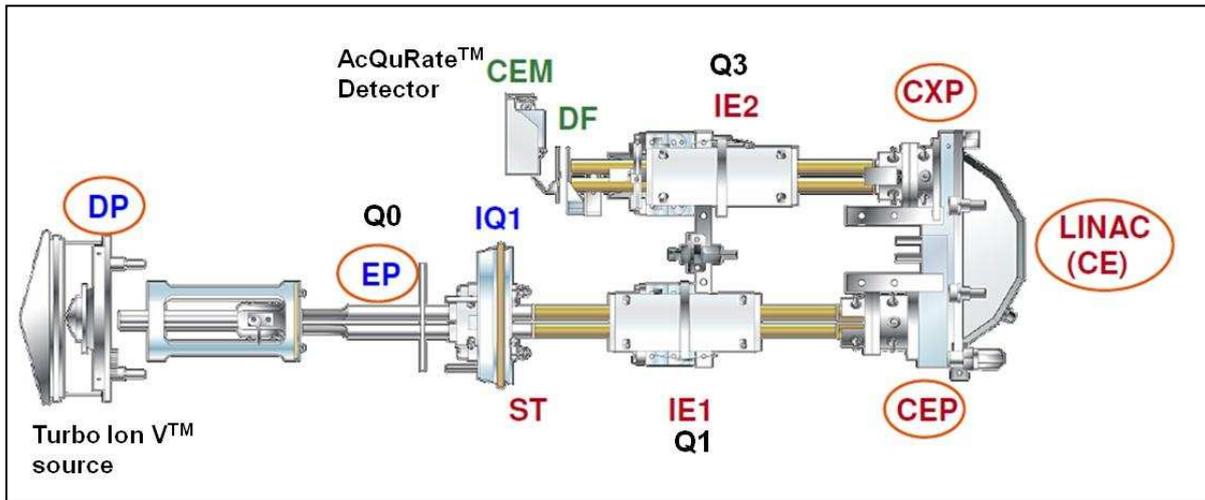


Figure n°10 : Schéma du spectromètre de masse Q-TRAP 5500. DP : Declustering Potentiel ; EP : Entrance potential ; CEP : Cell Entrance Potential ; CXP : Cell Exit Potential.

La méthode du dosage du bortezomib a été développée par notre laboratoire en collaboration avec la plateforme génomique fonctionnelle (PGF) à l'aide d'un Q-TRAP modèle 5500 de la société Applied Biosystems Sciex (Ontario, Canada) représentée avec la figure 11.



Figure n°11 : Photographie du spectromètre de masse Q-TRAP 5500 à la plateforme génomique fonctionnelle (PGF) à Bordeaux.

Les paramètres par défaut au niveau de la source ESI de notre appareil sont les suivants : pression du gaz « Curtain Gaz » (CUR = 15,0 psi), voltage (IS = 5500,0 eV) et température de (0°C) pour des débits (≤ 300 ml/min). L'ionisation est faite en mode positif. Comme le gaz (azote) est inerte, L'énergie à l'ion est transférée en convertissant une fraction de l'énergie cinétique en énergie interne. L'ion se fragmentera et les fragments seront analysés par le quadripôle Q3. Dans les appareils à quadripôles, les potentiels sont réglés de manière à ce que les ions d'un rapport m/z déterminé traversent les barres de l'analyseur. Pour le Q-TRAP le principe est différent, les ions de différents m/z sont présents simultanément dans la trappe, et on cherche à les expulser en fonction de leur m/z pour obtenir le spectre.

Les paramètres instrumentaux qu'il faut optimiser pour obtenir la meilleure trajectoire des ions sont : DP (« Declustering Potentiel »), CXP (« Collision Cell Exit Potential ») et CE (« Collision Energy ») (figure 10). Le potentiel de dissociation DP contrôle la tension appliquée au niveau de la source et influence la dissociation des molécules

injectées. Il est utilisé pour limiter l'entrée des ions dissociés issus du solvant dans l'instrument. Les molécules sont d'autant plus fragmentées que le DP augmente. En MS/MS, le CXP permet de concentrer les ions dans la cellule de collision. Ce paramètre est indépendant de la masse des ions et n'influe pas directement sur l'intensité. L'énergie de collision (CE) correspond à l'accélération que subit l'ion précurseur lorsqu'il entre en collision avec les molécules de gaz et les autres fragments dans la cellule de collision. L'optimisation a été faite en mode MS² et plus précisément en mode MRM. Ceci implique l'infusion continue d'une solution assez concentrée du produit, généralement une solution pure « standard ». L'infusion est réalisée avec un débit de 10 µl/min pour une solution de bortezomib dosée à 10 µg/ml (dilution de la SM à 1 mg/ml au 1/100 avec la solution de rinçage 90/10 ACN/eau 0.1% Ac F) et une solution de carbutamide dosée à 10.84 µg/ml (dilution 1/2500 de la SM à 1 mg/ml avec la solution de rinçage).

c. Fragmentations en mode MS²

L'analyse MS/MS peut être menée selon quatre modes différents selon l'information recherchée : le mode descendant est le plus utilisé pour obtenir des informations structurales, les deux modes (ascendant et perte de neutre) sont d'un usage plus restreint et permettent de mettre en évidence des ions ayant des particularités communes. Le quatrième mode MRM, dérivé du mode descendant, est voué à la quantification.

Le premier mode de balayage consiste à focaliser un ion d'une masse choisie dans le premier analyseur. Cet ion subit des collisions dans le quadripôle central et réagit ou se fragmente. Les produits de réaction sont analysés par le second analyseur. C'est un balayage des ions produits issus de la fragmentation de l'ion parent, ou « Product ion scan ».

Le second mode permet de focaliser le second quadripôle (Q3) sur un ion sélectionné, et à balayer les ions dans le premier quadripôle (Q1). Dans ce cas, nous détecterons tous les ions qui, en réagissant ou en se fragmentant, produisent l'ion de masse sélectionné. Nous détectons les ions parents de l'ion sélectionné d'où le nom « Precursor ion scan ».

Le troisième mode courant consiste à balayer en parallèle avec le premier et le second quadripôle, mais en imposant entre les deux un décalage de masse. On détectera ainsi tous les ions qui en se fragmentant perdent un neutre de masse constante, égale à la différence de masse entre les deux balayages des deux analyseurs. Il s'agit du balayage en perte de neutre (neutral loss scan).

Le quatrième mode : la détection de réaction sélectionnée (SRM pour « Single Reaction Monitoring ») consiste à sélectionner une réaction de fragmentation. Pour ce balayage, le premier et le deuxième analyseur sont focalisés sur les masses des ions du précurseur et du fragment choisi. Il n'y a ainsi aucun balayage. La méthode est analogue à la détection d'ions sélectionnés (SIM). Mais ici les ions choisis par le premier analyseur de masse sont seulement détectés s'ils produisent un fragment donné, par la réaction choisie. Quand il s'agit de plusieurs réactions (à partir de deux) nous parlons de mode MRM. L'ion parent à étudier est sélectionné par le premier analyseur et fragmenté dans la cellule de collision, comme en mode descendant. En revanche, le second analyseur est focalisé sur l'ion produit. Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité, au niveau des sélections de l'ion parent et de l'ion produit. En outre les deux analyseurs étant fixées à des tensions constantes, la sensibilité de détection est améliorée par rapport à d'autres modes de balayage, faisant du MRM un mode de choix pour la quantification (figure 12).

Nous avons choisi de travailler avec le mode MRM en se basant sur deux transitions afin d'être plus spécifique. Chaque transition prend en compte l'ion parent et un fragment majoritaire [95].

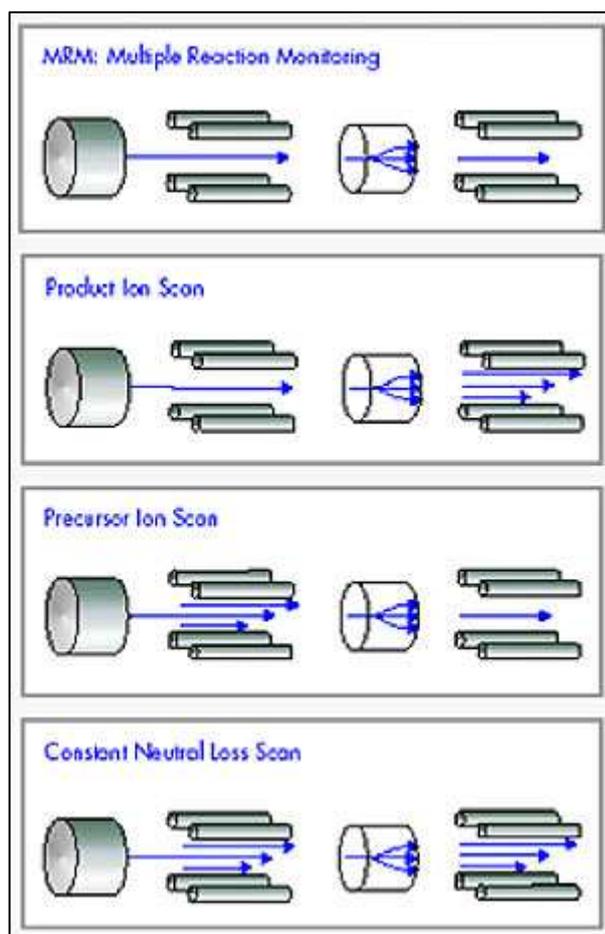


Figure n°12 : Les différents modes de fragmentation SM/SM.

C. Couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse

La technique LC-MS/MS en mode MRM est choisie. Le signal obtenu en électrospray dépend de la concentration de l'échantillon et non d'un débit massique. Il n'y a donc pas d'avantage à utiliser des débits de chromatographie élevés. De plus, le couplage avec des systèmes nano et capillaires CLHP permet un gain important en sensibilité. Nous avons testé des débits de 300 et 60 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Pour le développement de notre méthode, le système utilisé est une chaîne CLHP Ultimate 3000, pilotée informatiquement par le logiciel « Chromeleon » de Dionex (Amsterdam, The Netherlands), puis un Q-TRAP 5500 piloté par le logiciel « Analyst » version 2.5.2 (ABSciex, Canada). Un ordinateur complète ce dispositif, pour la

commande du système chromatographique, ainsi que l'acquisition et le traitement des données (figure 13).



Figure n°13 : Couplage LC-SM/SM (Plateforme Génomique Fonctionnelle, Bordeaux 2011).

D. Traitement de l'échantillon

Il n'est généralement pas possible d'injecter directement des milieux biologiques contenant les molécules à doser. Ces milieux sont d'une grande complexité, avec de nombreux composés endogènes (par exemple le plasma contient de 65 à 70 g/L de protéines). Ceci oblige à prétraiter les échantillons de manière à extraire la molécule du milieu et à obtenir une solution limpide.

Différents types de prétraitement sont envisageables:

1. Précipitation des protéines

Les acides, notamment l'acide trichloracétique et l'acide perchlorique, à une concentration de 5 à 20%, sont très efficaces pour précipiter les protéines

plasmatiques. Ces dernières sont sous forme cationique à pH faible et forment des sels insolubles avec les acides. Certains solvants organiques (acétonitrile, méthanol, éthanol...) sont aussi très utilisés, même s'ils sont peu efficaces. Leur avantage est d'être plus compatible avec les systèmes CLHP, plus particulièrement les systèmes LC-MS.

Ce type de prétraitement est simple, rapide et peu coûteux, mais ne permet pas toujours d'obtenir des échantillons suffisamment « propres », et n'est pas spécifique : seules les protéines sont éliminées. Le protocole suivant a été testé : Rajouter 50 µl de solution d'EI (200 ng/ml) et 1000 µl de solution d'ACN 0.1% Af (froid, 4°C) à 250 µl de plasma ou de solution aqueuse (blanc ou chargé de bortezomib à C = 20 ng/ml) puis mixer pendant 10 minutes (15 000 rpm, 15°C) et enfin récupérer le surnageant et évaporer sous azote.

2. Extraction liquide-solide (SPE)

C'est la technique la plus récente et présente de nombreux avantages. Comme la chromatographie, cette technique utilise les propriétés d'un analyte à être retenu sur une phase stationnaire, composée de particules de silice greffées par des groupements variables. Comme en HPLC, la rétention peut se faire en phase normale, en phase inverse ou par échange d'ions.

Les deux techniques ont été testées, précipitation des protéines et la SPE avec différents sorbants (Strata X, HLB, échange d'ions X-AW et X-CW) de Phenomenex (Torrance, Ontario, Canada), afin de comparer leurs rendements. Nous avons présenté un des protocoles testés sur les cartouches StrataX dans la figure 14. Nous avons utilisé un extracteur automatique GX-271 LIQUIDHANDLER (Gilson, Middleton USA) piloté par le logiciel TRILUTION™ LH Software (2006). Les solutions du bortezomib et de l'EI utilisées étaient dosées à 20.0 et 200.0 ng/ml respectivement. Une concentration faible de bortezomib a été choisie afin d'éviter le phénomène d'accumulation de ce dernier dans la colonne chromatographique. Ceci nous permet également de tester la sensibilité des deux types d'extraction.

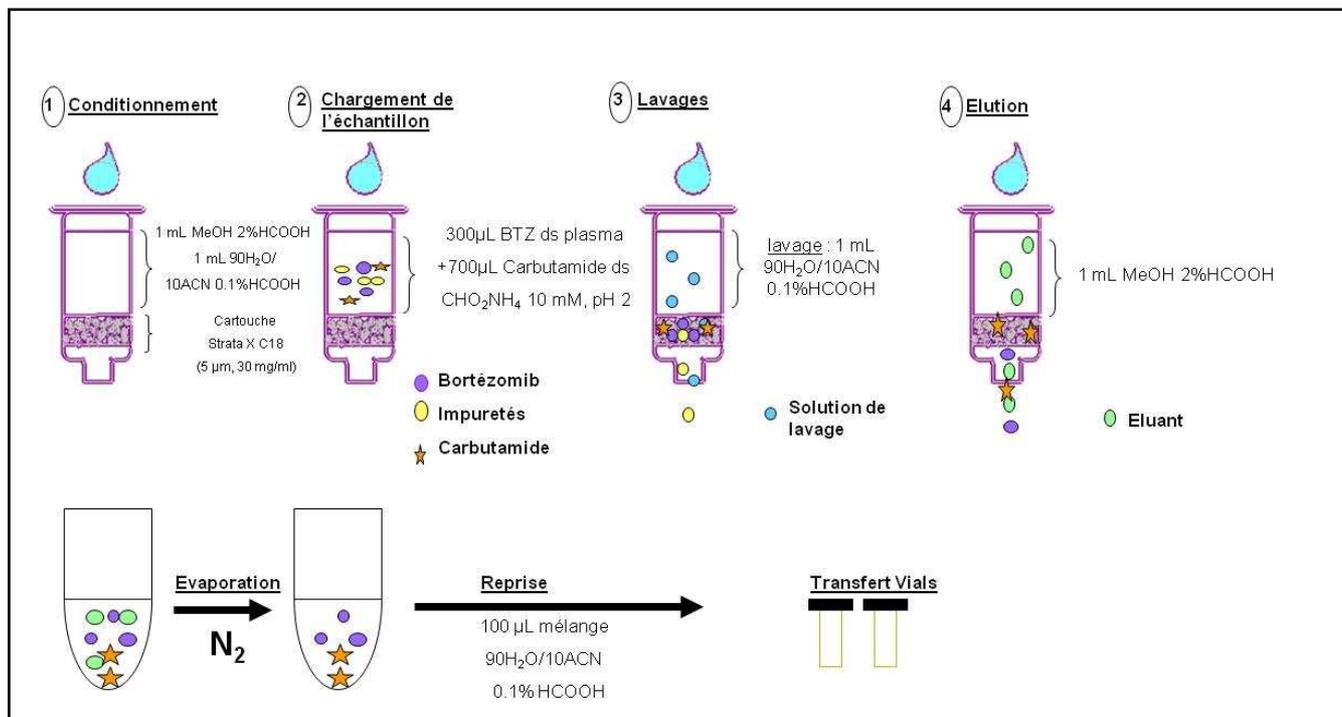


Figure n°14 : Protocole expérimental de la SPE sur StrataX C18.

E. Validation d'une méthode analytique pour un milieu biologique

La validation de notre méthode de dosage suit les normes FDA 2001. Nous procédons à la validation pour assurer la fiabilité et la reproductibilité de la méthode en déterminant les paramètres spécifiques suivants : limite de détection (LOD), limite de quantification (LOQ), linéarité, répétabilité intra- et inter-journalière (exactitude, précision), spécificité et sélectivité.

✓ Spécificité et sélectivité

Six blancs plasmatiques et une concentration LOQ ont été injectés pour vérifier l'absence d'interférence avec des composés endogènes et exogènes.

✓ Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

La LOD et la LOQ sont définies respectivement par la concentration donnant le rapport signal sur bruit de 3 et de 10 sur le chromatogramme. La LOQ est définie par la concentration minimum donnant des résultats précis, avec une erreur relative inférieure à 20%. Nous l'avons déterminée en injectant cinq fois chacun des échantillons de concentrations décroissantes.

✓ **Linéarité**

La gamme d'étalonnage est composée de 7 concentrations du bortezomib dans le plasma humain : 0, 4, 25, 50, 100, 200, et 300 ng/ml. Les dilutions successives sont réalisées à partir de la solution mère du bortezomib de 1 mg/ml à l'aide du plasma humain. La gamme est fabriquée extemporanément à chacun des jours de la validation analytique.

Les calculs de la quantification sont réalisés grâce au logiciel Analyst, et étudient le rapport entre les aires des pics du bortezomib et les aires de l'EI. Une droite de régression linéaire est calculée en utilisant l'équation $y = ax + b$, où y est le rapport des aires des pics, x la concentration en bortezomib et a et b deux constantes. Les concentrations inconnues sont calculées à partir de l'équation de régression linéaire des ratios des pics contre les concentrations de la gamme d'étalonnage.

La linéarité de la droite de calibration est importante à tester. Le coefficient de détermination r^2 (test de Pearson's) doit être supérieur à 0,99 et l'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées doit être la plus proche de zéro (test de l'ordonnée à l'origine).

✓ **Exactitude et précision**

Trois concentrations ont été choisies pour assurer le contrôle qualité (CQ) : CQ1 (15 ng/ml), CQ2 (125 ng/ml), CQ3 (250 ng/ml). Nous avons fabriqués 6 aliquots de chaque CQ. Les dilutions successives sont réalisées à partir de la solution mère du bortezomib de 1 mg/ml à l'aide du plasma humain. Les CQ sont fabriqués extemporanément à chacun des jours de la validation analytique.

La précision et l'exactitude intra-journalières ont été déterminées en injectant six fois le même jour chaque CQ pour les différentes matrices validées. L'exactitude est le rapport de la moyenne des concentrations observées des CQ (C_{obs}) sur la concentration théorique ($C_{théorique}$), le résultat est exprimé en pourcentage selon la formule : $Exactitude (\%) = (C_{obs}/C_{théorique}) \times 100$. Elle doit se situer entre 85 et 115% sauf pour la LOQ pour laquelle nous admettons un écart de 20%.

La précision a été calculée par le coefficient de variation, pourcentage qui correspond au rapport de l'écart-type sur la concentration moyenne ($CV (\%) = (Ecart\text{-}type/C_{obs}) \times$

100). Le CV (%) doit être inférieur à 15%, sauf pour la LOQ 20%, pour être acceptable.

La variabilité inter-journalière a été déterminée avec les mêmes paramètres (précision et exactitude) en injectant six fois par jour chaque CQ pendant quatre jours (n=24). La reproductibilité de la méthode devrait être testée aussi sur les échantillons chargés avec la molécule dosée ou des patients inclus dans l'étude, particulièrement quand il s'agit de molécule ayant des métabolites que les CQ et les étalons ne contiennent pas. Les métabolites peuvent interférer avec la molécule dosée et induire une « non-reproductibilité ». Il faudrait analyser les échantillons des patients 6 fois et calculer l'exactitude et la précision afin de s'assurer de leur reproductibilité [5].

✓ **Rendement d'extraction**

Déterminé en comparant les aires moyennes des pics du bortezomib dans les CQ (CQ1, CQ2, CQ3) extraits avec les CQ aqueux. Ces CQ ont été préparés à l'aide de la méthode « ajouts dosés » en rajoutant des quantités connues de bortezomib dans chaque échantillon. Les deux techniques d'extraction ont été comparées : liquide-liquide et solide-liquide.

✓ **Stabilité à court et à long terme**

La stabilité de la molécule à doser dans les solutions mères, le milieu biologique (le plasma humain), ainsi que dans l'extrait, à différentes températures et temps a été testée.

○ Décongélation/recongélation

La stabilité de l'analyte après 3 cycles de décongélation/recongélation a été déterminée. Au moins 3 aliquots de chaque concentration (par exemple les CQ choisis) ont été analysés au temps zéro juste après préparation, congelés pendant 24h, puis décongelés à température ambiante. Une fois complètement décongelés, ils ont été à nouveau recongelés pour 12 à 24h dans les mêmes conditions ; ce cycle a été répété 2 autres fois, puis les tubes analysés au 3^e cycle.

○ Stabilité à court terme dans le milieu biologique

Trois aliquots de chaque CQ ont été décongelés et laissés à température ambiante entre 4 et 24 heures (selon la durée d'analyse prévue), puis analysés.

- Stabilité à long terme dans le milieu biologique

Trois aliquots de chaque CQ ont été conservés dans les mêmes conditions que les échantillons des patients : à -20°C ou à -80°C. Ils ont été analysés au moins à 3 reprises (par exemple à 2 semaines, 1 mois, 3 mois), la quantité d'échantillon a été suffisante. Nous avons comparé les concentrations à la moyenne des concentrations mesurées au temps zéro.

- Stabilité des solutions mères

La stabilité des solutions mères ou solutions stock a été testée à T° ambiante pendant 6 à 24 heures. Nous avons également testé les solutions à la température de stockage : +4°C, -20°C ou -80°C, pendant une durée correspondant à celle de conservation.

- Stabilité des échantillons extraits

La stabilité des molécules après extraction du milieu biologique a été testée, en particulier dans les flacons en verre, durant au moins le temps prévu de l'analyse CLHP (12 heures). Pour cela nous calculons les concentrations de contrôles qualité après le temps de stockage dans le rack à 4°C.

II. Résultats

A. Mise au point et validation de la méthode de dosage plasmatique

1. Mise au point de la méthode de dosage

- Infusion :

Nous nous sommes basés sur l'ion moléculaire $[M+H]^+$ du bortezomib pour optimiser l'énergie de collision (CE) et obtenir le signal le plus intense. Deux transitions « MRM » ont été sélectionnées pour le bortezomib et l'EI. Les ions précurseurs du bortezomib (figure 15) et du carbutamide (m/z 367.2 et 271.7 respectivement) passent à travers le Q1 et entrent dans la cellule de collision.

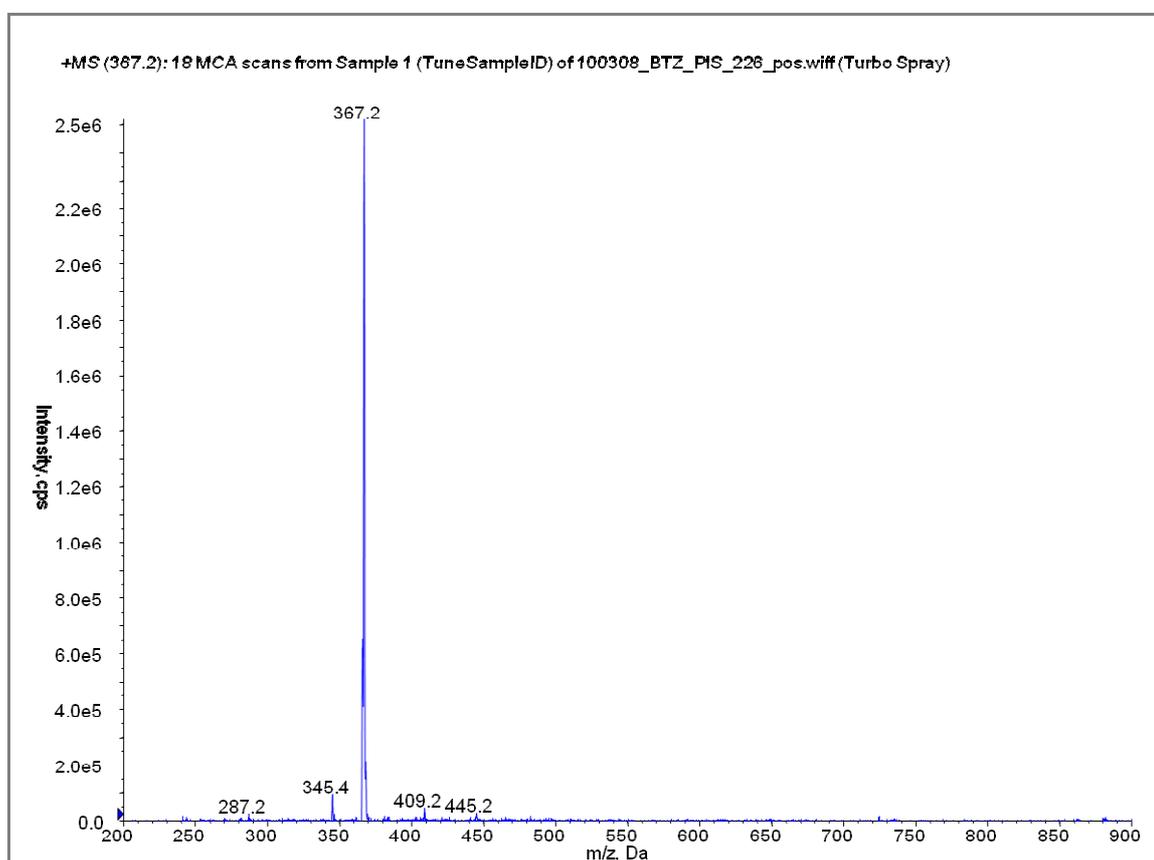


Figure n°15 : Spectre SM du bortezomib.

La CE des ions produits a été optimisée. Les valeurs suivantes ont été obtenues : à la transition 367.2 / 226.2 (23.0 eV) et 367.2 / 208.2 (37 eV) pour le bortezomib et à la

transition 271.7 / 156.1 (21.0eV) et 271.7 / 108.2 (35.0 eV) pour l'EI. Les fragmentations correspondantes sont représentées dans la figure 16. La quantification du bortezomib et du carbutamide est basée sur les deux transitions principales 367.2/226.2 et 271.7/156.1, puis vérifiée sur les transitions 367.2 / 208.2 et 271.7 / 108.2 du bortezomib et de l'EI respectivement.

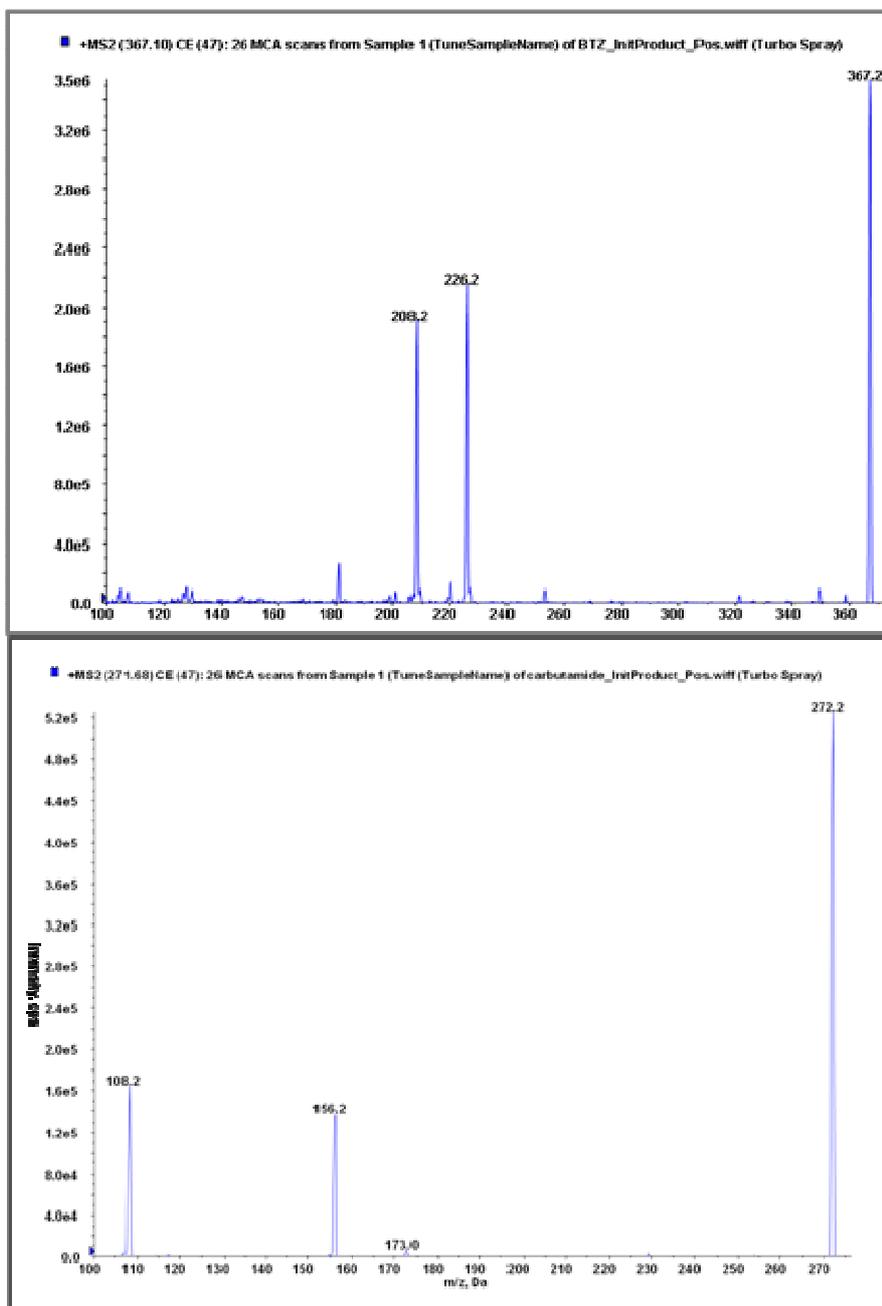


Figure n°16 : Spectres SM/SM du carbutamide et du bortezomib.

- **Couplage LC-MS/MS :**

Plusieurs phases mobiles ont été testées notamment l'eau 0,1% acide formique (phase A1) / acétonitrile 0,1% Acide formique (phase B1) et le tampon ammonium formiate 10 mM à 3 pH différents (4, 6, 8) (phase A2) / acétonitrile (phase B2). Les résultats satisfaisants sont obtenus avec les phases A1 / B1 et les phases A2 (pH = 6). La phase contenant l'ammonium formiate induit la formation de dépôts de sels sur la source ESI nécessitant un nettoyage plus fréquent. Ceci pourrait à long terme diminuer la sensibilité de détection. Nous avons choisi de travailler avec les phases mobiles A1 / B1.

Plusieurs gradients ont été testés pour l'utilisation de chaque colonne. Nous avons constaté que le meilleur gradient pour la colonne Luna C8 était celui démarrant avec 20 % de phase B1, allant de 20 % à 90 % de B1 sur 6 minutes, restant 2 minutes à 90 % de B1, revenant à 20 % de B1 sur une minute. La mise en équilibre de la colonne se fait sur 10 minutes. Pour les colonnes Kinetex et Atlantis le meilleur gradient était celui démarrant avec 20 % de phase B1, allant de 20 % à 90 % de B1 sur 5 minutes, restant 2 minutes à 90 % de B1, revenant à 20 % de B1 sur une minute. La mise en équilibre de la colonne se fait sur 5 minutes.

Nous avons testé plusieurs colonnes dans les conditions optimales (débits et gradient optimaux). La colonne Kinetex et Atlantis C18 impliquent un pic de BTZ avec une trainée visible à la fin du pic chromatographique du BTZ. Il pourrait s'agir d'interaction secondaires entre les fonctions NH du BTZ et les silanols libres (légèrement acides, pKa ~ 4-6) présents sur la phase stationnaire de la colonne. Ces interactions secondaires étant plus fortes que les interactions hydrophobes primaires du BTZ avec les greffons C8, ceci expliquerait que les pics qui traînent légèrement. Cependant, les fonctions NH du BTZ étant peu basiques, il est serait donc plus probable que la raison principale des traînées de pics soit que les fonctions acides B-OH interagissent avec les résidus métalliques présents dans notre système.

Nous avons sélectionné pour la suite du développement la colonne Luna C8 nous permettant d'avoir des pics de carbutamide et de BTZ « fins ». Le four était réglé à 40°C. Les chromatogrammes correspondants aux colonnes Kinetex et Atlantis C18 sont représentés dans la figure 17. Les manipulations expérimentales sur les trois

colonnes ont été réalisées dans les conditions optimales de chromatographie (phases mobiles, gradient, débit) et de spectrométrie de masse (paramètres instrumentaux).

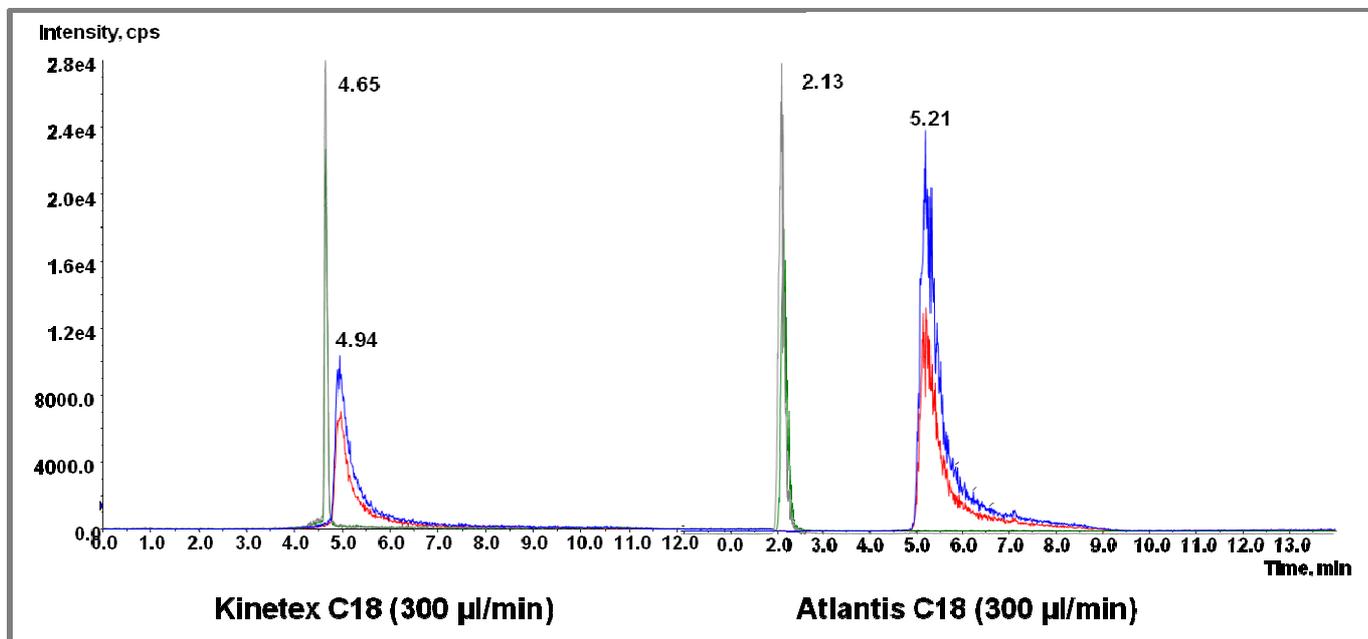


Figure n°17 : Spectres LC-SM/SM du bortézomib et du carbutamide avec les colonnes Kinetex C18 et Atlantis C18.

La figure **18** montre les chromatogrammes des différents extraits plasmatiques. Il s'agit du blanc de plasma (sans bortézomib ni EI, partie A), du blanc de plasma (avec EI, partie B), de la concentration C2 (avec l'EI, partie C et D). Nous constatons qu'il n'y pas d'interférence ou d'impuretés venant perturber la ligne de base des spectres MS². Les pics chromatographiques sont fins et bien séparés.

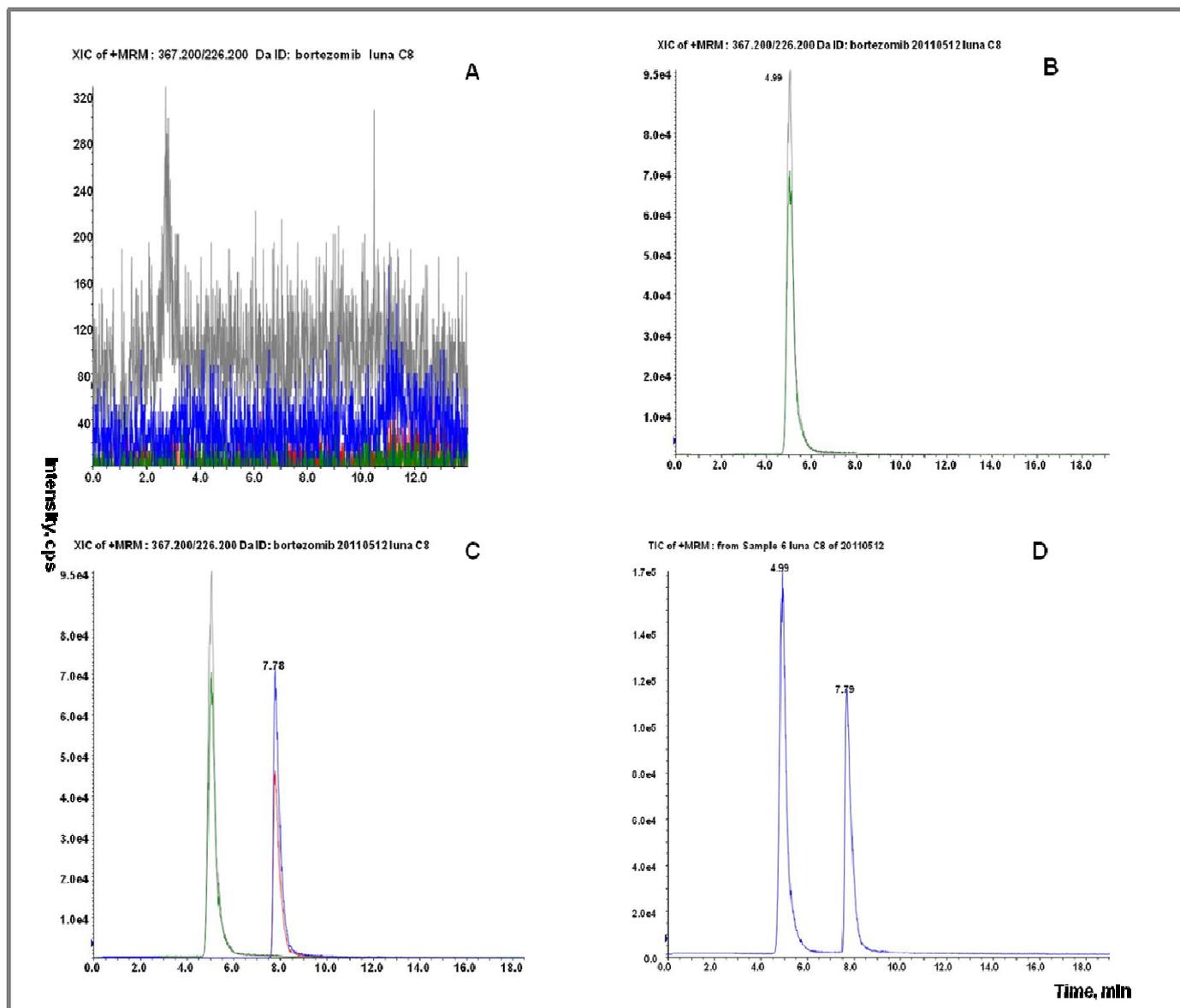


Figure n°18 : Spectres LC-SM/SM du bortézomib et du carbutamide avec la colonne Luna C8.

2. Validation de la méthode de dosage plasmatique

✓ Spécificité et sélectivité

Nous n'avons pas observés de pics d'interférence ni avec les extraits des six plasmas de sources différentes ni de la LOQ. Il faut savoir que la technique LC-MS² en mode MRM utilisée est très sélective et spécifique.

✓ LOD, LOQ et linéarité

LOD et LOQ ont été déterminées respectivement à 1 et 4 ng/ml dans le plasma. La linéarité de droites de calibration a été respectée sur les quatre jours de validation. Le r^2 moyen est égal à 0.9948 et l'ordonnée à l'origine moyenne b égale à 0.00103 est proche de 0. Cette linéarité est représentée par la figure 19 par la droite de calibration obtenue le jour 2 de la validation analytique.

Nous avons relevés également les aires sous la courbes (ASC) de la transition non majoritaire du bortezomib et de l'EI sur les 4 jours de validation et étudié leur linéarité. Le r^2 moyen est égal à 0.9948 et l'ordonnée à l'origine moyenne b égale à 0.00103 est proche de 0. Le coefficient de variation calculé sur les 6 ASC chaque jour de validation analytique n'excède pas 15%.

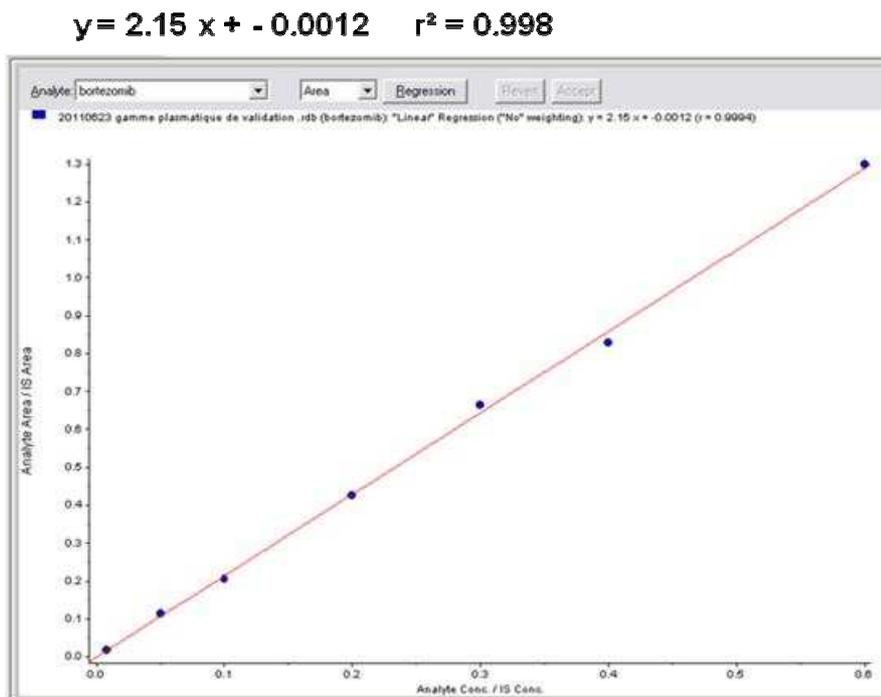


Figure n°19 : Droite de calibration obtenue au J2 de la validation analytique.

✓ Exactitude et précision

La validation intra-journalière a donné des bons résultats pour les CQ testés et les résultats sont résumés dans le tableau X. L'exactitude est comprise dans l'intervalle [104,27 % ; 114,48 %] le jour J1 de la validation et dans l'intervalle [95,83 ; 101,04 %] pour la moyenne de l'exactitude calculée sur les 4 jours de validation analytique. La précision est comprise dans l'intervalle [2,09 % ; 7,57 %] le jour J1 de la validation et dans l'intervalle [5,74 % ; 9,92 %] pour la moyenne de la précision calculée sur les 4 jours de validation analytique. Ces chiffres prennent en compte les 3 CQ à 250, 125, 15 ng/ml.

Tableau X : Exactitude et précision en inter-journalier.

Concentration théorique	Validation intra-journalière				Validation inter-journalière			
	Conc Observée	Exactitude %	Précision%	n	Conc observée	Exactitude %	Précision%	n
Bortézomib Plasma (ng/ml)								
250	286,0	114,48	3,63	6	252,60	101,04	9,92	24
125	1128,92	103,14	2,09	6	122,31	97,84	5,74	24
15	15,64	104,27	7,57	6	14,38	95,83	9,06	24

✓ Rendement

Nous avons comparé plusieurs types de cartouches. Les cartouches échangeuses de cations XC sont utilisées avec un échantillon plasmatique de pH 1 à 2 (acidifié avec le HCl). Le BTZ se protone et interagit fortement avec la matrice anionique de la cartouche. Ces cartouches sont lavées avec une solution de HCl 0.1M puis avec une solution de méthanol. Elles sont éluées avec du MeOH 5% NH₄OH. Elles ont montré un excellent rendement (94,22 ± 1,15 %) pour le BTZ mais un faible rendement pour l'EI (24.60 ± 3,48 %). Ceci démontre le caractère basique faible du BTZ possédant des fonctions CO-NH.

Nous avons choisi les cartouches StrataX qui nous ont permis un bon rendement et de l'EI ($94,20 \pm 1,70$) et du BTZ ($76,32 \pm 2,45$). La SPE nous permet d'obtenir un rendement nettement meilleur que celui obtenu avec la précipitation liquide-liquide ($43,00\% \pm 3,50\%$).

✓ **Stabilité à court et à long terme**

○ Décongélation/recongélation

Les CQs stockés à -80°C et -20°C sont stables après 3 cycles de décongélation/recongélation. Les moyennes calculées sont de 90,10 à 94,32% pour le CQ1, de 92,6% à 98,3% pour le CQ2 et de 91,6 à 96,0% pour le CQ3.

○ Stabilité à court terme dans le milieu biologique

Les trois aliquots de chaque CQ ont été stables à température ambiante pendant 4 heures. Les moyennes calculées sont pour CQ1 93.6%, CQ2 91.3%, CQ3 91.6%.

○ Stabilité à long terme dans le milieu biologique

Les trois aliquots de chaque CQ ont été stables après 15 jours de stockage à -80°C . Les moyennes calculées sont pour CQ1 90.3%, CQ2 92.0% et CQ3 97.2%.

○ Stabilité des solutions mères

La solution mère du BTZ est stable après 48 heures à -20°C (95,0%) et -80°C (98,0%); après 24 heures à 4°C et après 12 heures à température ambiante.

○ Stabilité des échantillons extraits

Les extraits des échantillons plasmatiques des trois CQ sont stables après 4 heures à 4°C (91.4% à 98.9%) et à 20°C (91.3% à 98.3%) à l'abri de la lumière.

Les solutions mères sont stables à -20°C et -80°C pendant au moins 48 heures. Les échantillons plasmatiques sont stables -80°C pendant au moins 15 jours. Les extraits des échantillons plasmatiques sont stables en attendant l'extraction et pendant toute la durée de l'analyse à l'abri de la lumière et à 4°C .

B. Application clinique : quantification des concentrations plasmatiques du bortezomib chez deux patients atteints de MM

Nous allons appliquer notre méthode de dosage LC-MS² à 2 patients ayant reçu du bortezomib et dont les caractéristiques sont récapitulées dans le tableau XI. Les prélèvements ont été réalisés avant et après (10min) l'administration du médicament.

Tableau XI : Caractéristiques des patients prélevés.

	Patient 1	Patient 2
	71 ans	43 ans
Taille (cm)	170.0	142.0
Poids (Kg)	85.0	65.0
Créatinémie (µmol/L)	115.0	256.0
Clairance (ml/min)	62.65	26.00
Surface corporelle (m²)	1.97	1.54
Dose bortezomib (mg/m²)	1.300 ajustée à 1.000	1.300
Cycle et jour	C2, J15	C5, J11
Indications	MM, AMM	MM, AMM
Protocole	MPV	GAM-VELCADE

Chapitre 3 : DISCUSSION

Le MM représente 10 à 12% des hémopathies malignes. Son incidence dans la population de patients jeunes est en augmentation. Le bortezomib occupe une place importante dans le traitement du MM. Ce médicament fait partie des thérapies ciblées et innovantes nécessitant un suivi adapté et optimisé [14, 87].

Afin de répondre à ce suivi, il est nécessaire de disposer d'une méthode de dosage validée selon les normes FDA et plus rapide que celles décrites dans la littérature [70, 91, 92].

Nous avons mis au point une méthode analytique LC-MS/MS du bortezomib permettant de le doser au niveau plasmatique dans un premier temps et utilisant un EI. Les paramètres instrumentaux ont été optimisés en sélectionnant les trois transitions les plus importantes pour le bortezomib (367.2 / 226.2 ; 367.2 / 208.2 ; 367.2 / 108.2) et l'EI (271.7 / 156.1 ; 271.7 / 108.2 (35.0 eV) pour l'EI. La quantification du bortezomib et du carbutamide étant basée sur les deux transitions principales 367.2/226.2 et 271.7/156.1.

Nos échantillons biologiques ont été traités par extraction liquide-solide. Cette étape a été automatisée et validée assurant une grande spécificité et un meilleur rendement

Nous avons choisi les phases mobiles simples d'utilisation : eau 0,1% acide formique / acétonitrile 0,1% Acide formique avec un gradient. Le gradient démarrant à 20 % de phase B1, allant de 20 % à 90 % de B1 sur 6 minutes, restant 2 minutes à 90 % de B1 et revenant à 20 % de B1 sur une minute [70, 91, 93]. Le temps d'analyse a été réduit à 10 minutes. Nous pourrions réaliser la validation de la méthode de dosage plasmatique du BTZ sur une colonne de diamètre plus grand nous permettrait de raccourcir considérablement le temps d'analyse comme c'est le cas pour la colonne Atlantis (diamètre : 2.1 mm et débit : 300 µl/min) [80, 86]. Mais l'inconvénient majeur présenté par la colonne Atlantis est la largeur des pics chromatographiques à la base pouvant s'expliquer par les interactions secondaires entre les fonctions NH du BTZ et les silanols libres (légèrement acides, pKa ~ 4-6) présents sur la phase stationnaire de la colonne. Ces interactions secondaires étant plus fortes que les interactions hydrophobes primaires du BTZ avec les greffons C8, ceci expliquerait que la base du pic du BTZ soit plus large. Cependant, les fonctions NH du BTZ étant peu basiques, il est serait donc plus probable que la raison principale des traînées de pics soit que les

fonctions acides B-OH interagissent avec les résidus métalliques présents dans notre système chromatographique. Afin d'éviter ces effets chélates, il est possible de « passiver » le système chromatographique pour réduire les activités métalliques. Cela implique généralement l'utilisation d'une solution d'acide nitrique. Une autre solution réduisant l'activité métallique serait l'ajout de l'acide citrique qui est un agent chélatant compétitif dans la phase mobile. Néanmoins, ces deux solutions restent un dernier recours puisqu'elles induisent la détérioration rapide du système chromatographique voire de la source ESI du spectromètre de masse.

La méthode développée par notre laboratoire en collaboration avec la PGF est spécifique et sélective basée sur le mode MRM. Elle est très sensible puisque la LOQ est de 4 ng/ml nous permettant de détecter de très faibles concentrations plasmatiques. La gamme d'étalonnage (de 0 à 300 ng/ml) est linéaire intégrant les concentrations plasmatiques rencontrées chez les patients atteints du MM [86].

La validation intra-journalière a fourni des bons résultats pour l'exactitude et la précision des CQ utilisés. L'exactitude est comprise dans l'intervalle [85 % ; 115 %] et la précision est inférieure à 15 % pour les trois CQ sur les quatre jours de validation analytique.

Les solutions mères sont stables à -20°C et -80°C pendant au moins 48 heures. Les échantillons plasmatiques sont stables -80°C pendant au moins 15 jours. Les extraits des échantillons plasmatiques sont stables en attendant l'extraction et pendant toute la durée d'analyse à l'abri de la lumière et à 4°C.

Chapitre 4 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons mis au point et validé une méthode de dosage plasmatique du bortezomib. Nous avons utilisé le couplage LC-MS/MS. Cette méthode est validée selon les normes FDA. Elle est spécifique, sensible, exacte et précise. Il présente un avantage majeur qui est d'être rapide et automatisable. Nous allons dans l'avenir proche l'appliquer à des prélèvements de patients atteints de MM. Nous allons également poursuivre l'étude de stabilité des solutions aqueuses et biologiques à long terme (à 1 et 3 mois).

Cette méthode LC-MS/MS présente également l'avantage d'être applicable à d'autres matrices. Nous pourrions doser le bortezomib au niveau urinaire et mieux comprendre son élimination notamment chez les patients insuffisants rénaux dialysés. Nous pourrions également le doser au niveau intracellulaire (cellules mononucléées) afin d'établir une relation pharmacocinétique et pharmacodynamique entre la dose de bortezomib administrée et la réponse clinique du patient. A ce jour, il n'existe aucune publication réalisée sur la pharmacocinétique du bortezomib au niveau intracellulaire. Il faut se rappeler que la réponse au bortezomib sur l'inhibition du protéasome 26S est saturable [91]. Reece et al., ont démontré l'efficacité et la tolérance du bortezomib à la dose 1.0 mg/m² comparé à la dose 1.3 mg/m² [86]. Les études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (PK/PD) devraient nous aider à définir la dose du bortezomib efficace ainsi que les schémas d'administration simplifiés et optimisés. Et enfin, elles nous permettraient de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la toxicité du bortezomib notamment les neuropathies périphériques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alexander, D.D., et al., *Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature*. Int J Cancer, 2007. **120 Suppl 12**: p. 40-61.
2. Inc., J.-O., *Monographie du bortezomib (Velcade) d'après el laboratoire Janssen-Cilag*. janvier 2005.
3. Moreau, P. and e. al., *Une étude prospective, randomisée et internationale de la phase 3 (NMY-3021), comparaison de l'administration du bortezomib par voie-sous cutanée et par vois intraveineuse chez les patients souffrant de rechute du myélome multiple*. 2010, l'édition 2010 du congrès annuel de la société américaine de l'hématologie.
4. Moreau, P. and e. al., *Prospective comparaison of subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with multiple myeloma*. Haematologica, 2008. **93(12)**.
5. Sala, F., et al., *Development and validation of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of the novel proteasome inhibitor CEP-18770 in human plasma and its application in a clinical pharmacokinetic study*. J Mass Spectrom, 2010. **45(11)**: p. 1299-305.
6. http://www.edimark.fr/phototheque/galerie_detail.php?id_galerie=366.
7. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Multiple myeloma*. N Engl J Med, 2004. **351(18)**: p. 1860-73.
8. <http://pedagogie.ac-montpellier.fr/Disciplines/sti/biotechn/immuno.html>.
9. Brenner, H., A. Gondos, and D. Pulte, *Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma*. Blood, 2008. **111(5)**: p. 2521-6.
10. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Monoclonal_gammopathy_Multiple_Myeloma.png.
11. Dispenzieri, A., et al., *International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders*. Leukemia, 2009. **23(2)**: p. 215-24.
12. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010. **60(5)**: p. 277-300.
13. Greipp, P.R., et al., *International staging system for multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2005. **23(15)**: p. 3412-20.
14. Raanani, P., et al., *Immunoglobulin prophylaxis in chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma: systematic review and meta-analysis*. Leukemia & Lymphoma, 2009. **50(5)**: p. 764-772.

15. Weiss, B.M., et al., *A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients*. Blood, 2009. **113**(22): p. 5418-22.
16. Schwartz, G.G., *Multiple myeloma: clusters, clues, and dioxins*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997. **6**(1): p. 49-56.
17. Brown, L.M., et al., *Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3388-94.
18. Kirkeleit, J., et al., *Increased risk of acute myelogenous leukemia and multiple myeloma in a historical cohort of upstream petroleum workers exposed to crude oil*. Cancer Causes Control, 2008. **19**(1): p. 13-23.
19. Durie, B.G., S.E. Salmon, and G.R. Mundy, *Relation of osteoclast activating factor production to extent of bone disease in multiple myeloma*. Br J Haematol, 1981. **47**(1): p. 21-30.
20. Dimopoulos, M., et al., *International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma*. Leukemia, 2009. **23**(9): p. 1545-56.
21. Terpos, E., et al., *Myeloma bone disease and proteasome inhibition therapies*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1098-104.
22. Roodman, G.D., *Bone building with bortezomib*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 462-4.
23. Becker PS, M.C., Wood BL, et al., *Expression of erythropoietin receptors by plasma cells from patients with multiple myeloma: Potential relevance to pharmacological use of erythropoietin*. J Clin Oncol, 2010. **28:15s**: p. 115-137.
24. Pruzanski, W. and M.A. Ogryzlo, *Abnormal proteinuria in malignant diseases*. Adv Clin Chem, 1970. **13**: p. 335-82.
25. Kato, T., et al., *Early detection of bone marrow involvement in extramedullary plasmacytoma by whole-body F-18 FDG positron emission tomography*. Clin Nucl Med, 2000. **25**(11): p. 870-3.
26. Scudla, V., et al., *[Contribution of whole-body magnetic resonance in the diagnostics of monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and the assessment of Durie-Salmon Plus staging system]*. Vnitr Lek, 2011. **57**(1): p. 52-60.
27. Bird, J.M., et al., *Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011*. Br J Haematol, 2011. **154**(1): p. 32-75.
28. *Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group*. Br J Haematol, 2003. **121**(5): p. 749-57.

29. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma*. Leukemia, 2009. **23**(1): p. 3-9.
30. Réseau de Cancérologie d'Aquitaine (RCA), *Prise en charge du myélome multiple*, Juillet 2010.
31. *Anomalies génétiques dans le myélome: rôle dans l'oncogenèse et implications pronostiques*. 2007, Prescrire. p. 677-681
32. Attal M, H.J., Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, et al., *A prospective, randomised trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma*. N Engl J Med, 1996. **335**: p. 91-7.
33. Child, J.A., et al., *High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma*. N Engl J Med, 2003. **348**: p. 1875-1883.
34. Harousseau, J., et al., *Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma*. Haematologica, 2006. **91**: p. 1498-1505.
35. Richardson, P.G., et al., *Phase II Trial of single agent bortezomib (VELCADE) in patients with previously untreated multiple myeloma*. Blood, 2004.
36. Dispenzieri, A., et al., *Primary therapy with single agent bortezomib as induction, maintenance and re-induction in patients with high-risk myeloma: Results of the ECOG E2A02 trial*. Leukemia, 2010. **24**: p. 1406-1411.
37. Jagannath, S., et al., *Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma*. Br J Haematol, 2005. **129**: p. 776-783.
38. Harousseau, J.L., et al., *Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: Results of the IFM 2005-01 Phase III trial*. J Clin Oncol, 2010. **28**: p. 4621-4629.
39. Mateos, M.V., A. Oriol, and J. Martinez-Lopez, *Bortezomib:melphalan/prednisone (VMP) versus bortezomib/thalidomide/prednisone (VTP) as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib/thalidomide (VT) versus bortezomib/prednisone (VP): A randomised trial in elderly untreated patients with multiple myeloma older than 65 years*. Lancet Oncol, 2010. **11**: p. 934-941.
40. Harousseau, J.L., et al., *Bortezomib:dexamethasone versus VAD as induction prior to autologous stem cell transplantation (ASCT) in previously untreated multiple myeloma (MM). Updated data from IFM 2005/01 trial*. J Clin Oncol, 2008. **15**: p. 26.
41. Attal, M., et al., *Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma*. N Engl J Med, 2003. **349**(26): p. 2495-502.

42. Palumbo, A., et al., *Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial*. Lancet, 2006. **367**(9513): p. 825-31.
43. Facon, T., et al., *Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial*. Lancet, 2007. **370**(9594): p. 1209-18.
44. Mateos, M.V., et al., *Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study*. Blood, 2006. **108**(7): p. 2165-72.
45. San Miguel, J.F., et al., *Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma*. N Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 906-17.
46. San Miguel, J.F., et al., *Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma*. N Engl J Med, 2008. **359**: p. 906-917.
47. Mateos, M.V., et al., *Bortezomib plus melphalan plus prednisone compared with melphalan and prednisone in previously untreated multiple myeloma: Updated follow-up and impact of subsequent therapy in the Phase III VISTA Trail*. J Clin Oncol, 2010. **28**: p. 2259-2266.
48. Migliorati, C.A., *Intravenous bisphosphonate therapy may lead to osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma, breast, and prostate cancer patients*. J Evid Based Dent Pract, 2008. **8**(2): p. 93-4.
49. Snowden, J.A., et al., *Guidelines for supportive care in multiple myeloma 2011*. Br J Haematol. **154**(1): p. 76-103.
50. HAS. *Avis Eprex*. [cited.
51. Snowden, J.A., et al., *Guidelines for supportive care in multiple myeloma 2011*. Br J Haematol, 2011. **154**(1): p. 76-103.
52. Durie, B.G., et al., , *International uniform response criteria for multiple myeloma*. Leukemia., 2006. **20**(9): p. 1467-73.
53. Durie, B.G., et al., *International uniform response criteria for multiple myeloma*. Leukemia, 2006. **20**(9): p. 1467-73.
54. Richardson, P.G., et al., *A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma*. N Engl J Med, 2003. **348**(26): p. 2609-17.
55. Richardson, P.G., et al., *Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma*. N Engl J Med, 2005. **352**(24): p. 2487-98.
56. Dimopoulos, M., et al., *Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma*. N Engl J Med, 2007. **357**(21): p. 2123-32.

57. Weber, D.M., et al., *Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America*. N Engl J Med, 2007. **357**(21): p. 2133-42.
58. Barlogie, B., G. Tricot, and E. Anaissie, *Thalidomide in the management of multiple myeloma*. Semin Oncol, 2001. **28**(6): p. 577-82.
59. Singhal, S., et al., *Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma*. N Engl J Med, 1999. **341**(21): p. 1565-71.
60. ADAMS, J., *Development of novel proteasome inhibitor*. The Oncologist, 2002. **7**(9-16).
61. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bortezomib.png>.
62. RCP. RESUME DES CARACTERISTIQUES DU PRODUIT. 2008 [cited; VELCADE].
63. Adams, J., et al., *Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids*. Bioorg Med Chem Lett, 1998. **8**(4): p. 333-8.
64. Mc Cormack, T., et al., *Active site-directed inhibitors of Rhodococcus 20 S proteasome. Kinetics and mechanism*. J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26103-9.
65. CNIL, *Commission nationale de l'informatique et des libertés*. 2010.
66. Adams, J., *The proteasome: structure, function, and role in the cell*. Cancer Treat Rev, 2003. **29 Suppl 1**: p. 3-9.
67. Stanford, B.L. and S.D. Zondor, *Bortezomib treatment for multiple myeloma*. Ann Pharmacother, 2003. **37**(12): p. 1825-30.
68. http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000539/WC500048471.pdf.
69. Orlowski, R.Z., *Bortezomib and its role in the management of patients with multiple myeloma*. Expert Rev Anticancer Ther, 2004. **4**(2): p. 171-9.
70. Pekol, T., et al., *Human metabolism of the proteasome inhibitor bortezomib: identification of circulating metabolites*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(6): p. 771-7.
71. Ferrari, A., et al., *Methadone--metabolism, pharmacokinetics and interactions*. Pharmacol Res, 2004. **50**(6): p. 551-9.
72. Goldstein, J.A., *Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily*. Br J Clin Pharmacol, 2001. **52**(4): p. 349-55.
73. Klotz, U., M. Schwab, and G. Treiber, *CYP2C19 polymorphism and proton pump inhibitors*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2004. **95**(1): p. 2-8.
74. Furuta, T., et al., *Pharmacogenomics of proton pump inhibitors*. Pharmacogenomics, 2004. **5**(2): p. 181-202.
75. Uttamsingh, V., et al., *Relative contributions of the five major human cytochromes P450, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4, to the hepatic metabolism of the proteasome inhibitor bortezomib*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(11): p. 1723-8.

76. Lamba, J.K., et al., *Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations*. Pharmacogenetics, 2002. **12**(2): p. 121-32.
77. Roy, J.N., et al., *CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(7): p. 884-7.
78. Goldstein, J.A. and S.M. de Morais, *Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily*. Pharmacogenetics, 1994. **4**(6): p. 285-99.
79. Ward, S.A., et al., *Propranolol's metabolism is determined by both mephenytoin and debrisoquin hydroxylase activities*. Clin Pharmacol Ther, 1989. **45**(1): p. 72-9.
80. Mounier et al., *Drug interactions between antineoplastic and retroviral therapies: Implications and management for clinical practice*. 2008.
81. C Fournier, L.R., K Cochonat, B Frimat, *Association d'une infection à VIH et d'un myélome multiple chez un patient de 65 ans*. Journal de Pharmacie Clinique, 2005 **24**,(Numéro 1,): p. 52-5.
82. Ontario, C.C. <http://www.cancercare.on.ca/pdfdrugs/bortezomib.pdf>. 12 juin 2005 [cited].
83. Saadia Skalli, S.C., Céline Villier, Benoit Allenet, *Interaction médicamenteuse entre un anticoagulant oral, la fluindione, et le bortezomib : À propos d'un cas*. Pharmactuel 2010.
84. Richardson, P.G., P. Sonneveld, and M.W.e.c. Schuster, *Bortezomib or High-dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma*. NEJM, 2005. **352**: p. 2487-98.
85. COMEDIMS. *ORDONNANCE Bortezomib (VELCADE)*. 2010 [cited].
86. Reece, D.E. and e. al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of two doses of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma*. Cancer Chemother Pharmacol, 2010.
87. Chartier, A. and et al., *Avez-vous entendu parler du bortezomib* Québec Pharmacie, 2006. **53**.
88. ONCOMIP, *Réseau régional de cancérologie Midi-pyrénées: Prise en charge du Myélome Multiple*. 2011.
89. Andre, P., et al., *Stability of bortezomib 1-mg/mL solution in plastic syringe and glass vial*. Ann Pharmacother, 2005. **39**(9): p. 1462-6.
90. Vanderloo, J.P., et al., *Stability of unused reconstituted bortezomib in original manufacturer vials*. J Oncol Pharm Pract, 2010.
91. Papandreou, N.C. and e. al., *Phase I Trial of the Proteasome Inhibitor Bortezomib in Patients With Advanced Solid Tumors With Observations in Androgen-Independent Prostate Cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**.

92. Labutti, J. and e. al., *Oxidative Deboronation of the Peptide Boronic Acid Proteasome Inhibitor Bortezomib: Contributions from Reactive Oxygen Species in This Novel Cytochrome P450 Reaction*; Chem Res Toxicol, 2006. **19**: p. 539-546.
93. Hsieh, F.Y., et al., *Elucidation of potential bortezomib response markers in multiple myeloma*. J Pharm Biomed Ana, 2009. **49**: p. 115-122.
94. Hoizey, G., et al., *Recherche et dosage de sulfamides hypoglicémiants dans le plasma humain par CLHPSM/SM à trappe d'ions : validation et application au dépisatge des hypoglicémiants factices*. Ann Toxicol Anal, 2006. **18**: p. 197-205.
95. Hoffman, E. and V. Stroobant, eds. *SPECTROMETRIE DE MASSE*. ed. ^e. édition. 2007.

SERMENT DE GALIEN

« Je jure, en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque. »

RESUME : Le Bortezomib est un inhibiteur de protéasome indiqué dans le myélome multiple. Une méthode de chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse (SM) a été développée sur une colonne Luna C8® (Phenomenex) afin de réaliser son dosage plasmatique dans le cadre des études de pharmacocinétique et pharmacodynamie. Le traitement de l'échantillon est basé sur l'extraction liquide-solide sur les cartouches strata X® après l'ajout du carbutamide comme étalon interne. Cette méthode CLHP-SM/SM est rapide et sélective et requiert un faible volume de plasma (300 µl). Elle est précise, exacte et sensible. La précision est exprimée en coefficient de variation (CV %) lequel est toujours inférieur à 15.0%. L'exactitude est comprise entre 95.8 et 101.0% et le rendement est proche de 80 %. La limite de détection est 1.0 ng/ml et la limite de quantification est 4.0 ng/ml. Il s'agit dans ce travail de la première méthode CLHP- SM/SM développée et validée selon les normes FDA. Cette méthode analytique va être utilisée pour doser le bortezomib chez des patients atteints de myélome multiple et traités par le bortezomib.

TITLE : Validation of an analytical method for the determination of the bortezomib in human plasma on Q-TRAP 5500 mass spectrometer.

ABSTRACT: Bortezomib is a novel proteasome inhibitor used in multiple myeloma. To investigate its clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics, a high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) method was developed on Phenomenex Luna C8® column to measure the drug in human plasma. Bortezomib was extracted from plasma by solid phase technique with Phenomenex Strata-X® cartridges after the addition of carbutamid as internal standard. The method requires a small volume of sample (300 µl) and is rapid and selective. It is sensitive, precise and accurate, with overall precision, expressed as coefficient of variation (CV%), always < 15.0%, accuracy in the range 95.8–101.0% and high recovery, close to 80%. The limit of detection is 1.0 ng/ml and the limit of quantitation (LOQ) is 4.0 ng/ml. This is the first method developed and validated for analyzing a bortezomib in human plasma. The method will be applied to study the pharmacokinetics of bortezomib in cancer patients with multiple myeloma who had received the drug.

DISCIPLINE: Pharmacocinétique et Pharmacie Clinique

MOTS CLES: Bortezomib, CLHP-SM/SM, FDA, Myélome multiple.

Université de Limoges

Faculté de Pharmacie

2, rue du Docteur Marcland

87025 Limoges Cedex