



**HAL**  
open science

# Mise au point du dosage de l'Imatinib, du Norimatinib, du Dasatinib et du Nilotinib par chromatographie liquide haute performance et détecteur à barrette de diodes

Alexandre Harlé

► **To cite this version:**

Alexandre Harlé. Mise au point du dosage de l'Imatinib, du Norimatinib, du Dasatinib et du Nilotinib par chromatographie liquide haute performance et détecteur à barrette de diodes. Sciences pharmaceutiques. 2011. hal-01738917

**HAL Id: hal-01738917**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01738917>**

Submitted on 20 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

2011

---

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE**  
**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**de PIBM**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 5 Octobre 2011

par **Alexandre HARLÉ**  
né le 16 Juillet 1980

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT**  
**de DOCTEUR en PHARMACIE**

---

Mise au point du dosage de l'Imatinib, du Norimatinib, du Dasatinib et du Nilotinib par chromatographie liquide haute performance et détecteur à barrette de diodes.

---

Membres du Jury

Président : Monsieur Jean-Louis MERLIN (PU, Nancy)

Juges : Madame Marie-José ROYER-MORROT (Directeur de thèse, MCU-PH, Nancy)  
Monsieur Bernard ROYER (PH, Besançon)  
Madame Geneviève UBEAUD-SÉQUIER (PU-PH, Strasbourg)

**UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2010-2011**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Mobilité ERASMUS et Communication**

Francine KEDZIEREWICZ

**Hygiène Sécurité**

Laurent DIEZ

**Responsable de la filière Officine :** Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :** Isabelle LARTAUD,  
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement :** Jean-Michel SIMON  
**Pharmaceutique Hospitalier**

**DOYEN HONORAIRE**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES  
HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANT HONORAIRE**

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

## ***ENSEIGNANTS***

### **PROFESSEURS**

Gilles AULAGNER .....	Pharmacie clinique
Alain BAGREL .....	Biochimie
Jean-Claude BLOCK .....	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE .....	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL .....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER .....	Microbiologie environnementale
Max HENRY .....	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU .....	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE .....	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR .....	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER .....	Biochimie
Pierre LEROY .....	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT .....	Pharmacie galénique
Alain MARSURA .....	Chimie thérapeutique
Patrick MENU .....	Physiologie
Jean-Louis MERLIN .....	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS .....	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN .....	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON .....	Economie de la santé, législation pharmaceutique

### **MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS .....	Parasitologie
Mariette BEAUD .....	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT .....	Communication et santé
Isabelle BERTRAND .....	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN .....	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX .....	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER .....	Chimie Physique
Cédric BOURA .....	Physiologie
Igor CLAROT .....	Chimie analytique
Joël COULON .....	Biochimie
Sébastien DADE .....	Bio-informatique
Dominique DECOLIN .....	Chimie analytique
Roudayna DIAB .....	Nanotechnologies pharmaceutiques
Béatrice DEMORE .....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU .....	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY .....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS .....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL .....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE .....	Hématologie - Génie Biologique
Adil FAIZ .....	Biophysique-acoustique
Luc FERRARI .....	Toxicologie

Caroline GAUCHER DI STASIO.....	Expertise biopharmacologique
Stéphane GIBAUD .....	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT .....	Chimie organique
Frédéric JORAND .....	Santé et environnement
Olivier JOUBERT .....	Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ .....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT .....	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Christophe MERLIN .....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU .....	Pharmacognosie
Maxime MOURER .....	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS .....	Informatique
Christine PERDICAKIS .....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO .....	Pharmacologie
Virginie PICHON .....	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER .....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY .....	Santé publique
Gabriel TROCKLE .....	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER .....	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIYOU .....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI .....	Pharmacie galénique

### **ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES**

Marie SOCHA.....	Pharmacie clinique
Julien PERRIN .....	Hématologie

### **PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER .....	Sémiologie
--------------------------	------------

### **PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD .....	Anglais
--------------------------	---------

### **Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)**

Anne-Pascale PARRET.....	Directeur
--------------------------	-----------

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**J**é jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

**D**e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Q**ue les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Q**ue je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE  
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX  
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES  
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES  
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».



## **REMERCIEMENTS**

**Au Directeur de thèse, Madame le Docteur Marie-José ROYER-MORROT,**

*Je vous remercie Madame, de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire durant un an et de m'avoir permis de travailler sur ce sujet qui me tenait particulièrement à cœur. Je vous remercie également pour l'encadrement et le soutien que vous m'avez apportés tout au long de ce travail. Veuillez-trouver ici, Madame Royer-Morrot, l'assurance de mon profond respect.*

**Au Président du jury, Monsieur le Professeur Jean-Louis MERLIN,**

*Je vous remercie d'avoir accepté d'être président de ce jury et de m'avoir accueilli depuis Mai 2011 au sein de l'unité E4421 SiGReTO à l'Unité de Biologie des Tumeurs du Centre Alexis Vautrin. Je vous remercie également d'avoir donné une vision plus globale de ce que peut être le travail translationnel de la recherche en cancérologie et de me permettre aujourd'hui de continuer à travailler à vos côtés dans un domaine qui me passionne. Veuillez-croire, Monsieur Merlin à l'expression de toute ma considération.*

**À Madame le Professeur Geneviève UBEAUD-SÉQUIER, membre du jury,**

*C'est un grand honneur pour moi de compter parmi les membres de mon jury une personne experte en pharmacologie et en pharmacocinétique. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Veuillez-trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.*

**À Monsieur le Docteur Bernard ROYER, membre du jury,**

*C'est un grand honneur pour moi de compter parmi les membres de mon jury une personne experte en suivi thérapeutique pharmacologique. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Veuillez-trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.*

**À Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU,**

*Merci Monsieur pour votre soutien et votre aide au cours de l'année écoulée. Merci également pour vos conseils concernant aussi bien ce travail que mon avenir professionnel.*

**À Monsieur le Professeur Patrick NETTER,**

*Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire durant ces deux semestres.*

**À Monsieur le Docteur Nicolas GAMBIER, et Monsieur le Docteur Julien SCALABERTOLA,**

*Merci Nicolas et Julien pour votre soutien sans faille, votre aide et votre amitié. Nos RCP ont été durant l'année passée au laboratoire de toxicologie des moments riches d'échanges et particulièrement productifs.*

**Au personnel du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie et de Pharmacovigilance de l'Hôpital Central de Nancy,**

*Merci pour votre accueil et pour votre bonne humeur. Merci en particulier à Sophie, Natacha et Agnès d'avoir joué le jeu pour les manips de reproductibilité.*

**Au personnel de l'Unité de Biologie des Tumeurs du centre Alexis Vautrin,**

*Merci pour votre accueil et votre soutien pendant cette période difficile où se sont enchainés M2R et thèse d'exercice.*

**À Monsieur le Docteur Gérard MILANO et Madame Nicole RENEE du centre Antoine  
Lacassagne de Nice,**

*Merci pour votre collaboration à cette étude.*

**À Madame le Docteur Agnès GUERCI-BRESSLER**

*Merci pour l'aide apportée dans la partie clinique de ce travail.*

**À mes parents,**

*Merci pour votre soutien et votre amour. Merci pour vos encouragements pendant toute la durée de mes études et ce malgré la distance.*

**À ma famille et proches,**

*Merci pour votre inconditionnel soutien.*

**À mes amis,**

*Merci à tous ceux qui se reconnaîtront.*

# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	6
<b>1. Première partie .....</b>	<b>7</b>
1.1. Leucémie myéloïde chronique ou LMC.....	7
1.2. Tumeurs stromales gastro-intestinales ou GIST .....	10
1.3. Thérapie ciblée .....	11
1.4. Inhibiteurs de Tyrosine Kinase .....	12
1.4.1. Imatinib .....	13
1.4.2. Dasatinib.....	20
1.4.3. Nilotinib .....	24
1.5. Suivi thérapeutique des ITK.....	27
1.5.1. Etudes concentration-efficacité dans la LMC .....	27
1.5.2. Etudes concentration-efficacité dans les GIST .....	30
1.5.3. Etudes concentration-toxicité.....	30
1.5.4. Essais thérapeutiques en cours .....	31
1.5.5. Hypothèses et objectifs.....	34
<b>2. Deuxième Partie : Mise au point et validation du dosage plasmatique de l’Imatinib, Dasatinib et Nilotinib par CLHP-BD .....</b>	<b>35</b>
2.1. Matériel et Méthode .....	35
2.1.1. Principe de la Chromatographie Liquide Haute Performance et du détecteur à barrette de diodes .....	35
2.1.2. Etat des connaissances pour le dosage des ITK en CLHP .....	36
2.1.3. Instruments et conditions opératoires.....	39
2.1.4. Préparation des échantillons .....	40
2.1.4.1. Droite d’étalonnage et contrôles .....	40
2.1.4.2. Etalon interne .....	41
2.1.4.3. Préparation des échantillons de sang.....	42
2.1.5. Validation de la méthode selon les normes COFRAC :.....	43
2.1.5.1. Spécificité.....	43
2.1.5.2. Répétabilité.....	43
2.1.5.3. Reproductibilité ou fidélité intermédiaire .....	44
2.1.5.4. Justesse ou biais .....	44
2.1.5.5. Contamination inter-échantillons .....	44
2.1.5.6. Limites de détection et de quantification .....	45
2.1.5.7. Linéarité .....	45
2.1.5.8. Stabilité.....	46
2.1.5.9. Robustesse.....	46

2.2.	Résultats .....	47
2.2.1.	Spécificité.....	47
2.2.2.	Répétabilité.....	52
2.2.3.	Reproductibilité ou fidélité intermédiaire .....	54
2.2.4.	Justesse ou biais .....	55
2.2.5.	Contamination inter-échantillons .....	56
2.2.6.	Limites de détection et de quantification .....	57
2.2.7.	Linéarité .....	60
2.2.8.	Stabilité.....	60
2.2.9.	Robustesse .....	60

### **3. Troisième partie : Validation croisée de la technique et cas cliniques ..... 62**

3.1.	Imatinib .....	62
3.2.	Norimatinib .....	63
3.3.	Contrôles externes .....	63
3.3.1.	Imatinib .....	63
3.3.2.	Dasatinib.....	64
3.4.	Cas cliniques .....	64
3.4.1.	Cas de mauvaise observance .....	65
3.4.2.	Cas d'adaptation posologique .....	67

### **4. Quatrième partie : Discussion et Conclusion ..... 69**

4.1.	Discussion .....	69
4.1.1.	Aspects techniques .....	69
4.1.2.	Aspects cliniques.....	71
4.2.	Conclusion et perspectives .....	72

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	1
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	2
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	3
<b>ANNEXES</b> .....	74
<i>Annexe 1 : Résultats obtenus pour la mesure de la répétabilité</i> .....	75
<i>Annexe 2 : Résultats obtenus pour la mesure de la reproductibilité</i> .....	77
<i>Annexe 3 : Résultats obtenus pour le calcul du biais</i> .....	79
<i>Annexe 4 : Tableaux récapitulatifs pour le calcul de la linéarité</i> .....	80
<i>Annexe 5 : Protocole de dosage des ITK</i> .....	81
<i>Annexe 6 : Liste des médicaments contenus dans le TDM3</i> .....	85
<i>Annexe 7 : Abstract, Oncologie, Volume 13, Supplément 4 au numéro 9, Septembre 2011.</i> .....	88
<i>Annexe 8 : Communication affichée, 2<sup>ème</sup> Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie, OncoTrans, 8 et 9 Septembre 2011.</i> .....	89
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	90

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : Le chromosome de Philadelphie.....	8
<b>Figure 2</b> : Mésilate d'Imatinib (Glivec®) .....	13
<b>Figure 3</b> : Mécanisme d'action de l'Imatinib.....	14
<b>Figure 4</b> : Norimatinib.....	16
<b>Figure 5</b> : Dasatinib (Sprycel®).....	20
<b>Figure 6</b> : Nilotinib (Tasigna®) .....	24
<b>Figure 7</b> : Colonne Sunfire C18 .....	39
<b>Figure 8</b> : Composition de la phase mobile en fonction du temps.....	40
<b>Figure 9</b> : La Clozapine (Leponex®).....	42
<b>Figure 10</b> : Spectre UV de l'Imatinib.....	47
<b>Figure 11</b> : Spectre UV du Norimatinib.....	48
<b>Figure 12</b> : Spectre UV du Nilotinib.....	48
<b>Figure 13</b> : Spectre UV du Dasatinib.....	49
<b>Figure 14</b> : Spectre UV de la Clozapine.....	49
<b>Figure 15</b> : Chromatogramme type du point 0 de la gamme d'étalonnage.....	50
<b>Figure 16</b> : Chromatogramme type (Gamme Niveau III) à 265nm. ....	51
<b>Figure 17</b> : Chromatogramme type (Gamme Niveau III) à 305 nm. ....	51
<b>Figure 18</b> : Chromatogramme du contrôle TDM3 à 265nm. ....	52
<b>Figure 19</b> : Détermination graphique de la limite de quantification de l'Imatinib .....	57
<b>Figure 20</b> : Détermination graphique de la limite de quantification pour le Norimatinib .....	58
<b>Figure 21</b> : Détermination graphique de la limite de quantification du Dasatinib.....	58
<b>Figure 22</b> : Détermination graphique de la limite de quantification du Nilotinib.....	59
<b>Figure 23</b> : Suivi du ratio MBCR/ABL de Madame V. ....	65
<b>Figure 24</b> : Suivi du ratio MBCR/ABL de Madame S.....	66
<b>Figure 25</b> : Suivi du ratio MBCR/ABL et concentrations plasmatiques en Imatinib de Monsieur B.....	67
<b>Figure 26</b> : Suivi du ratio MBCR/ABL et concentrations plasmatiques en Imatinib de Monsieur P. ....	68



## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau I : Résumé des études faisant appel au dosage des ITK pour un choix de traitement ou pour une adaptation posologique.....</i>	<i>33</i>
<i>Tableau II : Comparaison des différentes méthodes de dosage de l'Imatinib, Norimatinib, Dasatinib et Nilotinib.....</i>	<i>38</i>
<i>Tableau III : Concentrations des différents points de gamme et contrôles .....</i>	<i>41</i>
<i>Tableau IV : Calcul des résolutions pour chacune des molécules analysées .....</i>	<i>50</i>
<i>Tableau V : Résumé des résultats obtenus pour le calcul de la répétabilité.....</i>	<i>53</i>
<i>Tableau VI : Résumé des résultats obtenus pour la mesure de la reproductibilité.....</i>	<i>54</i>
<i>Tableau VII : Résultats obtenus pour le calcul du biais pour chacune des molécules.....</i>	<i>55</i>
<i>Tableau VIII : Valeurs calculées de la contamination inter-échantillons.....</i>	<i>56</i>
<i>Tableau IX : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour les quatre molécules étudiées.....</i>	<i>59</i>
<i>Tableau X : Données obtenues pour le dosage de 10 échantillons sanguins contenant de l'Imatinib.....</i>	<i>62</i>
<i>Tableau XI : Données obtenues pour le dosage de 10 échantillons sanguins contenant de l'Imatinib.....</i>	<i>63</i>
<i>Tableau XII : Résultats de contrôle qualité externe pour l'Imatinib.....</i>	<i>64</i>
<i>Tableau XIII : Résultats de contrôle qualité externe pour le Dasatinib.....</i>	<i>64</i>
<i>Tableau XIV : Estimation de l'incertitude des résultats selon le guide COFRAC 2011 .....</i>	<i>70</i>

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ABCB1</b>	Adenosine triphosphate-Binding Cassette
<b>ABL</b>	de Abelson Leukemia Virus
<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>AFSSAPS</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
<b>AGP</b>	Alpha-1 Glycoprotéine Acide
<b>AKT</b>	du nom d'un oncogène viral
<b>ALK</b>	Activin receptor-Like Kinase
<b>ANGPT</b>	Angiopoïétine
<b>AREG</b>	Amphiréguline
<b>ASC</b>	Aire Sous la Courbe
<b>ATP</b>	Adénosine Triphosphate
<b>BCR</b>	Breakpoint Cluster Region
<b>BD</b>	Détecteur à barrette de diodes
<b>BTC</b>	Bêta-celluline
<b>CL</b>	Chromatographie Liquide
<b>CLHP</b>	Chromatographie Liquide Haute Performance
<b>COFRAC</b>	Comité Français d'Accreditation
<b>CV</b>	Coefficient de Variation
<b>CYPxAy</b>	Cytochrome Px Ay
<b>Cys</b>	Cystéine
<b>DDR</b>	Discoidin Domain Receptor
<b>EFN</b>	Ephrin
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>EPG</b>	Epiréguline
<b>EPH</b>	Ephrin Receptor
<b>EPHA2</b>	EPH Receptor A2
<b>ERbB</b>	de Erythroblastosis B virus
<b>EREG</b>	Epiréguline
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FGF</b>	Fibroblastic Growth Factor
<b>FGFR</b>	Fibroblastic Growth Factor Receptor
<b>FLT3</b>	FMS-Like Tyrosine Kinase
<b>FLT3LG</b>	FLT3 Ligand
<b>GAS6</b>	Growth Arrest-Specific Gene 6
<b>GDNF</b>	Glial cell line-derived Neutropenic Factor
<b>GIST</b>	Gastro-Intestinal Stromal Tumor
<b>GRB</b>	Growth factor Receptor Binding protein
<b>HBEGF</b>	Heparin-Binding EGF
<b>HER</b>	Human Epidermal growth factor Receptor
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>hOCT1</b>	Human Organic Cation Transporter 1
<b>IGF</b>	Insulin-like Growth Factor
<b>IGFR</b>	Insulin-like Growth Factor Receptor
<b>Ig-like</b>	Immunglobulin like
<b>INCa</b>	Institut National du Cancer

<b>ITK</b>	Inhibiteur de Tyrosine Kinase
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	dihydrogénophosphate de potassium
<b>KIT</b>	du nom d'un oncogène viral
<b>KITLG</b>	KIT Ligand
<b>LAL</b>	Leucémie Aigue Lymphoïde
<b>LCK</b>	Lymphocyte-specific protein Tyrosine Kinase
<b>LCR</b>	Liquide céphalorachidien
<b>Leu</b>	Leucine
<b>LMC</b>	Leucémie Myéloïde Chronique
<b>LOD</b>	Limite de détection
<b>LOQ</b>	Limite de quantification
<b>LTK</b>	Leukocyte receptor Tyrosine Kinase
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MDK</b>	Midkine
<b>MET</b>	Mesenchymal-Epithelial Transition factor receptor tyrosine kinase
<b>MYC</b>	de Myelocytomatosis virus
<b>NGF</b>	Nerve Growth Factor
<b>NRG</b>	Neuréguline
<b>NTRK</b>	Neutrophic Tyrosine Kinase Receptor
<b>p53</b>	Protéine p53
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDGF</b>	Platelet-Derived Growth Factor
<b>PDGFR</b>	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
<b>PDZ</b>	Postsynaptic density-95, Discs-large and Zonula occludens-1
<b>Ph+</b>	Positif pour le chromosome de Philadelphie
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PIK3R</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase, sous-unité régulatrice
<b>PLCG</b>	Phospholipase C Gamma
<b>PTN</b>	Pléiotrophine
<b>PTPN</b>	Protein Tyrosine Phosphatase, non-receptor
<b>RASA1</b>	RAS Activator 1
<b>RCC</b>	Réponse Cytologique Complète
<b>RET</b>	Rearranged during Transfection
<b>RMC</b>	Réponse Moléculaire Complète
<b>RMM</b>	Réponse Moléculaire Majeure
<b>ROR</b>	Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor
<b>RTK</b>	Récepteur à activité Tyrosine Kinase
<b>SCF</b>	Stem Cell Factor
<b>SH3</b>	SRC homology domain 3
<b>SHC</b>	SH2 domain-Containing
<b>SHP</b>	SH2 domain-Containing Phosphatase
<b>SM</b>	Spectromètre de Masse
<b>SRC</b>	de Sarcoma virus
<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription
<b>STP</b>	Suivi Thérapeutique Pharmacologique
<b>SYK</b>	Spleen Tyrosine Kinase
<b>TAM</b>	Tyro 3, Axl and Mertk
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor alpha
<b>TIE</b>	Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains
<b>TK</b>	Tyrosine Kinase

**UV** Ultra-Violets  
**VEGF** Vascular Endothelial Growth Factor  
**VEGFR** Vascular Endothelial Growth Factor Receptor  
**WNT** Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site

## INTRODUCTION

Selon le dernier rapport de l'Institut National du Cancer (INCa), paru en Novembre 2010, le cancer a tué en France, dans la période allant de 2003 à 2007, 147 800 personnes. Il constitue la première cause de décès chez l'homme avec 33% de l'ensemble de la mortalité et la seconde chez la femme avec 23% de l'ensemble de la mortalité. En 2010, le nombre de décès toujours imputable au cancer a été estimé à 146 800 personnes.

Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ont été, au cours de ces dernières années, un apport majeur dans le traitement du cancer, en particulier dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC) et dans celui des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST). Le traitement de ces maladies fait appel à l'Imatinib (Glivec<sup>®</sup>) et plus récemment, les formes de LMC résistantes à l'Imatinib peuvent être traitées par deux ITK de seconde génération, le Dasatinib (Sprycel<sup>®</sup>) et le Nilotinib (Tasigna<sup>®</sup>).

De récentes études ont permis de démontrer l'intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique (STP) dans le traitement de la LMC et des GIST. Il a été clairement montré qu'il existe une relation entre concentration plasmatique en Imatinib et réponse au traitement dans le cas de ces deux maladies. D'autres études sont en cours pour déterminer également s'il existe une relation entre concentration plasmatique en Dasatinib ou en Nilotinib et réponse au traitement de la LMC.

Le développement du STP nécessite la mise au point d'une méthode de dosage simple et efficace permettant de déterminer les concentrations plasmatiques de ces médicaments. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser une méthode de chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplé à un détecteur à barrette de diodes (BD). Cette méthode permet de déterminer simplement et rapidement les concentrations plasmatiques en Imatinib (et de son métabolite majeur le Norimatinib), en Dasatinib et en Nilotinib.

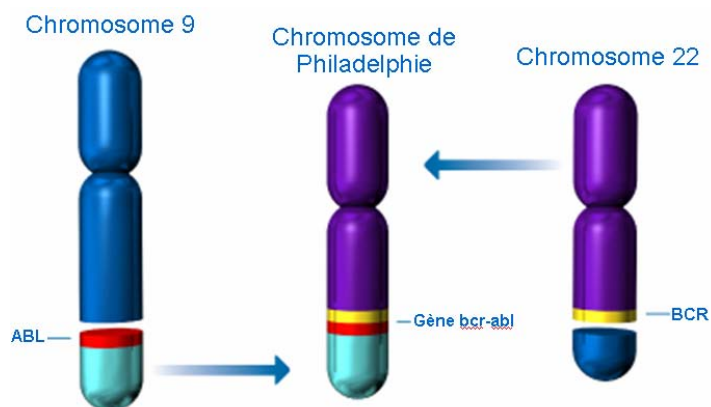
# 1. Première partie

## 1.1. *Leucémie myéloïde chronique ou LMC*

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie qui a été décrite pour la première fois par John Hughes Bennett en 1845 au Royal Infirmary d'Edimburgh (1). Cette maladie est classée parmi les syndromes myéloprolifératifs au même titre que la thrombocytémie essentielle, la splénomégalie myéloïde et la maladie de Vaquez. La LMC a pour origine un trouble clonal myéloprolifératif d'une cellule souche pluripotente.

La LMC est une maladie relativement rare qui touche environ 2 personnes sur 100 000 chaque année (2). L'âge médian de découverte de cette pathologie se situe à 65 ans. Aucun facteur n'est connu pour favoriser cette maladie et aucun moyen ne permet de prédire son apparition. Cependant, une augmentation de l'incidence a été observée au Japon en 1945 après l'explosion des bombes nucléaires d'Hiroshima et de Nagasaki et il a été supposé qu'une exposition à des radiations allant de 0,5 à 0,09 Gy pourrait favoriser la survenue de cette maladie (3).

La LMC est la première maladie maligne pour laquelle une anomalie chromosomique a été identifiée : un chromosome anormal résultant d'une translocation réciproque 9; 22, connu sous le nom de chromosome de Philadelphie. Cette translocation implique le gène *ABL1* (Abelson), un proto-oncogène présent sur le chromosome 9 et le gène *BCR* (Breakpoint Cluster Region) présent sur le chromosome 22 (*Figure 1*). La translocation de ces gènes donne naissance à la formation d'une protéine chimérique Bcr-Abl possédant une activité tyrosine kinase (4, 5). C'est la découverte de cette activité tyrosine kinase particulière qui a permis le développement de thérapies dites ciblées.



**Figure 1** : Fusion anormale des gènes BCR du chromosome 22 et ABL du chromosome 9 : Le chromosome de Philadelphie

Adapté d'après [www.mycmlcare.com](http://www.mycmlcare.com)

Classiquement, la maladie se déroule en trois phases : une phase chronique, une phase accélérée et une phase blastique. 90% des patients sont diagnostiqués lors de la phase chronique, la plupart du temps de manière fortuite suite à un examen sanguin de routine. Cela s'explique par le fait que les patients atteints de LMC en phase chronique possèdent toujours un système immunitaire compétent, ce qui les rend asymptomatiques pendant cette période. La phase chronique se caractérise principalement par une leucocytose qui peut atteindre  $1000 \cdot 10^9/L$  ainsi que des signes cliniques comme la fatigue ou des douleurs osseuses. Après une période de 3 à 5 ans, les patients non traités évolueront en maladie blastique, une forme de leucémie aigue particulièrement agressive, hautement chimiorésistante et très rapidement fatale.

Le suivi de l'évolution de la maladie s'effectue par l'évaluation de trois critères, la réponse hématologie, la réponse cytogénétique et la réponse moléculaire.

La réponse hématologique complète (RHC) correspond à la disparition des signes hématologiques de la maladie (taux de plaquettes inférieur à 450 G/L, taux de leucocytes inférieur à 10 G/L, disparition des cellules granuleuses immatures circulantes, réduction de la basophilie à moins de 5 % de la formule sanguine) et cliniquement à la disparition de la splénomégalie.

La réponse cytogénétique est évaluée par l'analyse des cellules médullaires sur au moins 20 à 30 mitoses. Une réponse cytogénétique complète (RCC) se définit par la disparition complète des métaphases Ph<sup>+</sup> et la réponse partielle à leur diminution entre 1 et 35 % des mitoses examinées. Lorsque la réponse est complète ou partielle, elle est aussi appelée réponse cytogénétique majeure (RCM). La réponse cytogénétique est dite mineure s'il persiste 36 à

65% de mitoses Ph+ et minime s'il persiste 66 à 95%. Au-delà de 95%, on parle d'absence de réponse cytogénétique.

La réponse moléculaire est évaluée par la quantification par PCR en temps réel du taux de transcrits BCR-ABL. La réponse moléculaire est dite complète (RMC) si le ratio BCR-ABL / gène de contrôle est non détectable ou non quantifiable. La réponse moléculaire est dite majeure (RMM) si le ratio BCR-ABL / gène de contrôle est inférieur ou égal à 0,1%.

Le traitement de la LMC a radicalement changé depuis 2002, suite à l'autorisation de mise sur le marché de l'Imatinib, un Inhibiteur de Tyrosine Kinase (ITK) commercialisé sous le nom de Glivec® (6). L'étude d'enregistrement de l'Imatinib montre qu'à la dose de 400 mg par jour 96% des patients présentent une RHC et 55% une RCC. Le taux de survie globale à 5 ans s'élève à 79%. Auparavant, les traitements disponibles comme l'interféron alpha et les allogreffes de cellules souches ne permettaient d'obtenir qu'une survie globale allant de 30 à 50% à 10 ans (1) et les patients ne bénéficiaient que d'une qualité de vie médiocre. La posologie de 400 mg par jour est donc la posologie indiquée dans le traitement de la LMC, cependant, il semblerait que la réponse au traitement par Imatinib soit corrélée avec sa concentration plasmatique ; en effet, dans une étude datant de 2008 (7), sur une sélection de 40 patients, 20 répondant au traitement par Imatinib et 20 ne répondant pas au traitement, il s'est avéré que la concentration plasmatique en Imatinib des patients répondeurs était significativement plus élevée (moyenne observée de 1670 ng/mL dans le groupe répondeur et 530 ng/mL dans le groupe des non répondeurs). Une étude publiée la même année par Awidi *et al.* (8) conclue à la nécessité de la mise en place d'un suivi thérapeutique pharmacologique (STP) de l'Imatinib.

En cas d'échec du traitement par Imatinib ou en cas d'intolérance à cette molécule, deux autres molécules plus récentes, elles aussi de la famille des ITK peuvent être prescrites : Le Nilotinib (Tasigna®) et le Dasatinib (Sprycel®). Ces deux molécules sont capables de traiter la quasi-totalité des mutants *BCR-ABL* connus, à l'exception de la mutation T315I. D'autres molécules sont par conséquent à l'essai dans le traitement de la LMC. C'est le cas notamment d'un autre ITK, le Bosutinib. Les résultats préliminaires des études de phase III en cours montrent une efficacité de cette molécule comparable à celle du Dasatinib ou du Nilotinib, après échec au traitement par Imatinib. Le profil de toxicité semble lui aussi équivalent, cependant, cette molécule s'est également révélée inefficace dans le traitement des patients présentant la mutation T315I (9). Afin de traiter les formes mutées T315I, un certain nombre



de molécules sont en développement : C'est le cas du danusertib (PHA-739358), l'AT9283 (inhibiteur des Aurora Kinases), le Ponatinib (AP24534), de la molécule XL228 ou encore de deux nouvelles molécules de la famille des inhibiteurs de Switch Pocket Kinases, DCC-2036 et DCC-2157 (10).

## **1.2. Tumeurs stromales gastro-intestinales ou GIST**

C'est en 1983 (11) que ce type particulier de cancer a été décrit pour la première fois. Bien qu'étant les tumeurs mésoenchymateuses non-épithéliales du tractus gastro-intestinal les plus fréquentes (12), elles restent relativement rares avec une incidence de 8,5 à 10 cas par million d'habitants en France (13). Les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) se développent le plus fréquemment à partir de la paroi de l'estomac, parfois de l'intestin grêle et plus rarement d'autres segments du tractus digestif.

Il a fallu attendre 15 années après la description de Mazure en 1983 pour identifier les mécanismes moléculaires qui interviennent dans les GIST. Ainsi, c'est en 1998 (14) que le rôle oncogénique de *KIT* a été décrit : La mutation de ce gène provoque une forte augmentation de l'activité tyrosine kinase de la cellule et surtout enclenche le processus de tumorigenèse. C'est donc la découverte de cette augmentation de l'activité tyrosine kinase qui a orienté les thérapeutes vers l'utilisation d'ITK pour traiter ce cancer, qui jusqu'ici, ne bénéficiait que d'une thérapeutique pauvre et peu pertinente. L'utilisation de l'Imatinib dans cette pathologie a considérablement amélioré la survie sans progression des malades atteints de GIST (6, 15), en particulier chez les patients dont le volume tumoral est réduit de façon telle qu'une exérèse chirurgicale devient alors possible. Il a été également montré que la réponse partielle au traitement et la survie globale étaient significativement supérieures (risque de décès inférieure à 95%) pour les patients possédant la mutation de l'exon 11 du gène *KIT* plutôt que de l'exon 9 ou ne présentant pas de mutation (16).

Le traitement de première ligne est, si elle est réalisable, l'exérèse chirurgicale par voie classique ou endoscopique pour les plus petites lésions. Si cette exérèse n'est pas possible (lésions trop étendues localement, patients inopérables ou présence de sites métastatiques), le traitement par Imatinib à raison de 400 mg par jour en une prise, chez les patients exprimant la protéine c-KIT est recommandé.

En cas d'échec au traitement par Imatinib, il est possible d'utiliser un autre ITK : le Sunitinib (Sutent<sup>®</sup>). Le Sunitinib a obtenu l'autorisation de mise sur le marché en seconde ligne du traitement des GIST après échec du traitement par Imatinib ou en cas d'intolérance à celui-ci. En 2006, une étude clinique de Phase III a été menée chez des patients résistants à l'Imatinib par Demetri *et al.* (17), randomisant 312 patients. Le bras expérimental recevait du Sunitinib (Sutent<sup>®</sup>), alors que le bras témoin recevait un placebo. La survie sans progression était de 27,3 semaines dans le bras expérimental, contre 6,4 semaines dans le bras témoin (Hazard Ratio = 0,33 ;  $p < 0,0001$ ).

### **1.3. Thérapie ciblée**

Les thérapeutiques ciblées sont devenues prépondérantes dans le traitement des cancers (18). Ce concept assez neuf de médecine personnalisée désigne la pratique selon laquelle il est nécessaire pour un patient donné, de trouver les marqueurs cellulaires propres au cancer de ce patient et utiliser les traitements les plus adaptés afin d'assurer la meilleure efficacité et également diminuer les toxicités souvent lourdes des chimiothérapies anticancéreuses. Des techniques de biologie moléculaire sont utilisées pour établir en quelque sorte la « carte d'identité » de la tumeur. En effet, la tumeur possède sa propre identité génétique, bien dissociée de celle du patient. La tumeur possède son propre génome : On parle de pharmacogénomique tumorale.

Depuis quelques années, de nombreuses molécules ont été développées, notamment grâce à la découverte de nouveaux biomarqueurs, améliorant de manière significative le pronostic vital de certains patients (19). C'est le cas des anticorps monoclonaux et des Inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITK). Ces deux familles de molécules ont pour cible les récepteurs de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (20). Les anticorps monoclonaux ciblent la partie extracellulaire du récepteur à activité tyrosine kinase. Ils sont administrés exclusivement par voie parentérale. Les ITK ciblent quant à eux la partie intracellulaire du récepteur à activité tyrosine kinase. Ces molécules sont administrées quasi exclusivement per os.

L'essor de la biologie moléculaire a permis de mieux comprendre et appréhender la notion de thérapie ciblée et de développer le diagnostic moléculaire. L'étude du génome de la tumeur permet de mettre en évidence des mutations, des délétions, des protéines de fusion ou encore tout type d'anomalies génétiques. En fonction des anomalies identifiées et selon le type tumoral, un choix thérapeutique peut être établi. En 2011, la prescription de thérapies ciblées nécessite des tests de biologie moléculaire précis : c'est le cas de la surexpression de HER-2 dans le cancer du sein pour débiter un traitement par Trastuzumab (21), ou encore la mutation des récepteurs EGFR dans le cancer du poumon pour l'utilisation du Gefitinib ou de l'Erlotinib (22) et enfin l'absence de mutation de l'oncogène *KRAS* pour l'utilisation du Cetuximab ou du Panitumumab dans les cancers colorectaux métastatiques (23). Plus récemment, l'étude de la mutation V600E de l'oncogène *BRAF* a montré son grand intérêt dans le traitement du mélanome métastatique, permettant la prescription du Vemurafenib, améliorant le taux de réponse de 48% contre 5% pour la thérapeutique classique par Décabazine (24).

C'est également le cas de la présence ou non des mutations BCR-ABL dans la leucémie aigue lymphoïde (LAL) pour l'utilisation de l'Imatinib. Le statut mutationnel de *c-KIT* est également prépondérant dans le choix de la thérapeutique par ITK dans le traitement des GIST.

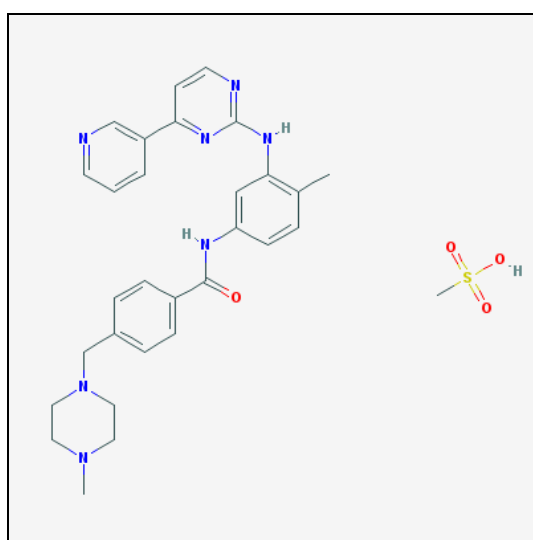
#### **1.4. Inhibiteurs de Tyrosine Kinase**

Les ITK sont des molécules de faible masse moléculaire. Ils se fixent compétitivement au niveau du domaine catalytique et plus exactement au niveau du site de fixation de l'ATP, inhibant ainsi les enzymes à activité tyrosine-kinase. Ces molécules sont administrées essentiellement par voie orale.

La présente étude s'intéresse à trois ITK majeurs utilisés en hématologie et en gastroentérologie oncologique. L'Imatinib et son métabolite actif le Norimatinib, le Dasatinib et le Nilotinib.

### 1.4.1. Imatinib

Le mésilate d'Imatinib (CGP57148B ou STI571) a été le premier inhibiteur de tyrosine kinase mis sur le marché dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique Ph+ et des tumeurs stromales gastro-intestinales. Il est également indiqué en association à la chimiothérapie dans les leucémies aiguës lymphoïdes Ph+ et chez les patients atteints de dermatofibrosarcome protuberans. Cette molécule est commercialisée sous le nom de Glivec® en France et Gleevec® dans les pays anglo-saxons (**Figure 2**).



**Figure 2 :** Mésilate d'Imatinib (Glivec®)

IUPAC: 4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-N-[4-methyl-3-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-yl)amino]phenyl]benzamide

Masse moléculaire : 589.7 g/mol

Formule brute : C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>S

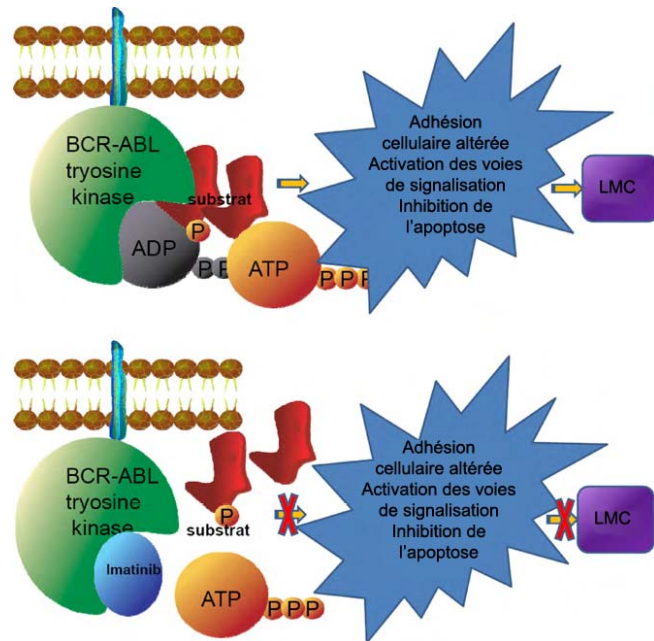
pKa 13,45

D'après PubChem, NCBI et DrugBank

#### Mécanisme d'action :

L'Imatinib est un puissant inhibiteur de la tyrosine kinase BCR-ABL au niveau cellulaire in vivo et in vitro. Cette molécule inhibe sélectivement la prolifération et induit l'apoptose des cellules leucémiques Ph+ et des lignées cellulaires BCR-ABL positives.

L'Imatinib se lie sélectivement à la conformation inactive de la protéine ABL et bloque de manière compétitive la liaison de l'ATP et par conséquent empêche le passage de la protéine à sa forme active (25). L'Imatinib inhibe la prolifération cellulaire ainsi que la formation de tumeurs, mais sans provoquer l'apoptose (**Figure 3**).



**Figure 3 :** Mécanisme d'action de l'Imatinib.

Adapté d'après An *et al.* (25)

L'Imatinib empêche l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL en bloquant la liaison de l'ATP

L'Imatinib est également un inhibiteur de tyrosine kinase du Platelet-derived growth factor (PDGF) et du stem cell factor (SCF) c-Kit. Il inhibe, par conséquent, les processus cellulaires médiés par PDGF et SCF. Ce mécanisme explique l'activité de l'Imatinib sur les cellules présentant une mutation activatrice de Kit, ce qui est notamment le cas dans les GIST.

#### Indication et posologie :

Dans le traitement de la LMC, la posologie est de 400 mg par jour en phase chronique et de 600 mg par jour en phase accélérée et en phase blastique ; elle est de 400 mg par jour chez les patients atteints de GIST. Des études de 2007 (Picard *et al*) (26) et 2008 (Larson *et al*) (27) semblent montrer dans ces deux dernières pathologies l'importance de la concentration plasmatique résiduelle dans les phénomènes de réponse au traitement. Ces deux études montrent qu'il existe une relation entre concentrations plasmatiques d'Imatinib et réponse au traitement.

Les résultats de l'étude STIM (28), menée par une équipe Française pendant une période moyenne de 24 mois sur 100 patients atteints de LMC, ont montré que les patients

ayant conservé une Réponse Moléculaire Complète (RMC) pendant 2 ans sous Imatinib peuvent suspendre le traitement. A 12 mois, la probabilité de conservation d'une RMC était de 41%. L'imatinib a été réintroduit chez tous les patients ayant présenté une rechute et cela sans aucun échec. Ainsi, les résultats de cette étude montrent que l'Imatinib peut être interrompu sans risque chez les patients présentant une RMC sous Imatinib depuis plus de 2 ans.

### Pharmacocinétique :

#### Absorption :

Après administration orale, la biodisponibilité absolue de l'Imatinib est supérieure à 97%, quelle que soit la formulation (98,7% pour la forme capsule et 97,3% pour la solution orale) (29). Le pic plasmatique est observé entre la deuxième et la quatrième heure suivant la prise (6). L'Imatinib est détectable dans le plasma 30 minutes après une première administration (30). L'étude de l'Aire Sous la Courbe (ASC) sur 321 échantillons plasmatiques correspondant à 59 patients traités par Imatinib per os (capsules orales), a permis de mettre en évidence une forte variabilité interindividuelle, dépendante en particulier du poids corporel, de l'âge ou du sexe (31). L'absorption de l'Imatinib n'est pas modifiée par l'absorption concomitante de nourriture ou d'antiacides (32).

#### Distribution :

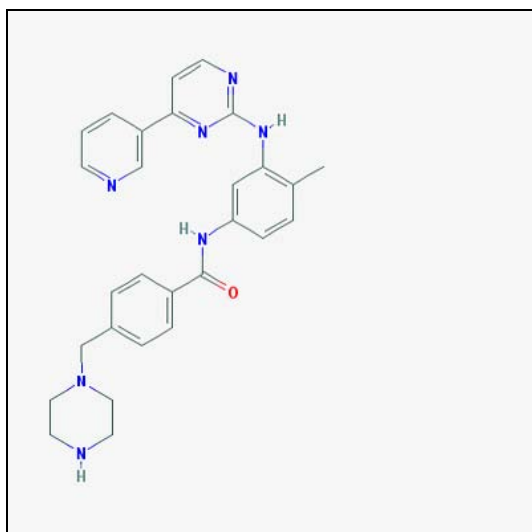
À des concentrations plasmatiques cliniquement significatives, l'Imatinib est lié à 95% aux protéines plasmatiques, principalement l'albumine et l' $\alpha_1$ -glycoprotéine acide (AGP) ; dans une plus faible proportion, l'Imatinib se lie également aux lipoprotéines (6). L'Imatinib est très largement distribué dans les tissus. Son volume de distribution est de 435 Litres. Il est également distribué dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), mais les concentrations retrouvées y sont cent fois moins élevées que dans le plasma (32).

#### Métabolisme :

Le principal métabolite circulant de l'Imatinib est le Norimatinib ou N-Desmethyl Imatinib (**Figure 4**). Le Norimatinib présente une activité similaire à celle de l'Imatinib.

L'ASC du Norimatinib n'atteint que 16% de l'ASC de l'Imatinib. La liaison aux protéines plasmatiques du Norimatinib est similaire à celle de l'Imatinib.

La biotransformation de l'Imatinib est essentiellement effectuée par le CYP3A4 et le CYP3A5 ce qui explique un certain nombre d'interactions médicamenteuses, notamment avec le Clopidogrel, le Verapamil, le Diltiazem, l'Amlodipine, la Nifedipine, la plupart des statines ou encore les antiarythmiques, dont il augmente l'exposition (33). Les cytochromes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 et CYP1A2 jouent un rôle mineur dans sa métabolisation (32). L'Imatinib inhibe la O-glucuronidation du paracétamol, ce qui peut induire une hépatotoxicité. La dose maximale de 1300 mg par jour de paracétamol est ainsi recommandée chez les patients traités par Imatinib (33).



**Figure 4 :** Norimatinib

IUPAC: N-[4-methyl-3-[(4-pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]phenyl]-4-(piperazin-1-ylmethyl)benzamide

Masse moléculaire : 479,6 g/mol

Formule brute : C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O

D'après PubChem, NCBI

### Élimination :

Les demi-vies plasmatiques de l'Imatinib et du Norimatinib sont respectivement de 18 et 40h (34).

Environ 81% de la dose d'Imatinib est éliminée en 7 jours, 68% dans les fèces et 13% dans les urines (6). La forme inchangée représente 25% de la dose (20% dans les fèces et 5% dans les urines), le reste étant composé de métabolites.

## Résistances à l'Imatinib :

La résistance à l'Imatinib peut se classer en résistance primaire ou secondaire. La résistance primaire s'exprime d'emblée, c'est-à-dire que le patient ne tire à aucun moment bénéfice de la thérapie. Les patients présentant une résistance primaire sont dits « réfractaires ». La résistance secondaire, aussi appelée résistance acquise, se manifeste au cours du traitement (35).

Chez les patients atteints de LMC, il est considéré qu'une perte de la réponse moléculaire majeure (RMM) ou de la réponse cytologique complète (RCC) constitue le développement d'une résistance secondaire. La conséquence clinique d'une résistance secondaire est l'échec du traitement par Imatinib. Le clinicien doit alors augmenter la posologie quotidienne, qui passera de 400 à 600, voire 800 mg par jour. Si le patient présente toujours une résistance secondaire après l'augmentation de la posologie, il faut alors changer de molécule pour un autre ITK (Dasatinib ou Nilotinib). D'après la littérature, 20 à 30% des patients sont susceptibles de développer une résistance secondaire à l'Imatinib (36).

Les mécanismes de résistance à l'Imatinib peuvent être classés en deux groupes : les mécanismes de résistance indépendants du transcrit *BCR-ABL1* et les mécanismes de résistance dépendants de *BCR-ABL1* (35).

Parmi les mécanismes de résistance indépendants de *BCR-ABL1*, des considérations purement pharmacocinétiques comme une grande variabilité interindividuelle de l'absorption interviennent (31). La quantité d'Imatinib pouvant entrer dans la cellule tumorale est également un paramètre important et indépendant de *BCR-ABL1*. Des protéines transmembranaires comme ABCB1 (Adenosine triphosphate-binding cassette) pourraient intervenir dans cette variabilité. Le transporteur de cations hOCT1 pourrait également jouer un rôle non négligeable (35). Une autre piste concerne la présence de cellules malades quiescentes exprimant CD34+. Un taux de 0,5% de cette population cellulaire particulière se caractérise par sa résistance naturelle à l'Imatinib (37). Un autre mécanisme de résistance à l'Imatinib non dépendant de *BCR-ABL1* est décrit sous le nom « d'évolution clonale ». Pendant le développement de la maladie, notamment lors du passage à la phase blastique, un certain nombre d'anomalies génétiques supplémentaires peuvent se présenter. C'est le cas par exemple de trisomies 8 (34% des cas), l'isochromosomie 17 (20% des cas) ou encore la duplication du chromosome Ph+ (38% des cas). A cette dernière anomalie génétique ont été



attribuées la surexpression du proto-oncogène *c-Myc*, la surexpression de *BCR-ABL1* ou encore la délétion 17p. Il est à noter que le gène suppresseur de tumeur *p53* est situé sur le locus 17p et se retrouve muté dans 25 à 30% des cas. L'inactivation de *p53* a été rapportée comme un mécanisme de résistance à l'Imatinib (35).

Parmi les mécanismes de résistance à l'Imatinib dépendants de *BCR-ABL1*, on trouve tout d'abord la surexpression de ce gène. Les cellules surexprimant *BCR-ABL1* présentent naturellement une forte résistance à l'Imatinib. D'autre part, un certain nombre de mutations ponctuelles intervenant sur le domaine kinase de *BCR-ABL1* sont responsables de résistances à l'Imatinib. En effet, l'Imatinib se lie de manière spécifique au domaine ABL1 kinase et cette liaison devient impossible en cas de mutation. Plus de 100 mutations ponctuelles de *BCR-ABL1* ont été rapportées à ce jour (35).

#### Effets indésirables :

Le traitement en première ligne par Imatinib est relativement bien supporté, puisque dans l'étude IRIS, après un suivi de 5 ans, seulement 4,9% des patients ont dû interrompre leur traitement à cause d'effets indésirables (38).

Les affections hématologiques sont les plus fréquemment rencontrées. Toujours dans l'étude IRIS, des neutropénies et des thrombopénies de grade 3 et 4 ont été observées avec des fréquences respectives de 14 et 8 % (38). Les autres effets hématologiques graves communément observés sont des pancytopénies et des neutropénies fébriles. Il est à noter que les effets indésirables hématologiques sont plus fréquemment rencontrés chez les patients atteints de LMC que chez les patients atteints de GIST.

Des rétentions de fluides plus ou moins graves ont été observées dans 62% des cas lors de l'utilisation de l'Imatinib, dont 60% représentait des œdèmes superficiels. 7% des patients ont développés quant à eux d'autres effets indésirables comme des épanchements pleuraux, de l'ascite, des épanchements péricardiques ou encore des œdèmes pulmonaires. Les œdèmes périorbitaux ou de la lèvre inférieure sont les œdèmes les plus fréquemment rencontrés chez les patients traités par Imatinib (38).

Les effets indésirables cardiaques sont assez rares et semblent plus difficiles à identifier. En effet, la plupart des études cliniques visant à évaluer l'Imatinib ont de manière systématique exclus les patients possédant des facteurs de comorbidité cardiaque. Une étude rétrospective estime la survenue d'accident cardiaque ou d'une dysfonction ventriculaire

gauche entre 0,5 et 1,1% chez les patients traités pour une LMC (38). Cette proportion est inférieure à 1% chez les patients traités pour un GIST.

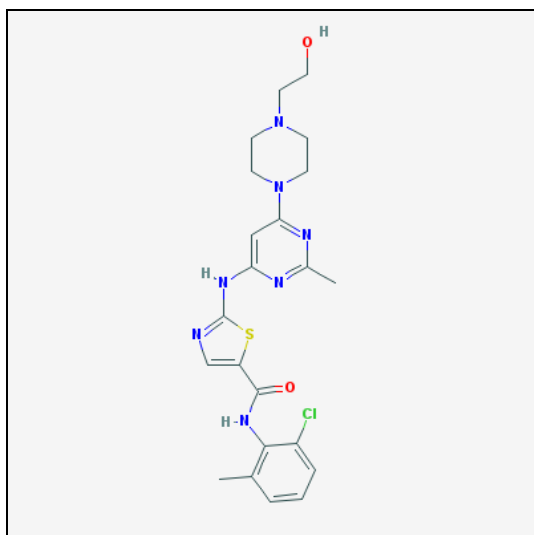
Les autres effets indésirables rencontrés sont une élévation des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT), des céphalées, des insomnies, des bouffées vasomotrices, des hémorragies, des dyspnées, des épistaxis, de la toux, des nausées, des diarrhées, des vomissements ainsi que des troubles musculosquelettiques comme des crampes, des spasmes musculaires, des myalgies, des arthralgies et des douleurs osseuses.

Les patients souffrant d'effets indésirables nécessitant l'arrêt du traitement par Imatinib peuvent aujourd'hui compter sur les traitements de seconde génération comme le Dasatinib ou le Nilotinib.

## 1.4.2. Dasatinib

### Mécanisme d'action :

Le Dasatinib (**Figure 5**), commercialisé sous le nom de Sprycel<sup>®</sup> possède tout comme l'Imatinib, une activité inhibitrice puissante des protéines kinases. Au même titre que l'Imatinib, le Dasatinib bloque le passage de la conformation inactive à la conformation active de la protéine ABL à activité tyrosine kinase en inhibant de manière compétitive la fixation de l'ATP. Il a été démontré que, in vitro, le Dasatinib est plus sélectif que l'Imatinib, notamment sur les formes de BCR-ABL sauvages ainsi que sur la plupart des lignées mutées présentant une forte résistance à l'Imatinib, à l'exception des mutations T315I. Le Dasatinib inhibe également d'autres kinases de la famille SRC, c-Kit, Lck, EPHA2 et PDGFR- $\beta$  (39).



**Figure 5 :** Dasatinib (Sprycel<sup>®</sup>)

IUPAC: N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-2-methylpyrimidin-4-yl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide

Masse moléculaire : 488,0 g/mol

Formule brute : C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S

pKa 10,28

D'après PubChem, NCBI et DrugBank

### Indication et posologie :

Le Dasatinib est indiqué dans le traitement de la LMC chez l'adulte quelle que soit la phase de la maladie, en cas de résistance ou intolérance à l'Imatinib et dans la LAL Ph+.

La dose de Dasatinib recommandée, en une administration quotidienne, est de 100 mg pour la phase chronique de la LMC et de 140 mg dans la phase blastique myéloïde ou blastique lymphoïde de la LMC, ainsi que dans la LAL Ph+.

Cette molécule a été autorisée le 18 Octobre 2010 comme traitement de première ligne de la LMC par l'agence de santé Américaine, la Food and Drug Administration (FDA), notamment suite à l'étude publiée dans le New England Journal of Medicine par Kantarjian *et al* (39). Cette étude prospective réalisée sur 519 patients consistait à suivre pendant 12 mois les patients inclus soit dans un bras expérimental (traitement par Dasatinib), soit dans un bras témoin (traitement par Imatinib). Le taux de réponse complète cytogénétique était de 88% dans le bras expérimental contre 72% dans le bras témoin ( $p=0,001$ ). Le taux de réponse moléculaire majeure était de 46% dans le bras Dasatinib contre 28% dans le bras Imatinib ( $p < 0,0001$ ). Ainsi, cette étude démontre la supériorité du Dasatinib sur l'Imatinib comme traitement de première ligne de la LMC, aussi bien sur la RCC que sur la RMM.

L'agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) n'a pas encore autorisé en France le Dasatinib en première ligne de traitement de la LMC. Pour le moment, son indication reste le traitement après échec d'un traitement par Imatinib ou en cas d'intolérance à cette dernière molécule.

#### Pharmacocinétique :

##### Absorption :

L'absorption du Dasatinib est rapide avec un pic de concentration entre 0,5 et 3 heures (40). L'ASC est augmentée de 14% en cas de prise concomitante à un repas riche en graisses, bien que cela n'ait apparemment pas d'impact significatif sur la réponse clinique au traitement. Comme pour l'Imatinib, il existe une grande variabilité interindividuelle de l'absorption, allant de 32 à 118% (32).

##### Distribution :

Le volume de distribution du Dasatinib est de 2505 litres, ce qui indique que le médicament est fortement distribué dans le compartiment extravasculaire. À des concentrations plasmatiques cliniquement significatives, le Dasatinib est lié à environ 96% aux protéines plasmatiques, principalement à l'albumine. La distribution dans le LCR est quasi inexistante (de 0,05 à 0,28 fois la concentration plasmatique) (32).

### Métabolisme :

Le Dasatinib est fortement métabolisé, principalement par le CYP3A4 (41). Dix neuf métabolites ont été identifiés. Les métabolites du Dasatinib ne semblent pas jouer un rôle majeur dans son activité in vivo.

La métabolisation utilisant le CYP3A4, il existe un certain nombre d'interactions médicamenteuses susceptibles d'augmenter l'exposition au Dasatinib. C'est le cas de la Levothyroxine, les macrolides, les quinolones, les azolés, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, les statines, le Verapamil et le Diltiazem. Au contraire, l'association avec des médicaments comme la Rifampicine, le Phénobarbital, la Carbamazépine, diminue l'exposition au Dasatinib (33).

### Élimination :

Le Dasatinib est à 85% éliminé dans les fèces et à 4% dans les urines (40). Sa demi-vie moyenne est de 5 heures.

### Effets indésirables :

Le traitement par Dasatinib est relativement bien toléré. Au cours des études cliniques réalisées sur patients résistants à l'Imatinib et traités en seconde ligne par Dasatinib, seulement 4% des patients ont interrompu le traitement pour cause d'effets indésirables après 6 mois de suivi. Après un suivi de 2 ans, 11% des patients ont du interrompre temporairement le traitement par Dasatinib pour cause d'effets indésirables et 69% de ces patients l'ont interrompu de manière définitive (38). Dans une étude randomisée de phase III utilisant le Dasatinib comme traitement de première ligne, 5% des patients ont du interrompre le traitement pour cause d'effets indésirables (38).

Comme pour l'Imatinib, les principales affections rencontrées sont hématologiques. Après un suivi de 24 mois, 35% des patients traités par une dose quotidienne de 100 mg de Dasatinib ont souffert de neutropénie de grade 3 ou 4 et 23% d'une thrombocytopénie (38). Des neutropénies fébriles et des pancytopénies sont également fréquentes avec ce traitement.

Des rétentions de fluides sont également communément observées lors du traitement par Dasatinib. Chez les patients traités par une dose quotidienne de 100 mg et après un suivi de 24 mois, l'incidence de l'apparition d'œdème était de 17% (14% pour les épanchements

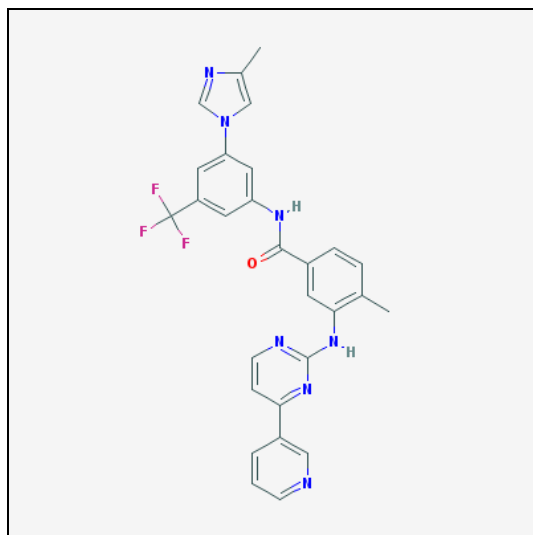
pleuraux et 2% pour les épanchements péricardiques) (38). Les œdèmes pulmonaires, l'hypertension pulmonaire et les pneumonies sont également des effets indésirables fréquents.

Des insuffisances cardiaques congestives ont été observées chez 4% des patients traités par une dose quotidienne de 140 mg par jour de Dasatinib. De plus, l'allongement de l'intervalle QT a été observé dans moins d'1% des cas, chez des patients traités en première ligne par l'Imatinib (38).

Les autres effets indésirables fréquemment rencontrés lors du traitement par Dasatinib sont des céphalées, des neuropathies, des troubles visuels, des acouphènes, des hémorragies, des épisodes hypertensifs, des diarrhées, des nausées, des vomissements et des rashes cutanés. Comme pour l'Imatinib, des affections musculosquelettiques sont observées. Des douleurs, des arthralgies ou des inflammations musculaires sont souvent rapportées.

### 1.4.3. Nilotinib

Le Nilotinib, commercialisé sous le nom de Tasigna® possède tout comme l'Imatinib et le Dasatinib, une forte activité inhibitrice de l'oncoprotéine Bcr-Abl (**Figure 6**).



**Figure 6** : Nilotinib (Tasigna®)

IUPAC: 4-methyl-N-[3-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]-3-[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino benzamide

Masse moléculaire : 529,5 g/mol

Formule brute : C<sub>28</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O

pKa 13,47

D'après PubChem, NCBI et DrugBank

#### Mécanisme d'action :

Le mécanisme d'action du Nilotinib est identique à celui de l'Imatinib et du Dasatinib : il empêche compétitivement la fixation de l'ATP au domaine catalytique de la protéine à activité tyrosine kinase ABL. Par conséquent ABL ne peut pas passer sous sa forme active et reste sous sa forme inactive. Des études cristallographiques ont montré que le Nilotinib possède une affinité plus grande que l'Imatinib pour le domaine kinase de la protéine ABL. De cette affinité plus grande résulte une meilleure sélectivité du Nilotinib contre la forme sauvage de BCR-ABL. De plus, cette molécule est active contre 32 des 33 formes mutantes des BCR-ABL résistants à l'Imatinib. Comme le Dasatinib, le Nilotinib n'a pas d'activité sur les porteurs de la mutation T315I (42).

#### Indication et posologie :

Le Nilotinib est indiqué dans le traitement de la LMC Ph<sup>+</sup> en phase chronique ou accélérée, chez les patients présentant une intolérance ou une résistance à un traitement antérieur, dont l'Imatinib (43).

La posologie usuelle est de 400 mg toutes les douze heures dans le traitement en seconde ligne de la LMC après échec du traitement par Glivec<sup>®</sup> ou en cas d'intolérance à ce dernier.

La FDA a autorisé le 17 Juin 2010 l'utilisation du Nilotinib en traitement de première ligne de la LMC à la posologie de 300 mg toutes les douze heures. Cette décision fait suite à la publication par Saglio *et al.* (42) des résultats d'une étude clinique menée prospectivement sur 846 patients pendant 12 mois. Un nombre égal de patients a été inclus dans chacun des bras de cette étude. Les patients du bras expérimental, séparés en deux groupes, recevaient soit deux fois par jour 300 mg de Nilotinib, soit deux fois par jour 400 mg de Nilotinib. Les patients du bras témoin recevaient quant à eux quotidiennement et en une seule prise 400 mg d'Imatinib. Le taux de RCC dans le bras expérimental a été significativement supérieur à celui du bras témoin (80% dans le bras 300 mg, 78% dans le bras 400 mg et 65% dans le bras Imatinib –  $p < 0,001$  pour les deux comparaisons). La RMM était également supérieure dans le bras expérimental puisque les taux s'élevaient à 44% dans le bras 300 mg et 43% dans le bras 400 mg, tandis que ce taux était de 22% dans le bras témoin Imatinib ( $p < 0,001$  pour les deux comparaisons).

### Pharmacocinétique :

#### Absorption :

Après administration orale, le Nilotinib est absorbé à environ 30%. La biodisponibilité du Nilotinib augmente de 29 et 15% en cas de prise, respectivement 30 minutes ou 2 heures après le repas (44). Elle est de 82% en cas de prise concomitante à un repas riche en graisses (32). Pour ces raisons, le médicament doit être pris en dehors des repas. Les concentrations plasmatiques maximales sont obtenues 3 heures après absorption du médicament (32).

#### Distribution :

Le Nilotinib est lié à 98% aux protéines plasmatiques. Son volume de distribution est d'environ 600 litres (45).



### Métabolisme :

Les deux voies principales de biotransformation du Nilotinib sont l'hydroxylation et l'oxydation. Le Nilotinib est essentiellement métabolisé par le CYP3A4 et en toute petite partie par le CYP2C8. Aucun des métabolites du Nilotinib ne semble avoir d'activité pharmacologique.

L'exposition au Nilotinib est augmentée en cas d'association avec des inhibiteurs du CYP3A4, c'est le cas par exemple avec le Ketaconazole. Une étude a montré que l'administration du Nilotinib avec 240 mL de jus de pamplemousse augmentait l'ASC du Nilotinib de 60%. Inversement, l'association avec des inducteurs du CYP3A4 réduit l'exposition du Nilotinib. C'est par exemple le cas avec la Rifampicine qui diminue l'exposition au Nilotinib par un facteur 4,8 (33).

### Elimination :

Le Nilotinib est éliminé à 94% dans les selles. Sa demi-vie est d'environ 17 heures. Il est totalement éliminé de l'organisme en 7 jours.

### Effets indésirables :

Le Nilotinib est une molécule relativement moins bien tolérée que l'Imatinib ou le Dasatinib. Au cours du premier essai clinique de phase III, 15% des patients ont été contraints d'interrompre le traitement durant les six premiers mois de l'étude (38). Après 24 mois de suivi, en raison d'effets indésirables, 58% des patients ont à un moment ou un autre interrompu provisoirement leur traitement et 19% ont dû l'interrompre de manière définitive. Dans une étude de Phase III comparant le Nilotinib à l'Imatinib, après 14 mois de suivi, respectivement 9 et 7,5% des patients ont dû interrompre leur traitement en raison d'effets indésirables (38).

Comme pour l'Imatinib et le Dasatinib, les principales affections rencontrées sont hématologiques. Sur 24 mois, les patients traités quotidiennement par 800 mg de Nilotinib ont souffert de neutropénies de Grades 3 et 4 dans 31% des cas de thrombocytopénie dans 30% des cas (38). Les autres affections hématologiques rencontrées sont des neutropénies fébriles et des pancytopénies.

Des affections cardiaques ont été rapportées avec le Nilotinib. De l'angor, des arythmies, des palpitations et des allongements de l'intervalle QT font partie des phénomènes les plus fréquemment rencontrés. Le Nilotinib est contre-indiqué chez les patients souffrant d'hypokaliémie, d'hypomagnésémie et également en cas d'allongement de l'intervalle QT. Un cas de mort subite, survenu après des complications cardiaques chez un patient traité par Nilotinib, a déjà été décrit (46).

Les autres effets indésirables du Nilotinib fréquemment rencontrés sont des affections psychiatriques comme la dépression ou l'insomnie, des affections oculaires comme des œdèmes périorbitaires, des conjonctivites ou des hémorragies, des affections respiratoires (dyspnées), des affections gastro-intestinales comme des pancréatites, des douleurs musculosquelettiques ou encore des sueurs nocturnes et des eczémas.

## **1.5. Suivi thérapeutique des ITK**

Les ITK étant de petites molécules administrées essentiellement par voie orale, il a été supposé puis démontré que les concentrations plasmatiques de ces médicaments étaient très variables d'un patient à l'autre. Cette grande variabilité interindividuelle pourrait expliquer certains échecs de traitements en cas de concentrations plasmatiques trop faibles ou certaines toxicités en cas de concentrations plasmatiques trop élevées (34). Afin d'étudier ces variations et la réponse au traitement en fonction de la concentration plasmatique, un certain nombre d'études cliniques ont été mises en place. Ces études ont pour but d'étudier l'influence des concentrations plasmatiques sur l'efficacité de ces molécules, afin d'établir l'utilité d'un suivi thérapeutique pharmacologique (STP).

### **1.5.1. Etudes concentration-efficacité dans la LMC**

Les premières études concentrations-efficacité ont été mises en place pour l'Imatinib en 2006, les premiers résultats publiés en 2007. En particulier, une étude réalisée par le CHU de Bordeaux sur 68 patients atteints de LMC et traités par Imatinib depuis au moins 12 mois a mis en évidence que la réponse cytogénétique complète (RCC) ainsi que la réponse moléculaire majeure (RMM) étaient corrélées à la concentration plasmatique d'Imatinib : 56 patients en RCC ( $p=0,03$ ) et 34 patients en RMM ( $p < 0,001$ ). Ainsi cette étude a mis en

évidence qu'une concentration plasmatique résiduelle mesurée en moyenne à 24h (entre 21 et 27h) de 1002 ng/mL semblait favoriser la RCC et la RMM (26).

Pour valider les résultats préliminaires obtenus sur les 68 patients de l'étude Bordelaise, une sous-analyse de l'étude IRIS, les concentrations plasmatiques en Imatinib de 351 patients, sur les 553 inclus dans le protocole et recevant de l'Imatinib, ont été mesurées et croisées avec les données de RCC et de RMM (27). Les auteurs concluent, comme pour l'étude française, qu'une concentration plasmatique égale ou supérieure à 1000 ng/mL est importante pour obtenir une RCC (test t  $p = 0,01$  ; Wilcoxon  $p = 0,004$ ) mais ne concluent pas, par manque de données, sur l'éventuel lien avec la RMM.

En 2009, une étude comparant deux groupes de 20 patients a été réalisée par Singh *et al.* (7). Le premier groupe est constitué de patients répondeurs à l'Imatinib et l'autre groupe de patients non-répondeurs. Conformément aux études citées précédemment, basées sur une population globale triée à posteriori en répondeurs et non-répondeurs, un bénéfice est démontré pour des concentrations plasmatiques supérieures à 1000 ng/mL et cela aussi bien sur la RCC que la RMM.

Awidi *et al.* en 2010 ont réalisé sur 103 patients une étude similaire (8). Les conclusions sont identiques aux précédentes, mais la concentration plasmatique en Imatinib proposée est beaucoup plus élevée. En effet, un bénéfice sur la RCC et la RMM est observé à une concentration plasmatique moyenne en Imatinib de 2158 ng/mL.

En 2009, une équipe de Vancouver a publié une étude contradictoire (47). En effet, cette étude réalisée sur 78 patients ne montre pas de corrélation entre RCC, RMM et concentration plasmatique en Imatinib (48). Cependant, les conclusions apportées par les auteurs de ce travail ont rapidement été discutées, puisque il apparaît que la sélection des patients, très stricte, a d'emblée exclu un certain nombre de patients non répondeurs au traitement et qui potentiellement pouvait avoir une concentration plasmatique faible en Imatinib.

Une revue de la littérature publiée en 2009 (49) conclut sur l'intérêt du suivi thérapeutique de l'Imatinib et précise que bien que la concentration plasmatique recommandée en Imatinib soit de 1000 ng/mL, il appartient aux médecins de prendre en

compte également les paramètres cliniques de leurs patients, comme la RMM, la RCC, la compliance au traitement ou encore la survenue d'effets indésirables, afin d'adapter au mieux le traitement. L'heure de la consultation médicale semble être une limite à l'interprétation de tous ces résultats. Le prélèvement sanguin destiné à la mesure de la concentration résiduelle en Imatinib est réalisé juste avant la prise suivante de médicament, ce qui représente 24 +/- 3 heures, le Glivec<sup>®</sup> se prenant en une prise quotidienne (34). Pour éviter ce problème, Wang *et al.* (50) ont proposé un algorithme mis au point à partir des résultats de l'étude IRIS. Cet algorithme permet de s'affranchir de la variable citée précédemment et calculer la véritable concentration résiduelle à plus ou moins 6 heures.

Un article publié en Décembre 2010 par Takahashi *et al.* (51) confirme que chez les patients Japonais, on retrouve également une corrélation entre concentration plasmatique en Imatinib et réponse au traitement. Cette étude effectuée chez 254 patients atteints de LMC montre qu'une concentration plasmatique en Imatinib supérieure ou égale à 1002 ng/mL est corrélée avec une meilleure RMM ( $p = 0,0120$ ). Cependant l'étude de Li *et al.* (52), réalisée sur seulement 46 patients Chinois atteints de LMC, ne retrouve pas de corrélation entre concentrations plasmatiques en Imatinib et réponse au traitement. De plus, toujours d'après les auteurs de cet article, la concentration minimale plasmatique en Imatinib serait supérieure chez les patients Chinois que chez les patients Caucasiens, mettant en évidence des différences de métabolisation.

Il existe un lien entre mauvaise observance et perte de la réponse cytogénétique et échec du traitement (53). Le suivi thérapeutique pharmacologique de l'Imatinib semble donc indispensable dans le traitement de la LMC afin d'identifier plus facilement les patients mal ou non observants et ainsi prendre les mesures adéquates pour la réussite de leur traitement.

Aujourd'hui, aucune étude concentration-efficacité n'a été publiée pour le Dasatinib ou pour le Nilotinib.

### **1.5.2. Etudes concentration-efficacité dans les GIST**

La première étude traitant de la pharmacocinétique de l'Imatinib dans les GIST date de 2005. C'est l'équipe de Ian Judson (54) qui a pour la première fois démontré qu'un lien entre concentration plasmatique en Imatinib et réponse au traitement pouvait exister. Les conclusions de cette étude ont été confirmées par les travaux de Delbaldo et Chatelut (55) en 2006 sur 43 patients. Dans les deux cas, seule une tendance entre réponse au traitement et concentration plasmatique semble apparaître. En 2009, l'étude de Demetri *et al.* (56) montre sur 73 patients atteints de GIST, que la durée sans progression était de 11,3 mois chez les patients possédant une concentration plasmatique résiduelle en Imatinib inférieure à 1100 ng/mL, alors qu'elle dépassait les 30 mois pour les patients au dessus de 1100 ng/mL. Ainsi, les auteurs recommandent le STP pour les patients atteints de GIST, afin de s'assurer que la concentration plasmatique thérapeutique soit bien atteinte. Ce seuil de 1100 ng/mL a été reconfirmé par Von Mehren et Widmer en 2010 (57) suite à l'analyse des données pharmacocinétiques du protocole clinique de Phase II B2222. 73 premiers patients sur les 147 patients randomisés dans le protocole clinique ont été inclus dans l'étude de Von Mehren. L'analyse de ces données fait apparaître une concentration minimale de 1100 ng/mL pour obtenir une meilleure réponse au traitement.

L'utilité du STP pour l'Imatinib dans les GIST a été reconfirmée en Janvier 2011 par l'équipe de Yoo (58). En effet, sur l'analyse des concentrations plasmatiques d'Imatinib de 58 patients, il apparaît au bout de 9 mois que la concentration plasmatique à l'équilibre varie considérablement : Pour 22 patients, la concentration plasmatique a diminué significativement et à l'inverse augmenté significativement pour 36 autres patients. Les auteurs expliquent cette variabilité par des différences significatives des valeurs des concentrations plasmatiques en albumine.

### **1.5.3. Etudes concentration-toxicité**

A ce jour, une seule équipe (Widmer *et al.* en 2008) (59) a montré qu'il existe une relation entre concentration libre en Imatinib et mauvaise tolérance au traitement. L'étude, réalisée sur 58 patients (38 patients traités pour un GIST et 20 patients traités pour une LMC), met en évidence un lien entre tolérance au traitement et concentration plasmatique en Imatinib

libre ( $p < 0,001$  dans la population de patients atteints de GIST et  $p = 0,013$  dans la population de patients souffrant de LMC). Afin de calculer la concentration plasmatique libre en Imatinib, les auteurs ont utilisé l'ASC calculée selon un modèle qu'ils ont établi et publié en 2006 (31). Ce modèle tient compte notamment de la concentration plasmatique en  $\alpha_1$  glycoprotéine acide (AGP), protéine plasmatique à laquelle l'Imatinib se fixe préférentiellement. Il semble qu'à traitement identique les patients qui possèdent une concentration plasmatique élevée en AGP sont ceux chez qui on retrouve les concentrations plasmatiques libres en Imatinib les plus faibles, ce qui par conséquent impose une augmentation des posologies pour obtenir la concentration plasmatique cible (60).

#### **1.5.4. Essais thérapeutiques en cours**

Des essais cliniques destinés à établir une relation entre concentration plasmatique en ITK et réponse au traitement sont en cours. Toutes ces informations sont disponibles sur le site [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) et sur le site de l'INCa [www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr).

##### Les études avec l'Imatinib

L'étude MIM est un essai de Phase III randomisé évaluant l'efficacité d'une stratégie d'adaptation de dose de l'Imatinib chez des patients atteints de LMC en phase chronique en RCC mais pas en RMC. Les patients inclus dans ce protocole clinique reçoivent un traitement par Imatinib. Chaque patient bénéficie d'un dosage plasmatique de l'Imatinib. Les patients possédant une concentration plasmatique supérieure à 1000 ng/mL conserveront le même schéma thérapeutique. Pour les patients présentant une concentration plasmatique en Imatinib inférieure à 1000 ng/mL, une randomisation aura lieu en deux bras : Les patients du premier bras continueront le même traitement qu'en début d'étude, tandis que les patients de l'autre bras bénéficieront d'une augmentation de dose jusqu'à obtention d'une concentration plasmatique en Imatinib supérieure ou égale à 1000 ng/mL. La réponse au traitement est évaluée par la mesure de la RMC et de la RCC. Cette étude a pour but de confirmer les différentes données de la littérature de manière prospective fixant une concentration plasmatique en Imatinib supérieure ou égale à 1000 ng/mL dans le traitement de la LMC.

L'étude OPTIM IMATINIB est une étude similaire actuellement en demande de financement. Cette étude a pour but l'adaptation de la posologie en Imatinib en fonction de la concentration plasmatique, mais cette fois en traitement de première ligne.

L'essai NCT01031628 est le seul essai se rapportant au traitement des GIST et associant un suivi thérapeutique de l'Imatinib. Dans cette étude de phase III, les patients atteints de GIST et traités depuis plus de 4 semaines par l'Imatinib bénéficient d'un dosage plasmatique de l'Imatinib. Si la concentration mesurée est supérieure ou égale à 1100 ng/mL, le traitement est continué en l'état. Si la concentration plasmatique en Imatinib mesurée est inférieure à 1100 ng/mL, les patients sont randomisés dans deux bras distincts : les patients du premier bras ne bénéficient d'aucune adaptation posologique, tandis que les patients du second bras bénéficient d'une augmentation de posologie et d'un nouveau dosage plasmatique de l'Imatinib jusqu'à obtenir une concentration plasmatique supérieure ou égale à 1100 ng/mL. Cette étude a pour but de démontrer de manière prospective les différentes données déjà publiées dans la littérature et qui prédisent une meilleure réponse au traitement des GIST par l'Imatinib avec une concentration plasmatique supérieure ou égale à 1100 ng/mL.

#### Les études avec le Dasatinib

L'essai OPTIM DASATINIB mené par le Centre Hospitalier de Versailles vise à déterminer s'il existe un bénéfice d'une adaptation de dose en fonction de la concentration sanguine en Dasatinib chez des patients atteints de LMC en phase chronique traités en première ligne avec cette molécule. La concentration résiduelle après 24 heures est mesurée. Si la concentration plasmatique en Dasatinib mesurée est inférieure à 3 nM (soit environ 1,5 ng/mL), le traitement n'est pas modifié, alors que s'il dépasse les 3 nM, la dose de Dasatinib administrée au patient est diminuée, jusqu'à obtenir une concentration minimale résiduelle inférieure à 3 nM. Cette adaptation posologique a pour but de diminuer la survenue d'effets indésirables. L'analyse des résultats de cette étude permettra de déterminer si une concentration minimale plasmatique en Dasatinib inférieure ou supérieure à 3 nM est suffisante pour obtenir à la fois RMC et RCC. Cet essai prévoit également, comme objectif secondaire, la mesure des pics plasmatiques obtenus 3 heures après administration du Dasatinib afin de déterminer si la concentration obtenue a un impact clinique.

## Les essais avec le Nilotinib

L'essai NCT01131325 vise quant à lui à déterminer l'intérêt du Nilotinib chez les patients présentant une concentration plasmatique en Imatinib inférieure à 850 ng/mL. Les patients inclus dans cette étude doivent tous avoir été traités plus de 12 mois par l'Imatinib à raison de 400 mg par jour et présenter une réponse moléculaire ou cytogénétique mineure. Si la concentration plasmatique mesurée en Imatinib chez ces patients est inférieure à 850 ng/mL, le traitement est remplacé par le Nilotinib à la posologie de 300 mg deux fois par jour.

### En résumé

Les objectifs de ces cinq études sont résumés dans le **Tableau I**.

**Tableau I** : Résumé des études faisant appel au dosage des ITK pour un choix de traitement ou pour une adaptation posologique (établi d'après [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) et [www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)).

<b>Nom de l'essai</b>	<b>Objectifs</b>	<b>Phase</b>	<b>Ouverture</b>	<b>Cloture</b>	<b>Promoteur</b>	<b>Financement</b>
<b>MIM</b>	Essai de phase 3 randomisé évaluant l'efficacité d'une stratégie d'adaptation de dose de l' <b>imatinib</b> , chez des patients ayant une <b>leucémie myéloïde chronique en phase chronique</b> .	3	sept.-09	déc.-11	Institut Bergonié (Bordeaux)	PHRC 2009
<b>NCT01031628</b>	Déterminer si une concentration plasmatique en <b>Imatinib</b> supérieure à 1100ng/mL est bénéfique dans le traitement des <b>GIST</b> .	3	janv.-10	déc.-14	Sarcoma Alliance for Research through Collaboration	Novartis Pharmaceuticals
<b>NCT01131325</b>	Déterminer le bénéfice du Nilotinib chez les patients atteints de <b>LMC en phase chronique</b> présentant une concentration plasmatique faible en <b>Imatinib</b> .	2	mars-10	sept.-13	Novartis Pharmaceuticals	Novartis Pharmaceuticals
<b>OPTIM DASATINIB</b>	Essai de phase 2 randomisé évaluant l'apport du dosage du taux plasmatique résiduel du <b>dasatinib</b> chez les patients atteints de <b>leucémie myéloïde chronique en phase chronique</b> .	2	mai-09	mai-11	Centre Hospitalier de Versailles	Bristol Myers Squibb (BMS)
<b>OPTIM IMATINIB</b>	Essai de phase 2 randomisé évaluant l'efficacité d'une stratégie d'adaptation de dose de l' <b>imatinib</b> , chez des patients ayant une <b>leucémie myéloïde chronique</b> et bénéficiant d'un traitement de première ligne par l'Imatinib.	2	-	-	CH Versailles et CHU de Bordeaux	en cours



### **1.5.5. Hypothèses et objectifs**

De nombreuses études cliniques montrent une relation entre concentration plasmatique en Imatinib et réponse au traitement, aussi bien chez les patients atteints de LMC que chez ceux atteints de GIST. La notion de concentration plasmatique en Imatinib semble donc indissociable d'une bonne réponse au traitement et inversement : Une faible concentration plasmatique en Imatinib, qu'elle soit due à la variabilité interindividuelle du métabolisme de l'Imatinib ou à une mauvaise compliance au traitement est synonyme d'échec thérapeutique.

Un certain nombre d'hypothèses sont en faveur de l'existence d'une relation concentration-efficacité également pour le Dasatinib et le Nilotinib et plusieurs protocoles de recherche clinique allant dans cette direction sont en cours. Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) de ces trois ITK semble donc avoir un réel intérêt dans la gestion des maladies exprimant le phénotype Ph+.

C'est dans le cadre du développement de ce STP au Centre Hospitalier Universitaire de Nancy qu'il m'a été demandé de mettre au point le dosage de l'Imatinib, du Dasatinib et du Nilotinib, afin d'être en mesure de répondre dans les délais les plus brefs aux demandes des cliniciens. Ce dosage plasmatique a été mis au point en utilisant la Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur à barrette de diodes (CLHP-BD). Ce système chromatographique possède l'avantage d'être plus simple à mettre en œuvre et également d'être beaucoup moins coûteux qu'un système de Chromatographie Liquide couplé à une détection par spectrométrie de masse (CL-SM) qui est utilisé par la plupart des laboratoires pour le dosage de l'Imatinib, le Norimatinib, le Dasatinib et le Nilotinib. Bien que possédant une sensibilité moindre que le système CL-SM, il a été démontré que le système CLHP-BD permettait d'obtenir des résultats comparables dans les concentrations plasmatiques thérapeutiques cibles (8, 61).

## **2. Deuxième Partie : Mise au point et validation du dosage plasmatique de l'Imatinib, Dasatinib et Nilotinib par CLHP-BD**

### **2.1. *Matériel et Méthode***

#### **2.1.1. Principe de la Chromatographie Liquide Haute Performance et du détecteur à barrette de diodes**

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est une méthode analytique permettant la séparation de différents constituants présents dans un mélange. La CLHP fait appel à une phase liquide mobile qui va, sous l'action d'une pompe, traverser une colonne constituant la phase stationnaire.

L'échantillon à analyser est introduit dans le système chromatographique grâce à un injecteur. Cet injecteur va permettre de mettre en mouvement par le biais de la phase mobile, les quelques microlitres d'échantillons à analyser. Cet échantillon est entraîné par la phase mobile dans la colonne. Les composés présents dans l'échantillon sont élués les uns après les autres en sortie de colonne puis devront ensuite passer dans un détecteur couplé à un enregistreur afin de tracer un chromatogramme. La qualité de la séparation, c'est-à-dire que les composés analysés possèdent une différence des temps d'éluion suffisante, s'exprime en calculant la résolution des différents pics obtenus.

Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser un détecteur à barrette de diodes (BD). Après leur séparation par la phase stationnaire au sein de la colonne, les composés à analyser atteignent successivement le détecteur à BD. Ce détecteur est composé d'une barrette de photodiodes placées en ligne et de deux lampes : une lampe au Deutérium et une lampe au Tungstène permettant respectivement des mesures d'absorbance dans l'ultra-violet et dans le visible. Ce système permet ainsi de mesurer des absorbances sur une gamme de longueurs d'onde s'échelonnant de 192 à 800 nm. Dans notre étude, au vue du spectre d'absorption des molécules étudiées, seule la lampe au Deutérium est utilisée (192 à 380 nm). Cette méthode de détection présente également l'avantage de réaliser le spectre d'absorbance des molécules

présentes dans la phase mobile. La réalisation de ce spectre permet de déterminer la longueur d'onde à laquelle l'absorbance de la molécule étudiée est maximale améliorant ainsi la qualité du chromatogramme obtenu. Enfin, en établissant le spectre UV d'une molécule, il est possible de le comparer à une base de données et s'assurer que la molécule détectée est bien celle que l'on recherche (les spectres UV de la molécule, dans la même phase mobile, doivent se superposer).

Le détecteur BD permet en un seul passage de l'échantillon de déterminer les absorbances sur une plage allant de 192 à 380 nm. Le Norimatinib, l'Imatinib et le Nilotinib possèdent un maximum d'absorbance à 265 nm et le Dasatinib à 305 nm.

### **2.1.2. Etat des connaissances pour le dosage des ITK en CLHP**

La première méthode de dosage de l'Imatinib et de son métabolite le Norimatinib a été décrite en 2002 par Bakhtiar (62). Le dosage, réalisé dans du sang de singe était effectué par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse. En 2004, l'analyse de l'Imatinib est ensuite décrite en utilisant cette fois-ci la chromatographie liquide haute performance, couplée à un détecteur UV ou à barrette de diodes. Ainsi, 3 publications détaillent la mise en œuvre de ce dosage, dans le plasma, l'urine ou le liquide céphalo rachidien. L'une de ces trois méthodes utilise la Clozapine comme étalon interne (63-65). Toujours en 2004, une équipe décrit le dosage de l'Imatinib et de ses impuretés dans les capsules commerciales d'Imatinib. Là aussi, la technique utilisée est de la CLHP couplée à un détecteur UV (66). En 2007, une nouvelle étude, toujours en CLHP UV, décrit le dosage simultané de l'Imatinib et du Nilotinib contenus dans des cellules tumorales où la Clozapine a été utilisée comme étalon interne (67). Il faudra attendre 2009 pour voir apparaître de nouvelles méthodes permettant d'analyser par une même technique l'Imatinib, le Dasatinib et le Nilotinib, en utilisant un système de chromatographie liquide couplé à un spectromètre de masse (68, 69). En 2010, deux publications comparent les systèmes de CLHP-UV et de CLSM pour l'analyse plasmatique de l'Imatinib. Dans les deux cas, les études concluent à une équivalence des résultats rendus par les deux systèmes, la CLHP-UV étant d'une plus grande simplicité, d'un coût moindre et d'une précision identique à du matériel moins commun et

abordable comme un spectromètre de masse (8, 61). Enfin, en 2010, Davies *et al.* (70) ont publié, une méthode CLHP-UV, utilisant la Clozapine comme étalon interne, permettant de doser l'Imatinib, le Norimatinib et le Nilotinib dans le plasma. Cependant, leur méthode n'est pas adaptée au dosage plasmatique du Dasatinib pour des raisons liées à des problèmes d'extraction de cette molécule.

Très récemment, l'équipe bordelaise déjà à l'origine des premiers dosages d'Imatinib en CLHP-SM a publié un nouvel article démontrant une fois de plus la performance des systèmes à détection par spectrométrie de masse, en proposant une méthode de dosage de neuf ITK (71). Les différentes méthodes de dosage décrites plus haut sont résumées dans le ***Tableau II***.

**Tableau II :** Comparaison des différentes méthodes de dosage de l'Imatinib, Norimatinib, Dasatinib et Nilotinib

Auteur, Année	Molécules	Séparation	Détection	Linéarité	LOQ	Extraction	Phase Mobile (%)
Bouchet <i>et al.</i> 2011 (71)	Imatinib	CL	SM	10 à 5000 ng/mL	10 ng/mL	Extraction Phase Solide	Formate d'ammonium / Acétonitrile
	Norimatinib			10 à 5000 ng/mL	10 ng/mL		
	Dasatinib			0,1 à 200 ng/mL	0,1 ng/mL		
	Nilotinib			10 à 5000 ng/mL	10 ng/mL		
Roth <i>et al.</i> 2010 (61)	Imatinib	CL	BD/SM	80 à 4000 ng/mL	80 ng/mL	Précipitation des protéines avec l'acide perchlorique	ACN / Phosphate (28-72)
Davies <i>et al.</i> 2010 (70)	Imatinib	CL	UV	100 à 12 000 ng/mL	50 ng/mL	Extraction Phase Solide	Méthanol / Acétate d'ammonium (65-35) pH 8
	Norimatinib			100 à 12 000 ng/mL	50 ng/mL		
	Nilotinib			100 à 12 000 ng/mL	50 ng/mL		
Awidi <i>et al.</i> 2010 (8)	Imatinib	CL	UV	100 à 4000 ng/mL	100 ng/mL	Précipitation des protéines avec le méthanol	ACN / Phosphate (30/70)
De Francia <i>et al.</i> 2009 (68)	Imatinib	CL	SM	78,1 à 10 000 ng/mL	78,1 ng/mL	Précipitation des protéines par ACN et Méthanol	Acide formique / Acétonitrile selon gradient
	Dasatinib			62,5 à 10 000 ng/mL	62,5 ng/mL		
	Nilotinib			62,5 à 10 000 ng/mL	62,5 ng/mL		
Klawitter <i>et al.</i> 2009 (69)	Imatinib	CL	SM	0,03 à 75 ng/mL	0,03 ng/mL	Précipitation des protéines par le Méthanol	Acide formique / Méthanol
Guetens <i>et al.</i> 2007 (67)	Imatinib	CL	UV	50 à 7500 ng/mL	50 ng/mL	-	-
	Nilotinib			50 à 7500 ng/mL	50 ng/mL		
Ivanovic <i>et al.</i> 2004 (66)	Imatinib	CL	UV	-	100 ng/mL	-	Methanol / Eau / Triéthylamine (25/74/1)
Schleyer <i>et al.</i> 2004 (63)	Imatinib	CL	UV	10 à 20 000 ng/mL	10 ng/mL	Précipitation des protéines par l'Acide perchlorique	Méthanol / Phosphate
	Norimatinib			10 à 20 000 ng/mL	10 ng/mL		
Velpandian <i>et al.</i> 2004 (64)	Imatinib	CL	BD	250 à 25 000 ng/mL	30 ng/mL	Précipitation des protéines par le Méthanol	Phosphate/ACN (70/30)
Widmer <i>et al.</i> 2004 (65)	Imatinib	CL	BD	100 à 10 000 ng/mL	50 ng/mL	Extraction Phase Solide	Methanol/Acetate d'ammonium
Bakhtiar <i>et al.</i> 2002 (62)	Imatinib	CL	SM	1 à 1000 ng/mL	1 ng/mL	Extraction Phase Solide	Méthanol/Eau/ Acétate d'ammonium
	Norimatinib			2 à 1000 ng/mL	2 ng/mL		

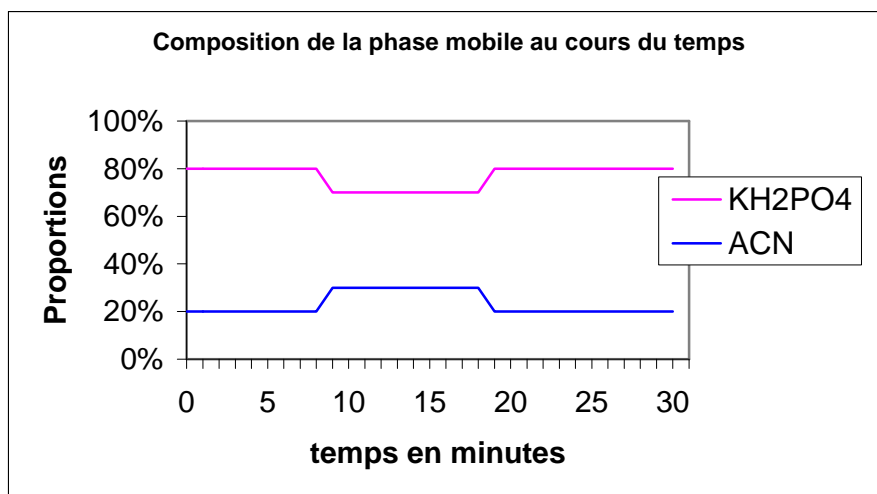
### 2.1.3. Instruments et conditions opératoires

Les dosages ont été effectués par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en utilisant un chromatographe Spectra system (Spectra System, Providence, U.S.A.) incluant un contrôleur de gradient PX1000, un injecteur automatique AS3000 et une pompe SCM 1000. Le contrôleur de gradient permet de faire varier la composition de la phase mobile en fonction du temps selon un programme enregistré dans le logiciel pilotant l'ordinateur de contrôle. La colonne utilisée pour la séparation des molécules est une SunFire C18 (4.6 x 250mm ; 5 $\mu$ m ; Waters, Dublin, Irlande) (**Figure 7**). La sortie de la colonne est reliée à un détecteur à barrette de diodes UV 6000LP.



**Figure 7** : Sunfire C18 (4.6 x 250mm ; 5 $\mu$ m ; Waters, Dublin, Irlande) – (photo A. Harlé)

La phase mobile est composée de tampon phosphate (0,01 M) et d'acétonitrile (ACN) (Carlo Erba Réactifs, Val de Reuil, France). Le tampon phosphate 0,01 M - préparé par dilution de 1,3609 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $M = 136,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) (Merck, Darmstadt, Allemagne) dans un litre d'eau distillée, puis ajusté à pH 3 avec quelques gouttes d'acide ortho phosphorique 85% (VWR BDH Prolabo, Fontenay Sous Bois, France) - et l'acétonitrile sont placés respectivement en voie A et en voie B. Les deux solutions sont filtrées au préalable, sur Buchner à l'aide d'un filtre Millipore de 0,45 $\mu$ m (Millipore, Billerica, Massachussets, U.S.A.) Le débit de la phase mobile est réglé à 1,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  et sa composition suit un gradient de concentration (**Figure 8**).



t (minutes)	0	1	9	18	19	30
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%)	80	80	70	70	80	80
ACN (%)	20	20	30	30	20	20

**Figure 8 :** Composition de la phase mobile en fonction du temps

## 2.1.4. Préparation des échantillons

### 2.1.4.1. Droite d'étalonnage et contrôles

L'étalonnage est effectué avec des calibrateurs fournis par ChromSystems (Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Munich, Germany) : Un échantillon dit « plasma calibrator » constitue le point 0 de la gamme et 3 points de gamme (Level I, II et III), correspondant à 3 concentrations croissantes de chacune des molécules étudiées. Afin de vérifier la fiabilité de la droite d'étalonnage, deux échantillons « contrôle » sont également utilisés : en calculant la concentration expérimentale de ces deux contrôles et en la comparant aux valeurs théoriques, il est possible de s'assurer de la fiabilité et de la reproductibilité des mesures effectuées.

Les produits lyophilisés sont à reconstituer selon le protocole du fournisseur. Le tableau ci-dessous (*Tableau III*) présente les différentes concentrations pour chacun des points de gamme.

**Tableau III** : Concentrations des différents points de gamme et contrôles

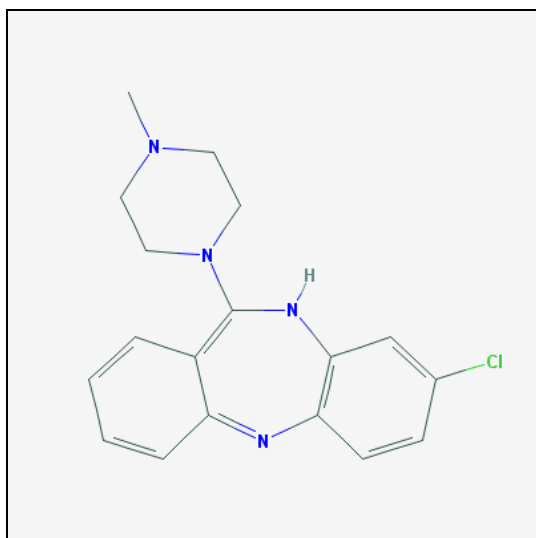
	Gamme d'étalonnage (en ng/mL)				Contrôles (en ng/mL)	
	Point 0	Level I	Level II	Level III	Contrôle I	Contrôle II
<b>Imatinib</b>	0,00	487,00	1408,00	2399,00	941,00	1911,00
<b>Norimatinib</b>	0,00	106,00	263,00	428,00	184,00	343,00
<b>Dasatinib</b>	0,00	79,00	194,00	315,00	116,00	252,00
<b>Nilotinib</b>	0,00	480,00	951,00	1428,00	711,00	1184,00

#### 2.1.4.2. Etalon interne

La technique mise au point pour le dosage d'ITK utilise la technique dite de l'étalon interne. Cette technique consiste à ajouter dans chacun des échantillons (gamme, contrôles et échantillon à doser) toujours la même quantité d'une molécule connue. Cette molécule produit un signal de même type que les molécules dosées et se comporte de la même manière que les analytes dans les mêmes conditions chromatographiques. La courbe d'étalonnage est ensuite tracée en établissant le rapport entre le signal de l'analyte sur celui de l'étalon interne qui sera porté en ordonnée et la concentration de l'analyte en abscisse. Cette technique permet de compenser certaines variations pendant les différentes phases de la technique.

Pour ce travail, nous avons choisi d'utiliser la Clozapine, molécule commercialisée sous le nom de Leponex<sup>®</sup> (**Figure 9**). La Clozapine est un antipsychotique atypique relativement peu ou pas prescrit chez les patients souffrant de pathologie hématologique. En effet, l'un des principaux effets indésirables de ce médicament est la survenue d'agranulocytose, c'est pourquoi les thérapeutes préfèrent ne pas l'utiliser chez des patients qui ont déjà le risque de développer un trouble hématologique compte tenu de leur traitement par ITK. Si toutefois un patient devait être traité par Clozapine et l'Imatinib, le Dasatinib ou le Nilotinib, il faudrait alors ne pas tenir compte de l'étalon interne pour réaliser la droite d'étalonnage et utiliser une méthode dite par étalonnage externe.





**Figure 9 :** La Clozapine (Leponex®)

IUPAC: 3-chloro-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-5H-benzo[b][1,4]benzodiazepine

Masse moléculaire : 326,8 g/mol

Formule brute : C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>

pKa 7,5

D'après PubChem, NCBI et DrugBank

La solution d'étalon interne est préparée par dilution au 1/200<sup>ème</sup> d'une solution mère méthanolique de Clozapine à 1mg/mL. On obtient ainsi une solution à 5 µg/mL.

#### 2.1.4.3. Préparation des échantillons de sang

L'analyse se réalise sur 200 µL de sérum ou de plasma qui sont à déposer dans un tube en pyrex de 7 mL où sont ajoutés 20 µL de solution fille d'étalon interne. Le tout est agité 30 secondes au vortex. Puis 200µL de soude 0,1 N sont ajoutés avant une nouvelle agitation au vortex pendant 30 secondes. Enfin, l'extraction est effectuée en ajoutant 5mL d'éther diéthylique (VWR BDH Prolabo, Fontenay Sous Bois, France) puis les tubes sont agités mécaniquement pendant 10 minutes. Une fois cette dernière étape effectuée, les tubes sont centrifugés 10 minutes à 2500 rpm à 10°C (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Le Pecq, France). Quatre millilitres de la phase étherée (supérieure) sont repris et placés dans des tubes à hémolyse en verre. L'éther est ensuite évaporé sous flux d'azote dans un bain marie à 30°C. Le résidu sec d'évaporation est repris par 100µL de phase mobile Tampon Phosphate 0,01M / ACN (80/20 v/v) et 80µL de cette solution reconstituée seront placés dans un réducteur de l'injecteur automatique et 30 µL seront injectés lors du passage de l'échantillon (Annexe 5).

## **2.1.5. Validation de la méthode selon les normes COFRAC :**

Le comité français d'accréditation (COFRAC) émet un certain nombre de recommandations. Nous avons choisi de valider notre méthode de dosage selon ces recommandations.

### **2.1.5.1. Spécificité**

Une méthode est spécifique lorsqu'elle permet de mesurer un analyte avec la garantie que le signal instrumental provient strictement de l'analyte et ce même en présence d'autres composants. En pratique, cela consiste à passer un échantillon de sérum blanc, le sérum surchargé et l'étalon interne, puis un point de gamme. Enfin, un sérum surchargé en différentes molécules potentiellement co-administrées avec le traitement par ITK est également testé afin de vérifier les différentes interférences possibles.

Les détecteurs à barrette de diodes permettent de vérifier la spécificité ainsi que la pureté du pic chromatographique. En effet, l'appareil établit pour chaque analyte un spectre UV caractéristique de la molécule : dans notre étude, les spectres de chaque molécule sont balayés de 192 à 380 nm. Une lampe au Deutérium est utilisée pour cette analyse.

### **2.1.5.2. Répétabilité**

Selon le COFRAC, la répétabilité « consiste à effectuer l'analyse d'un même échantillon pour la même analyse dans des conditions standardisées ». En pratique, cela consiste pour un même opérateur à utiliser la même procédure avec le même matériel et les mêmes réactifs pour analyser un même échantillon. Cet essai est réalisé au cours d'une même série, durant laquelle l'analyse de 3 niveaux de concentrations, correspondant à une concentration faible, une moyenne et une élevée. Chaque niveau de concentration est déterminé 5 fois et les valeurs obtenues seront étudiées statistiquement.

L'exploitation des résultats se fait, toujours selon les recommandations du COFRAC, en calculant la moyenne ( $m$ ), l'écart type ( $\sigma$ ) et le coefficient de variation (CV) des valeurs expérimentales de chaque série.

Le CV est calculé selon la formule  $CV \text{ en } \% = (\sigma / m) \times 100$

#### 2.1.5.3. Reproductibilité ou fidélité intermédiaire

La reproductibilité ou fidélité intermédiaire est testée afin de s'assurer que la méthode est reproductible d'un opérateur à l'autre. En pratique, un opérateur différent se chargera de reproduire la technique avec le même matériel et dans les mêmes conditions que la méthode originale. 15 à 30 mesures sont effectuées, ce qui permet de calculer les mêmes paramètres que pour les tests de répétabilité.

#### 2.1.5.4. Justesse ou biais

La justesse de la méthode se définit par l'aptitude à obtenir des résultats proches ou égaux à une valeur théorique déterminée. Plus le biais est faible et plus la méthode est juste. Pour cela, il faut utiliser des points dits de contrôle (correspondant à des concentrations intermédiaires) et les tester à 3 reprises. Nous utilisons pour cela deux concentrations de contrôles externes (C1 et C2), fournis par le laboratoire ChromSystems. Chaque contrôle est analysé à 3 reprises et on calcule ainsi, grâce à la droite d'étalonnage, la concentration de l'échantillon, que l'on compare à la concentration théorique fournie par le fabricant. Le coefficient de variation toléré dans le cadre de notre méthode analytique est de 20%.

#### 2.1.5.5. Contamination inter-échantillons

Le test de contamination inter-échantillons sert à s'assurer qu'un échantillon de forte concentration ne viendra pas surestimer les résultats obtenus si l'échantillon suivant est de faible concentration. Ce test permet de déterminer un éventuel « effet mémoire ».

Pour cela, le COFRAC préconise de doser trois fois un échantillon de forte concentration (H1, H2, H3), suivi immédiatement par un dosage également à trois reprises

d'un échantillon de faible concentration (B1, B2, B3). La contamination inter-échantillons est ensuite calculée selon la formule :

$$\text{Contamination en \%} = (B1-B3) / \text{moyenne des H}$$

La valeur de contamination doit être égale ou très proche de 0, sans quoi, il sera nécessaire de passer une phase mobile entre chaque patient pour lequel un dosage plasmatique est demandé, sous peine d'obtenir des concentrations erronées.

#### 2.1.5.6. Limites de détection et de quantification

La limite de détection se définit par la plus petite quantité de produit pour laquelle on peut obtenir un signal supérieur ou égal à trois fois l'écart type obtenu par la mesure d'un blanc à 10 reprises.

Le seuil de quantification est la plus petite concentration mesurable pour laquelle on obtient un coefficient de variation acceptable, dans notre cas 20% : en clair, c'est la plus faible concentration pour laquelle en comparant la valeur calculée à la valeur théorique, on obtient une variation maximale de 20%.

#### 2.1.5.7. Linéarité

La détermination de la linéarité se fait par le passage d'échantillons de forte concentration. Cela permet, en utilisant une méthode classique de régression linéaire, de s'assurer que la méthode donne des résultats linéaires jusqu'à une concentration donnée et par conséquent, cela permet d'extrapoler licitement au-delà de la gamme en cas de passage d'un échantillon patient de concentration élevée, et cela sans avoir à diluer le prélèvement.

Afin de tester statistiquement la significativité globale du modèle de régression le Test de Fischer est utilisé. La valeur observée est comparée avec celle de la table du F de Fischer. Si le F observé est supérieur au F théorique donné par la table, alors on peut considérer que le modèle est significatif, en d'autres termes, qu'il existe bien une relation de linéarité entre les différents points de gamme (72).

#### 2.1.5.8. Stabilité

Cette étude a pour but de vérifier la stabilité des concentrations en fonction des conditions de conservation.. Dans notre cas, les solutions sont fournies par le laboratoire ChromSystems, qui précise, sur chacun des flacons, la durée de validité avant et après reconstitution.

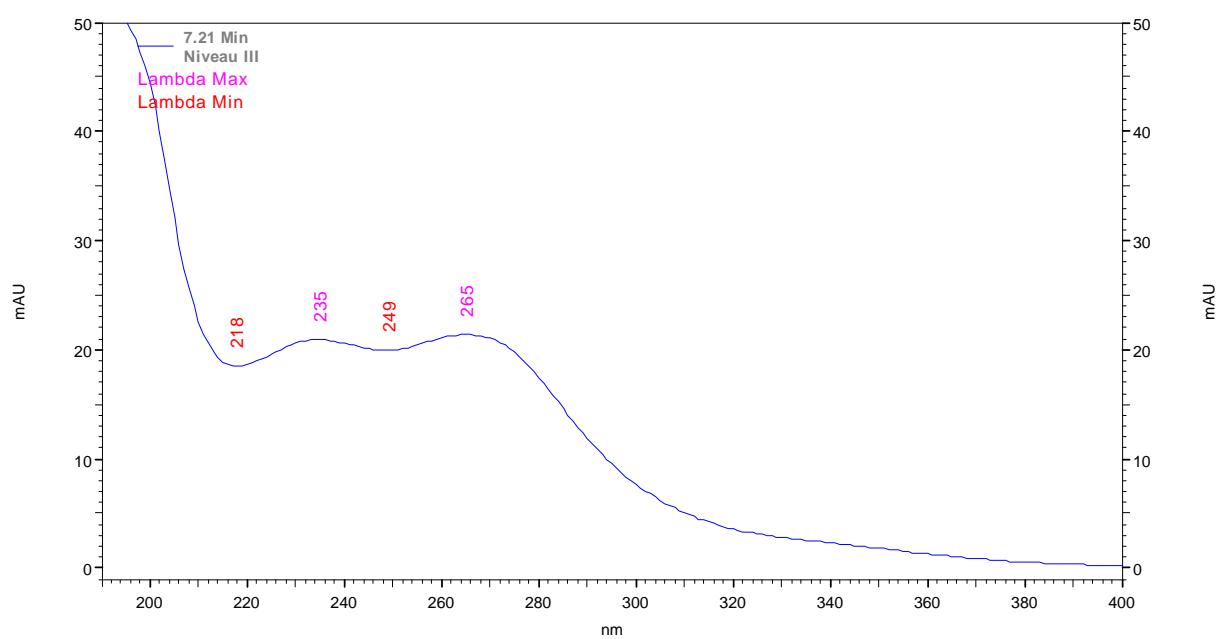
#### 2.1.5.9. Robustesse

La robustesse d'une méthode se définit par l'aptitude d'une méthode à donner des résultats cohérents en faisant varier légèrement les conditions opératoires (par exemple le pH ou la concentration du tampon utilisé). Moins ces paramètres ont d'influence sur l'analyse et plus la méthode est dite robuste.

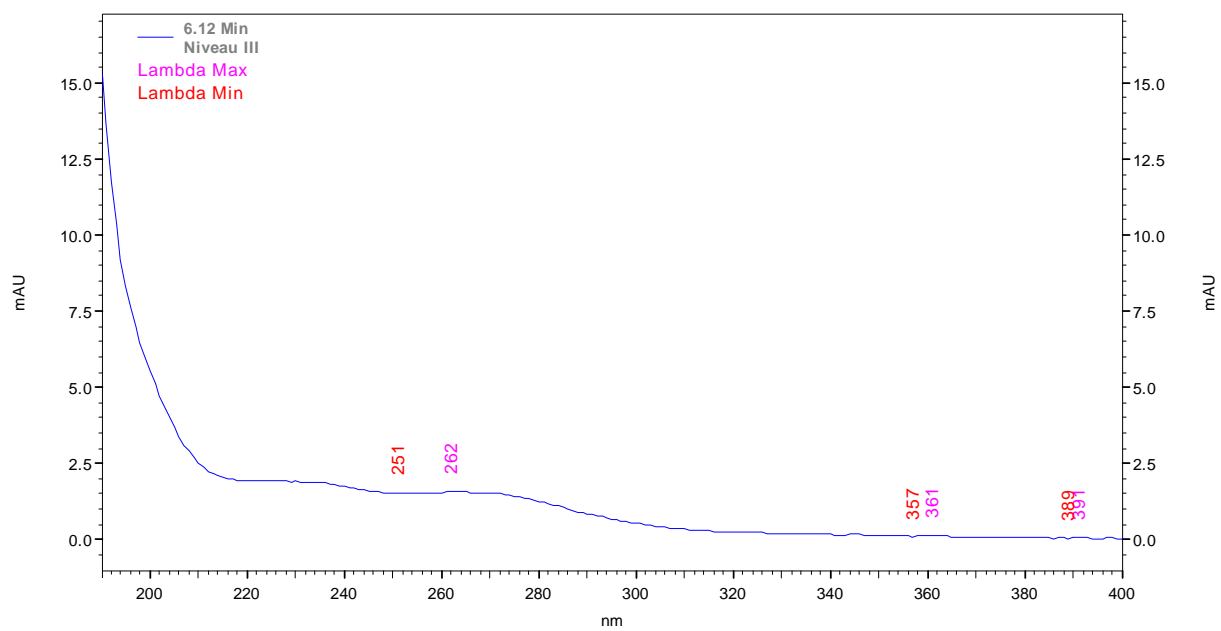
## 2.2. Résultats

### 2.2.1. Spécificité

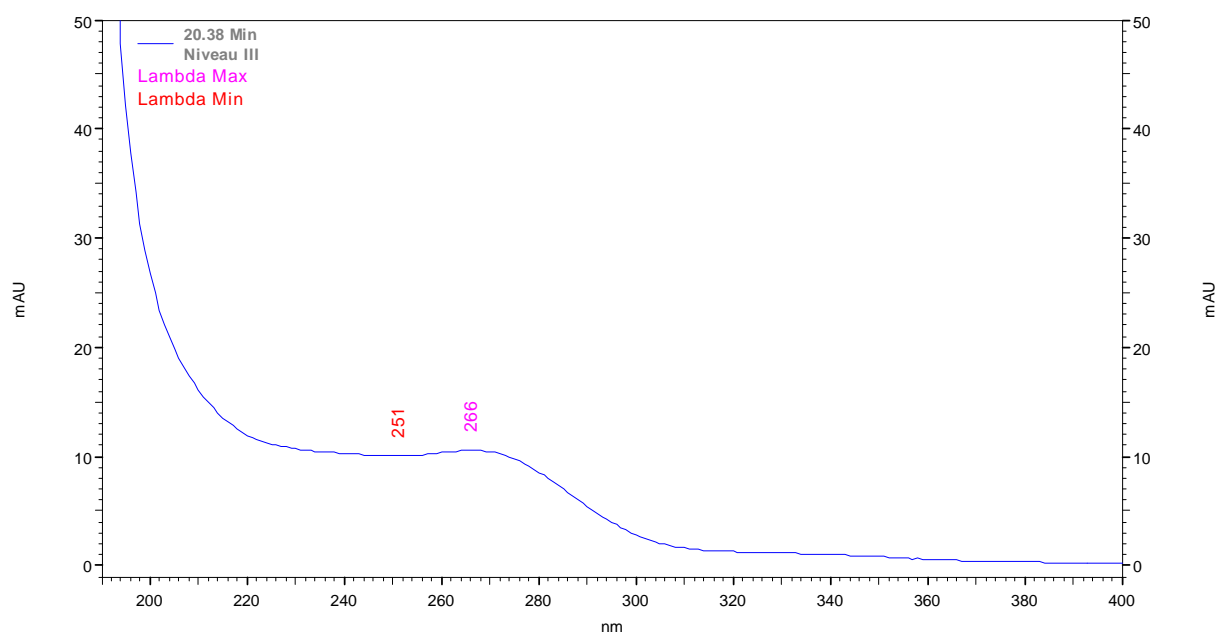
Le détecteur à barrette de diodes nous a permis d'obtenir les spectres UV de chacune des molécules analysées :



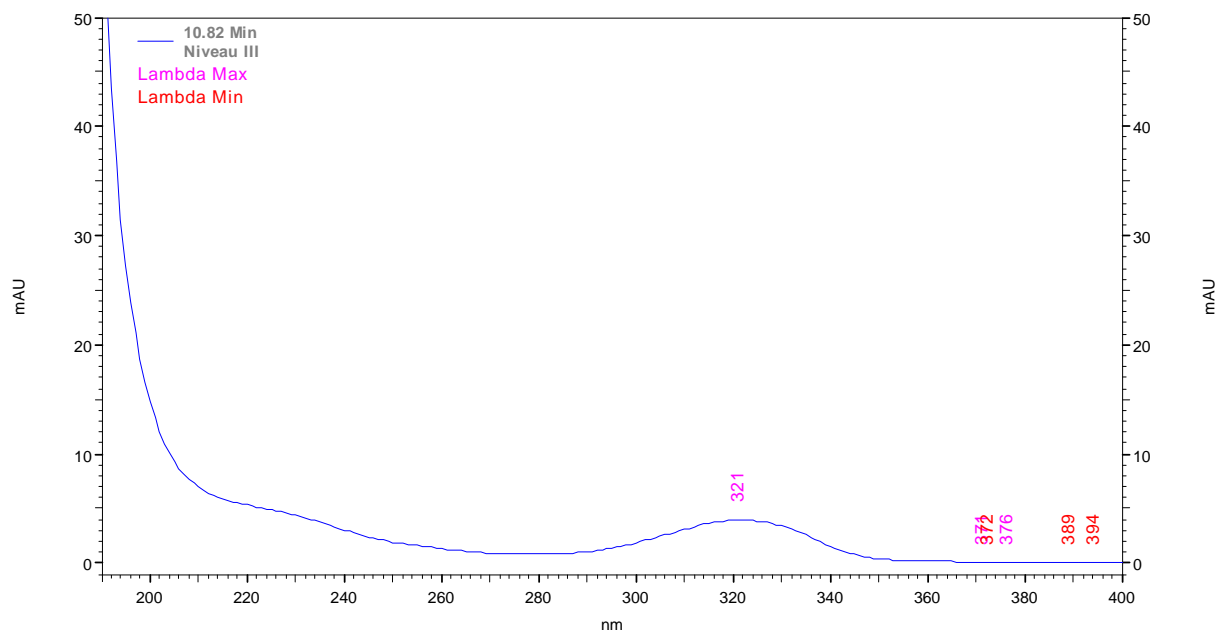
**Figure 10** : Spectre UV de l'Imatinib



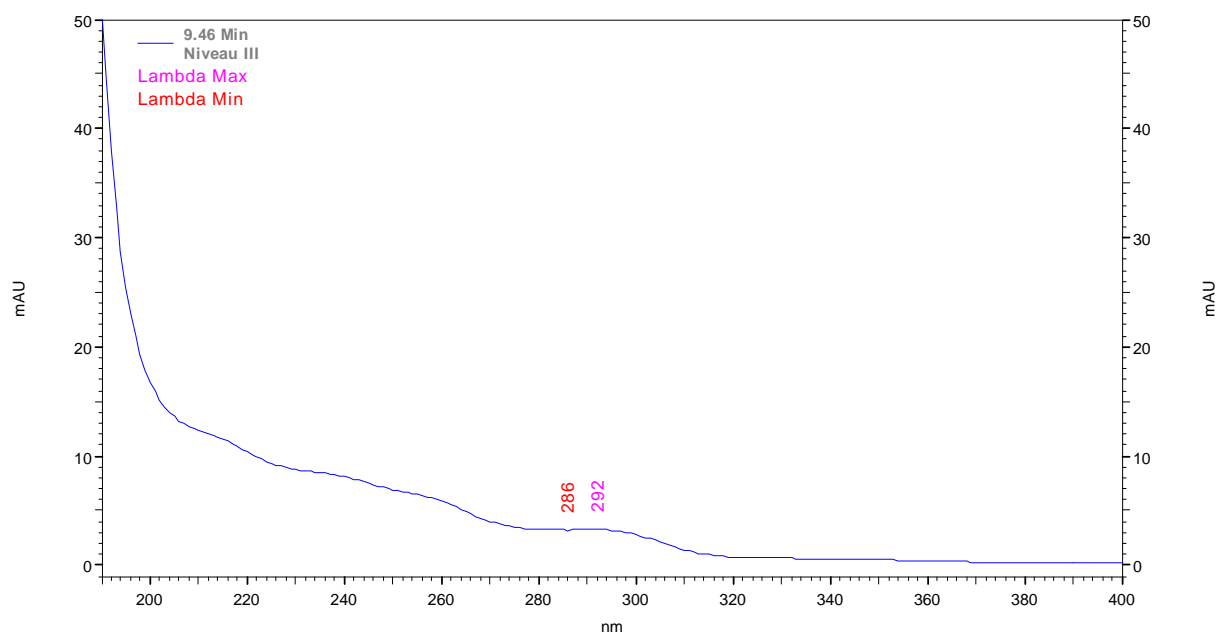
**Figure 11 :** Spectre UV du Norimatinib



**Figure 12 :** Spectre UV du Nilotinib



**Figure 13 :** Spectre UV du Dasatinib



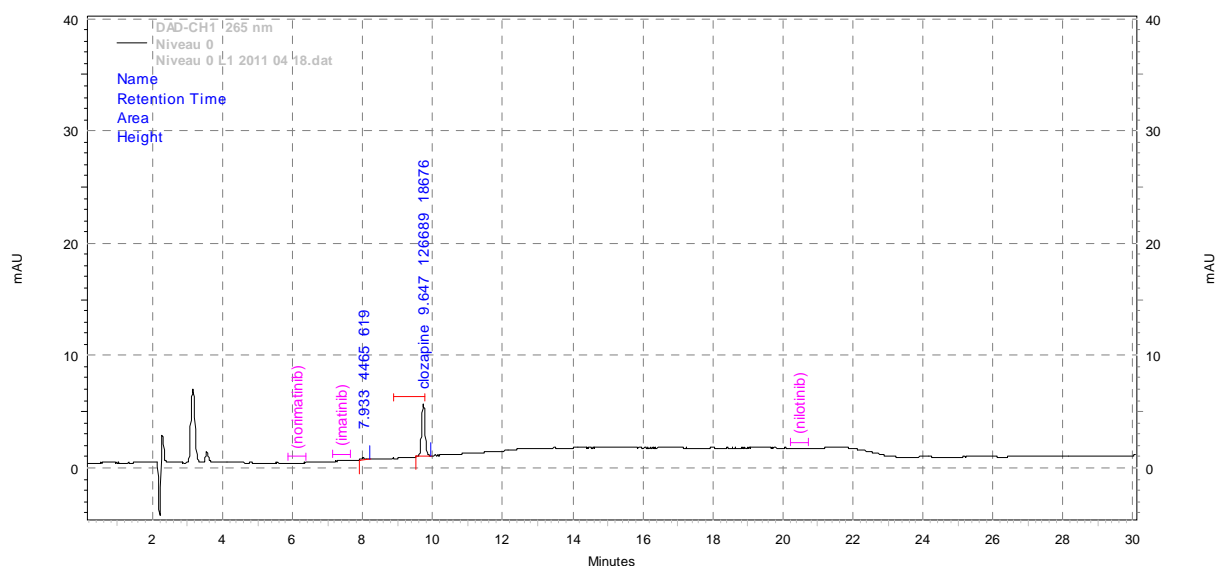
**Figure 14 :** Spectre UV de la Clozapine



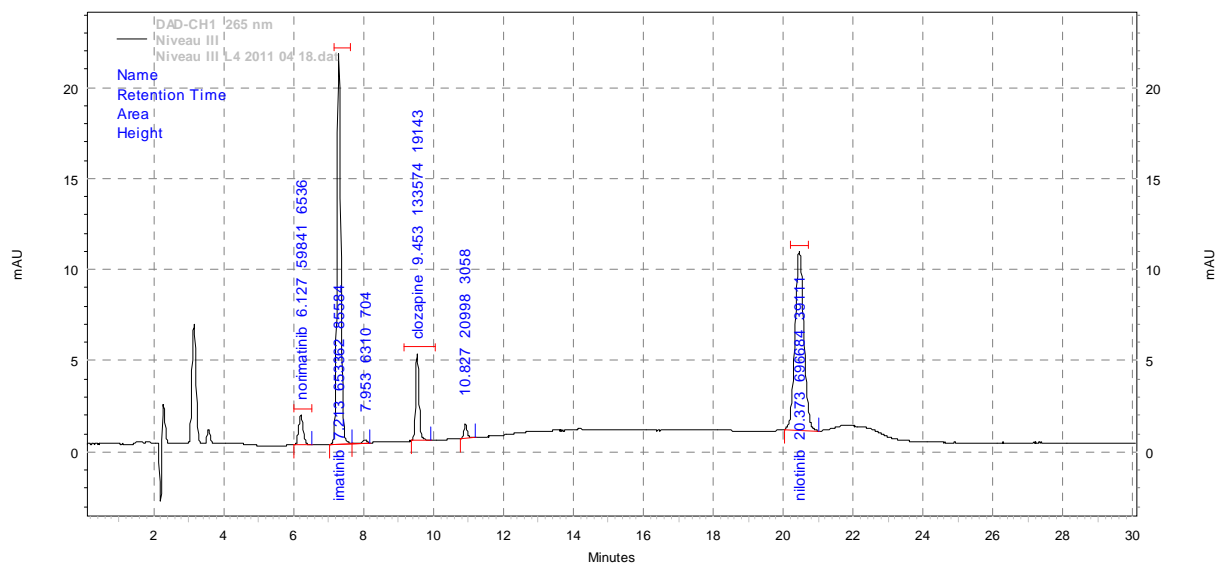
L'analyse des chromatogrammes obtenus nous permet de conclure que la spécificité de notre méthode est bonne. En effet, la séparation des pics est satisfaisante puisque le calcul des résolutions R donne pour chaque analyte une valeur supérieure à 1 (*Tableau IV*).

**Tableau IV** : Calcul des résolutions pour chacune des molécules analysées

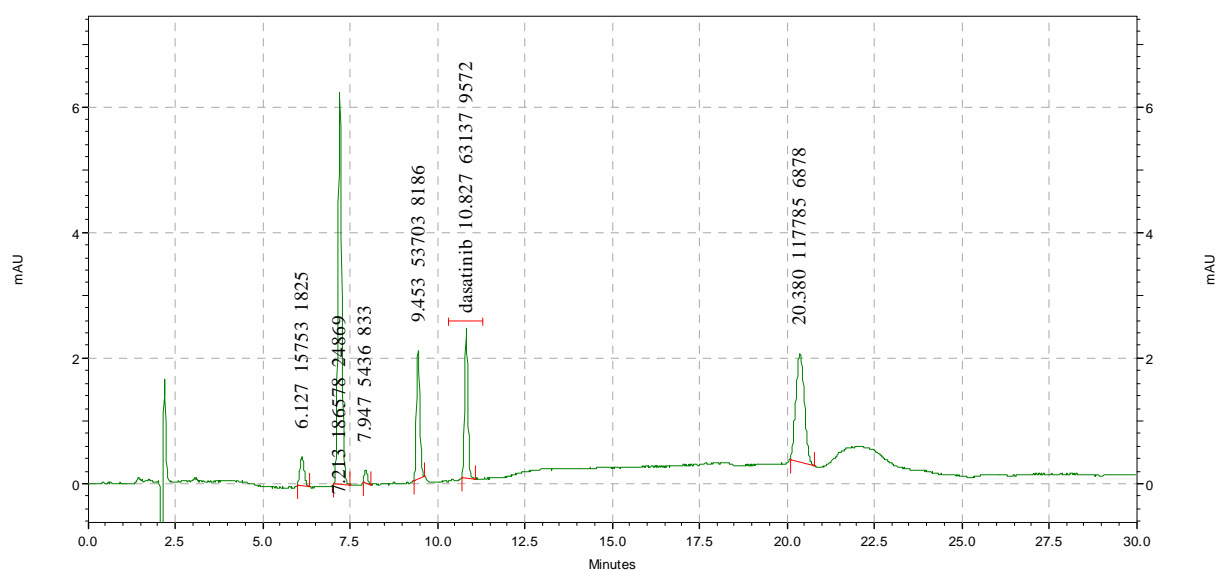
	Norimatinib	Imatinib	Clozapine	Dasatinib	Nilotinib
Temps de rétention en minutes	6,1	7,2	9,4	10,8	20,3
Largeur du pic (W <sub>r</sub> ) en minutes	0,41	0,49	0,45	0,34	0,90
Résolution par rapport au Norimatinib		2,44	7,72	12,66	21,76
Résolution par rapport à l'Imatinib			4,66	8,65	18,78
Résolution par rapport à la Clozapine				3,56	16,15
Résolution par rapport au Dasatinib					15,35
Résolution par rapport au Nilotinib					



**Figure 15** : Chromatogramme type du point 0 de la gamme d'étalonnage



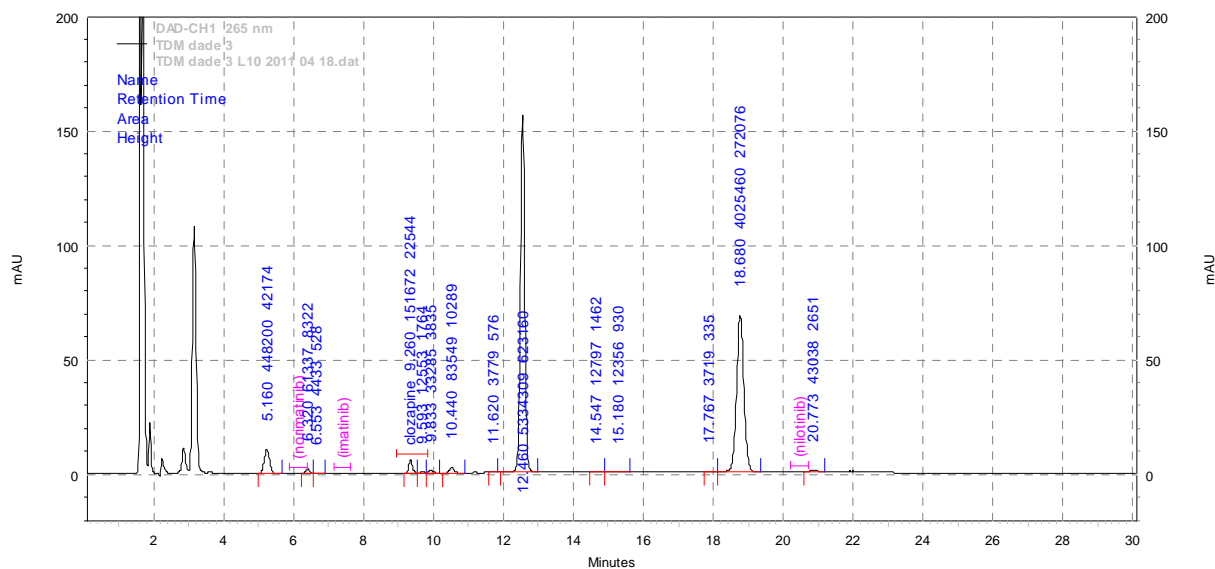
**Figure 16 :** Chromatogramme type (Gamme Niveau III) à 265nm.



**Figure 17 :** Chromatogramme type (Gamme Niveau III) à 305 nm.

Pour déterminer si d'autres médicaments pouvaient interférer avec les ITK testés, un échantillon de contrôle TDM3 (Microgenics Corporation, Fremont, CA, USA) a été analysé dans les mêmes conditions opératoires (**Figure 18**). Cet échantillon contient un grand nombre de molécules médicamenteuses ou substances susceptibles d'être administrées de façon concomitante avec un ITK, en particulier, le Paracétamol, la Caféine, la Carbamazépine, la Digoxine, l'Éthanol, l'Amikacine, la Gentamicine, des antidépresseurs tricycliques, les hormones thyroïdiennes, l'acide Valproïque, la Vancomycine, l'Aspirine, le Phénobarbital...

(liste exhaustive en Annexe 6) Aucune de ces molécules ne possèdent de temps de rétention identiques aux ITK que nous étudions et donc la probabilité que le dosage soit perturbé par une autre molécule qui pourrait interférer est faible.



**Figure 18 :** Chromatogramme du contrôle TDM3 à 265nm.

### 2.2.2. Répétabilité

Nous avons testé la répétabilité de notre méthode en mesurant à 5 reprises les concentrations de 3 points, correspondant à des concentrations faibles, moyennes et élevées pour chacune des molécules. Le calcul de l'écart type et du coefficient de variation a ensuite été réalisé pour chacune des molécules en faisant le rapport surface du pic obtenu / surface du pic de l'étalon interne.

Les résultats obtenus pour la mesure de la répétabilité pour les 4 molécules sont résumées dans le **Tableau V** :

**Tableau V** : Résumé des résultats obtenus pour le calcul de la répétabilité – n=15

		Level I	Level II	Level III
<b>Imatinib</b>	Concentration (ng/mL)	487	1408	2399
	CV	5,19%	6,54%	2,47%
<b>Norimatinib</b>	Concentration (ng/mL)	106	263	428
	CV	6,77%	6,73%	2,75%
<b>Dasatinib</b>	Concentration (ng/mL)	79	194	315
	CV	3,22%	5,01%	1,73%
<b>Nilotinib</b>	Concentration (ng/mL)	480	951	1428
	CV	2,75%	5,01%	0,94%

La méthode est répétable pour le dosage de l'Imatinib, avec un coefficient de variation inférieur à 7 %. Les résultats de la mesure de la répétabilité obtenus pour l'Imatinib sont résumés dans le **Tableau I de l'Annexe 1**).

Les coefficients de variation obtenus pour la mesure de la répétabilité du dosage du Norimatinib sont inférieurs à 7 %, montrant une bonne répétabilité de la méthode. Les résultats obtenus pour la mesure de la répétabilité du dosage du Norimatinib sont présentés dans le **Tableau II de l'Annexe 1**.

La répétabilité pour le dosage du Dasatinib est bonne, puisque les coefficients de variation calculés sont inférieurs à 5,1 %. Les mesures effectuées pour calculer la répétabilité du dosage du Dasatinib sont résumées dans le **Tableau III de l'Annexe 1**.

Pour le Nilotinib aussi, la méthode est répétable, puisque les coefficients de variation calculés sont inférieurs à 5,1 %. Les résultats obtenus pour la mesure de la répétabilité du dosage du Nilotinib par notre méthode sont décrits dans le **Tableau IV de l'Annexe 1**.

### 2.2.3. Reproductibilité ou fidélité intermédiaire

Pour mesurer la reproductibilité ou fidélité intermédiaire, nous avons demandé à 3 collègues du laboratoire de toxicologie de suivre le protocole (Annexe 5) 3 jours différents et sur une période de 15 jours. Les conditions expérimentales sont les mêmes (mêmes réactifs, même appareillage).

Les résultats du calcul de la reproductibilité pour chacune des molécules sont résumés dans le *Tableau VI*.

*Tableau VI* : Résumé des résultats obtenus pour la mesure de la reproductibilité – n = 30

		Level 0	Level I	C1	Level II	C2	Level III	moyenne
<b>Imatinib</b>	ng/mL	0	487,0	941,0	1408,0	1911,0	2399,0	9,8%
	CV	0,00%	9,92%	11,66%	12,58%	6,88%	8,06%	
<b>Norimatinib</b>	ng/mL	0	106	184	263	343	428	12,0%
	CV	0,00%	10,65%	11,11%	10,23%	17,34%	10,58%	
<b>Dasatinib</b>	ng/mL	0	79	116	194	252	315	15,2%
	CV	0,00%	15,81%	14,04%	13,40%	15,03%	17,71%	
<b>Nilotinib</b>	ng/mL	0	480	711	951	1184	1428	13,4%
	CV	0,00%	11,05%	14,98%	10,99%	16,82%	13,25%	

Pour la mesure des concentrations plasmatiques en Imatinib, la méthode est reproductible, avec des écarts types et des coefficients de variation satisfaisants allant de 8,06 à 12,58%, avec un CV moyen de 9,8%. Les résultats du calcul de reproductibilité pour l'Imatinib sont présentés dans le *Tableau I de l'Annexe 5*.

Pour le Norimatinib, les CV obtenus pour la mesure de la reproductibilité sont tous inférieurs à 20%, avec une moyenne de 12%. Il est donc possible de conclure que la mesure de la concentration plasmatique en Norimatinib est reproductible. Les données de reproductibilité pour le Norimatinib sont présentées dans le *Tableau II de l'Annexe 5*.

Pour le Dasatinib, les CV obtenus pour la mesure de la reproductibilité sont tous inférieurs à 20% avec une moyenne de 15,2%. Il est donc possible de conclure que la mesure de la concentration plasmatique en Dasatinib est reproductible. Les données de reproductibilité pour le Dasatinib sont présentées dans le *Tableau III de l'Annexe 5*.

Pour le Nilotinib, les CV obtenus sont tous inférieurs à 20% avec une moyenne de 13,4% ce qui nous permet d'affirmer que la méthode de dosage plasmatique de Nilotinib est reproductible. Les données de reproductibilité pour le Nilotinib sont présentées dans le **Tableau IV de l'Annexe 5**.

Cette étude nous indique que la méthode développée est reproductible pour les quatre molécules testées : en effet, les CV obtenus sont tous inférieurs au seuil fixé de 20%.

#### 2.2.4. Justesse ou biais

La justesse ou biais de notre méthode a été calculé en effectuant la moyenne des valeurs obtenues pendant la mesure de la répétabilité de la méthode. La moyenne obtenue a permis de calculer la concentration expérimentale de chacun des contrôles. La concentration expérimentale est ensuite comparée à la concentration théorique et le calcul du biais s'effectue en utilisant la formule :

$$\text{Biais (\%)} = (\text{Conc. expérimentale} - \text{Conc. théorique}) / \text{Conc. Théorique}$$

Les résultats de biais obtenus pour chacune des molécules sont détaillées dans le **Tableau VII**.

**Tableau VII** : Résultats obtenus pour le calcul du biais pour chacune des molécules.

	Biais	
	C1	C2
<b>Imatinib</b>	5,83%	1,44%
<b>Norimatinib</b>	3,29%	1,57%
<b>Dasatinib</b>	13,75%	12,08%
<b>Nilotinib</b>	4,57%	1,73%

Pour l'imatinib, notre méthode est considérée comme juste puisque le biais est inférieur à 20%. Le **Tableau I de l'Annexe 3** présente les résultats obtenus pour le calcul du biais. Le biais est inférieur à 5,9 %.

Pour le Norimatinib, le calcul de biais donne les résultats présentés dans le **Tableau II de l'Annexe 3**. Le biais observé est très inférieur à 20% (inférieur à 3,3 %) ce qui indique que notre méthode est juste pour le calcul de la concentration plasmatique en Norimatinib.

Le calcul du biais pour la mesure de la concentration plasmatique en Dasatinib donne également des valeurs satisfaisantes, bien en dessous des 20% (inférieur à 13,8 %). Les résultats sont résumés dans le **Tableau III de l'Annexe 3**.

Le calcul du biais pour la mesure de la concentration plasmatique en Nilotinib nous indique que la méthode développée est juste. Le biais est inférieur à 4,6 %, soit bien en dessous des 20% fixés. Les résultats sont résumés dans le **Tableau IV de l'Annexe 3**.

La méthode développée donne des résultats satisfaisants : en effet, le calcul des biais pour chacune des mesures donne des valeurs inférieures au seuil de 20% que nous nous étions fixé. Par conséquent, nous pouvons conclure que la méthode développée est juste.

### **2.2.5. Contamination inter-échantillons**

La contamination inter-échantillon a été déterminée en mesurant à 3 reprises un échantillon de forte concentration, puis tout de suite après un échantillon de faible concentration.

Les données sont résumées dans le tableau suivant :

**Tableau VIII** : Valeurs calculées de la contamination inter-échantillons

	<b>Imatinib</b>	<b>Norimatinib</b>	<b>Dasatinib</b>	<b>Nilotinib</b>
<b>Contamination</b>	-1,85%	-2,27%	0,20%	-1,20%

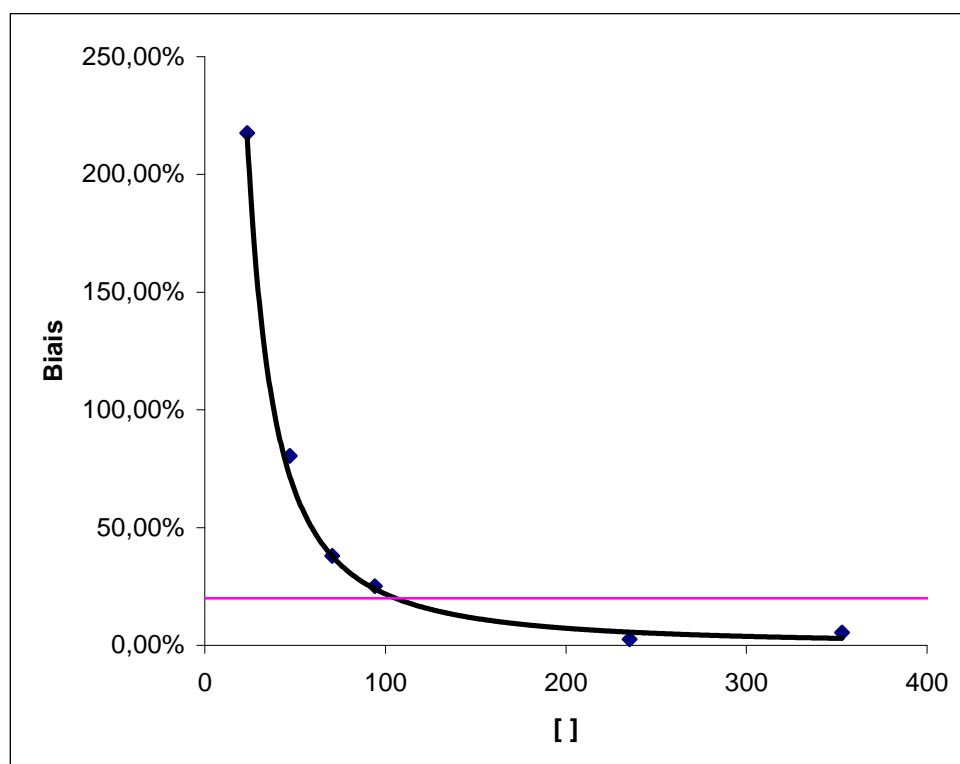
Les données obtenues sont négatives pour l'Imatinib et son métabolite actif, ainsi que pour le Nilotinib. Le taux de contamination calculé pour le Dasatinib est de 0,2%. Pour les quatre molécules, ces données démontrent qu'il n'existe pas de phénomène de contamination

inter-échantillons ni d'effet mémoire et par conséquent, il ne sera pas utile, en routine, de passer de manière systématique un échantillon vierge entre deux échantillons patient.

### 2.2.6. Limites de détection et de quantification

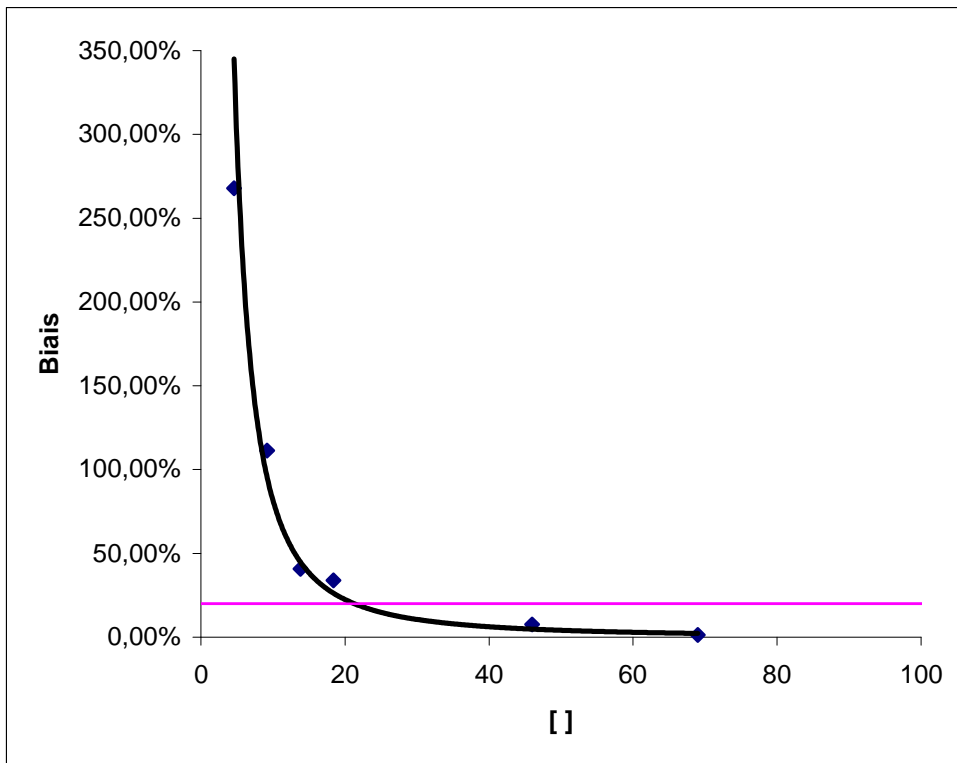
Nous avons étudié pour chacune des molécules dosées les limites de détection et de quantification.

Les limites de quantification ont été obtenues graphiquement en étudiant le coefficient de variation en fonction de la concentration. La courbe obtenue coupe une droite d'équation  $CV=20\%$ . L'abscisse lue au point d'intersection de ces deux courbes détermine la limite de quantification de la molécule étudiée.

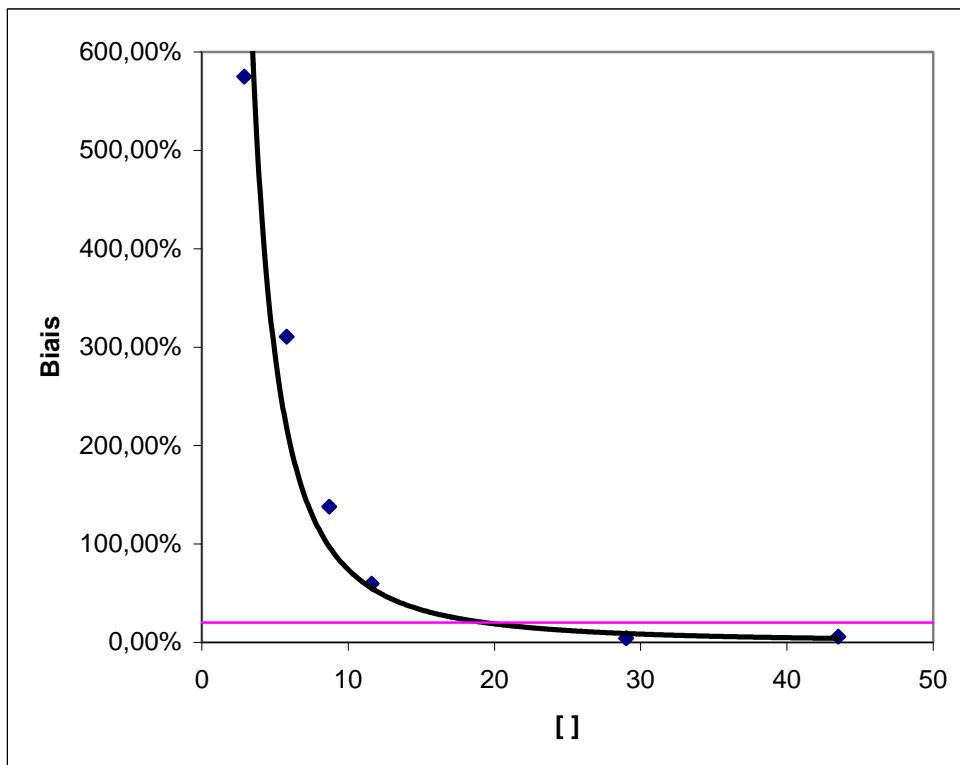


**Figure 19 :** Détermination graphique de la limite de quantification de l'Imatinib

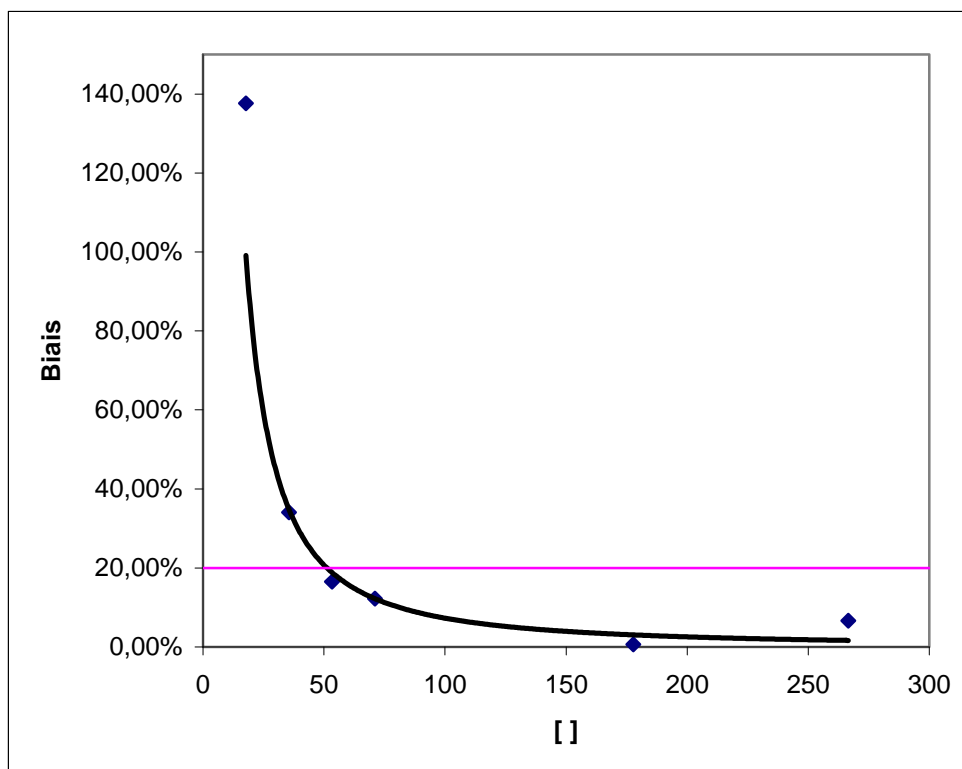




**Figure 20 :** Détermination graphique de la limite de quantification pour le Norimatinib



**Figure 21 :** Détermination graphique de la limite de quantification du Dasatinib



**Figure 22 :** Détermination graphique de la limite de quantification du Nilotinib

Les limites de détection sont évaluées visuellement, le détecteur à barrette de diodes permet d'identifier le spectre de la molécule. Ainsi, on considère que lorsqu'un pic apparaît sur le chromatogramme et tant que l'aspect du spectre UV est préservé, que la molécule peut être détectée.

Les limites de détection et de quantification sont résumées dans le **Tableau IX** :

**Tableau IX :** Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour les quatre molécules étudiées

	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
<b>Imatinib</b>	23	100
<b>Norimatinib</b>	5	21
<b>Dasatinib</b>	4	17
<b>Nilotinib</b>	17	50

### **2.2.7. Linéarité**

Nous avons étudié la linéarité de manière statistique en effectuant un test de Fisher à partir des données obtenues lors des mesures de répétabilité. Les données obtenues pour chacune des molécules sont résumées en Annexe 4.

Pour les quatre molécules étudiées, notre méthode donne de manière statistiquement significative des résultats linéaires.

### **2.2.8. Stabilité**

Les stabilités des solutions d'étalonnage et de contrôle sont directement fournies par le laboratoire ChromSystems : Avant reconstitution, les lyophilisats peuvent se conserver plusieurs mois à -20°C. Après reconstitution, les solutions peuvent être conservées 3 mois à -20°C et 3 semaines à +4°C.

Après 4 semaines à +4°C, les solutions d'étalonnages se sont révélées encore stables, puisque les pentes des droites d'étalonnages étaient encore comparables à celles obtenues habituellement. Cela a pu être déterminé par plusieurs mesures d'échantillons contrôles fraîchement reconstitués. Les CV obtenus se sont révélés, pour toutes les molécules, inférieurs à 20%.

Après 8 semaines à +4°C, la concentration en Imatinib a chuté de 21%, celle de Norimatinib de 45%, tandis que les concentrations en Dasatinib et Nilotinib ont diminué de 6% et 15,5% respectivement.

### **2.2.9. Robustesse**

Au cours du développement de la méthode, différents paramètres ont été étudiés. Tout d'abord, la composition de la phase mobile et son débit.

En utilisant une phase mobile composée de 75% de tampon et de 25% d'acétonitrile, avec un débit de 1mL/min les temps de rétention obtenus étaient de 3,6, 4,4, 8,4, 9,4 et 44,1

minutes respectivement pour le Norimatinib, le Dasatinib, l'étalon interne, le Dasatinib et le Nilotinib. Avec un débit de 1,5 mL/min ces temps de rétention devenaient 2,5, 2,8 6,4, 7,2 et 36,5 minutes.

Un nouvel essai a été effectué avec une phase composée de 70% de tampon et 30% d'acétonitrile. Les temps de rétention étaient respectivement pour le Norimatinib, l'Imatinib, l'étalon interne, le Dasatinib et le Nilotinib de 3,0, 3,1, 4,7, 6,8 et 15,0 minutes.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de mettre au point le gradient de phase utilisé pour notre méthode. En effet, la composition à 80/20 (Tampon/ACN), permet une meilleure séparation des premiers composés élués et l'augmentation à (70/30) permet de diminuer de manière considérable la durée de l'analyse en diminuant le temps d'élution du Nilotinib.

Différents pH pour la phase mobile ont été testés : A pH 7 et à pH 8, aucune détection des molécules d'intérêt n'a été possible.

Enfin, une colonne type C8 a également été testée, mais la résolution des pics obtenus étaient de moins bonne qualité qu'avec une colonne de type C18 comme utilisée dans notre méthode.

### 3. Troisième partie : Validation croisée de la technique et cas cliniques

Afin de valider notre technique de dosage de l'Imatinib, du Norimatinib, du Dasatinib et du Nilotinib, nous avons procédé à une cross-validation. Nous avons demandé à des laboratoires de nous transmettre 10 échantillons pour chaque molécule dosée et avons procédé en aveugle au dosage de la molécule d'intérêt. Nous avons également adhéré à un programme de contrôle de qualité externe organisé par les laboratoires Asqualab.

#### 3.1. Imatinib

10 échantillons de patients traités par Imatinib nous ont été transmis par le Laboratoire d'oncopharmacologie du Centre Antoine Lacassagne à Nice. Nous avons procédé au dosage de l'Imatinib sur ces 10 échantillons et communiqué nos résultats.

Nous avons étudié les coefficients de variation pour chaque échantillon, puis mesuré l'écart type sur l'ensemble des mesures. Enfin, nous avons procédé à un test de corrélation de Pearson afin de valider statistiquement si les résultats donnés par les méthodes étaient significativement comparables ou non. Le centre Niçois utilise également une méthode CLHP avec détection UV à 265 nm.

Le *Tableau X* représente les données obtenues :

*Tableau X* : Données obtenues pour le dosage de 10 échantillons sanguins contenant de l'Imatinib.

Imatinib (ng/mL)	Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3	Ech. 4	Ech. 5	Ech. 6	Ech. 7	Ech. 8	Ech. 9	Ech. 10
Nancy	1186	1221	2448	3586	801	1120	1179	479	1911	1968
Nice	1077	1178	2478	3345	714	1348	1436	568	1760	1495
Biais	10,08%	3,64%	1,19%	7,20%	12,14%	16,89%	17,92%	15,72%	8,56%	31,67%
Ecart Type	76,75	30,28	20,92	170,35	61,30	161,01	182,00	63,14	106,58	334,80
CV	6,78%	2,52%	0,85%	4,92%	8,09%	13,05%	13,92%	12,06%	5,81%	19,33%

L'échantillon 10 présentait un important caillot de fibrine. Ceci pourrait expliquer le fort biais observé entre la mesure effectuée à Nice et celle effectuée à Nancy. Par conséquent, nous avons décidé de ne pas prendre en compte pour le calcul des moyennes du biais (10,4%),

écart-type (96,93 ng/mL) et coefficient de variation (7,6%). Cette valeur a été également écartée pour le calcul statistique.

Nous avons utilisé un test de corrélation de Pearson pour comparer les valeurs obtenues par les deux méthodes. Le coefficient  $r$  calculé est de 0,987. La valeur calculée du  $t$  de Student ( $t_{obs}$ ) est égale à 16,046. Au risque d'erreur  $\alpha = 5\%$ ,  $t_{obs}$  est supérieur au  $t$  donné par la table de Student (test bilatéral) qui est de 2,364 ( $n = 7$  degrés de liberté). Nous pouvons donc admettre que les résultats obtenus par notre technique de dosage donnent des valeurs comparables à celles obtenues par le laboratoire de Nice.

### 3.2. *Norimatinib*

Nous avons également déterminé la concentration en Norimatinib sur les 10 échantillons fournis par le centre Niçois. Cependant, cette molécule n'a pas été dosée par le centre de Nice et par conséquent, nous n'avons pas pu réaliser de comparaison.

Les concentrations en Norimatinib pour chaque échantillon sont détaillées dans le **Tableau XI**.

*Tableau XI* : Données obtenues pour le dosage de 10 échantillons sanguins contenant de l'Imatinib.

(ng/mL)	Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3	Ech. 4	Ech. 5	Ech. 6	Ech. 7	Ech. 8	Ech. 9	Ech. 10
Norimatinib	65	47	55	50	101	184	237	104	163	288
Imatinib	1186	1221	2448	3586	801	1120	1179	479	1911	1968

### 3.3. *Contrôles externes*

Les laboratoires Asqualab proposent depuis Mars 2011 un programme d'assurance qualité pour le dosage des ITK. Nous avons participé aux contrôles de Mars et de Juin 2011. Asqualab envoie des échantillons lyophilisés à reconstituer avec 1 mL d'eau distillée.

#### 3.3.1. **Imatinib**

Les résultats des contrôles qualité externe de Mars et Juin 2011 pour l'Imatinib sont résumés dans le **Tableau XII**.

**Tableau XII** : Résultats de contrôle qualité externe pour l’Imatinib.

Echantillon	Nombre de Participants	Valeur Cible (ng/mL)	Moyenne générale (ng/mL)	Notre Valeur (ng/mL)	Biais (%)
ITK 1101	16	800	728	715	10,6
ITK 1102	16	2000	2080	1923	3,9
ITK 1103	18	1300	1327	1530	17,7
ITK 1104	18	2600	2325	3013	15,9

Pour les 4 échantillons, le biais calculé est inférieur à 20 %.

### 3.3.2. Dasatinib

Les résultats des contrôles qualité externe de Mars et Juin 2011 pour le Dasatinib sont résumés dans le **Tableau XII**.

**Tableau XIII** : Résultats de contrôle qualité externe pour le Dasatinib.

Echantillon	Nombre de Participants	Valeur Cible (ng/mL)	Moyenne générale (ng/mL)	Notre Valeur (ng/mL)	Biais (%)
ITK 1101	3	0,2	-	Indétectable	-
ITK 1102	4	25,0	21,7	23,0	8,0
ITK 1103	5	0,63	-	Indétectable	-
ITK 1104	5	18,75	19,1	17,0	9,3

Sur 4 échantillons, la concentration de deux d’entre eux n’a pas pu être déterminée pour cause de trop faible sensibilité de notre méthode. Pour les deux autres échantillons, le biais calculé est inférieur à 20 %.

### 3.4. Cas cliniques

L’efficacité du traitement contre la LMC s’effectue classiquement en mesurant le ratio de transcrit MCBR-ABL / ABL. Cette mesure de transcrit est effectuée par PCR quantitative. Il est considéré que le patient possède une réponse moléculaire majeure (RMM) lorsque le ratio calculé est inférieur à 0,1%. La concentration plasmatique en Imatinib est mesurée principalement dans les cas d’adaptations posologiques lorsque la RMM est jugée insatisfaisante. Dans les cas de mauvaise observance, le dosage plasmatique est effectué à titre

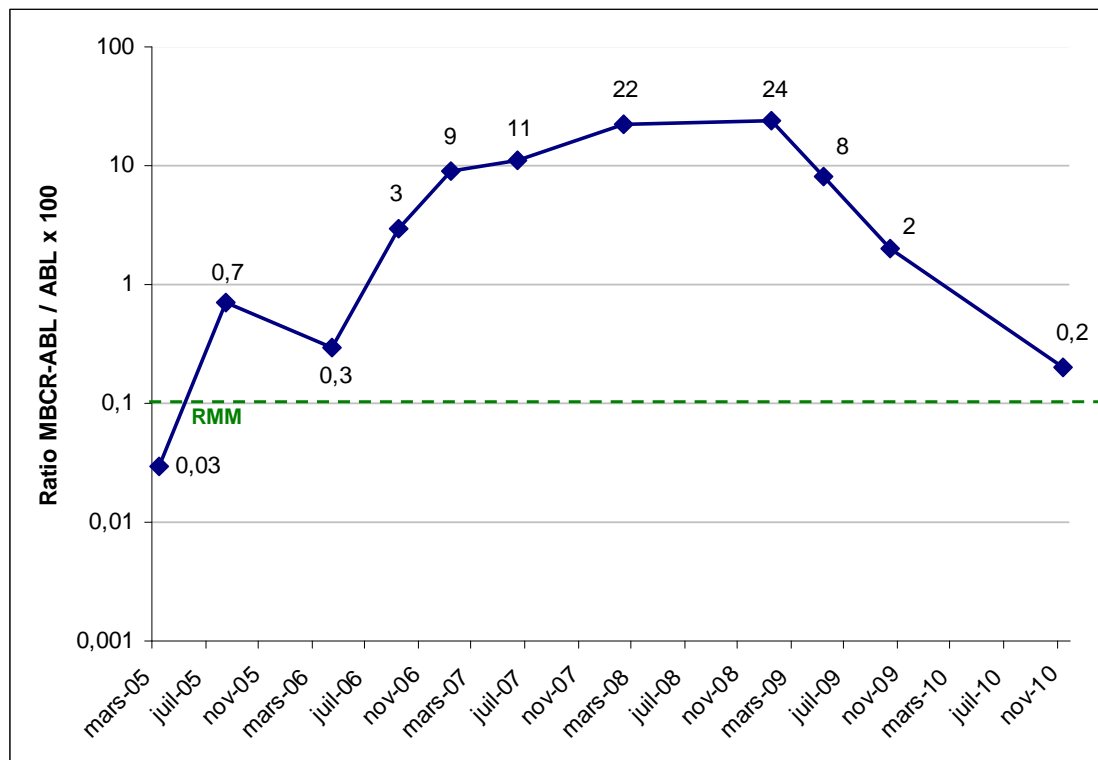
indicatif, mais ne permet pas de « piéger » le patient non observant, puisqu'il est prévenu la veille du dosage qu'il ne devra pas reprendre son traitement avant la consultation.

### 3.4.1. Cas de mauvaise observance

#### Cas de Madame V.

Madame V. née en 1979 a été diagnostiquée comme atteinte d'une LMC depuis 2001. Cette patiente a pris de façon régulière son traitement (400 mg d'Imatinib par jour) jusqu'en 2005, date à laquelle elle bénéficiait d'une RMM. Depuis 2005, cette patiente a commencé, sans véritable raison, à prendre son traitement de manière très anarchique, à raison d'un comprimé tous les deux ou trois jours.

Un dosage de la concentration en Imatinib a été effectué chez cette patiente en Mai 2009 qui a donné une concentration de 799 ng/mL en Imatinib. Ce dosage a été effectué dans le contexte d'une progression du ratio MBCR-ABL/ABL avant que la patiente n'avoue son inobservance au médecin.



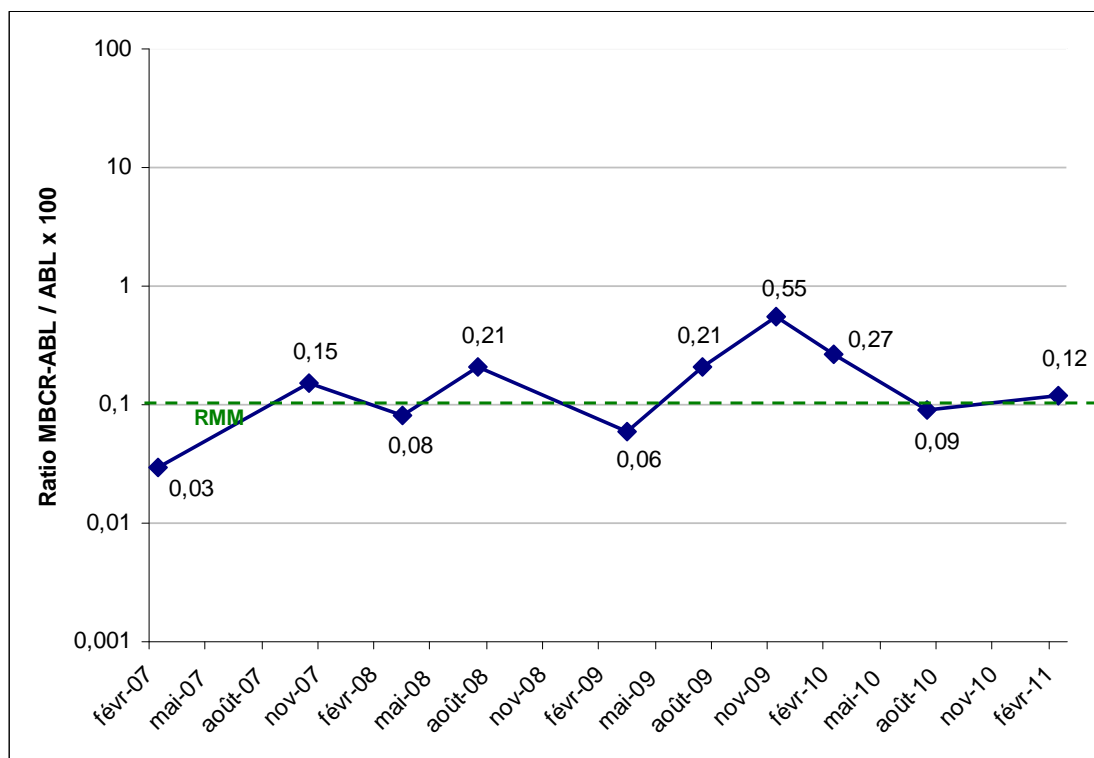
**Figure 23** : Suivi du ratio MBCR/ABL de Madame V.



Depuis que la patiente a décidé de ne pas prendre son traitement régulièrement, le ratio MBCR-ABL/ABL a considérablement augmenté. La prise quotidienne de ce médicament permet d'obtenir chez cette patiente une RMM et donc une maîtrise de sa maladie.

### Cas de Madame S.

Madame S., née en 1959, est suivie depuis 2001 pour le traitement d'une LMC. Cette patiente habituellement observante et bénéficiant d'une RMM a décidé de ne pas prendre son traitement (400 mg d'Imatinib par jour) pendant une période allant de Mars à Novembre 2009. C'est le pharmacien de Mme S. qui a informé le médecin de ses doutes quant à l'observance de la patiente. L'augmentation du ratio MBCR-ABL/ABL traduit de manière claire la période durant laquelle le traitement a été interrompu. Un dosage de la concentration plasmatique en Imatinib a été réalisé en Février 2010 après la réintroduction du traitement pour vérifier que la patiente avait, comme elle le prétendait repris la prise de son médicament. Ce dosage a donné une valeur de 750 ng/mL.

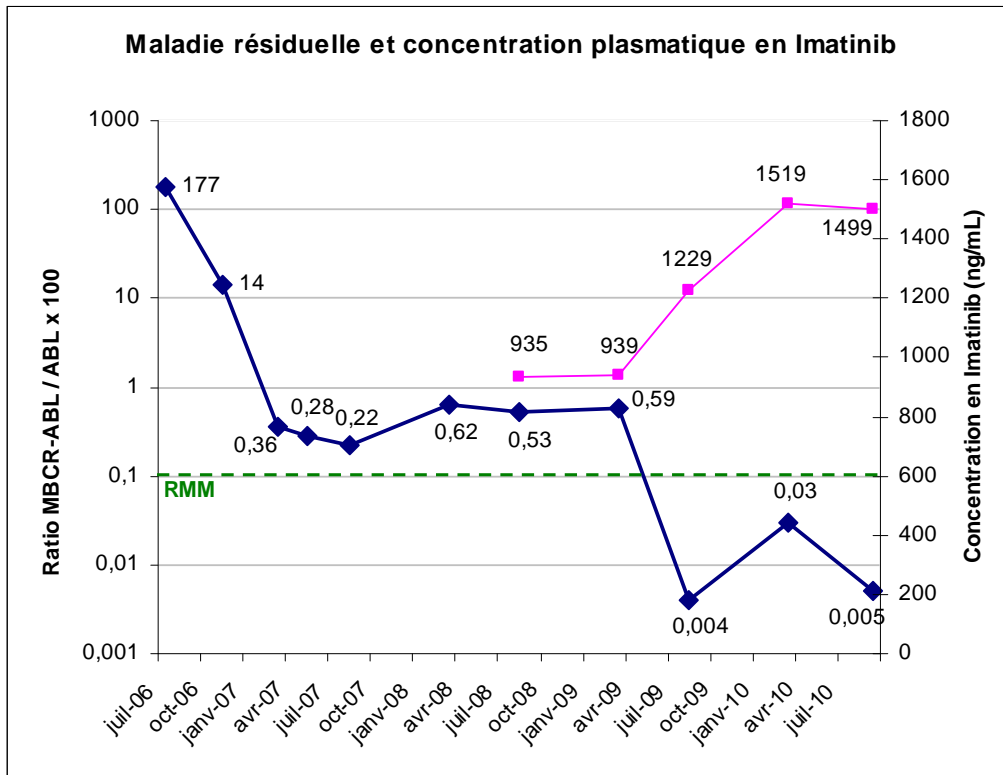


**Figure 24 :** Suivi du ratio MBCR/ABL de Madame S.

### 3.4.2. Cas d'adaptation posologique

#### Cas de Monsieur B.

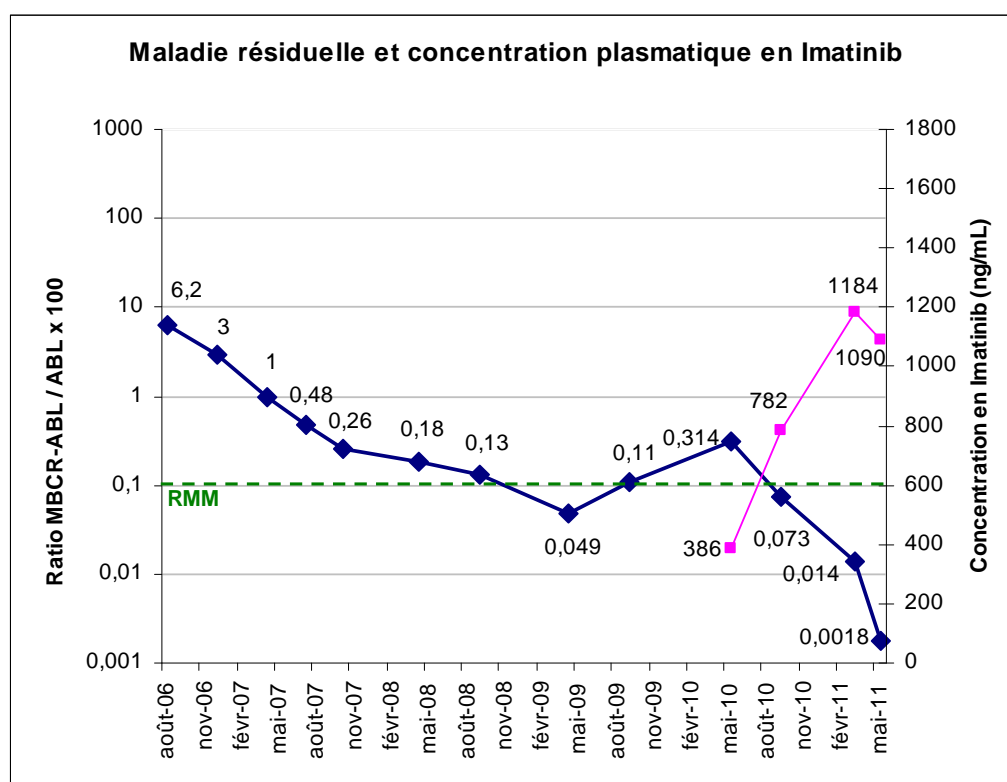
Monsieur B est un patient né en 1956 chez qui un diagnostic de LMC a été établi en juillet 2006. Ce patient a été inclus dans l'étude SPIRIT qui consistait à administrer de l'interféron alpha en plus de l'Imatinib afin d'augmenter la vitesse de réponse au traitement. Ce patient, bien qu'observant, ne bénéficiait pas d'une RMM une fois son traitement équilibré. Son médecin a alors décidé de mettre en place un suivi de ses concentrations plasmatiques en Imatinib. Les deux premières mesures ont donné des concentrations inférieures au seuil recommandé de 1000 ng/mL, alors que le patient prenait quotidiennement 400 mg d'Imatinib, c'est pourquoi en Mars 2009, une augmentation de 400 mg à 600 mg par jour a été décidée. Cette augmentation de posologie a permis au patient d'obtenir une RMM. En parallèle, sa concentration plasmatique en Imatinib a dépassé le seuil recommandé de 1000 ng/mL. La **Figure 25** montre clairement la relation entre l'augmentation de la posologie, l'augmentation de la concentration plasmatique en Imatinib et le passage en RMM.



**Figure 25 :** Suivi du ratio MBCR/ABL et concentrations plasmatiques en Imatinib de Monsieur B.

## Cas de Monsieur P.

Monsieur P., né en 1953 a été diagnostiqué comme atteint d'une LMC en Août 2006. Ce patient a alors bénéficié d'un traitement par Imatinib (400 mg par jour). Bien qu'observant, le patient ne bénéficiait pas d'une RMM. En Mai 2010, le patient a été inclus dans le protocole de recherche clinique MIM, consistant en une adaptation posologique de l'Imatinib en fonction de la concentration plasmatique mesurée. Le premier dosage effectué a révélé une concentration plasmatique de 386 ng/mL, donc bien inférieure aux 1000 ng/mL recommandés. Un second dosage en août 2010 a été effectué, révélant une concentration plasmatique à 782 ng/mL. Conformément au protocole, la posologie en Imatinib a été adaptée. Monsieur P. a alors reçu 800 mg d'Imatinib par jour, répartis en deux prises (matin et soir). Cette augmentation de posologie a permis de dépasser des concentrations plasmatiques de 1000 ng/mL en Imatinib et surtout d'obtenir une RMM chez ce patient.



**Figure 26 :** Suivi du ratio MBCR/ABL et concentrations plasmatiques en Imatinib de Monsieur P.

## 4. Quatrième partie : Discussion et Conclusion

### 4.1. Discussion

Nous avons développé une méthode analytique spécifique, fiable, juste, répétable et robuste pour la détermination des concentrations plasmatiques en Imatinib, Norimatinib, Dasatinib et Nilotinib.

La mise en œuvre de dosages en aveugle nous a permis de vérifier que les valeurs de concentrations plasmatiques obtenues par notre méthode sont fiables et comparables à ceux obtenus dans d'autres CHU. Certaines limites existent cependant pour cette méthode.

#### 4.1.1. Aspects techniques

Tout d'abord, le fait d'utiliser des solutions commerciales contenant les quatre molécules pour les gammes d'étalonnages, impose un temps de passage (run) de 30 minutes. En effet, bien que le Norimatinib, l'Imatinib et le Dasatinib possèdent un temps de rétention de respectivement 6,1 minutes, 7,2 minutes et 10,8 minutes, la sortie du Nilotinib à 20,3 minutes et le temps de rééquilibrage de la colonne nécessaire à cause du gradient de phase, imposent une durée d'analyse de 30 minutes.

L'autre inconvénient d'utiliser ces solutions commerciales est qu'il nous est impossible de déterminer le rendement d'extraction pour chacune des molécules.

Les détecteurs à barrette de diodes possèdent un grand nombre de qualités et une grande flexibilité d'utilisation, mais les limites de détection sont bien au dessus de celles que l'on peut obtenir avec un spectromètre de masse. Dans notre étude, cela ne pose pas de problème pour le dosage des concentrations résiduelles d'Imatinib, Norimatinib et Nilotinib habituellement bien au-delà du seuil de détection. Pour le Dasatinib, les concentrations résiduelles à 24h sont de l'ordre de 0,1 à 5 ng/mL. La limite de détection de notre méthode étant de 17 ng/mL, cela ne nous permet pas de doser ce médicament (à 24h) en résiduel. Il serait donc nécessaire de développer une technique d'extraction différente ou de changer de type de détection. Cependant, l'étude OPTIM Dasatinib étudie également les concentrations

plasmatiques au pic afin d'évaluer son influence sur la réponse au traitement. Notre méthode est tout à fait utilisable pour ce type de dosage.

Nous avons validé notre méthode selon les normes COFRAC établies en 2005, mais depuis avril 2011, une nouvelle version est disponible. En ce qui concerne la validation de méthode, cette nouvelle version reste assez proche de celle qui était en vigueur en 2005, avec cependant l'introduction de nouvelles notions comme le calcul de l'inexactitude de la méthode, obtenue comme le biais, mais à partir d'une évaluation externe de la qualité. Une autre nouvelle notion apparaît, celle de l'estimation de l'incertitude des résultats, directement inspirée des normes ISO 15189 et 22870. Cette estimation de l'incertitude se calcule à partir de l'écart type calculé lors des mesures de fidélité intermédiaire ( $u_1$ ) et du biais ( $u_2 = \text{biais}/\sqrt{3}$ ). Ces deux paramètres permettent de calculer l'incertitude combinée ( $u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2}$ ) et on considère enfin l'incertitude élargie U égale à deux fois  $u_c$ . Dans notre étude, le calcul de ces estimations de l'incertitude des résultats sont données dans le **Tableau XIV**. Afin d'être en accord avec les prochaines normes d'accréditation, les résultats devront être communiqués sous la forme :

$$R = \text{valeur mesurée} \pm U \text{ (unité)}$$

**Tableau XIV** : Estimation de l'incertitude des résultats selon le guide COFRAC 2011

	<b>Imatinib</b>	<b>Norimatinib</b>	<b>Dasatinib</b>	<b>Nilotinib</b>
<b>u1</b>	0,22	0,03	0,03	0,32
<b>u2</b>	0,02	0,01	0,07	0,02
<b>uc</b>	0,22	0,03	0,08	0,32
<b>U</b>	0,43	0,06	0,16	0,63

L'évaluation de la contamination est également un peu modifiée dans cette nouvelle version du guide du COFRAC, la séquence est passée 5 fois (H1, H2, H3, B1, B2, B3) pour ensuite calculer la contamination à partir des moyennes et plus à partir des valeurs mesurées sur une seule détermination. Ceci permet in fine de déterminer de manière statistique, en utilisant le test de Student, qu'il existe une différence significative entre les deux moyennes.

Enfin, cette nouvelle version du guide de validation du COFRAC développe une partie comparaison de méthodes. Ce paragraphe est destiné à mesurer l'équivalence des valeurs données pour un même échantillon par deux méthodes différentes. La méthode décrite demande le passage d'au moins 30 échantillons par les deux méthodes et répartis de manière homogène sur la gamme de concentrations rencontrées en situation clinique. Cela est facilement réalisable pour certains dosages, comme par exemple dans le domaine de la biochimie, mais cela est particulièrement difficile dans le cadre d'une validation de technique analytique comme c'est le cas dans ce travail. Ainsi, le calcul du coefficient de corrélation de Pearson, suivi du calcul du t value et la comparaison par rapport à la table de Student, nous semble la manière la plus appropriée pour tester la concordance des résultats donnés par deux techniques différentes pour un même échantillon.

#### **4.1.2. Aspects cliniques**

Les études cliniques visant à établir un lien entre concentration plasmatique et efficacité du traitement sont encore trop peu nombreuses. En effet, seulement 5 études à ce jour utilisent le suivi thérapeutique pharmacologique pour l'adaptation de la posologie. La plupart des études établissant un lien entre efficacité et concentration plasmatique ont été menées de manière rétrospective et par conséquent ne possèdent pas la puissance d'études qui seraient menées de manière prospectives. Des études concentration/efficacité ainsi que concentration/toxicité avec adaptation de posologies devraient être mises en place pour chacune des molécules utilisées dans le traitement de la LMC ou des GIST.

Les études ont démontré que l'Imatinib, le Dasatinib et le Nilotinib sont des molécules très efficaces pour le traitement de la LMC, cependant, ces trois molécules restent inactives chez les patients possédant la mutation T315I. De nouvelles molécules sont actuellement à l'étude dans le cadre d'études de Phase I. C'est le cas en particulier du Ponatinib. Cette molécule a démontré son efficacité chez un certain nombre de patients portant la mutation T315I. Cependant, elle reste inefficace dans une certaine proportion de patients. Cela pourrait être expliqué par la coexistence de mécanismes alternatifs de résistance non encore élucidés (10). L'utilisation du Ponatinib en première ligne pourrait cependant prévenir la survenue de résistances, qui apparaissent dans 20 à 30% des cas chez les patients traités par Imatinib.

D'autres molécules sont également à l'étude pour le traitement des patients atteints de LMC et porteurs de la mutation T315I. C'est le cas d'une molécule de la famille d'ITK dits 'switch pocket inhibitors', la DCC-2036. C'est le cas également de la GNF-5, qui comme la DCC-2036 est actuellement en utilisation dans une étude de Phase I.

Enfin, des alternatives n'utilisant pas des ITK existent. C'est le cas de l'Omacetaxine, un alcaloïde semi-synthétique induisant l'apoptose dans les cellules souches primaires portant l'anomalie responsable de la LMC (73).

Pour terminer, la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques reste une alternative intéressante chez les patients chimiorésistants, puisqu'elle permet d'obtenir une réponse moléculaire complète, en particulier chez les patients en phase chronique (74).

#### **4.2. Conclusion et perspectives**

Nous avons développé une méthode fiable, sensible et répétable pour la détermination des concentrations plasmatiques de l'Imatinib et de son principal métabolite le Norimatinib, ainsi que du Dasatinib et du Nilotinib. Cette méthode chromatographique utilisant un détecteur à barrette de diodes est simple, peu coûteuse et rapide à mettre en œuvre. À notre connaissance, la méthode que nous avons développée est la seule utilisant un système de CLHP couplé à un détecteur à barrette de diodes qui permet de doser simultanément ces 4 molécules.

La méthode est parfaitement adaptée au dosage de l'Imatinib et du Nilotinib, mais la limite de détection du Dasatinib pourra se révéler bloquante si les études en cours ne démontrent pas un intérêt du pic plasmatique dans le traitement des pathologies comme la LMC. En effet, notre méthode ne permet malheureusement pas de déterminer des concentrations aussi faibles que celles qui sont habituellement observées après 24 heures, c'est-à-dire inférieures à 5 ng/mL.

Des déterminations de concentrations plasmatiques d'autres ITK pourront probablement être effectuées en utilisant la même méthode de CLHP couplée à un détecteur à barrette de diodes. C'est le cas de molécules plus récentes utilisées dans le traitement du

cancer du poumon, comme l'erlotinib ou le gefitinib (75) où une méthode utilisant CLHP et détection UV a été récemment décrite (76), ou encore de molécules utilisées dans le traitement du cancer du sein comme le Lapatinib (77) où pour le moment, seules des méthodes de CLHP utilisant une détection par spectrométrie de masse ont été décrites (71, 78, 79). Il n'existe aujourd'hui aucune étude montrant une relation entre concentration plasmatique de ces molécules et réponse au traitement. Les résultats concentration-activité avec l'Imatinib pourraient être transposables à d'autres ITK, c'est pourquoi le développement de protocoles hospitaliers de recherche clinique est nécessaire.

Les thérapies ciblées se développent de plus en plus et il serait utile, dès les premiers essais thérapeutiques, de déterminer s'il existe une relation entre concentration plasmatique et réponse au traitement. La détermination précoce de l'existence de cette relation est à la fois un enjeu clinique et un enjeu pharmaco-économique. Clinique, car il paraît nécessaire de permettre aux patients de bénéficier des molécules adaptées à leur maladie et aux posologies suffisantes et efficaces afin de leur assurer le meilleur pronostic vital. Pharmaco-économique, car les molécules utilisées en thérapie ciblées sont particulièrement onéreuses et leur prescription pèse déjà lourdement sur les budgets de santé. En Mai 2011, l'éditorial du journal Nature citait un exemple Français : Il a été montré, chez les patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules, que seuls ceux dont la tumeur présente une mutation d'*EGFR* bénéficient cliniquement d'un traitement par Erlotinib (22). La mise en œuvre systématique de détection de la mutation d'*EGFR* avant prescription de l'Erlotinib et donc le fait de réserver cette molécule uniquement aux patients qui en recevraient un bénéfice clinique a permis l'économie de plus de 30 millions d'Euros. Suivant la même logique, il est possible d'imaginer que l'essor du suivi thérapeutique pharmacologique pourrait permettre un meilleur suivi des traitements anticancéreux et d'éviter un arrêt prématuré d'une thérapeutique que l'on juge à tort inefficace, alors qu'un simple ajustement posologique pourrait permettre une réponse clinique et éviter de passer précocement à un traitement de seconde ligne. Dans cette optique, l'étude préalable de la concentration plasmatique des ITK et l'étude de la relation dose-efficacité semble indispensable.



## **ANNEXES**

## Annexe 1 : Résultats obtenus pour la mesure de la répétabilité

**Tableau I :** Résultats de la mesure de la répétabilité pour l'Imatinib. Surface du pic / Surface Etalon interne.

	Level I	Level II	Level III
ng/mL	487,0	1408,0	2399,0
Mesure n° 1	0,45	1,51	2,73
Mesure n° 2	0,45	1,51	2,73
Mesure n° 3	0,50	1,63	2,74
Mesure n° 4	0,49	1,63	2,73
Mesure n° 5	0,48	1,39	2,89
<b>x</b>	0,47	1,53	2,76
<b>s</b>	0,025	0,100	0,068
<b>CV</b>	5,19%	6,54%	2,47%

**Tableau II :** Résultats de la mesure de la répétabilité pour le Norimatinib. Surface du pic / Surface Etalon interne.

	Level I	Level II	Level III
ng/mL	106,0	263,0	428,0
Mesure n° 1	0,05	0,16	0,27
Mesure n° 2	0,05	0,16	0,27
Mesure n° 3	0,06	0,17	0,29
Mesure n° 4	0,06	0,17	0,28
Mesure n° 5	0,06	0,14	0,29
<b>x</b>	0,06	0,16	0,28
<b>s</b>	0,004	0,011	0,008
<b>CV</b>	6,77%	6,73%	2,75%

**Tableau III :** Résultats de la mesure de la répétabilité pour le Dasatinib. Surface du pic / Surface Etalon interne.

	<b>Level I</b>	<b>Level II</b>	<b>Level III</b>
ng/mL	79,0	194,0	315,0
Mesure n° 1	0,10	0,28	0,45
Mesure n° 2	0,10	0,28	0,45
Mesure n° 3	0,10	0,28	0,46
Mesure n° 4	0,10	0,29	0,46
Mesure n° 5	0,11	0,25	0,47
<b>x</b>	0,10	0,28	0,46
<b>s</b>	0,003	0,014	0,008
<b>CV</b>	3,22%	5,01%	1,73%

**Tableau IV :** Résultats de la mesure de la répétabilité pour le Nilotinib. Surface du pic / Surface Etalon interne.

	<b>Level I</b>	<b>Level II</b>	<b>Level III</b>
ng/mL	480,0	951,0	1428,0
Mesure n° 1	0,74	1,48	2,37
Mesure n° 2	0,73	1,48	2,35
Mesure n° 3	0,76	1,55	2,40
Mesure n° 4	0,76	1,58	2,37
Mesure n° 5	0,78	1,38	2,40
<b>x</b>	0,75	1,50	2,38
<b>s</b>	0,021	0,075	0,022
<b>CV</b>	2,75%	5,01%	0,94%

## Annexe 2 : Résultats obtenus pour la mesure de la reproductibilité

**Tableau I :** Mesures de reproductibilité pour l'Imatinib. Surface du pic / Surface Etalon interne.

	Level 0	Level I	C1	Level II	C2	Level III
ng/mL	0,00	487,00	941,00	1408,00	1911,00	2399,00
Manip n°1 J1	0,000	0,730	1,700	2,260	3,310	4,180
Manip n°1 J1	0,000	0,860	1,740	2,870	3,960	5,180
Manip n°2 J5	0,000	0,780	2,080	2,640	3,840	4,570
Manip n°2 J5	0,000	0,900	1,900	2,800	3,800	4,900
Manip n°3 J15	0,000	0,930	2,230	3,210	3,600	4,890
<b>x</b>	0,000	0,840	1,930	2,756	3,702	4,744
<b>s</b>	0,0000	0,0834	0,2249	0,3466	0,2546	0,3821
<b>CV %</b>	0,00%	9,92%	11,66%	12,58%	6,88%	8,06%

**Tableau II :** Mesures de reproductibilité pour le Norimatinib. Surface du pic / Surface Etalon interne.

	Level 0	Level I	C1	Level II	C2	Level III
ng/mL	0,00	106,00	184,00	263,00	343,00	428,00
Manip n°1 J1	0,000	0,080	0,170	0,230	0,270	0,420
Manip n°1 J1	0,000	0,070	0,160	0,300	0,400	0,540
Manip n°2 J5	0,000	0,090	0,170	0,250	0,350	0,430
Manip n°2 J5	0,000	0,090	0,190	0,280	0,380	0,490
Manip n°3 J15	0,000	0,090	0,210	0,260	0,440	0,450
<b>x</b>	0,000	0,084	0,180	0,264	0,368	0,466
<b>S</b>	0,0000	0,0089	0,0200	0,0270	0,0638	0,0493
<b>CV %</b>	0,00%	10,65%	11,11%	10,23%	17,34%	10,58%

**Tableau III** : Mesures de reproductibilité pour le Dasatinib. Surface du pic / Surface Etalon interne.

	<b>Level 0</b>	<b>Level I</b>	<b>C1</b>	<b>Level II</b>	<b>C2</b>	<b>Level III</b>
ng/mL	0,00	79,00	116,00	194,00	252,00	315,00
Manip n°1 J1	0,000	0,100	0,160	0,230	0,310	0,390
Manip n°1 J1	0,000	0,110	0,200	0,250	0,340	0,440
Manip n°2 J5	0,000	0,080	0,150	0,180	0,410	0,290
Manip n°2 J5	0,000	0,090	0,140	0,230	0,300	0,410
Manip n°3 J15	0,000	0,120	0,170	0,260	0,410	0,480
<b>x</b>	0,000	0,100	0,164	0,230	0,354	0,402
<b>s</b>	0,0000	0,0158	0,0230	0,0308	0,0532	0,0712
<b>CV %</b>	0,00%	15,81%	14,04%	13,40%	15,03%	17,71%

**Tableau IV** : Mesures de reproductibilité pour le Nilotinib. Surface du pic / Surface Etalon interne.

	<b>Level 0</b>	<b>Level I</b>	<b>C1</b>	<b>Level II</b>	<b>C2</b>	<b>Level III</b>
ng/mL	0,00	480,00	711,00	951,00	1184,00	1428,00
Manip n°1 J1	0,000	1,290	2,150	2,540	3,260	3,930
Manip n°1 J1	0,000	1,480	2,300	2,940	3,490	4,510
Manip n°2 J5	0,000	1,470	2,560	2,960	4,120	4,810
Manip n°2 J5	0,000	1,330	2,040	2,880	3,500	4,350
Manip n°3 J15	0,000	1,120	1,690	2,280	2,540	3,380
<b>x</b>	0,000	1,338	2,148	2,720	3,382	4,196
<b>s</b>	0,0000	0,1479	0,3218	0,2990	0,5688	0,5559
<b>CV %</b>	0,00%	11,05%	14,98%	10,99%	16,82%	13,25%

### Annexe 3 : Résultats obtenus pour le calcul du biais

**Tableau I :** Résultats du calcul du biais pour l'Imatinib.

<b>Imatinib</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>
Conc. Théorique (ng/mL)	941,0	1911,0
Conc. Expérimentale (ng/mL)	995,9	1883,6
<b>Biais</b>	<b>5,83%</b>	<b>1,44%</b>

**Tableau II :** Résultats du calcul du biais pour le Norimatinib.

<b>Norimatinib</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>
Conc. Théorique (ng/mL)	184,0	343,0
Conc. Expérimentale (ng/mL)	178,0	348,4
<b>Biais</b>	<b>3,29%</b>	<b>1,57%</b>

**Tableau III :** Résultats du calcul du biais pour le Dasatinib.

<b>Dasatinib</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>
Conc. Théorique (ng/mL)	116,0	252,0
Conc. Expérimentale (ng/mL)	132,0	282,4
<b>Biais</b>	<b>13,75%</b>	<b>12,08%</b>

**Tableau IV :** Résultats du calcul du biais pour le Nilotinib.

<b>Nilotinib</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>
Conc. Théorique (ng/mL)	711,0	1184,0
Conc. Expérimentale (ng/mL)	743,5	1163,6
<b>Biais</b>	<b>4,57%</b>	<b>1,73%</b>

## Annexe 4 : Tableaux récapitulatifs pour le calcul de la linéarité

**Tableau I :** Données obtenues pour l'étude de linéarité de l'Imatinib

### TEST DE LINEARITE

#### Modèle Linéaire

Tableau de l'analyse de Variance

Source	SCE	ddl	Variances	F	Probabilité ( $\alpha=0,05$ )
Régression (SCE <sub>reg</sub> )	13,13	1	13,13	2579,28	3,3E-18
Répétabilité (SCE <sub>r</sub> )	0,061	12	0,01		<b>Régression Significative</b>
Erreur de Modèle (SCE <sub>nl</sub> )	0,007	1	0,01	1,37	0,264
Totale (SCE <sub>y</sub> )	13,20	14			<b>Linéarité Significative</b>

**Tableau II :** Données obtenues pour l'étude de linéarité du Norimatinib

### TEST DE LINEARITE

#### Modèle Linéaire

Tableau de l'analyse de Variance

Source	SCE	ddl	Variances	F	Probabilité ( $\alpha=0,05$ )
Régression (SCE <sub>reg</sub> )	0,13	1	0,13	2007,89	2,2E-17
Répétabilité (SCE <sub>r</sub> )	0,001	12	0,00		<b>Régression Significative</b>
Erreur de Modèle (SCE <sub>nl</sub> )	0,000	1	0,00	1,21	0,292
Totale (SCE <sub>y</sub> )	0,13	14			<b>Linéarité Significative</b>

**Tableau III :** Données obtenues pour l'étude de linéarité du Dasatinib

### TEST DE LINEARITE

#### Modèle Linéaire

Tableau de l'analyse de Variance

Source	SCE	ddl	Variances	F	Probabilité ( $\alpha=0,05$ )
Régression (SCE <sub>reg</sub> )	0,32	1	0,32	3597,13	2,8E-19
Répétabilité (SCE <sub>r</sub> )	0,001	12	0,00		<b>Régression Significative</b>
Erreur de Modèle (SCE <sub>nl</sub> )	0,000	1	0,00	0,02	0,884
Totale (SCE <sub>y</sub> )	0,32	14			<b>Linéarité Significative</b>

**Tableau IV :** Données obtenues pour l'étude de linéarité du Nilotinib

### TEST DE LINEARITE

#### Modèle Linéaire

Tableau de l'analyse de Variance

Source	SCE	ddl	Variances	F	Probabilité ( $\alpha=0,05$ )
Régression (SCE <sub>reg</sub> )	6,59	1	6,59	6481,86	3,4E-21
Répétabilité (SCE <sub>r</sub> )	0,012	12	0,00		<b>Régression Significative</b>
Erreur de Modèle (SCE <sub>nl</sub> )	0,002	1	0,00	2,44	0,145
Totale (SCE <sub>y</sub> )	6,61	14			<b>Linéarité Significative</b>

## Annexe 5 : Protocole de dosage des ITK

### ▪ PRINCIPE

L'Imatinib, le Dasatinib et le Nilotinib sont trois médicaments de la famille des inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITK). Ces 3 molécules ont un rôle majeur dans le traitement de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) ou encore les Tumeurs Stromales Gastro-intestinales (GIST). Le Norimatinib ou desméthyl Imatinib est un métabolite actif de l'Imatinib.

Un certain nombre d'études ont montré l'intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique de l'Imatinib dans la LMC ou dans les GIST et d'autres études sont en cours afin de déterminer, si comme pour l'Imatinib, le STP du Dasatinib et du Nilotinib l'est également (34, 56).

### ▪ PRELEVEMENT

- Plasma hépariné
- Nécessité de 200 µL pour l'analyse, demander au service au minimum un tube de 3 mL
- Conservation possible 10 jours à -20°C.

### ▪ REACTIFS

#### ◆ Solution mères :

Solutions étalons commandées chez ChromSystems (Allemagne). 4 points de gamme et 2 points de contrôle. Chaque point est à reconstituer selon le protocole fournisseur (2 mL d'eau distillée).

Niveau 0 (Plasma vierge)

Niveau I

Niveau II

Niveau III

Contrôle I

Contrôle II

Les compositions de chacun des points sont fixées par ChromSystems (chaque coffret est accompagné d'une feuille précisant ces données).

Etalon interne (Clozapine) : Solution méthanolique à 1mg/mL (conservée à -20°C)

#### Préparation :

Clozapine (1 mg/mL) : 10 mg de Clozapine QSP 10 mL de méthanol



### Conservation :

Solutions mères d'Imatinib, Norimatinib, Dasatinib et Nilotinib :

Plusieurs mois à -20°C si non reconstitués

3 mois à -20°C après reconstitution

3 semaines à +4°C après reconstitution

Clozapine : Dans des flacons bruns au congélateur à -20°C pendant 6 mois.

### ◆ Solutions filles :

#### Etalon interne :

Prélever 5 µL de solution mère de Clozapine (1 mg/mL) et les mettre dans un tube à hémolyse.

Compléter avec 995 µL d'eau distillée.

Agiter au vortex pendant 30 secondes.

▪ <b>MATERIEL</b>
-------------------

- **APPAREILLAGE :**

- Chaîne de HPLC Spectra System, DAD Spectra
- Colonne Sunfire<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (Waters, Dublin, Irlande) : 4,6 x 250mm; 5µm

- **MATERIEL :**

- Tubes pyrex de 7 mL (bouchons rouges)
- Vortex
- Centrifugeuse
- Micropipettes Eppendorf 2-20 µL, 10-100 µL, 50-200 µL et 100 1000 µL.

▪ <b>PREPARATION DE LA GAMME D'ETALONNAGE</b>
---

Solutions ChromSystems.

▪ EXTRACTION DES ECHANTILLONS, DES CONTROLES ET DE LA GAMME

- ◆ Echantillons : 200 µL de prise d'essai
- ◆ Ajouter dans chaque tube (échantillons et gamme)
  - 20 µL de solution fille d'EI (à 20 µg/mL) → Vortexer pendant 30 secondes
  - 200 µL de Soude 0,1 N → Vortexer pendant 30 secondes
  - 5 mL de diethyl éther
- ◆ Agitation mécanique pendant 10 minutes (Salle n°18)
- ◆ Centrifugation : centrifugeuse pièce n° 18 (2500 tours/mn – 10°C - 10 mn)
- ◆ Reprise de 4mL de phase étherée dans un tube pyrex (bouchons transparents)
- ◆ Evaporation sous flux d'azote, dans bain marie à 30°C
- ◆ Reprise des résidus secs par 100 µL de phase mobile
- ◆ Transfert de 80 µL dans les réducteurs pour injecteur automatique.
- ◆ Injection 30 µL par l'injecteur automatique

▪ SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

- ◆ Colonne : SunFire® C<sub>18</sub> (Waters, Dublin, Irlande)
- ◆ Débit : 1,5 mL/min
- ◆ Phase mobile : ACN / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M Selon programme de gradient

t (minutes)	0	1	9	18	19	30
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%)	80	80	70	70	80	80
ACN (%)	20	20	30	30	20	20

- ◆ Température du four : 25°C

*A/ Tableau de préparation de la phase mobile*

Dans une bouteille de volume approprié, à l'aide d'une éprouvette de 250mL ou de 500 mL.

Tampon (Voie A) :

Volume de phase finale	500 mL	1000 mL
Eau distillée (mL)	500	1000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> poudre (mg)	680,45	13 60,9

Acétonitrile (Voie B) :

Acétonitrile pur.

### *B/ Ajustement du pH du tampon*

Ajuster le pH avec de l'acide orthophosphorique (goutte à goutte) jusqu'à obtenir un pH de 3 (pH-mètre dans la pièce n° 18 : mode d'emploi et solutions d'étalonnage à côté de l'appareil.)

### *C/ Dégazage / Filtration*

Filtration sur Büchner (membrane Millipore HVLP 0.45 µm porosité)

#### ◆ Conditions chromatographiques :

Purger la voie A avec le tampon (débit minimum 7mL/mn pendant 5 minutes)  
Purger la voie B avec l'Acétonitrile (débit minimum 7mL/mn pendant 5 minutes)

Stabilisation de la colonne : débit 1,0 mL/mn pendant 8 min  
débit 1.5 mL/mn pendant 15 min.

Pompe : Thermo SpectraSystem AS 3000  
Volume d'injection : 30µL  
Temps d'analyse : 30 min

Détecteur : DAD UV6000LP  
. λ = 265 nm (Imatinib, Norimatinib et Nilotinib) et 305 nm (Dasatinib)  
Logiciel Chromquest v.4.0  
. Méthode : Imatinib-test.met (Chromquest)  
ITK (Elite VWR)

Temps de rétention approximatifs:  
. Norimatinib : 6,1 minutes  
. Imatinib : 7,2 minutes  
. Clozapine (EI) : 9,4 minutes  
. Dasatinib : 10,8 minutes  
. Nilotinib : 20,3 minutes

La durée du run est allongée à 30 minutes afin de rééquilibrer la colonne avec le mélange de phase initial, entre chaque échantillon.

#### ◆ Rinçage colonne :

- Débit 1,2 mL/min pendant 1 heure avec un mélange ACN/ED (40.60 V/V)







**DEVELOPMENT OF A SIMPLE METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF IMATINIB, NORIMATINIB, DASATINIB AND NILOTINIB IN HUMAN PLASMA BY HPLC PHOTODIODE ARRAY DETECTOR.**

A Harlé<sup>1,2,3</sup>, J Scala-Bertola<sup>1</sup>, N Gambier<sup>1</sup>, JY Jouzeau<sup>1</sup>, P Gillet<sup>1</sup>, JL Merlin<sup>2,3</sup>, MJ Royer-Morrot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, CHU of Nancy, Nancy, France.

<sup>2</sup>Unité de Biologie des Tumeurs, Centre Alexis Vautrin, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

<sup>3</sup>EA 4421 SiGReTO, Nancy Université, Nancy, France.

**Keywords:** Imatinib, Norimatinib, Dasatinib, Nilotinib, HPLC-DAD, Therapeutic Drug Monitoring.

**Introduction:** Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) such as Imatinib (IM), Dasatinib (DA) and Nilotinib (NI) revolutionized the treatment of Ph+ Chronic Myeloid Leukemia (CML) and Gastrointestinal stromal tumors (GIST). Recent studies or case reports showed that the response to TKI treatment as well as their toxicities – i.e. cutaneous toxicity or specific cardiac toxicity - could be related to their blood concentration. Therefore, therapeutic drug monitoring (TDM) of TKIs could be useful to determine the optimal blood concentration for a given patient. In the present study, we developed and validated a simple, specific, robust and reliable high performance liquid chromatography method with a diode array detection (HPLC-DAD) to determine simultaneously IM, Norimatinib (N-IM) – i.e. its main metabolite -, DA and NI in human plasma.

**Material & Method:** After a liquid phase extraction of 200 µL of plasma, ITKs were separated with a Sunfire C18 column (250mm x 4.6mm, i.d.; 5µm) using a gradient elution mode (Acetonitrile / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01M) with UV detection at 265 nm for IM, N-IM, NL and 305 nm for DA.

**Results:** The specificity of the method was demonstrated and its linearity was established in the range of 487 to 2399 ng/mL ( $r = 0.999$ ), 106 to 408 ng/mL ( $r = 0.997$ ), 79 to 315 ng/mL ( $r = 0.998$ ) and 480 to 1428 ng/mL ( $r = 0.999$ ) for IM, N-IM, DA and NI, respectively. The method showed an excellent accuracy (102.2%, 99.1%, 112.9%, 101.4% for IM, N-IM, DA and NI, respectively). Precision (repeatability) expressed in relative standard deviation value was 2.2%, 2.8%, 4.3%, 2.7%, for IM, N-IM, DA and NI, respectively with a corresponding intermediate precision of 9.3%, 14.2%, 14.5% and 15.9%. Finally, the test of robustness showed the influence showed that the method was sensitive to changes of pH and counter-ion concentration in the mobile phase.


**Conclusion:** We developed a precise, reliable, robust and specific method for the simultaneous determination of IM and its main metabolite (N-IM), DA and NI in human plasma. Since recent studies have demonstrated the beneficial additive effects of TKIs combination such as IM with NI, our method could be useful to monitor clinical samples containing each TKI alone or in combination.

**Annexe 8 : Communication affichée, 2<sup>ème</sup> Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie, OncoTrans, 8 et 9 Septembre 2011.**

## Development of a simple method for the simultaneous determination of Imatinib, Nilotinib, Dasatinib and Nilotinib in human plasma by HPLC Photodiode Array Detector.

Alexandre Fauriol<sup>1</sup>, Julien Soule-Bartolet<sup>1</sup>, Nicolas Demonce<sup>1</sup>, Jean-François Lussac<sup>2</sup>, Pierre Gillet<sup>1</sup>, Jean-Louis Verhaeghe<sup>1</sup>, Marie-Cécile Royer-Morel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, CHU of Nancy, Nancy, France. <sup>2</sup> Cancer Biology Unit, Centre Alexis Mourin, Vandœuvre-lès-Nancy, France. <sup>3</sup> EA 4421 809R10, HECV Université, Nancy, France.



### Introduction

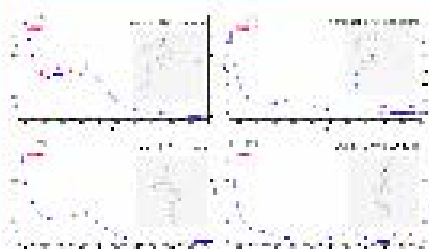
TKI's are used in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML), Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL) and gastrointestinal stromal tumors (GIST). Because of their high toxicity, therapeutic drug monitoring (TDM) is recommended. The aim of this study was to develop a simple, sensitive and specific method for the simultaneous determination of Imatinib, Nilotinib, Dasatinib and Nilotinib in human plasma by HPLC with a photodiode array detector.

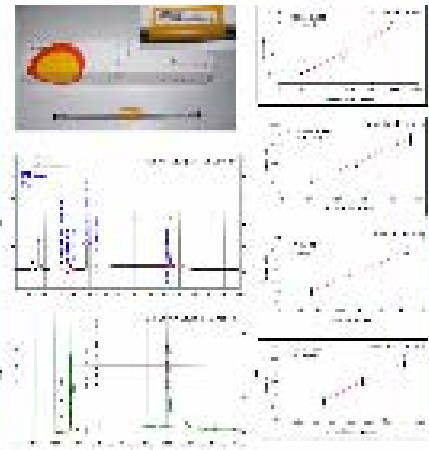
### Material & Method

All the reagents used in this method were purchased from Sigma-Aldrich. The chromatographic system was composed of a Waters 1525 HPLC pump, a Waters 1515 injector, a Waters 1525 HPLC column (C18, 150x4.6 mm, 5 μm) and a Waters 2445 photodiode array detector. The mobile phase was composed of 0.1% TFA in water and acetonitrile (70:30 v/v). The flow rate was 1 mL/min. The oven temperature was 30°C. The detection wavelength was 254 nm. The injection volume was 10 μL. The calibration curves were constructed by plotting the peak area against the concentration of the standards. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined by the signal-to-noise ratio (S/N) method.

### TKI's and Therapeutic Drug Monitoring

TKI's are used in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML), Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL) and gastrointestinal stromal tumors (GIST). Because of their high toxicity, therapeutic drug monitoring (TDM) is recommended. The aim of this study was to develop a simple, sensitive and specific method for the simultaneous determination of Imatinib, Nilotinib, Dasatinib and Nilotinib in human plasma by HPLC with a photodiode array detector.





### Results

The LOD and LOQ of the method were 0.1 and 0.2 ng/mL, respectively. The method was linear for concentrations ranging from 0.2 to 200 ng/mL. The intra-day and inter-day precision were 1.5% and 2.5%, respectively. The recovery was 100%. The method was validated for the simultaneous determination of Imatinib, Nilotinib, Dasatinib and Nilotinib in human plasma.

### Discussion & Conclusion

A simple, sensitive and specific method for the simultaneous determination of Imatinib, Nilotinib, Dasatinib and Nilotinib in human plasma was developed. The method was validated for the simultaneous determination of Imatinib, Nilotinib, Dasatinib and Nilotinib in human plasma. The method was linear for concentrations ranging from 0.2 to 200 ng/mL. The intra-day and inter-day precision were 1.5% and 2.5%, respectively. The recovery was 100%. The method was validated for the simultaneous determination of Imatinib, Nilotinib, Dasatinib and Nilotinib in human plasma.

© 2011 by the authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Quintas-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(7):973-88.
2. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med.* 2003;349(15):1451-64.
3. Ichimaru M, Tomonaga M, Amenomori T, Matsuo T. Atomic bomb and leukemia. *J Radiat Res (Tokyo).* 1991;32(Suppl 2):14-9.
4. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst.* 1960;25:85-109.
5. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243(5405):290-3.
6. Cohen MH, Williams G, Johnson JR, Duan J, Gobburu J, Rahman A, et al. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2002;8(5):935-42.
7. Singh N, Kumar L, Meena R, Velpandian T. Drug monitoring of imatinib levels in patients undergoing therapy for chronic myeloid leukaemia: comparing plasma levels of responders and non-responders. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009;65(6):545-9.
8. Awidi A, Ayed AO, Bsoul N, Magablah A, Mefleh R, Dweiri M, et al. Relationship of serum imatinib trough level and response in CML patients: long term follow-up. *Leuk Res.* 2010;34(12):1573-5.
9. Wei G, Rafiyath S, Liu D. First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib. *J Hematol Oncol.* 2010;3:47.
10. Gibbons DL, Priel S, Kantarjian H, Cortes J, Quintas-Cardama A. The rise and fall of gatekeeper mutations? The BCR-ABL1 T315I paradigm. *Cancer.* 2011;2011(5):26225.

11. Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol.* 1983;7(6):507-19.
12. Paral J, Slaninka I, Kalabova H, Hadzi-Nikolov D. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, diagnostics, prognosis and treatment options. *Acta Gastroenterol Belg.* 2010;73(3):349-59.
13. Monges G, Bisot-Locard S, Blay JY, Bouvier AM, Urbietta M, Coindre JM, et al. The estimated incidence of gastrointestinal stromal tumors in France. Results of PROGIST study conducted among pathologists. *Bull Cancer.* 2010;97(3):E16-22.
14. Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Hase-Sawada N, Taniguchi M, et al. A novel gain-of-function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology.* 1998;115(5):1090-5.
15. Joensuu H, Dimitrijevic S. Tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) as an anticancer agent for solid tumours. *Ann Med.* 2001;33(7):451-5.
16. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol.* 2003;21(23):4342-9.
17. Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2006;368(9544):1329-38.
18. Collins I, Workman P. New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nat Chem Biol.* 2006;2(12):689-700.
19. Wistuba, II, Gelovani JG, Jacoby JJ, Davis SE, Herbst RS. Methodological and practical challenges for personalized cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(3):135-41.
20. Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology.* 2009;77(6):400-10.
21. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1673-84.

22. Langer CJ. Roles of EGFR and KRAS Mutations in the Treatment Of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *P T*. 2011;36(5):263-79.
23. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006;66(8):3992-5.
24. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2507-16.
25. An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby CR, Jr., Chen ZS. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res*. 2010;34(10):1255-68.
26. Picard S, Titier K, Etienne G, Teillet E, Ducint D, Bernard MA, et al. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;109(8):3496-9.
27. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood*. 2008;111(8):4022-8.
28. Mahon FX, Rea D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(11):1029-35.
29. Peng B, Dutreix C, Mehring G, Hayes MJ, Ben-Am M, Seiberling M, et al. Absolute bioavailability of imatinib (Glivec) orally versus intravenous infusion. *J Clin Pharmacol*. 2004;44(2):158-62.
30. Peng B, Hayes M, Resta D, Racine-Poon A, Druker BJ, Talpaz M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol*. 2004;22(5):935-42.

31. Widmer N, Decosterd LA, Csajka C, Leyvraz S, Duchosal MA, Rosselet A, et al. Population pharmacokinetics of imatinib and the role of alpha-acid glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol*. 2006;62(1):97-112.
32. van Erp NP, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(8):692-706.
33. Haouala A, Widmer N, Duchosal MA, Montemurro M, Buclin T, Decosterd LA. Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood*. 2011;117(8):e75-87.
34. Bouchet S, Royer B, Le Guellec C, Titier K. [Therapeutic drug monitoring of tyrosine-kinase inhibitors in the treatment of chronic myelogenous leukaemia: interests and limits]. *Therapie*. 2010;65(3):213-8.
35. Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control*. 2009;16(2):122-31.
36. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1038-42.
37. Holtz MS, Slovak ML, Zhang F, Sawyers CL, Forman SJ, Bhatia R. Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. *Blood*. 2002;99(10):3792-800.
38. Jabbour E, Deininger M, Hochhaus A. Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011;25(2):201-10.
39. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;362(24):2260-70.

40. Christopher LJ, Cui D, Wu C, Luo R, Manning JA, Bonacorsi SJ, et al. Metabolism and disposition of dasatinib after oral administration to humans. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(7):1357-64.
41. Li X, He Y, Ruiz CH, Koenig M, Cameron MD. Characterization of Dasatinib and Its Structural Analogs as CYP3A4 Mechanism-Based Inactivators and the Proposed Bioactivation Pathways. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(6):1242-50.
42. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010;362(24):2251-9.
43. Kantarjian HM, Giles FJ, Bhalla KN, Pinilla-Ibarz J, Larson RA, Gattermann N, et al. Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Blood.* 2011;117(4):1141-5.
44. Trent J, Molimard M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nilotinib in gastrointestinal stromal tumors. *Semin Oncol.* 2011;38(Suppl 1):S28-33.
45. Tanaka C, Yin OQ, Sethuraman V, Smith T, Wang X, Grouss K, et al. Clinical pharmacokinetics of the BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor nilotinib. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;87(2):197-203.
46. Tefferi A, Letendre L. Nilotinib treatment-associated peripheral artery disease and sudden death: yet another reason to stick to imatinib as front-line therapy for chronic myelogenous leukemia. *Am J Hematol.* 2011;86(7):610-1.
47. Mahon FX, Molimard M. Correlation between trough imatinib plasma concentration and clinical response in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2009;33(8):1147-8; author reply 9-50.
48. Forrest DL, Trainor S, Brinkman RR, Barnett MJ, Hogge DE, Nevill TJ, et al. Cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia are correlated with Sokal risk scores and duration of therapy but not trough imatinib plasma levels. *Leuk Res.* 2009;33(2):271-5.

49. Cortes JE, Egorin MJ, Guilhot F, Molimard M, Mahon FX. Pharmacokinetic/pharmacodynamic correlation and blood-level testing in imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2009;23(9):1537-44.
50. Wang Y, Chia YL, Nedelman J, Schran H, Mahon F-X, Molimard M. A Therapeutic Drug Monitoring Algorithm for Refining the Imatinib Trough Level Obtained at Different Sampling Times. *Ther Drug Monit*. 2009;31(5):579-84 .
51. Takahashi N, Wakita H, Miura M, Scott SA, Nishii K, Masuko M, et al. Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther*. 2010;88(6):809-13.
52. Li QB, Chen C, Chen ZC, Wang HX, Wu YL, You Y, et al. Imatinib plasma trough concentration and its correlation with characteristics and response in Chinese CML patients. *Acta Pharmacol Sin*. 2010;31(8):999-1004.
53. Ibrahim AR, Eliasson L, Apperley JF, Milojkovic D, Bua M, Szydlo R, et al. Poor adherence is the main reason for loss of CCyR and imatinib failure for chronic myeloid leukemia patients on long-term therapy. *Blood*. 2011;117(14):3733-6.
54. Judson I, Ma P, Peng B, Verweij J, Racine A, di Paola ED, et al. Imatinib pharmacokinetics in patients with gastrointestinal stromal tumour: a retrospective population pharmacokinetic study over time. EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005;55(4):379-86.
55. Delbaldo C, Chatelut E, Re M, Deroussent A, Seronie-Vivien S, Jambu A, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of imatinib and its main metabolite in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res*. 2006;12(20 Pt 1):6073-8.
56. Demetri GD, Wang Y, Wehrle E, Racine A, Nikolova Z, Blanke CD, et al. Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol*. 2009;27(19):3141-7.

57. von Mehren M, Widmer N. Correlations between imatinib pharmacokinetics, pharmacodynamics, adherence, and clinical response in advanced metastatic gastrointestinal stromal tumor (GIST): an emerging role for drug blood level testing? *Cancer Treat Rev.* 2011;37(4):291-9.
58. Yoo C, Ryu MH, Ryoo BY, Beck MY, Chang HM, Lee JL, et al. Changes in imatinib plasma trough level during long-term treatment of patients with advanced gastrointestinal stromal tumors: correlation between changes in covariates and imatinib exposure. *Invest New Drugs.* 2011;2011:14.
59. Widmer N, Decosterd LA, Leyvraz S, Duchosal MA, Rosselet A, Debiec-Rychter M, et al. Relationship of imatinib-free plasma levels and target genotype with efficacy and tolerability. *Br J Cancer.* 2008;98(10):1633-40.
60. Larghero J, Leguay T, Mourah S, Madelaine-Chambrin I, Taksin AL, Raffoux E, et al. Relationship between elevated levels of the alpha 1 acid glycoprotein in chronic myelogenous leukemia in blast crisis and pharmacological resistance to imatinib (Gleevec) in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(10):1907-13.
61. Roth O, Spreux-Varoquaux O, Bouchet S, Rousselot P, Castaigne S, Rigaudeau S, et al. Imatinib assay by HPLC with photodiode-array UV detection in plasma from patients with chronic myeloid leukemia: Comparison with LC-MS/MS. *Clin Chim Acta.* 2010;411(3-4):140-6.
62. Bakhtiar R, Khemani L, Hayes M, Bedman T, Tse F. Quantification of the anti-leukemia drug STI571 (Gleevec) and its metabolite (CGP 74588) in monkey plasma using a semi-automated solid phase extraction procedure and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2002;28(6):1183-94.
63. Schleyer E, Pursche S, Kohne CH, Schuler U, Renner U, Gschaidmeier H, et al. Liquid chromatographic method for detection and quantitation of STI-571 and its main metabolite N-desmethyl-STI in plasma, urine, cerebrospinal fluid, culture medium and cell preparations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;799(1):23-36.

64. Velpandian T, Mathur R, Agarwal NK, Arora B, Kumar L, Gupta SK. Development and validation of a simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of imatinib in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;804(2):431-4.
65. Widmer N, Beguin A, Rochat B, Buclin T, Kovacsovics T, Duchosal MA, et al. Determination of imatinib (Gleevec) in human plasma by solid-phase extraction-liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;803(2):285-92.
66. Ivanovic D, Medenica M, Jancic B, Malenovic A. Reversed-phase liquid chromatography analysis of imatinib mesylate and impurity product in Glivec capsules. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;800(1-2):253-8.
67. Guetens G, Prenen H, De Boeck G, van Oosterom A, Schoffski P, Highley M, et al. Simultaneous determination of AMN107 and Imatinib (Gleevec, Glivec, STI571) in cultured tumour cells using an isocratic high-performance liquid chromatography procedure with UV detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;846(1-2):341-5.
68. De Francia S, D'Avolio A, De Martino F, Pirro E, Baietto L, Siccardi M, et al. New HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib, and nilotinib in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(18-19):1721-6.
69. Klawitter J, Zhang YL, Klawitter J, Anderson N, Serkova NJ, Christians U. Development and validation of a sensitive assay for the quantification of imatinib using LC/LC-MS/MS in human whole blood and cell culture. *Biomed Chromatogr.* 2009;23(12):1251-8.
70. Davies A, Hayes AK, Knight K, Watmough SJ, Pirmohamed M, Clark RE. Simultaneous determination of nilotinib, imatinib and its main metabolite (CGP-74588) in human plasma by ultra-violet high performance liquid chromatography. *Leuk Res.* 2009;34(6):702-7.
71. Bouchet S, Chauzit E, Ducint D, Castaing N, Canal-Raffin M, Moore N, et al. Simultaneous determination of nine tyrosine kinase inhibitors by 96-well solid-phase extraction and ultra performance LC/MS-MS. *Clin Chim Acta.* 2011;412(11-12):1060-7.



72. Feinberg M. Labo-Stat  
Guide de validation des méthodes analytiques. Tec & Doc Lavoisier ed; 2009.
73. Allan EK, Holyoake TL, Craig AR, Jorgensen HG. Omacetaxine may have a role in chronic myeloid leukaemia eradication through downregulation of Mcl-1 and induction of apoptosis in stem/progenitor cells. *Leukemia*. 2011;25(6):985-94.
74. Velev N, Cortes J, Champlin R, Jones D, Rondon G, Giralt S, et al. Stem cell transplantation for patients with chronic myeloid leukemia resistant to tyrosine kinase inhibitors with BCR-ABL kinase domain mutation T315I. *Cancer*. 2010;116(15):3631-7.
75. Ballas MS, Chachoua A. Rationale for targeting VEGF, FGF, and PDGF for the treatment of NSCLC. *Onco Targets Ther*. 2011;4:43-58.
76. Faivre L, Gomo C, Mir O, Taieb F, Schoemann-Thomas A, Ropert S, et al. A simple HPLC-UV method for the simultaneous quantification of gefitinib and erlotinib in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011;879(23):2345-50.
77. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(26):2733-43.
78. Bai F, Freeman BB, 3rd, Fraga CH, Fouladi M, Stewart CF. Determination of lapatinib (GW572016) in human plasma by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006;831(1-2):169-75.
79. Roche S, McMahon G, Clynes M, O'Connor R. Development of a high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric method for the determination of cellular levels of the tyrosine kinase inhibitors lapatinib and dasatinib. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(31):3982-90.

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 5 Octobre 2011

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE

présenté par Alexandre Harlé

Sujet : Mise au point du dosage de l'Imatinib, du Norimatinib, du Dasatinib et du Nilotinib par chromatographie liquide haute performance et détecteur à barrette de diodes.

Jury :

Président : Jean-Louis MERLIN (PU)  
Directeur : Marie-José ROYER-MORROT (MCU-PH)

Juges : Bernard ROYER (PH)  
Geneviève UBEAUD-SEQUIER (PU-PH)

Vu,

Nancy, le 5/9/2011

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

M. MERLIN JL

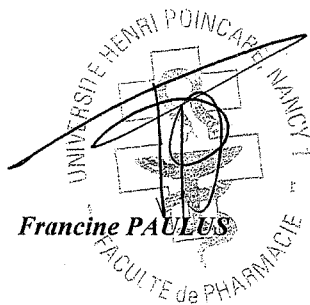
M. J. Royer-Morrot




Vu et approuvé,

Nancy, le 08.09.2011

Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,



Vu,

Nancy, le 26.9.2011

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président  
et par Délégation,  
La Vice-Présidente du Conseil  
des Etudes et de la Vie Universitaire,

  
Jean-Pierre FINANCE  
CCAPDEVILLE-ATKINSON

N° d'enregistrement : 3769

N° d'identification :

**TITRE**

Mise au point du dosage de l'Imatinib, du Norimatinib, du Dasatinib et du Nilotinib par chromatographie liquide haute performance et détecteur à barrette de diodes.

Thèse soutenue le 5 Octobre 2011

Par Alexandre HARLÉ

**RESUMÉ :**

L'Imatinib, le Dasatinib et le Nilotinib sont des molécules faisant partie de la famille des inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITK). Elles sont utilisées dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique et des tumeurs stromales gastro-intestinales.

Ce travail présente le développement et la validation d'une méthode de dosage de ces 3 molécules ainsi que du métabolite actif de l'Imatinib (le Norimatinib) par méthode de Chromatographie Liquide Haute Performance couplé à un détecteur à barrette de diodes.

L'intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique (STP) des ITK ainsi que les études cliniques prenant en compte les concentrations plasmatiques de ces molécules sont détaillés également dans ce manuscrit.

La méthode de dosage proposée utilise une colonne SunFire C18 et un système de détection à barrette de diodes. Les mesures sont effectuées à 265nm pour l'Imatinib, le Norimatinib et le Nilotinib et à 305nm pour le Dasatinib. La phase mobile est constituée d'un mélange de tampon phosphate et d'acétonitrile ajusté à pH 3, dont les proportions varient selon un gradient de concentration.

La méthode développée est linéaire répétable, juste et reproductible. Les limites de détection sont de 23 ng/mL, 5 ng/mL, 4 ng/mL et 17 ng/mL pour l'Imatinib, le Norimatinib, le Dasatinib et le Nilotinib respectivement.

**MOTS CLES :** Imatinib, Norimatinib, Dasatinib, Nilotinib, LMC, GIST, STP

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr. Marie José ROYER-MORROT (MCU-PH)	Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie – CHU de Nancy	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème <input type="checkbox"/>

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales  
3 – Médicament  
**5 - Biologie**

2 – Hygiène/Environnement  
4 – Alimentation – Nutrition  
6 – Pratique professionnelle