



HAL
open science

Approche intégrative du VYXEOS®: du flacon au patient

Mélanie Donnette

► **To cite this version:**

Mélanie Donnette. Approche intégrative du VYXEOS®: du flacon au patient. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-02480729

HAL Id: dumas-02480729

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02480729>

Submitted on 17 Feb 2020

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.

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu le 24 janvier 2020

Par Mme Mélanie Donnette
Née le 29 juillet 1992 à Nîmes

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 04 octobre 1988
tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

---oOo---

**APPROCHE INTEGRATIVE DU VYXEOS® : DU FLACON AU
PATIENT**

---oOo---

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Joseph CICCOLINI

Membres : Madame le Docteur Raphaëlle FANCIULLINO (Directeur de Thèse)

Monsieur le Docteur Bertrand POURROY

Monsieur le Professeur Alexandre EVRARD

Madame le Docteur Laure FARNAULT

Monsieur le Docteur Geoffroy VENTON

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05

Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen:</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens:</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission:</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen:</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires:</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites:</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires:</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean- Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet:</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité:</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme AlessandraPAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

MmeAngélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. SeydinaMouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS
----------------------------	------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE - CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme SokSiya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	MmeFrédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	MmeNadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO,
Pharmacien-Praticien hospitalier Mme

Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-
Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET,
Pharmacien titulaire

Mme Florence
LEANDRO, Pharmacien
adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM
de l'Assurance Maladie Mme Clémence TABELLE,
Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

Je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements aux membres du jury :

Je remercie le Professeur *Joseph Ciccolini* de me faire l'honneur de présider ce jury. Vous apportez au SMART-c une bonne humeur sans faille...ou presque. Je suis ravie de poursuivre mon doctorat au sein de votre équipe et espère encore vous entendre narrer de nombreuses anecdotes.

Je remercie le Docteur *Raphaëlle Fanciullino*, ma directrice de thèse de m'avoir encadrée sur ce sujet. Je vous remercie pour votre soutien, votre aide précieuse et vos encouragements tout au long de cette aventure, et ce face aux difficultés que j'ai pu rencontrer. Je suis heureuse de continuer le périple à vos côtés et de poursuivre la rédaction de cet incontournable livre d'or. Merci pour tout.

Je remercie le Docteur *Bertrand Pourroy*, d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je vous remercie pour vos conseils et votre aide, sans quoi ce travail n'aurait pas pu aboutir.

Je remercie le Professeur *Alexandre Evrard* d'avoir accepté de faire partie du jury, et d'avoir consacré de votre temps pour lire ce manuscrit et d'y apporter votre expertise.

Enfin, je remercie les Docteurs *Laure Farnault* et *Geoffroy Venton* d'avoir acceptés de faire partie de mon jury. Je vous remercie pour votre aide, votre patience et votre engagement si précieux dans ce projet. Je vous remercie pour tous ces tubes percutés, et j'espère que ce manuscrit ne vous élèvera pas trop les troponines (surtout pour vous Geoffroy).

Je dédie cette thèse :

A ma famille, Maman pour toutes ses heures passées à m'écouter me plaindre et pour ton soutien durant toutes ces longues années d'études. Mamie, pour tous ces bons repas (sans beurre bien entendu), qui ont ensoleillé tous ces moments passés à vos côtés. Et puis, je sais que tu n'aimes pas l'entendre...mais il fait quand même plus beau à Marseille qu'à Aubais. A la famille Roy et à toutes ces soirées au bord de la piscine. Petite mention spéciale pour Prupru et Ben, pour leurs bisous mouillés.

Au Sister act, Julie et Chloe (et puis...Elsa), pour tous ces fous rires, ces moments de partages et de confidences. Que fleur de cœur reste à tout jamais la même, je vous aime fort !

A la team Hard Discount: Mamy, Wafoufounette, Ma coquine et Big Ali. Sans vous je ne connaîtrais pas le plaisir des soirées du jeudi, vendredi, samedi et dimanche, le danger du poivron associé au rhum, et de la constipation du Maroc. Vous faites parties de mes plus belles rencontres...même si je sais que ma mère finance notre amitié ! Love, paillettes et poney.

Aux Marseillaises par adoption : Sophie, Ophélie et Mélusine (si un peu quand même), merci pour ces années de pharma colorées (#pantalonrouge), ces soirées qui ont parfois finies aux urgences, et pour toutes ces randonnées dans nos chères calanques...et puis...allez l'OM !

A la GLAM team and cie: Guillaume, Laure, Anne, Sarah et Anne-Sophie. Votre bonne humeur accompagne mon quotidien et rend mes journées plus belles. A toutes nos pauses café autour du mimosa et nos fous rires dans les couloirs de la faculté et ailleurs. Je n'ai plus qu'une chose à dire... « Hello Everybody !! ».

A Madeleine qui a pris (beaucoup) de son temps pour me former sur la masse, pour sa patience et sa bonne humeur. Un merci à Manon et Renée, qui ont plus d'une fois lancé ma plaque pour m'épargner des aller-retours, et à Caroline qui m'a permise de venir travailler sur les machines du laboratoire.

A l'ensemble des personnes travaillant au sein du laboratoire d'hémostase, pour leur adorée centrifugeuse.

Au Professeur Regis Costello, et certaines des infirmières du service pour leur accompagnement et leur participation active dans mon projet de recherche.

« L'université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

LISTE DES ABREVIATIONS :

AMM : Autorisation de mise sur le marché

APHM : Assistance Publique Hôpitaux de Marseille

Ara-C : Cytosine arabinoside

Ara-U : Arabinofuranosyl uracil

ASMR : Amélioration du service médical rendu

ATU : Autorisation temporaire d'utilisation

CDA : Cytidine déaminase

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

COSEPS : Comité de sécurisation des produits de santé

CTCAE : Common Terminology Criteria for Adverse effect

DEHP : DiethylhexylPhthalate

DH : Dose haute

DI : Dose intermédiaire

DS : Dose standard

Eau ppi : Eau pour préparation injectable

ECG : Electrocardiogramme

ELN : European LeukemiaNet

EM : Extensive metabolizer

EPR effect: Enhanced permeability and retention effect

F : Femme

FAB : French American British

FDA : Food and drug administration

FEVG : Fraction d'éjection ventriculaire gauche

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor

GHS: Groupe Homogène de Séjour

GR : Globule rouge

H : Homme

IV : Intraveineux

LA : Leucémie aigüe

LAM : Leucémie Aigüe myéloïde

LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse

MO : Moelle osseuse

OMS : Organisation mondiale de la santé

PA : Principe actif

PdI : Indice de polydispersité

PK : Pharmacocinétique

PM : Poor-metabolizer

PNN : Polynucléaire neutrophile

PVC : Polychlorure de vinyle

RC : Réponse complète

Rci : Réponse complète intermédiaire

RCP : Résumé des caractéristiques du produit

ROC : Receiver Operating characteristic

SC : Sous-cutané

SMR : Service médical rendu

UM : Ultra-rapidmetabolizer

LISTE DES FIGURES IMAGES ET TABLEAUX:

Figure 1 : Structure chimique de la Cytarabine

Figure 2 : Structure d'un liposome

Figure 3 : Evolution au cours du temps de la taille moyenne des particules de Vyxeos® au sein de différents contenants.

Figure 4 : Evolution au cours du temps du Pdi moyen des particules de Vyxeos® au sein de différents contenants.

Figure 5 : Evolution au cours du temps de la concentration moyenne en Cytarabine dans les différents contenants.

Figure 6 : Représentation des durées d'aplasie chez les patients atteints d'une LAM-t (vert) et les patients atteints de LAM-MRC (bordeaux).

Figure 7 : Histogramme représentant la proportion de toxicité en fonction du grade et du type de LAM des patients : LAM-MRC (bordeaux) et LAM-t (vert).

Figure 8 : Histogramme représentant la proportion des réponses au traitement post-induction par Vyxeos® en fonction du statut CDA.

Figure 9 : Concentrations moyennes en Cytarabine totale (courbe trait plein), libre (courbe pointillée) et encapsulée (courbe petits traits) en fonction du type de LAM : LAM-MRC (bordeaux) et LAM-t (vert).

Figure 10 : Concentrations plasmatique de la Cytarabine et de son métabolite (Ara-U) totale à différents jours de traitement (jour 1 et 5)

Figure 11 : Histogrammes représentant l'AUC en Cytarabine libre, encapsulée et totale en fonction du type de LAM : LAM-MRC (bordeaux) et LAM-t (vert).

Figure 12 : Concentrations moyennes en Cytarabine libre (courbe pointillée), encapsulée (courbe petits traits) et totale (courbe trait plein), en fonction du statut CDA des patients : le patient non-déficient (orange) et les patients déficients (bleu).

Figure 13 : Représentation des AUC des fractions libres, encapsulées et totales de la Cytarabine en fonction du statut CDA du patient : patients déficients (bleu) et non-déficient (orange)

Figure 14 : Comparaison des profils pharmacocinétiques entre une induction par Vyxeos® ou par le protocole standard « 7+3 » en dissociant les patients déficients en CDA (en bleu), et les non-déficients (en orange).

Image 1 et 2 : Photos prises au microscope de l'accumulation du Vyxeos® sur une lame de MO.

Image 3 : Photo de Vyxeos® après ultracentrifugation au vivaspin®

Image 4 : Photos de la tubulure du montage en Y d'un mélange de Vyxeos® et de Vancomycine à T0min (a), dans une cuve à T+90min (b), ainsi qu'une tubulure du montage en Y contenant du Vyxeos® et de l'Amikacine à T+90min (c).

Image 5 : Solution diluée de Vyxeos® observée au microscope électronique en coloration négative à différentes échelles : 2µm (a), 500 nm (b) et 200 nm (c)

Image 6 : Photos prises de toxicités cutanées au J11 (a), J19 (b) ou J28 (c) du traitement d'induction par Vyxeos®

Image 7 : Photographie du plasma de patient coloré par le cuivre contenu dans la composition du Vyxeos®

Tableau 1 : Schéma d'administration du Vyxeos®

Tableau 2 : Paramètres pharmacocinétiques de la Cytarabine et Cytarabine sous forme liposomale au sein du Vyxeos®.

Tableau 3 : Résumé des volumes nécessaires de solution diluée de Vyxeos® pour l'étude de stabilité.

Tableau 4 : Résumé des résultats de compatibilité obtenus après mesure au DLS entre le Vyxeos® et les différentes molécules testées à T0 et T90min.

Tableau 5: Résumé des observations au DLS après mise en contact du Vyxeos et différentes molécules.

Tableau 6 : Caractéristiques des patients traités par Vyxeos®

Tableau 7 : Valeurs des concentrations moyennes en Cytarabine (fraction libre, encapsulée et totale), en fonction du temps chez des patients atteints de LAM-MRC

Tableau 8 : Valeurs des concentrations moyennes en Cytarabine (fraction libre, encapsulée et totale), en fonction du temps chez des patients atteints de LAM-t.

TABLE DES MATIERES:

LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES IMAGES ET TABLEAUX :	13
TABLE DES MATIERES :	16
INTRODUCTION :	18
PARTIE I : Actualités sur la prise en charge de la Leucémie Aigüe Myéloïde.....	20
I Définition :	20
II Epidémiologie	20
III Pathogénie et immunologie	21
A Pathogénie	21
IV Physiopathologie des LAM :	21
V Les signes cliniques	22
VI Le diagnostic	22
A L'hémogramme	22
B Le myélogramme :	23
C Classification morphologique :	23
VII Facteurs pronostics et traitement :	24
A Facteurs pronostics :	24
B Traitement	24
PARTIE II : Les liposomes	29
I Définition	29
II La structure des liposomes	29
III La pharmacocinétique des liposomes	29
PARTIE III : le Vyxeos®.....	31
I Les généralités	31
II Le Vyxeos® : une efficacité démontrée	32
III Le Vyxeos® en pratique et bon usage d'utilisation	33
IV L'impact de la formulation liposomale sur la pharmacocinétique des cytotoxiques encapsulés	35
PARTIE IV : Travaux personnels	38
I Etude de stabilité de la poche de Vyxeos®	38
A Matériel et Méthode	38
B Résultats	41
II Etude de compatibilité en Y :	44
A Matériel et méthode	44

B Résultats	46
III Etude pharmacocinétique du Vyxeos® :	51
A Matériel et méthode	52
B Résultats	53
PARTIE V : Discussions et perspectives	63
BIBLIOGRAPHIE :	69
ANNEXES :	73
Annexe 1 : Protocole de dosage de la Cytarabine en LC-MS/MS	73

INTRODUCTION :

La Leucémie Aigüe Myéloïde (LAM), est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération de cellules myéloïdes immatures présentant une différenciation variable. Les LAM représentent un groupe de maladies biologiques hétérogènes impliquant le plus souvent la moelle osseuse et le sang périphérique. Elles peuvent toutefois se manifester dans les tissus extra-médullaires(1).

Les LAM ont une évolution clinique agressive et le taux de survie globale à 5ans est de 25%(2).

Bien que l'étiologie de certaines de ces LAM soit inconnue, de nombreux facteurs de risque existent et sont décrits, avec entre autres, l'âge avancé, l'exposition aux produits chimiques mais aussi à certains agents antinéoplasiques(1)(2).

Aujourd'hui et ce, depuis plusieurs décennies, la Cytarabine est un des deux piliers dans le traitement de la LAM en association avec des Anthracyclines selon un schéma « 7+3 » lors de la cure d'induction et le plus souvent en monothérapie durant les cures de consolidation(3). Selon les schémas de traitement et les protocoles, la Cytarabine peut être prescrite à dose dite standard (DS = 100 à 200 mg/m²/j pendant 7 jours consécutifs) pour la cure d'induction, et à dose intermédiaire (DI = 1 à 1,5 g/m²/12H pendant 3 jours), ou encore à haute dose (DH = 2 à 3 g/m²/12H pendant 3 jours) pour les cures de consolidation(4).

La Cytarabine et les Anthracyclines se présentent sous forme de solutions et sont administrées par voie intra-veineuse (IV). Leur activité n'est pas ciblée, par conséquent, celle-ci peut s'accompagner d'effets secondaires généraux comme des pancytopénies ou encore des toxicités cardiaques décrites pour les Anthracyclines (5). Ces toxicités pouvant conduire parfois jusqu'au décès toxique du patient, d'où l'intérêt des recherches qui ont conduit à une nouvelle formulation : le Vyxeos®.

En effet, en août 2017, la Food and Drug Administration (FDA), a approuvé le Vyxeos® (Jazz Pharmaceutical), une formulation liposomale caractérisée par une co-encapsulation de Daunorubicine et Cytarabine (44mg/100 mg, respectivement) avec un ratio molaire fixe de 5 : 1), indiquée dans le traitement des patients adultes présentant une LAM nouvellement diagnostiquée, secondaire à un traitement (LAM-t) ou avec des anomalies associées aux myélodysplasies (LAM-MRC)(6). Le Vyxeos® a obtenu une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) de cohorte en France en juillet 2018, puis l'AMM pour cette même indication en août 2018.(7). Elle a obtenu un service médical rendu (SMR) important justifiant

une prise en charge par la solidarité nationale dans son indication, mais une amélioration du service médical (ASMR) de IV, dite mineure(8).

Avec cette nouvelle formulation, le laboratoire offre à la Cytarabine et la Daunorubicine de nouvelles caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (9)(10) , avec des résultats d'étude de phase II promettants (11).

Au sein de l'APHM, dans le service d'hématologie du Pr Costello, 9 patients ont bénéficié d'un traitement par cette molécule. C'est dans ce contexte que nous avons voulu réaliser une étude intégrative du Vyxeos®.

En effet, dans ce manuscrit, nous aborderons dans une première partie les Leucémies Aigues myéloïdes (LAM) ainsi que leur prise en charge. Puis, un point sera fait sur la forme vectorielle et les bénéfices attendus en oncologie, nous permettant de mieux appréhender l'intérêt ainsi que le devenir du Vyxeos®. Pour finir une partie recherche sur le Vyxeos® vous sera présentée associant un versant pharmacocinétique, clinique et physico-chimique avec une étude de la stabilité de la molécule, ainsi qu'une étude d'incompatibilité dite en Y.

PARTIE I : Actualités sur la prise en charge de la Leucémie Aigüe Myéloïde

I Définition :

Les leucémies Aigües Myéloïdes (LAM) représentent l'ensemble des proliférations malignes qui aboutissent à une accumulation dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes de progéniteurs de cellules sanguines d'origine myéloïdes : « les blastes ». Ces cellules ont perdu partiellement ou totalement leur capacité à se différencier.

Le diagnostic repose sur différents examens :

- L'examen cytomorphologique du sang et de la moelle
- Et l'étude cytogénétique

L'immunophénotypage des blastes et l'étude moléculaire complètent le diagnostic et sont utiles au pronostic et aux nouveaux protocoles thérapeutiques.

Le traitement des LAM repose avant tout sur la chimiothérapie, éventuellement complétée par l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, et dans certains cas par des thérapeutiques plus spécifiques.

II Epidémiologie

En France, nous recensons environ 3000 nouveaux cas /an de LAM. L'incidence est de 4 à 5 nouveaux cas/100 000 H/an avec un ratio H/F =1.5(12).

Elle est plus fréquente chez l'adulte avec un âge médian de 64ans. La répartition des LAM dans les différentes classes selon la classification de l'OMS varie avec l'âge : l'incidence d'anomalies cytogénétiques de bon pronostic est plus grande chez le patient jeune et celle de mauvais pronostic augmente avec l'âge. Elle est plus fréquemment retrouvée chez les hommes que chez les femmes(13). Selon le type d'anomalie cytogénétique on peut soigner 20 à 75% des LAM des patients de moins de 60 ans, mais seulement 10% des LAM des sujets plus âgés(14).

Les LAM peuvent être primaires ou secondaires à l'expositions à des toxiques :radiations ionisantes (par exemple traitement par radiothérapie), ou encore chez les travailleurs des industries nucléaires (mais pas ceux qui vivent à proximité des usines nucléaires) ; des pilotes d'avions exposés aux radiations cosmiques (risque multiplié par 5).

A l'exposition au benzène, et au tabagisme chronique qui en est la première source d'exposition : risque accru de 1,2 à 2,3 fois.

Ces LAM peuvent aussi être secondaires à un traitement par chimiothérapie (tumeurs solides essentiellement), avec 2 aspects :

- le plus souvent : apparition 5 à 10 ans après un traitement par des agents alkylants,
- ou 1 à 5 ans après un traitement par des inhibiteurs des topoisomérases II (étoposide, doxorubicine).

III Pathogénie et immunologie

A Pathogénie

La prédisposition génétique (trisomie 21, neurofibromatose) peut expliquer quelques cas de LAM de l'enfant (et de l'adulte).

Des variations génétiques des systèmes de détoxification du benzène et d'autres carcinogènes sont aussi impliquées, comme NQO1 (NAD(P)H quinone oxydoréductase 1) et de la famille du cytochrome P450.

On évoque un modèle à 2 « coups » pour expliquer la survenue des LAM :

- un dommage génétique de niveau 1 (classe 1) : activation constitutive de récepteurs de surface (RAS, récepteurs tyrosine kinases comme FLT3 ou c-KIT) qui activent l'hématopoïèse,

- un dommage génétique de niveau 2 (classe 2) : hyperexpression de gènes HOX ou de gènes de fusion bloquant la différenciation myéloïde, comme ceux induits par la t(8;21) ou l'inv(16).

Une LAM ne se développerait que si les 2 types de lésions sont présents.

Un mécanisme particulier impliquant l'interaction entre le récepteur de chimiokines CXCR4 des blastes et son ligand (Stromal-cell-derived factor 1) présent sur les cellules stromales peut expliquer la sensibilité plus faible des blastes médullaires (par rapport aux blastes sanguins) à l'apoptose induite par la chimiothérapie. Cette interaction semble aussi réguler la libération des blastes médullaires dans la circulation.

IV Physiopathologie des LAM :

Dans les LAM le décès est la conséquence de l'insuffisance médullaire : en premier lieu l'infection puis les hémorragies (tous les patients, sans traitement, seraient mort en moins d'un an). L'inhibition médullaire est la conséquence de la sécrétion de chimiokines inhibitrices par les blastes leucémiques.

Une infiltration blastique de certains organes, notamment les poumons et le cerveau, nécessite une chimiothérapie en urgence pour éviter un syndrome de détresse respiratoire aigu ou un syndrome de lyse tumorale.

V Les signes cliniques

Ils sont la conséquence de la prolifération des blastes dans la moelle (les cellules normales deviennent quiescentes), puis la survenue de leur accumulation éventuelle dans un ou plusieurs organes.

La symptomatologie liée aux cytopénies sanguines est plus ou moins marquée avec:

- un syndrome anémique
- un syndrome infectieux
- un syndrome hémorragique

Le syndrome tumoral est inconstant, en effet les adénopathies sont plus rares.

On peut observer une splénomégalie dans 15 à 20% des cas, ce qui permet d'orienter le diagnostic vers une leucémie aigüe (LA) à composante monocytaire.

L'hyperplasie gingivale et les localisations cutanées (leucémides) sont plus fréquentes pour les LA à composante monocytaire

VI Le diagnostic

Celui-ci se fait sur l'observation de différents critères, qui sont décrits dans la suite de ce paragraphe.

A L'hémogramme

1 L'anémie

Elle est quasi constante, modérée à très sévère (avec une hémoglobine pouvant aller de 3 à 5 g/dL), liée le plus souvent à l'aplasie des cellules normales, et/ou la dysplasie.

Dans 60% des cas : On ne constate pas d'anomalie morphologique des Globules Rouges (GR).

2 La leucocytose

On peut aller de la leucopénie franche (moins de 1G/L) sans blaste circulant, jusqu'à l'hyperleucocytose majeure (de 100 à 500 G/L), constituée essentiellement de cellules tumorales.

3 Les blastes

Ils peuvent être retrouvés en nombre variable, parfois presque 100%. Un nombre supérieur à 20% évoque une LA.

4 Les neutrophiles

La neutropénie est fréquente avec parfois l'apparition d'une agranulocytose (avec un taux de neutrophiles inférieur à 0.5 G/L). Ce phénomène est lié à un défaut de production.

Il se peut, parfois, que le nombre soit normal ou augmenté. Ce phénomène est le plus souvent lié à la maturation résiduelle du clone tumoral.

5 La myélémie

Une myélémie peut être observée et elle se définit par le passage dans le sang d'éléments immatures de la lignée granuleuse.

6 La thrombocytopénie

Une thrombocytopénie est observée dans la majorité des cas, et celle-ci peut être majeure (avec un taux de plaquettes inférieur à 10 G/L). Cette thrombocytopénie peut être due à une insuffisance de production, ou parfois à une consommation excessive (CIVD), qui sont surtout observées dans les LAM de type 3 (selon la classification FAB).

Dans quelques cas, on peut observer un nombre de plaquettes normal voire augmenté (souvent lié au clone tumoral ou à une dysplasie des mégacaryocytes), mais le syndrome hémorragique reste possible.

B Le myélogramme :

Il est habituellement richement cellulaire. La moelle peut-être, dans moins de 10% des cas, pauvre.

La blastose médullaire peut atteindre 20 à 100%

Il faut donc définir :

- le % de blastes : 20 à 100 %,
- les caractéristiques de toutes les autres cellules.

C Classification morphologique :

L'examen du frottis sanguin permet dans 2/3 des cas d'orienter le diagnostic, mais l'examen de la moelle osseuse (MO) est indispensable pour le diagnostic définitif.

Il existe deux classifications :

- La classification morphologique FAB (Franco-américano-Britannique)

- La classification OMS intégrant les données cytogénétique et la biologie moléculaire (15).

La classification internationale FAB reste utilisée bien que la classification OMS soit la nouvelle en vigueur.

VII Facteurs pronostics et traitement :

A Facteurs pronostics :

Il existe des facteurs pronostics associés à une mortalité accrue avant qu'une réponse au traitement soit appréciable, comme l'âge, le score OMS (16), les données cytogénétiques et moléculaires...).

Certaines caractéristiques cytogénétiques influencent le pronostic dont la majorité sont décrite dans le EuropeanLeukemiaNet (ELN 2017). (17).

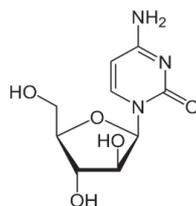
Pour faire suite à ce bref descriptif de la LAM, nous allons maintenant nous intéresser à la prise en charge et aux traitements de celle-ci.

B Traitement :

1 La Cytarabine

1-1 Pharmacodynamie

La Cytarabine, aussi appelée cytosine arabinoside (Ara-C), fait partie de la famille des analogues nucléosidiques. En effet, c'est un analogue structural de la déoxycytidine. Elle intègre la famille des antimétabolites en inhibant la synthèse de l'acide désoxyribonucléique au niveau de la phase S du cycle cellulaire(18). La cytotoxicité de la Cytarabine est dépendante de son métabolite actif, l'arabinofuranosylcytosine triphosphate (Ara-CTP), qui, incorporé à l'ADN en bloque sa synthèse(19). Cette incorporation provoque au sein de l'ADN des anomalies structurales qui entraînent des perturbations du métabolisme cellulaire et altèrent sa reproduction.



Structure chimique de la Cytarabine

Figure 1 : Structure chimique de la Cytarabine(20)

1-2 Les données de pharmacocinétique

La cytarabine est désaminée et transformée en arabinofuranosyl uracile (Ara-U), son métabolite inactif, dans le foie et le rein. Après une administration intraveineuse (IV), une majorité de la dose (90%) est éliminée sous forme de métabolite désaminé inactif. La métabolisation de la Cytarabine est rapide. En effet, suite à l'administration unique d'une dose élevée de celle-ci, les concentrations sanguines chutent jusqu'à des taux non mesurables chez les patients en 15 min environ. Le temps de demi-vie du médicament est de 10 min.

1-3 Les effets indésirables

La Cytarabine entraîne différents types d'effets indésirables, comme des infections virales, bactérienne ou fongique, suite à son effet myelosuppresseur. Son administration entraîne des affections hématologiques et du système lymphatique par son mécanisme d'action. Elle entraîne aussi des infections respiratoires, et gastro-intestinales(19).

1-4 Les enzymes du métabolisme

Au sein de l'équipe de recherche dans laquelle je réalise mon doctorant, une des thématiques majeure, est l'étude des enzymes du métabolisme des analogues nucléosidiques, dont la Cytidine déaminase (CDA) fait partie. La CDA est une enzyme ubiquitaire qui a pour rôle physiologique de catalyser l'hydrolyse irréversible de la cytidine et déoxycytidine en uridine et déoxyuridine respectivement, lorsqu'elles sont sous forme libre de mononucléotides ou de nucléosides (21). La CDA est l'enzyme clé du métabolisme des antimétabolites intégrant la Cytarabine(22)(23). Elle est codée par un gène soumis à un haut polymorphisme génétique. On observe alors trois phénotypes de patients :

- les Poor-Metabolizer, PM, avec une activité de la CDA réduite
- les Extensive Metabolizer, EM, avec une activité dite normale de la CDA
- les Ultra-Métabolizer, UM, avec une forte activité de la CDA.

Une étude rétrospective, monocentrique a été réalisée par notre équipe de recherche, sur des patients traités pour une LAM par de la Cytarabine, au sein du service d'hématologie de la Conception du Pr. Costello. Nous avons pu identifier grâce à une courbe de ROC (Receiver Operating Characteristic), une valeur seuil de l'activité de la CDA(24). En effet, en hématologie, la valeur de 2 UI/mg de protéine, est la limite en dessous de laquelle, le patient est considéré comme PM, avec un risque de survenue de toxicité plus importante que les patients ayant une activité de la CDA \geq 2UI/mg de protéine(24). Cette survenue de

toxicité pourrait s'expliquer par une surexposition plasmatique à la Cytarabine chez ces patients PM, par défaut de métabolisation de la Cytarabine. Inversement, les patients UM, pourraient être sous-exposés à la Cytarabine et donc la rendre inefficace. Ces hypothèses sont en cours d'étude et font l'objet d'un AORC au sein de l'APHM (référence 2017-A000070-53).

2 Les anthracyclines

Les anthracyclines agissent en s'intercalant au niveau des bases azotées de l'ADN et inhibent l'activité de la topoisomérase de type II. La grande majorité des anthracyclines produisent des radicaux libres oxygénés responsable de leur toxicité. En effet, elles sont cardio-toxiques avec un effet dose dépendante et cumulative, ce qui peut donc être un obstacle à leur utilisation. Cette cardiotoxicité peut apparaître de manière aiguë, après la première administration. Plus généralement, elle apparaît dans l'année qui suit l'instauration du traitement, avec une insuffisance cardiaque chronique le plus souvent, voire plus tardivement des défaillances cardiaques congestives et/ou troubles du rythme cardiaque(25). Pour prévenir ce risque, la mesure de la Fraction d'Ejection du Ventricule Gauche (FEVG), ainsi qu'un ECG avant chaque cure à la recherche d'une modification transitoire témoin d'une toxicité aiguë, sont réalisés.

Parmi elles, l'Idarubicine et la Daunorubicine disposent d'une AMM dans le traitement d'induction intensive des LAM.

3 Le schéma « 7+3 »

Depuis plus de 40ans le protocole « 7+3 » reste le protocole standard international de première ligne de prise en charge de la LAM(26). Ce traitement d'induction reste encore en vigueur pour la majorité des chimiothérapies d'induction de LAM dans le monde. Cet acronyme désigne la durée de temps pendant laquelle les deux molécules vont être utilisées. La Cytarabine va être administrée pendant 7 jours en perfusion IV continue de 24h à 200 mg/m². Associée à celle-ci, une anthracycline de type Daunorubicine ou Idarubicine sera administrée pendant les 3 premiers jours. La Daunorubicine s'administre par voie IV à la dose de 90mg/m²/jr pendant 3 jours, et l'Idarubicine s'administre par voie IV à 12mg/m²/jr pendant 3 jours consécutifs(27).Après la cure d'induction la rémission complète (RC) est observée chez 60-80% des patients jeunes et chez 45-65% des patients âgés (17). Cette cure d'induction peut être suivie par 1 à 3 cures de consolidation avec une administration de Cytarabine, à la dose de 1 à 3 g/m²/12H au J1, J3 et J5, ou bien une greffe de cellules souches

hématopoïétiques dépendamment de l'âge du patient, du risque lié à sa maladie ainsi que de l'existence de donneurs compatibles (28)

Même si le schéma 7+3 est un standard dans le traitement de la LAM, des essais cliniques sont en cours afin d'identifier de nouvelles combinaisons ou stratégies thérapeutiques bénéficiant au patient (29).

Pour les patients non éligibles à une chimiothérapie intensive, les traitements recommandés sont l'Azacytidine (Vidaza®) et la Décitabine (Dacogen®) ou encore la Cytarabine à faible dose en administration sous-cutanée (SC). Ces molécules pourront être utilisées jusqu'à progression de la maladie, ainsi que des soins de support, comme notamment l'hydroxyurée.

Depuis 2018, le Vyxeos® a obtenu une AMM Européenne dans le traitement des LAM, avec des indications plus ciblées. Cette nouvelle spécialité est une nouvelle forme associant la Cytarabine et la Daunorubicine sous forme de liposome. Le Vyxeos® tient son originalité de sa formulation liposomale, raison pour laquelle avant de vous en détailler plus précisément les caractéristiques je vais brièvement définir/introduire la notion de « liposome ».

L'utilisation de bon nombre de principes actifs (PA) est dépendante de leurs caractéristiques physicochimiques, comme leur lipo/hydrophilie ou encore leurs poids moléculaires, qui peut être un obstacle pour le passage de certaines barrières biologiques dont la barrière hémato-encéphalique. Il est alors difficile voire impossible pour la PA d'atteindre son site d'action depuis son site d'administration. D'autres PA peuvent être confrontés à des barrières enzymatiques, à de pH acides ou basiques entraînant une dégradation et/ou une métabolisation rapide, ou encore des toxicités majeures en limitant leur utilisation en thérapeutique. Pour pallier à ces phénomènes, le développement de nanotechnologies s'est considérablement accru ces dernières années. Appliquées aux médicaments, on parle alors de nanomédicament, le préfixe définissant une taille de l'ordre du nanomètre (nm), étant la caractéristique majeure et commune aux vecteurs. Les nanomédicaments combinent un nanovecteur et un médicament. Les nanovecteurs sont des molécules qui peuvent être de différentes natures : liposomes, nanoparticules polymères, cubosomes... (30) Ils sont appelés ainsi car leurs structures sont nanométriques. Cette structure confère au vecteur des propriétés particulières permettant le transport des molécules actives ainsi que leurs libérations au niveau de tissu et/ou cellule cible. On parle de nanomédecine lorsque les nanotechnologies sont appliquées au domaine

médical. En médecine le développement des nanovecteurs est en plein essor, en particulier en oncologie, infectiologie et cardiologie.

PARTIE II : Les liposomes

I Définition

Les liposomes sont des structures vésiculaires constitués d'une bicouche souvent de type phospholipidique qui permet de délimiter 2 compartiments aqueux : un compartiment aqueux interne et un compartiment aqueux externe dans lequel les liposomes vont se retrouver en suspension. Le principal intérêt des liposomes est de pouvoir vectoriser des principes actifs hydrophiles, lipophiles et amphiphiles, et ce, par inclusion dans la membrane lipidique ou bien par encapsulation dans l'espace interne.

II La structure des liposomes

Ils sont constitués de molécules dites amphiphiles bicaténaires : avec deux chaînes hydrocarbonées et une tête polaire.

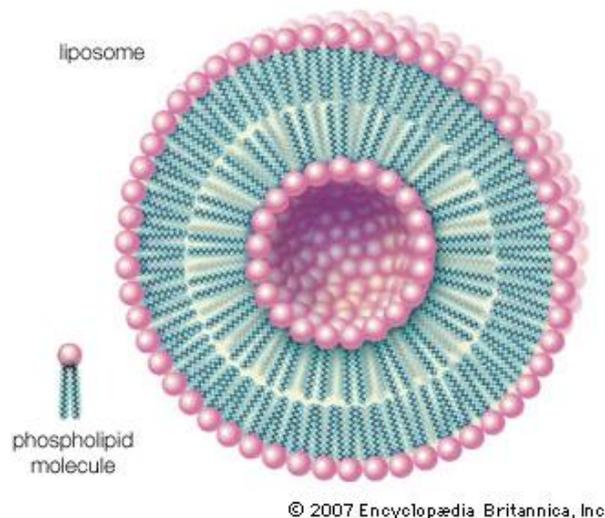


Figure 2 : Structure d'un liposome

La composition de celui-ci (comme représentée sur la figure 2) dépend du choix du procédé de fabrication ainsi que des composants de la bicouche lipidique (phospholipides naturels ou synthétiques).

Dans leur composition est la plupart du temps, ajouté du cholestérol, un stéroïde, permettant d'améliorer la stabilité in vitro et in vivo des liposomes. De plus, il influe sur la fluidité de la bicouche lipidique(31).

III La pharmacocinétique des liposomes

Tout d'abord, il est important de souligner qu'il n'existe pas une pharmacocinétique mais des pharmacocinétiques des liposomes et donc des molécules encapsulées. En effet, il existe une

pharmacocinétique du principe actif encapsulé, celle du principe actif libéré mais également une pharmacocinétique systémique puis tumorale(32).

On peut généraliser, en disant que l'association du principe actif au liposome :

- Permet l'optimisation de la phase de distribution
- Retarde son métabolisme en le protégeant des dégradations enzymatiques,
- Retarde son élimination, avec une réduction de la clairance.

A présent, je peux vous présenter de manière détaillée cette nouvelle forme liposomale associant de la Cytarabine et de la Daunorubicine.

PARTIE III : le Vyxeos®

I Les généralités

Le Vyxeos® est une formulation liposomale innovante. C'est la première spécialité qui vient révolutionner le schéma classique d'induction « 7+3 » pilier du traitement de la LAM. Elle permet l'association au sein d'une forme liposomale de deux chimiothérapies, la Cytarabine et la Daunorubicine(33)(34), sur un schéma d'administration d'une perfusion de 90min, au lieu de 7 jours de perfusion continue, avec le schéma « 7+3 ».Le Vyxeos® a obtenu une AMM sans remboursement en sus, dans l'indication du traitement chez des patients adultes d'une LAM nouvellement diagnostiquée, secondaire à un traitement (LAM-t) ou une LAM avec anomalies associées aux myélodysplasie(35). Il a obtenu un SMR important. Le prix unitaire d'un flacon (P.M.T) hors taxe est de 3600.00 euros. Cette nouvelle formulation permettrait d'optimiser la délivrance ainsi que l'activité de la Daunorubicine et de la Cytarabine. Les deux chimiothérapies sont combinées avec un ratio molaire fixe et synergique de (1 : 5)(34). Ce ratio synergique permet:

- Un effet prolongé, avec un maintien plus de 24 heures après l'administration, du ratio molaire.
- Des concentrations maintenues élevées, avec une accumulation dans la moelle osseuse à une concentration élevée
- Une cible préférentielle, en effet, le Vyxeos® serait capté sélectivement par les cellules leucémiques plutôt que par les cellules normales de la moelle osseuse.

Le Vyxeos® est administré sous forme de perfusion intra-veineuse de 90 minutes, avec une posologie basée sur la surface corporelle, selon le schéma thérapeutique résumé dans le tableau 1 suivant :

CURE	Dose (Daunorubicine/Cytarabine)	Jours d'administration
1 ^{ière} Induction	44mg/100mg/m ²	J1, 3 et 5
2 ^{ième} Induction*	44mg/100mg/m ²	J1 et J3
1 ^{ière} Consolidation**	29mg/65mg/m ²	J1 et J3
2 ^{ième} Consolidation***	29mg/65mg/m ²	J1 et J3

Tableau 1 : Schéma d'administration du Vyxeos®

*Un second cycle d'induction peut être administré chez les patients ne présentant pas de progression de la maladie ou de toxicité inacceptable.

**Le premier cycle de consolidation doit être administré 5 à 8 semaines après le début de la dernière induction.

***Un autre cycle de consolidation peut être administré dans les 5 à 8 semaines suivant le début du premier cycle de consolidation chez les patients ne présentant pas de progression de la maladie ou de toxicité. (35)

Des effets indésirables ont été rapportés dans les études cliniques, similaires à ceux rencontrés avec la Cytarabine.

II Le Vyxeos® : une efficacité démontrée

Une étude pilote de phase III a été menée. Cette étude était multicentrique, randomisée, en ouvert et contrôlée en double bras(11)(35).

Elle avait pour objectif d'évaluer la nouvelle formulation liposomale par rapport à l'association standard de Cytarabine et de Daunorubicine, et ce, chez 309 patients âgés de 60 à 75 ans présentant une LAM (comme selon l'AMM). Les résultats montrent que le Vyxeos® réduit significativement le risque de décès par rapport au protocole standard « 7+3 » de 31% ($p\text{-value} = 0,005$)(11).

Cette formulation améliore significativement les taux de réponse complète (RC) et composite (RC + RCi) par rapport au schéma classique, avec 37,3 % de RC versus 25,6% pour le schéma « 7+3 » ($p\text{-value} = 0,040$). Concernant les réponses composites, 47,7% de RCi avec le Vyxeos® versus 33,3% avec le schéma classique ($p\text{-value} = 0,016$)(11)(35).

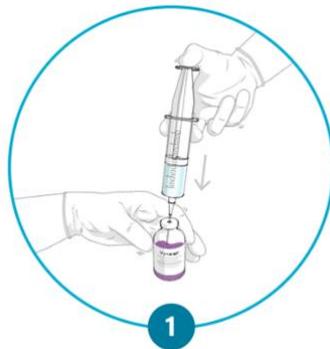
Dans cette étude de phase III, la durée de traitement était plus longue dans le bras Vyxeos®, avec un temps médian de neutropénie de 35 jours (versus 29 jours avec le schéma 7+3) ainsi qu'un temps médian de récupération d'une thrombocytopénie (taux plaquettaire $>50000 / \mu\text{L}$) de 36.5 jours (versus 29 jours dans le bras 7+3). Celle-ci retrouve un taux d'évènements hémorragiques de tous grades, supérieur pour le bras Vyxeos® que pour le schéma 7+3 (74.5% versus 59.6% respectivement)(11). De plus, les patients qui ont procédé à une greffe de cellules souches, ont vu leur mortalité à 30 et 60 jours diminuée avec la Daunorubicine et la Cytarabine liposomale(36).

Dépendamment de sa formulation originale, les étapes de préparation sont différentes de celles d'un cytotoxique conventionnel, je vais donc vous en présenter succinctement les différentes étapes.

III Le Vyxeos® en pratique et bon usage d'utilisation

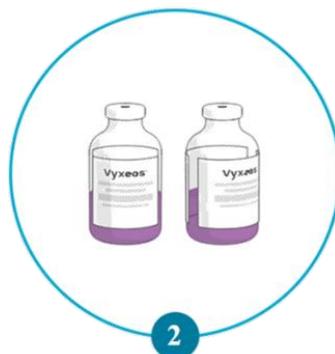
Un flacon de Vyxeos® contient 44 mg de Daunorubicine et 100mg de Cytarabine. La dose et le nombre de flacon nécessaire est fonction de la surface corporelle du patient. Les excipients utilisés dans sa composition sont multiples, tels que le distéaroylphosphatidylcholine/glycérol, du cholestérol ainsi que de trolamine (pour l'ajustement du pH), et du cuivre gluconate qui lui confère sa couleur violette.

Les flacons doivent être sortis du réfrigérateur 30 min avant son utilisation à température ambiante.



La reconstitution de la solution se fera avec ajout de 19ml d'eau pour préparation injectable (PPI), et le flacon sera par la suite retourné pendant 5 minutes.

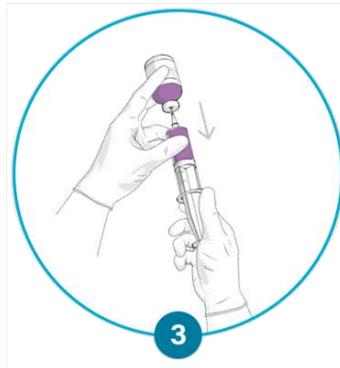
Après cette reconstitution les flacons seront laissés au repos pendant 15 minutes.



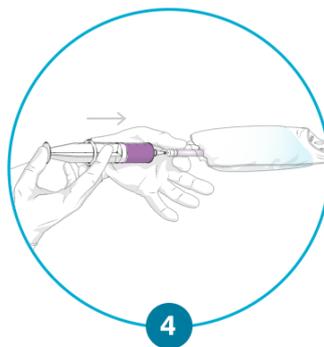
Le volume de la solution reconstituée de Vyxeos® qui sera nécessaire, sera calculé en utilisant la formule suivante :

$$\frac{(Dose\ de\ Daunorubicine \times Surface\ corporelle\ du\ patient)}{2.2} = \text{volume nécessaire (mL)}$$

Avec la dose de Daunorubicine en mg/m^2 et la surface corporelle en m^2



Avant de prélever le volume calculé de manière aseptique, la solution reconstituée devra être retournée doucement 5 fois.



Le volume prélevé sera par la suite transféré dans une poche à perfusion contenant 500 mL de solution injectable de NaCl à 0,9% ou du Glucose à 5%. La poche sera retournée doucement pour mélanger la solution et l'homogénéiser. Le produit dilué se présentera sous forme de dispersion homogène translucide de couleur violet foncé.

Pour l'administration aux patients, le temps de perfusion sera de 90 minutes, par voie intraveineuse uniquement, par un cathéter veineux central ou un cathéter central inséré par voie périphérique à l'aide d'une pompe à perfusion. Il ne faudra pas utiliser de filtre en ligne, ni l'administrer en même temps que d'autres médicaments.

Après l'administration de la poche, la tubulure sera rincée avec une solution injectable de NaCl à 0,9%. (37).

La conservation du Vyxeos® en flacon avant ouverture est de maximum 2 ans en position verticale au réfrigérateur entre 2 et 8°C. La solution reconstituée dans le flacon doit aussi être

conservée en position verticale mais celle-ci maximum 4 heures, au réfrigérateur entre 2 et 8°C. Pour finir, la solution diluée pour perfusion peut être conservée maximum 4 heures au réfrigérateur entre 2 et 8°C(37).

IV L'impact de la formulation liposomale sur la pharmacocinétique des cytotoxiques encapsulés

Les nanotechnologies ne visent pas de nouvelles cibles pharmacologiques mais à augmenter la spécificité antitumorale des traitements. Les bénéfices thérapeutiques reposent sur une amélioration des profils pharmacocinétiques permettant une meilleure réponse pharmacodynamique.

La bicouche lipidique du Vyxeos® protégerait les médicaments anticancéreux qui le composent, en les empêchant d'être dégradés/métabolisés à un stade précoce, afin d'améliorer leurs effets sur les cellules cancéreuses(38).

Nous nous focaliserons dans la suite de ce manuscrit sur la Cytarabine, que nous savons doser.

Les différences concernant les paramètres pharmacocinétiques de la Cytarabine sont résumés dans le tableau2 suivant(7)(18) :

Paramètres PK	Cytarabine	Cytarabine sous forme liposomale (Vyxeos®)
Posologie (à l'induction)	200 mg/m ² /24h pendant 7 jours consécutifs	100 mg/m ² au J1, 3 et 5
Temps de demi-vie	Environ 10 minutes	40,4 h
AUC	NA	1900 µg/l×h
Cl	13,92 L/h/m ²	0,13 L/h

Tableau 2 : Paramètres pharmacocinétiques de la Cytarabine et Cytarabine sous forme liposomale au sein du Vyxeos®.

Les données pharmacocinétiques (PK) du tableau nous montre l'impact de cette nouvelle formulation sur les paramètres PK de la Cytarabine en augmentant son temps de demi-vie, et diminuant sa clairance pour une dose moindre (50%) de Cytarabine sous forme liposomale et ce comparativement au schéma « 7+3 ». A ce stade, il est essentiel de préciser que ces données PK concernent la « Cytarabine totale », laquelle est la combinaison de la Cytarabine encapsulée mais également de la Cytarabine libre à un instant t.

Pour autant, les toxicités de même que l'efficacité rencontrées avec la nouvelle formulation, sont liées à la fraction libre de la Cytarabine relarguée à partir de la forme vectorielle. En effet, les anticancéreux encapsulés sont protégés des dégradations éventuelles mais ne sont également pas actifs (efficace et/ou toxiques). La fraction libérée à partir du vecteur est le support de cette efficacité et/ou toxicité c'est la raison pour laquelle il apparaît intéressant d'étudier ce qui pourrait déstabiliser cette forme liposomale, et donc faire varier la quantité de forme active libre de Cytarabine au cours du temps et dépendamment de nombreuses covariables telles que l'administration de traitements concomittants, déstabilisant le liposome, le microenvironnement tumorale, l'état inflammatoire du patient, son statut immunitaire.

Par ailleurs, un autre axe d'intérêt est d'étudier la relation entre la Cytarabine liposomale et le statut CDA du patient. En effet, bien qu'un des intérêts de la nanovectorisation soit de réduire la métabolisation hépatique, le Vyxeos® reste un nanomédicament de première génération (liposome), il existe donc un captage hépatique, avec une possible activité de la CDA, même mineur, de plus que cette enzyme ubiquitaire reste majoritairement retrouvée dans le foie. Tout reste encore à faire dans ce domaine d'étude.

Un autre des avantages de la formulation liposomale est le ciblage moléculaire. En effet, ce ciblage permet d'acheminer le principe actif directement sur sa cible, ce phénomène d'EPR (Enhanced Permeation and Retention) effect est retrouvé dans le traitement de tumeurs dites solides (comme dans le cancer du sein par exemple, avec le Caelyx®). Le défi est tout autre pour le Vyxeos®, qui lui s'attaque à une tumeur dite liquide. Le Vyxeos doit alors répondre à un double enjeu, celui d'avoir un tropisme médullaire pour cibler les cellules leucémiques, mais aussi de rester stable dans la circulation sanguine avant d'être capté dans la MO.

Des études sur le modèle murin, ont montré que le Vyxeos® serait absorbé de manière plus spécifique par les cellules leucémiques que par les cellules normales de la moelle osseuse. Cette meilleure absorption pourrait s'expliquer par une composition similaire de la bicouche lipidique du liposome et celle de la membrane des cellules leucémiques(39).

Dans le cadre de la prise en charge des patients atteints de LAM, des myélogrammes doivent être réalisés. Le myélogramme ci-dessous (images 1 et 2) a été réalisé au J15 de la cure de chimiothérapie chez un patient traité par Vyxeos® et semble illustrer ce tropisme médullaire. Nous observons une accumulation de Vyxeos® (tâches violettes punctiformes) autour des macrophages visibles au microscope optique.

Accumulation de Vyxeos®

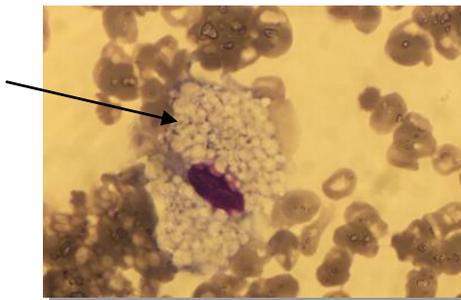
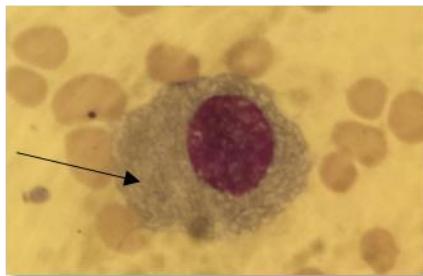


Image 1

Accumulation de Vyxeos®



Images 2

Images 1 et 2 : Photos prises au microscope de l'accumulation de Vyxeos® sur une lame de MO.

Toutes ces généralités ont permis de refaire un point sur la LAM, et sur les traitements qui sont actuellement utilisés pour la traiter.

Dans la partie suivante de ce manuscrit, vous seront présentés les travaux de recherche réalisés sur cette molécule, avec un périple qui débutera du flacon de Vyxeos® pour finir par une étude PK du Vyxeos® chez le patient, autour d'une technique analytique de spectrométrie de masse.

PARTIE IV : Travaux personnels

I Etude de stabilité de la poche de Vyxeos® :

Le laboratoire commercialisant le Vyxeos® a décrit une conservation pour la solution diluée pour perfusion de 4 heures maximum, dans des conditions décrites précédemment(37). Dans le cas des poches réalisées sur l'APHM, celles-ci ne sont pas préparées sur place. En effet, la reconstitution et la dilution se font sur le site de la Timone (Oncopharmacie), alors que l'administration aux patients est réalisée sur le site de la Conception. Il est donc important de prendre en compte ce temps de transit entre les deux sites. De plus, ces poches sont dédiées à des patients instables, ayant de nombreux traitements et/ou supports transfusionnels, qu'il est parfois difficile d'interrompre lors de l'administration des chimiothérapies. Nous avons donc décidé, suite à ces observations d'étudier la stabilité de la solution pour perfusion pendant ces 4 premières heures ainsi qu'au-delà de cette période de temps.

De plus, nous savons qu'il existe pour certaines molécules des interactions contenant / contenu décrites dans la littérature (40). Nous avons donc mené cette étude de stabilité du Vyxeos® :

- conservé dans des poches en PVC.
- conservé dans des flacons en verre.

A Matériel et Méthode :

1-Préparation des échantillons :

La préparation de solution diluée de Vyxeos® a été réalisée dans des conditions aseptiques, au sein de l'unité de préparation cytotatique de la Timone, dirigée par le Dr Pourroy et Dr Villano, par un mélange de 1,7 mL de solution reconstituée de Vyxeos® dans 50 mL de NaCL (0,9%), (concentration à 0,17 mg/mL de Cytarabine).

- Contenant PVC : Trois poches de solution diluée pour perfusion de Vyxeos® ont été préparées et ce, à des jours différents (correspondant aux J1, J3 et J5 du traitement d'induction), dans des conditions identiques comme décrites dans le RCP du produit (35).
- Contenant flacon en verre : deux poches de solution diluée ont été également préparées. De la même manière, deux solutions diluées de Vyxeos®, cette fois conservées dans des contenants (flacon) en verre, ont aussi été préparées (aux J1 et J5 du traitement d'induction).

Nous avons étudié la stabilité au cours du temps de ces solutions de Vyxeos® et ce à différents temps d'analyse théoriques :

- Contenant PVC : T0, T4H, T8H, T24H, T36H, T48H, T60H, T72H, T96H et T120H concernant les poches PVC.

Contenant flacon en verre : Les temps d'analyse pour les flacons en verre sont T0, T24H, T48H, T72H, T96H et T120H. Différentes techniques seront utilisées pour traiter et/ou analyser les échantillons. Tout d'abord, une analyse au DLS ou méthode de Light Scattering (ou encore diffusion de la lumière en français) sera utilisée. Cette méthode spectroscopique non destructive permet d'accéder à la taille des particules en suspension. La lumière d'un laser va atteindre des petites particules dans une microcuvette, avec une lumière qui diffuse dans toutes les directions. Ce phénomène est principalement de la diffusion de Rayleigh, diffusion élastique où les particules sont plus petites que la longueur d'onde considérée. On peut mesurer l'intensité de la lumière diffusée par les particules à un angle considéré (90° généralement) au cours du temps. Cette méthode spectroscopique permet aussi de déterminer l'indice de polydispersité (PDI).

Nous utiliserons aussi des concentrateurs à centrifuger, Vivaspin®. Ces concentrateurs sont des unités d'ultrafiltration à usage unique permettant la concentration d'échantillons biologiques(41). Cette technique va permettre de dissocier notre échantillon en deux fractions : la fraction libre, il s'agit de la Cytarabine relarguée à partir du liposome, et la fraction encapsulée, la Cytarabine étant encore encapsulée au moment de l'analyse.

Pour chaque temps, des volumes nécessaires ont été définis, comme résumé dans le tableau 3 ci-dessous :

	Etude DLS	Vivaspin®
Volumes nécessaires	1mL	1mL

Tableau 3 : Résumé des volumes nécessaires de solution diluée de Vyxeos® pour l'étude de stabilité.

Les volumes ont été prélevés à l'aide d'une seringue en verre (Hamilton, seringue Gastight™ série 1000) et tous les contenants utilisés par la suite, seront en verre (tube à hémolyse).

Après ultracentrifugation dans Les Vivaspins® (5kDa) à 6000g, pendant 15min à 4°C, 3 échantillons ont été identifiés :

- La fraction libre
- La fraction encapsulée
- Le rinçage du filtre, par 500 μ L de méthanol

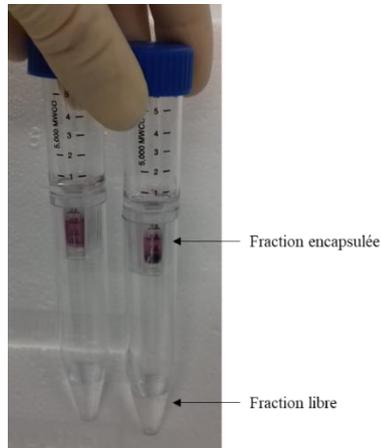


Image 3 : Photo du Vyxeos® après ultracentrifugation au Vivaspin®.

Tous les volumes ont été mesurés et conservés dans des tubes à hémolyse au congélateur (-20°C), avant décongélation pour leur dosage.

Entre les différents temps d'analyse, les solutions diluées pour perfusion contenues dans les poches en PVC ainsi que celles contenues dans les flacons en verre ont été conservées à une température entre 2 et 8°C, à l'abri de la lumière.

2-Analyse au DLS :

La mesure de la taille des particules des solutions de Vyxeos® a été réalisée pour chaque temps étudiés, pour les 3 poches de PVC ainsi que les 2 solutions contenues dans des flacons en verre. La mesure de leur indice de polydispersité (PdI) a aussi été mesuré. Cette valeur de PdI doit être inférieure à 0.2 afin de considérer la population étudiée comme unimodale(42).

3-Dosage de la Cytarabine :

Le dosage de la Cytarabine a été réalisée au sein du laboratoire de pharmacocinétique du Pr. Lacarelle (Laboratoire accrédité Cofrac). La méthode de dosage de la Cytarabine a été validée par notre équipe au sein de ce même laboratoire et a fait l'objet d'une publication (43), voir le protocole de dosage en annexe 1.

Le dosage de la Cytarabine a été réalisé selon une technique analytique de type LC-MS/MS. Nous avons dosé selon le protocole établi la fraction encapsulée, libre ainsi que la solution de rinçage du filtre.

La concentration considérée comme totale en Cytarabine sera alors l'addition des 3 concentrations mesurées suivantes : libre, encapsulée et le rinçage du filtre et sera comparée à la concentration théorique initiale normalement retrouvée au sein des poches PVC et des flacons, soit de 0.17 mg/ml de Cytarabine. Cette dernière n'ayant pas pu faire l'objet d'un dosage analytique.

4-Analyses statistiques :

Tous les tests statistiques ont été réalisés sur le logiciel Sigma Stat (Jandel Scientific, Germany).

B Résultats :

1-Analyse DLS :

L'évolution de la moyenne des tailles mesurées au DLS ainsi que l'évolution de la moyenne des PDI au cours du temps ont été représentées sur les figures suivantes :

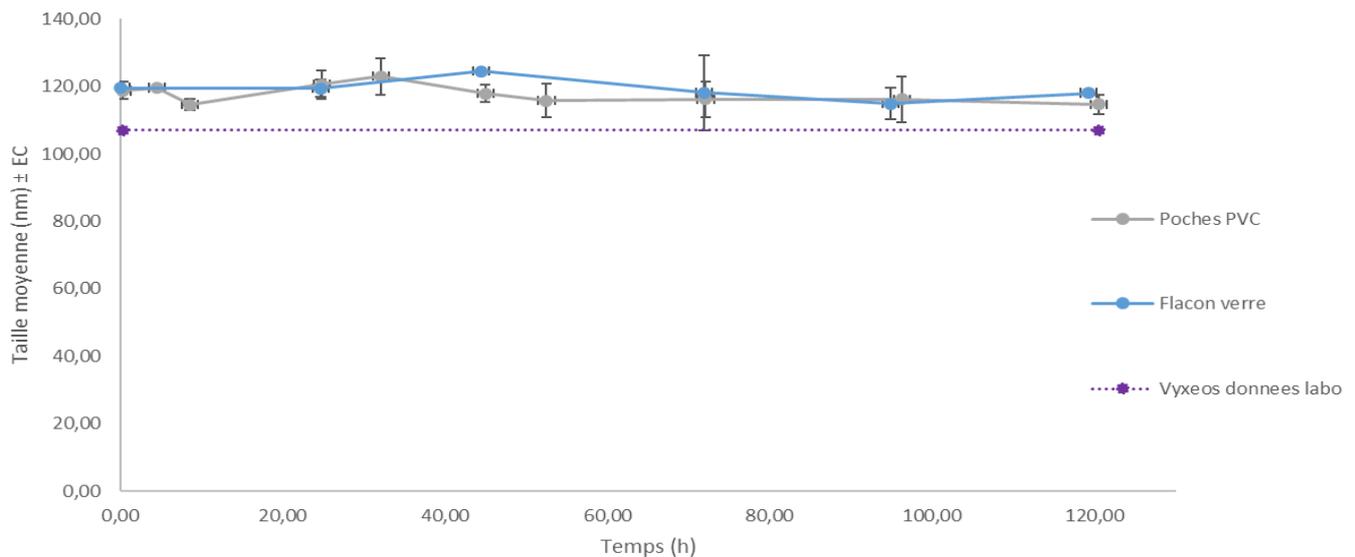


Figure 3 : Evolution au cours du temps de la taille moyenne des particules de Vyxeos® au sein de différents contenants.

Les courbes bleue et grise, représentent l'évolution des tailles moyennes des particules de Vyxeos® au cours du temps et ce dépendamment des différents contenants : les poches PVC (courbe grise), et les flacons en verre (courbe bleue).

La courbe violette (en pointillé) correspond à la valeur moyenne de la taille des particules de Vyxeos® décrite par le laboratoire fabricant. Cette taille a été déterminée à 107 nm(44).

Nous observons une différence significative de la taille moyenne des particules de Vyxeos® mesurée au sein de nos différents contenants (poche PVC et flacon en verre), comparativement à celle indiquée par le laboratoire fabricant ($p > 0.05$). Nous avons obtenu une taille moyenne pour les particules contenues dans les poches PVC de 117.73 ± 1.89 nm et celle dans les flacons en verre de 119.09 ± 4.30 nm.

Il n'existe pas de différence significative entre la taille moyenne du Vyxeos® mesurée selon que la solution est conservée dans les poches PVC ou dans les flacons en verre au T0, et ce durant toute la durée de l'étude de stabilité (120 heures) ($p < 0.05$).

En dépit de la différence minimale de taille mesurée en comparaison avec celle annoncée par le laboratoire fabricant, celle-ci reste significativement la même pour une période de 120H et ce, au sein des 2 types différents de contenant (poches PVC et flacons en verre). Les données obtenues montrent une stabilité de cette forme liposome au cours de notre étude de stabilité et ce quel que soit le contenant.

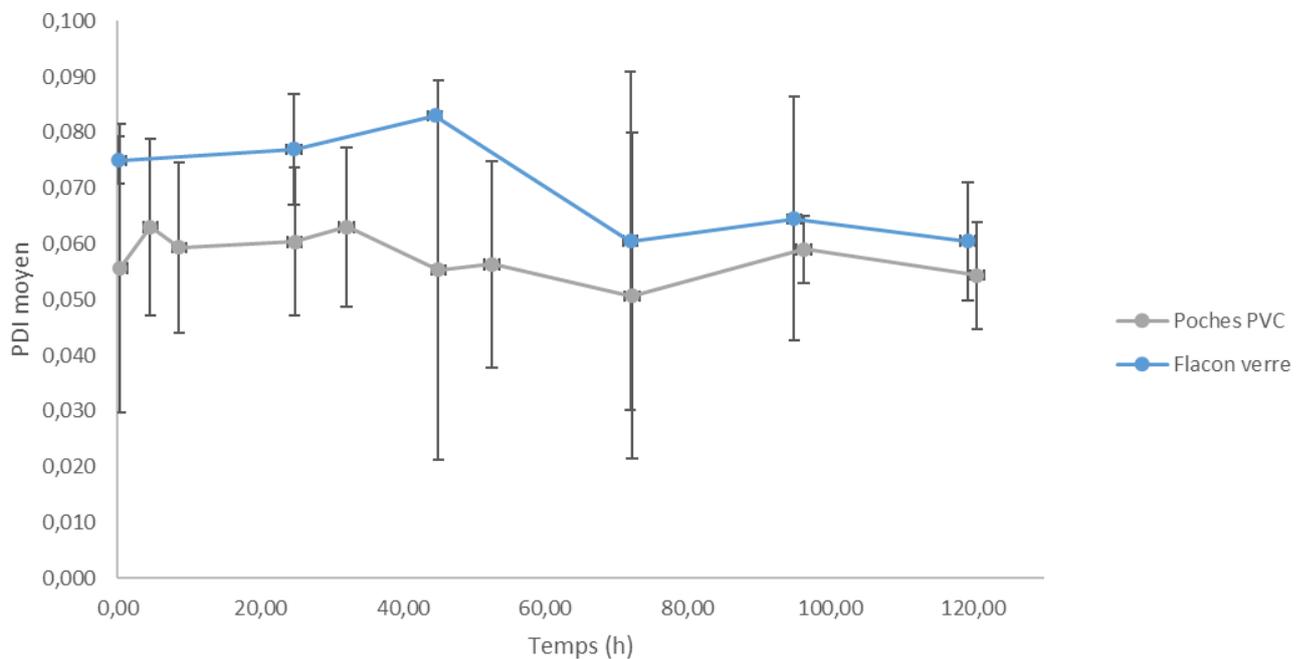


Figure 4 : Evolution au cours du temps du PDI moyen des particules de Vyxeos® au sein de différents contenants.

Ces deux courbes (grise et bleue), représentent la mesure de l'indice de polydispersité moyen de nos différents échantillons en fonction du temps, toujours dépendamment du contenant. Il est important de souligner, qu'en dépit des fluctuations des valeurs moyennes du PDI, celles-ci

restent toutes inférieures à 0,2 (voire même 0,090) durant la période de temps de l'étude (soit 120H). Durant cette période de temps, nous pouvons dire que nos échantillons sont homogènes et monodisperse. Ceci met en évidence l'absence de formation d'agrégat ou de fusion des liposomes au cours de leur conservation.

Nous pouvons déjà conclure, en disant que le Vyxeos® en solution diluée, contenu dans des poches PVC ou des flacons en verre, reste structurellement stable et monodispersé au moins pour les 120 premières heures après reconstitution.

Par la suite nous nous intéresserons à l'étude de l'évolution des concentrations en Cytarabine au sein du Vyxeos®.

2-Dosage de la Cytarabine :

L'évolution au cours du temps des concentrations moyennes de Cytarabine totales, mesurées par la technique analytique de LC-MS est représentée sur la figure 5 suivante :

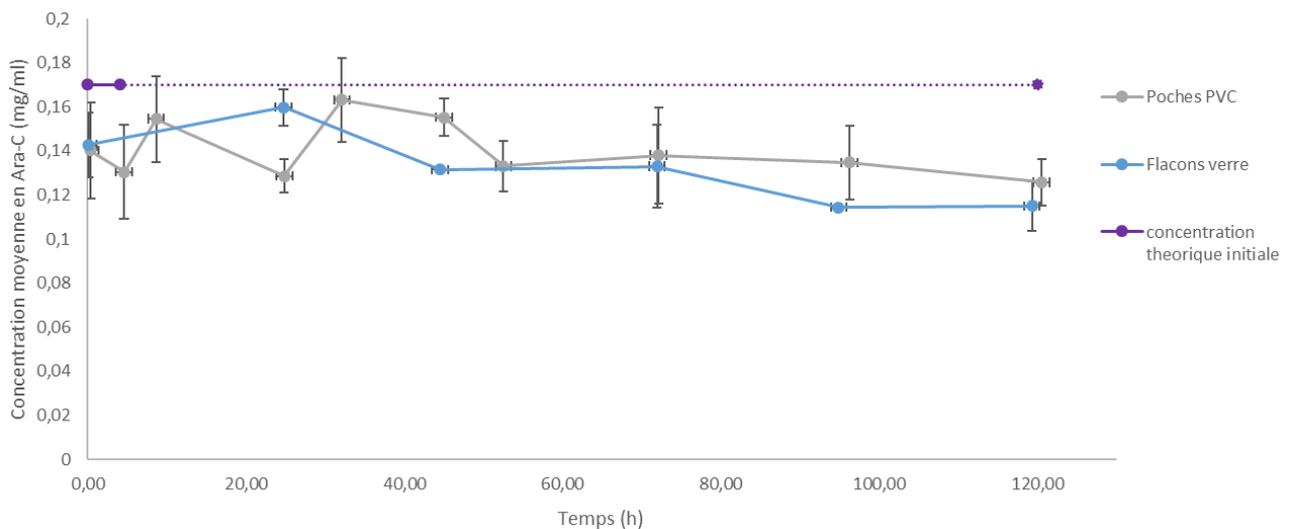


Figure 5 : Evolution au cours du temps de la concentration moyenne de Cytarabine dans les différents contenants.

La courbe violette correspond à la concentration initiale théorique que nous devons retrouver en Cytarabine totale dans les poches préparées. La stabilité du Vyxeos® étant décrite uniquement pour une durée de 4H, la courbe représentant cette concentration totale de Cytarabine initiale a été mise en pointillé pour les temps allant de 4h à 120h, car il s'agit ici d'une extrapolation que nous avons faite.

Nous ne retrouvons pas de différence significative concernant la concentration moyenne totale en Cytarabine contenue dans les poches PVC ainsi que dans les flacons en verre,

comparativement à la concentration initiale théorique attendue, et ce pour la période de temps allant de T0H à T8H ($p > 0.05$).

Au T24H, nous observons une différence significative de concentration totale en Cytarabine au sein des poches PVC en comparaison avec la concentration en Cytarabine théoriquement retrouvée. Cette observation n'est pas vraie pour les flacons en verre, au sein desquels la concentration moyenne en Cytarabine totale reste significativement semblable à la concentration en Cytarabine théorique durant 72H ($p < 0.05$).

Dans la partie que nous allons aborder maintenant, nous allons nous intéresser à une toute autre étude, celle de la compatibilité en Y du Vyxeos®.

II Etude de compatibilité en Y :

Les patients, hospitalisés dans le service d'hématologie du Pr Costello à l'hôpital de la Conception (APHM), sont des patients, pour la plupart, polymédicamentés. Des études préliminaires sont menées sur la compatibilité lors de la co-administration de certains traitements, mais toutes ne sont pas encore connues.

Une étude dans ce même service a été réalisée durant une période d'un an (1^{er} janvier 2017 au 31 décembre 2017), afin de distinguer les principes actifs les plus prescrits(45). Une centaine de principes actifs (PA) ont été retenus. Par la suite, et ce, pour cette centaine de PA une analyse de la littérature a permis de compiler les profils de compatibilité en Y (par couple de médicaments)(45)

Actuellement, il n'y a pas de donnée existante concernant les incompatibilités relatives à l'administration par voie intra-veineuse du Vyxeos®. Seules des incompatibilités dans la littérature pour la Cytarabine et la Daunorubicine sont décrites(46)(47). Sur la base de l'étude précédente, nous avons réalisé une étude de compatibilité en Y du Vyxeos®.

A Matériel et méthode

Chaque mélange a été évalué en comparant les solutions sur un fond clair et foncé. Le contrôle visuel a été effectué par deux opérateurs différents. La compatibilité visuelle acceptable a été définie comme l'absence de changement de couleur (solution violette de Vyxeos®), de voile, de particules, de précipité à T = 0 min et à T = 90 min. Tous les phénomènes observés ont été notifiés.

1-Incompatibilité en Y :

Parmi la liste des PA les plus prescrits au sein du service d'hématologie, nous avons retenu 34 composés (31 PA et 3 solvants).

Tous ces composés ont été reconstitués, si nécessaire, dans du NaCl 0,9%, ou de l'eau PPI avec un volume identique aux conditions définies dans le Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP).

Le modèle d'incompatibilité en Y a été simulé avec l'aide de deux seringues Luer Lock 5 mL (référence IVL05, batch 18090502, exp 09/2023, Medicina) et d'un prolongateur trois voies de 35 cm (référence XTEN-R30, batch 181225 04567, exp 11/2023, Doran International). Les dispositifs médicaux utilisés étaient stériles sans DEHP, latex et à l'oxyde d'éthylène. Les différents composés de la seringue étaient: pour le corps de seringue (du copolymère éthylène- propylène), le piston (polyisoprène), les joints en silicone et le lubrifiant étant de l'huile de silicone.

Les PA étudiés ont été mis en contact sur la base d'un ratio 1 : 1, avec un mélange de 2mL de solution diluée de Vyxeos®. Cette solution avait été préparée dans des conditions aseptiques à une concentration de 0,4 mg/mL. Les deux composés ont été injectés en même temps dans le prolongateur.

Tous les mélanges ont été analysés immédiatement à la sortie du prolongateur (T0) et 90 minutes (T+90) après conservation à température ambiante (25°C). Toutes les mesures ont été réalisées en double. Les couples de drogues ont été classés en 3 catégories :

- Compatible
- Compatibilité variable (lorsqu'un phénomène douteux apparaissait) et,
- Incompatible

Avant le mélange, un contrôle visuel a été réalisé par 2 opérateurs différents et par Dynamic Light Scattering (DLS).

1-1Analyse au DLS :

La taille et l'indice de polydispersité (PDI) du Vyxeos® seul et combiné à d'autres PA ont été mesurés par DLS. Le mélange a été analysé par le Zeta Sizer Nano S (Malvern instruments, Malvern UK). Les préparations ont été considérées comme unimodales pour un PDI < 0.2(48). Toutes les mesures des mélanges seront comparées à la mesure du Vyxeos® seule (dilué dans le NaCl à 0,9%). Chaque couple a été analysé deux fois, et a été déterminé comme

incompatible lorsqu'une variation significative de la taille a été observée (test de Student), ou lorsqu'un autre pic est apparu sur le spectre au DLS.

1-2 Observation au microscope électronique :

La solution de Vyxeos® (à 0,4mg/ml) a été observée au microscope électronique en coloration négative, et en transmission. Le principe de cette technique de microscopie est l'émission d'un faisceau d'électrons qui sera transmis à travers un échantillon très mince. La coloration négative est une technique d'adsorption des échantillons sur une grille métallique recouverte d'une grille de carbone fin. Une solution contenant un agent contrastant est ajoutée sur la grille. Celui-ci va se fixer préférentiellement au bord des particules adsorbées. Par sa forte masse atomique, le contrastant va dévier les électrons, et va faire apparaître l'échantillon biologique plus clair que ce qui l'entoure. C'est pour cette raison que l'on parle de coloration négative.

Nous avons regardé si après contact avec les molécules dites incompatibles ou avec une compatibilité variable, une modification de la structure du liposome était visible en microscopie électronique en coloration négative.

Le Vyxéos® (solution diluée à 0.4mg/ml de Cytarabine) a été mis en contact (500µL) dans des tubes à hémolyse, dans un ratio de volume 1 : 1 avec les molécules suivantes : l'Héparine sodique, le Chlorure de magnésium, la Mycamine, l'Amikacine, la Vancomycine, l'Amiodarone, le Triméthoprime-Sulfaméthoxazole, Pipéracilline et Tazobactam, la Gentamicine, le Paracétamol ainsi que le Ringer lactate.

B Résultats :

La taille des particules de Vyxeos® mesurée dans la solution à 0,4 mg/mL était de 114.4 ± 29.42 nm avec un PDI de $0,065 \pm 0,016$. Cette valeur a été utilisée comme référence pour la suite des interprétations concernant l'étude des incompatibilités. La différence de taille obtenue n'est pas statistiquement différente que celle indiquée par le laboratoire Jazz Pharmaceutical, de 107nm ($p\text{-value} = 6,10$ Test de Student). (44)

1-Analyse visuelle :

Nous avons retrouvé une incompatibilité visuelle pour 3 molécules, à T0min et T+90 :

- L'Amikacine
- La Vancomycine
- Le Triméthoprime-sulfaméthoxazole

Concernant la Vancomycine et le Triméthoprime-Sulfaméthoxazole, nous avons observé une augmentation du précipité brut, et pour l'Amikacine, nous avons observé une perturbation de la solution, comme illustré sur les images 4 (a, b et c) suivantes.

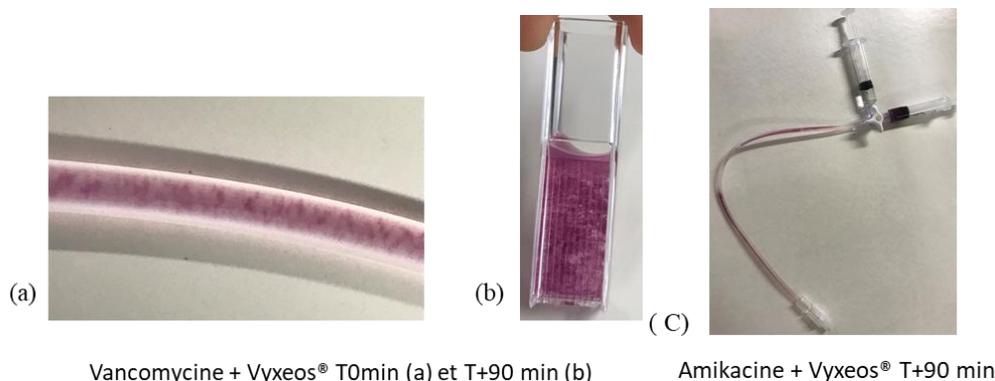


Image 4 :Photos de la tubulure du montage en Y d'un mélange de Vyxeos et de Vancomycine à T0min (a), dans une cuve à T+90 min (b), ainsi qu'une tubulure du montage en Y contenant du Vyxeos®et Amikacine à T+90min.

2-Analyse au DLS :

Huit médicaments ont montré des incompatibilités avec le Vyxeos® à T0 et T+90min :

- L'Amikacine
- L'Amiodarone
- La Gentamicine
- La Vancomycine
- L'Hydroxyzine
- Le Chlorure de magnésium
- La PipéracillineTazobactam
- Le Triméthoprime-Sulfaméthoxazole

L'Héparine sodique présente une incompatibilité variable.

Les résultats pour l'ensemble des molécules sont résumés dans le tableau 4 suivant (I = incompatibilité, et C= compatible) :

<i>Drugs</i>	<i>T = 0'</i>	<i>T = 90'</i>
Acetaminophen	C	C
Acyclovir	C	C
Amikacin	I	I
Amiodarone	I	I
Amoxicillin	C	C

Amoxicillin and clavulanate	C	C
Calcium chloride	C	C
Calcium gluconate	C	C
Cefazolin	C	C
Ceftriaxone	C	C
Ciprofloxacin	C	C
Dextrose 5%	C	C
Fluconazole	C	C
Furosemide	C	C
Gentamicin	I	I
Heparin sodium	I/C	I/C
Hydroxyzine	I	I
Imipenem and cilastatin	C	C
Lactated Ringer's	C	C
Levetiracetam	C	C
Magnesium chloride	I	I
Meropenem	C	C
Metronidazole	C	C
Micafungin	C	C
Midazolam	C	C
Multivitamins	C	C
Pantoprazole	C	C
Phloroglucinol	C	C
Piperacillin and tazobactam	I/C	I/C
Potassium chloride	C	C
Sodium chloride 0,9%	C	C
Tranexamic acid	C	C
Trimetoprim and sulfamethoxazole	I	I
Vancomycin	I	I

Tableau 4 : Résumé des résultats de compatibilité obtenus après mesure au DLS entre le Vyxeos® et les différentes molécules testées à T0 et T90min.

Les différentes observations au DLS pour les 33 molécules testées sont résumés dans le tableau 5 ci-dessous :

<i>Drugs</i>	<i>Compatibility</i>	<i>Description</i>
Amikacin	Incompatible	3 peaks : Peak 1 = 100.09 +/- 19.12 nm Peak 2 = 2041.5 +/- 566.4 nm Peak 3 = 5090 +/- 244.65 nm PdI = 0.546 +/- 0.047
Amiodarone	Incompatible	Decrease of liposome size 8.77 +/- 0.18 nm PdI = 0.133 +/- 0.006
Gentamicin	Incompatible	Decrease of liposome size and

		apparition of a second peak Peak 1 = 109.8 +/- 30.81 nm Peak 2 = 4009 +/- 834.39 nm PdI > 1
Heparin sodium	Variable compatibility	Conflicting data between the two experiments Experiment 1 : significant difference of size Experiment 2 : no significant difference of size
Hydroxyzine	Incompatible	Increase of liposome size 1215.25 +/- 382.90 nm PdI = 0.284 +/- 0.119
Magnesium chloride	Incompatible	Increase of liposome size and apparition of a second peak Peak 1 = 151.4 +/- 0.71 nm Peak 2 = 2288.05 +/- 2313.17 nm PdI = 0.259 +/- 0.043
Piperacillin and tazobactam	Variable compatibility	
Trimetoprim-sulfamethoxazole	Incompatible	Increase of liposome size 283.2 +/- 17.54 nm PdI = 0.0835 +/- 0.040
Vancomycin	Incompatible	No liposome detected with DLS

Tableau 5: Résumé des observations au DLS après mise en contact du Vyxeos et différentes molécules.

Nous avons retrouvé une incompatibilité physique avec le Vyxeos® pour 7 des molécules testées, et une incompatibilité variable pour 2 de ces molécules. Ces incompatibilités physiques ont été définies par l'observation d'une modification de la taille des particules de Vyxeos® (augmentation ou diminution), par la disparition complète de signal, ou bien par l'apparition d'une population multimodale.

Est-il possible de visualiser ces modifications de tailles, indiquées par le DLS, par une simple mise en contact du Vyxeos® et des molécules étudiées ? Nous avons réalisé cette étude et les résultats vous sont présentés ci-dessous.

3-Analyse au microscope électronique en coloration négative :

L'observation seule du Vyxeos® en solution diluée dans du NaCl (0.9%) est visible sur les images 5 (a, b et c) suivantes à différentes échelles (de 2µm à 200 nm).

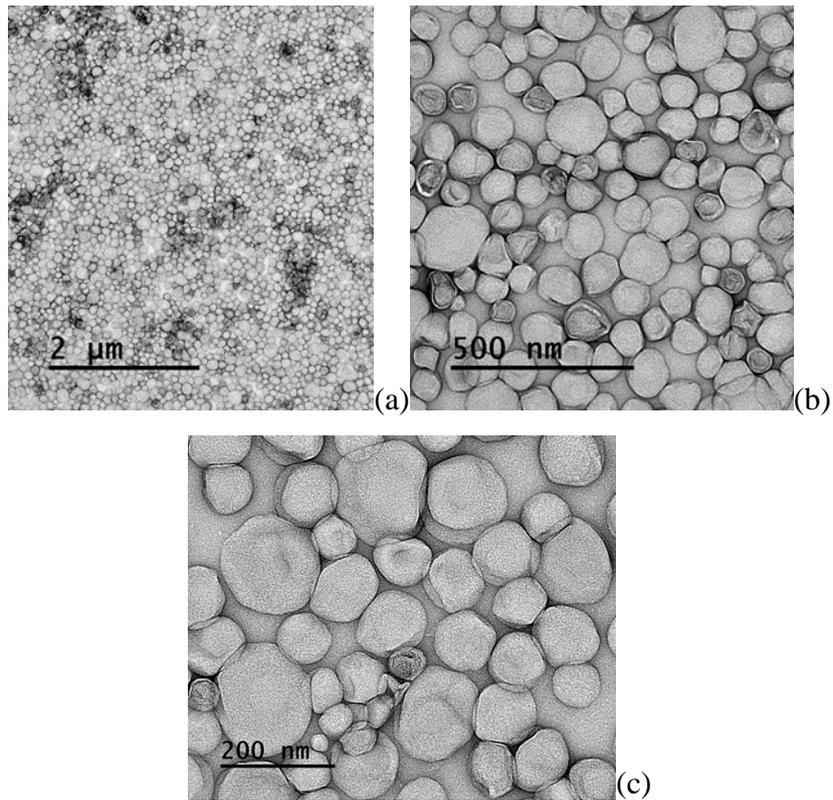
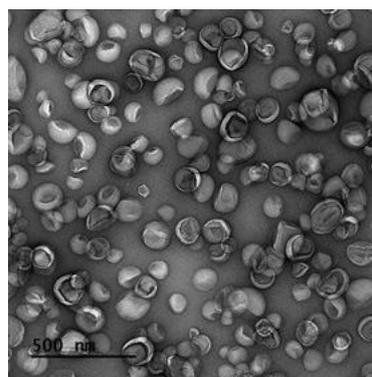
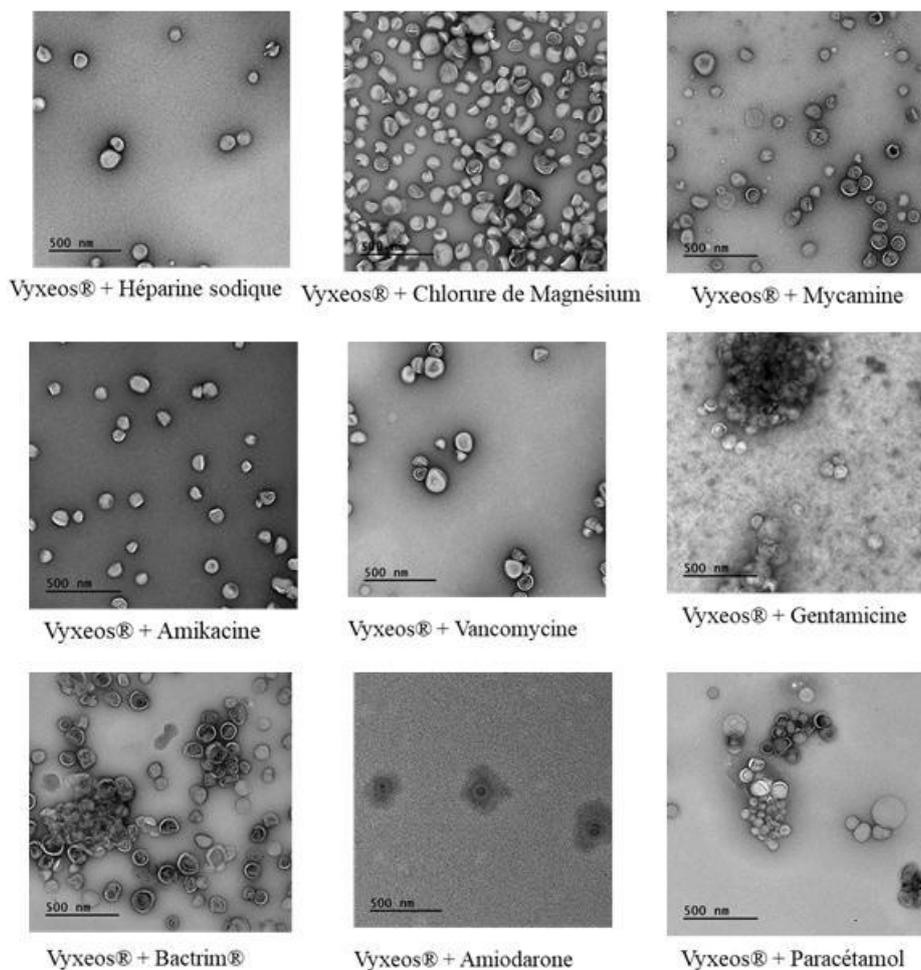


Image 5 : Solution diluée de Vyxeos® observée au microscope électronique en coloration négative à différentes échelles, 2 μ m (a), 500 nm (b) et 200 nm (c).

Les observations faites avec le mélange de solutions diluée de Vyxeos® et certaines molécules compatibles et incompatibles physiquement été réalisées de la même manière, avec une technique de microscopie électronique en coloration négative. Les observations sont les suivantes :



Vyxeos + NaCl 0,9%



Nous observons sur ces photos différents phénomènes physico-chimiques en comparaison avec l'image faite avec la solution de Vyxeos® + NaCl à 0.9%. En effet pour certaines de ces molécules nous constatons soit : une disparition des liposomes de Vyxeos®, comme avec l'Amiodarone et l'Héparine sodique, soit la formation d'un agglomérat de Vyxeos®, comme avec le Bactrim®, la Vancomycine, la Pipéracilline/Tazobactam, Gentamicine ou encore le Paracétamol. Les images faites suite au mélange de Chlorure de magnésium et de Ringer lactate avec la Vyxeos® n'illustrent pas de différence visuelle notable concernant la structure des particules de Vyxeos®.

III Etude pharmacocinétique du Vyxeos® :

Au sein du service d'hématologie de la Conception du Pr Costello, 9 patients ont reçu un traitement par Vyxeos® dans l'indication de l'AMM. L'objectif primaire de cette étude a été de s'intéresser à la pharmacocinétique du Vyxeos® en étudiant les concentrations plasmatiques de la Cytarabine encapsulée et libre. Les objectifs secondaires sont d'étudier l'évolution clinique des patients, la réponse et les toxicités au traitement.

A Matériel et méthode :

1-Etude clinique des patients :

Tout au long de leur hospitalisation, un suivi des patients a été effectué. Nous avons recensé l'ensemble des supports transfusionnels dont les patients ont bénéficié, ainsi que le type et la durée de traitement par un facteur de croissance. De la même manière, la durée du temps d'aplasie a été déterminée. Celle-ci a été définie comme la période de temps durant laquelle le taux de polynucléaires (PNN) du patient était inférieur à 0.5 G/L.

Nous avons recensé l'apparition de toxicités chez ces mêmes patients, ainsi que leur grade (G) selon le CTCAE version 4.0(49).

La réponse au traitement par Vyxeos® est définie comme complète (RC), lorsque le taux de blastes médullaires est inférieur à 5%, absence de blastes avec corps d'Auer, l'absence de blastes extra-médullaires, avec un nombre de polynucléaires neutrophiles, supérieur à 1 G/L, un nombre de plaquettes supérieur à 100 G/L combiné à une indépendance transfusionnelle.

La réponse sera considérée comme intermédiaire (RCi) lorsque tous les critères de la RC seront présents, exceptés une neutropénie et thrombocytopenie résiduelles.

2-Phénotypage de la CDA :

Le phénotypage de la CDA était réalisé avant chaque J1 de cure de traitement par Vyxeos®, afin de pouvoir établir le statut phénotypique du patient concernant cette même enzyme.

Ce phénotypage est réalisé en routine au sein du laboratoire du Pr Ouafik à l'hôpital Nord. Il est basé sur une technique spectrophotométrique et est exprimé en fonction de la quantité de protéines sériques(50).

3-Dosage de la Cytarabine :

Une étude pharmacocinétique de la Cytarabine contenue dans cette nouvelle forme liposomale a été menée. Pour cela, des prélèvements ont été réalisés au J05 de leur cure d'induction. Un tube EDTA a été prélevé aux temps : 90min avant l'administration de la poche du J05 de Vyxeos®, puis T+2H, T+4H, T+6H, T+24H, T+48H, T+72H, T+96H, T+168H après la fin de l'écoulement de cette même poche de chimiothérapie. Un tube EDTA a été récolté pour chaque temps de cinétique et mis 15 minutes à centrifugation à 2500 Tr/min à 25°C. Le plasma récupéré a été conservé, en aliquots de 500µl au congélateur (-20°C) jusqu'au dosage.

La méthode de dosage de la Cytarabine et de son métabolite inactif dans le plasma humain, l'Ara-U, utilisée est la même que précédemment décrite pour l'étude de stabilité du Vyxeos®(43). Le dosage a été réalisé au sein du laboratoire de pharmacocinétique du Pr. Lacarelle, toujours selon des normes Cofrac.

Compte tenu de la formulation liposomale une étape s'avère nécessaire afin de déterminer la PK de la Cytarabine. Nous devons séparer la Cytarabine libre, il s'agit de la Cytarabine relarguée à partir du liposome, de la Cytarabine encapsulée. La fraction dite « totale » sera la somme des concentrations de la fraction libre et encapsulée pour chaque temps de la cinétique. Pour cela une étape d'ultracentrifugation à 6000g pendant 15min à 4°C dans un Vivaspin®. Le dosage est ensuite réalisé sur le plasma des patients.

B Résultats :

9 patients au cours de la période d'étude ont bénéficié d'un traitement par Vyxeos® de février 2019 à janvier 2020 au sein du service d'hématologie du Pr Costello sur l'hôpital de la Conception (APHM). 6 (67%) femmes et 3 (33%) hommes ont été traités. La moyenne d'âge était de 66 ans ± 13 ans, avec une médiane de 71 ans [rang de 37 à 76 ans]. Les caractéristiques des patients sont regroupées dans le tableau ci-dessous (tableau 6) suivant :

Patients		N (%)
Total		9
Moyenne d'âge		66 ± 13 ans
Age médian (rang)		71 (37-76)
Sexe	Homme	3 (33%)
	Femme	6 (67%)
Statut CDA	Déficients (CDA ≤ 2U/mg)	8 (89%)
	Non-Déficients (CDA > 2 U/mg)	1 (11%)
Indications	LAM-MRC	5 (56%)
	LAM-t	4 (44%)
Caryotype	Défavorable	6 (67%)
	Favorable	3 (33%)

Tableau 6 : Caractéristiques des patients traités par Vyxeos®

Tous les patients de cette étude ont reçu à minima une cure d'induction par Vyxeos® à 1 UI/m² pendant 3 jours sans réduction de dose, hormis un patient n'ayant reçu que 2 jours de traitement sur les 3 jours théoriques.

Le dosage de la CDA a été effectué avant la cure d'induction par Vyxeos®. Nous observons une forte proportion de patients déficients, définis par une CDA < 2 UI/mg avec une CDA moyenne de 0.99 ± 0.51 UI/mg, avec une CRP moyenne de 18.3 ± 30.10 mg/ml. Pour notre seul patient non-déficient, son taux d'activité de la CDA était de 5.89 UI/mg avec une CRP de 19.2 mg/ml.

Pour la suite de l'étude, nous allons dissocier 2 groupes de patients, les patients ayant une LAM secondaire au traitement (LAM-t) et ceux ayant une LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies (LAM-MRC).

1-Les besoins transfusionnels et aplasie

Nous avons recensé le nombre de transfusions (culot de globules rouges ainsi que les culots plaquettaires) administrés aux patients au cours de leur cure d'induction en fonction du type de LAM. Nous avons obtenu en moyenne 12 ± 5.94 transfusions administrées pour les patients atteints de LAM-t, et 15.2 ± 6.38 transfusions pour les patients ayant une LAM-MRC. Nous n'observons pas de différence significative concernant le nombre de transfusions administrées entre ces deux populations de patients ($p > 0.05$).

Le nombre de jours d'aplasie a également été relevé. Cette période d'aplasie correspond au temps durant lequel le taux de polynucléaires (PNN) du patient reste inférieur à 0.5 G/L. Les résultats sont présentés sur la figure suivante :

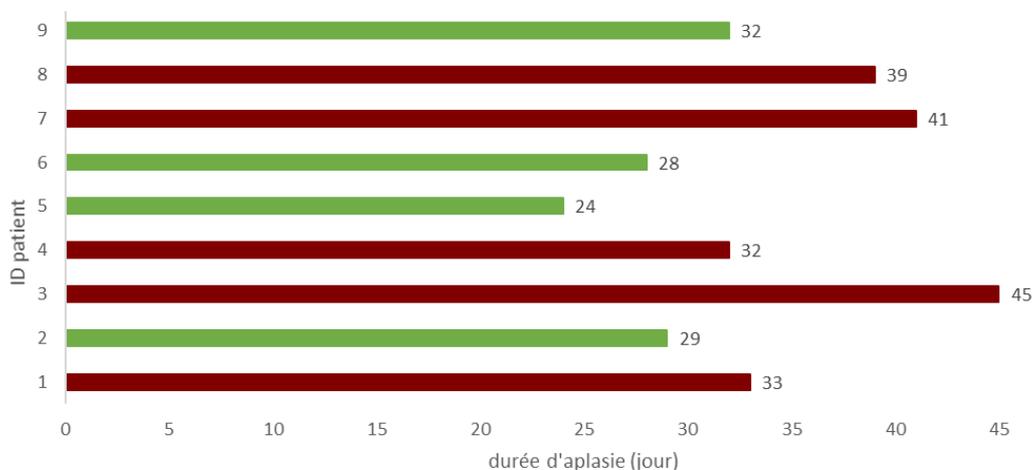


Figure 6 : Représentation des durées d'aplasie chez les patients atteints d'une LAM-t (vert) et les patients atteints de LAM-MRC (bordeaux).

Nous observons concernant les patients avec une LAM-MRC, une durée d'aplasie moyenne de 38 ± 5.48 jours, et concernant les patients avec une LAM-t. Entre ces deux durées d'aplasie il existe une différence statistiquement significative ($p < 0.05$).

Parmi les patients avec une LAM-MRC, 2 patients (N°4, et N°7) ont reçu de la Vancomycine en même temps que leur traitement par Vyxeos®.

La patiente N°6 n'a reçu que 2 jours de traitement d'induction par Vyxeos® pour cause d'une détresse respiratoire nécessitant l'arrêt de l'administration de la chimiothérapie.

2-Les toxicités

Les toxicités majoritairement retrouvées ont été des toxidermies, de type érythème punctiforme, comme les photos ci-dessous :



Image 6 : Photos prises de toxicités cutanées au J11 du traitement (a), au J19 (b) ou encore au J28 (c) de l'induction par Vyxeos®.

Le deuxième type de toxicités retrouvés chez ces patients sont de type hémorragique, avec des rectorragies secondaires à l'apparition d'hémorroïdes. Nous avons aussi retrouvé des nausées, vomissements ainsi que des phénomènes de constipation.

La répartition des différents grades de toxicité en fonction du type de LAM des patients est représentée sur la figure 7 suivante :

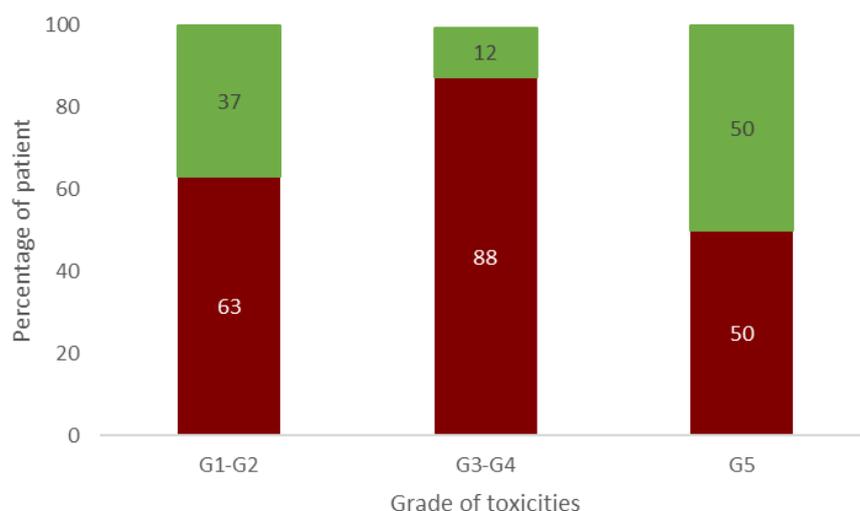


Figure 7 : Histogramme représentant la proportion de toxicité en fonction du grade et du type de LAM des patients, LAM-MRC (bordeaux) et LAM-t (vert).

Nous pouvons constater que la majorité (88%) des toxicités de grade 3-4 (G3-G4) se sont déclarées chez les patients atteints d'une LAM-MRC contre 12% chez les patients atteints de LAM-t. Nous avons observé 2 décès toxiques, répartis dans chaque groupe de patients, qui ont fait l'objet d'une déclaration de pharmacovigilance auprès de l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) N°MA20192390/MA20192390.

3-La réponse au traitement

En ce qui concerne la réponse au traitement, les résultats concernant les 9 patients de notre étude sont illustrés par la figure 8 suivant :

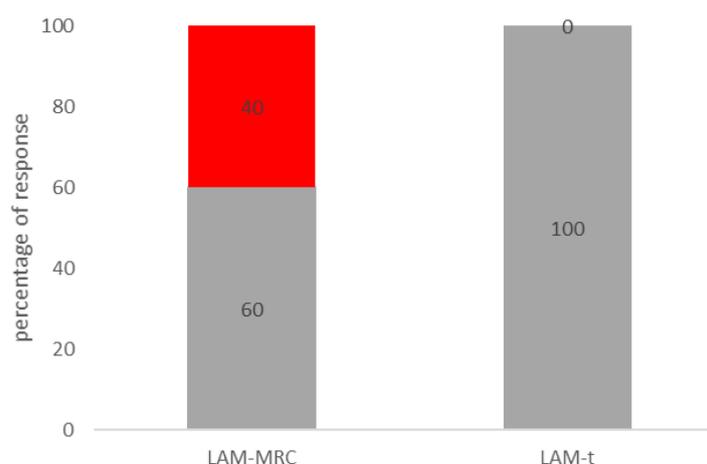


Figure 8 : Histogramme représentant la proportion de réponses post-induction par Vyxeos® en fonction du type de LAM : les RC (gris) et les échecs (rouge).

L'ensemble des patients ayant une LAM-t ont répondu suite à leur cure d'induction par Vyxeos®. On observe 60% de répondeur chez les patients atteints de LAM-MRC ($p=0.5303$).

4-Profil pharmacocinétique de la Cytarabine

Nous avons observé dans le plasma des patients avant ultracentrifugation une coloration violette laquelle étant directement liée au cuivre contenu dans la composition du Vyxeos® et caractéristiques des patients sous Vyxeos®.

L'image 7 ci-dessous, illustre cette coloration :

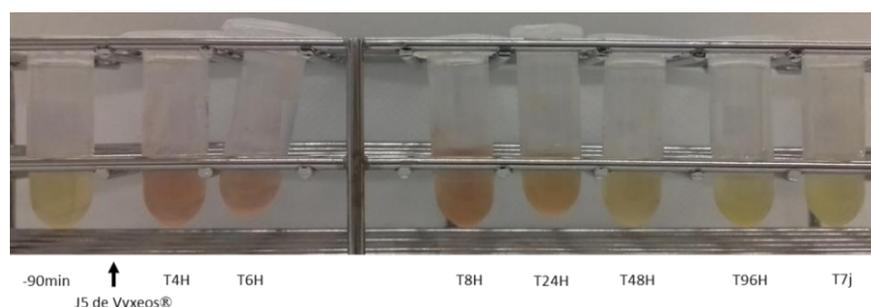


Image7 : Photographie du plasma de patient coloré par le cuivre contenu dans la composition du Vyxeos®

Nous avons présenté en introduction les particularités /les spécificités des formes liposomales vs forme conventionnelle, et mis l'accent sur la modification des profils PK des molécules encapsulées. De manière très cohérente, nous nous sommes donc intéressés à la PK de la Cytarabine lorsque cette dernière est administrée sous forme liposomale. Les analyses ont été faites comme précédemment décrit et on permet de déterminer la PK de la forme libre de la Cytarabine et également celle de la forme encapsulée. Ainsi, nous avons représenté la moyenne des concentrations de Cytarabine libre, encapsulée et totale retrouvées chez nos patients en fonction du type de LAM. Les résultats vous sont présentés sur la figure 9 suivante :

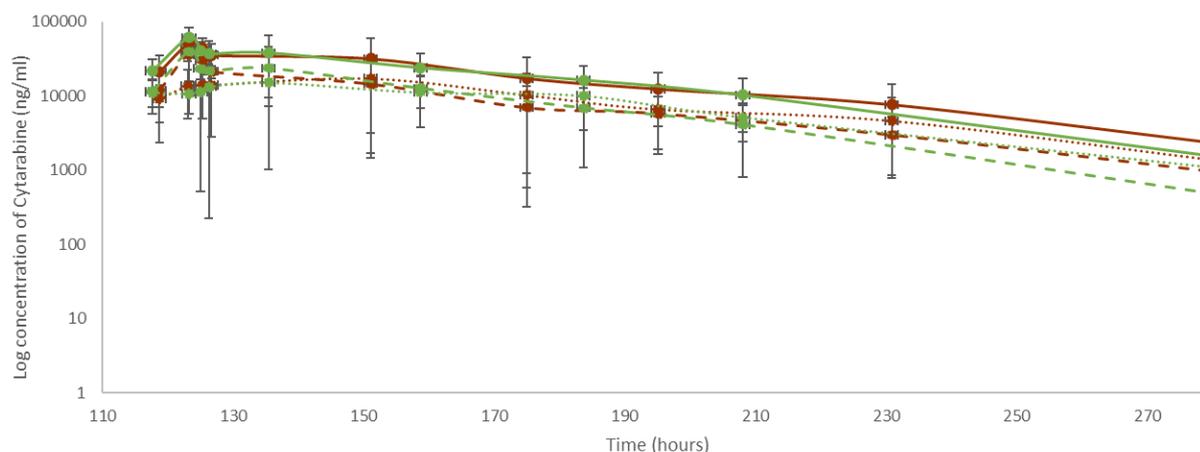


Figure 9 : Concentrations moyenne en Cytarabine totale (courbe traits pleins), libre (courbe pointillée) et encapsulée (courbes petits traits) en fonction du type de LAM : LAM-MRC (bordeaux) et LAM-t (vert).

Les concentrations moyennes retrouvées sont résumées dans les tableaux suivants (tableaux 7 et 8)

Temps (h)	Conc libre	Ecart-type	Conc enca	Ecart-type	Conc total	Ecart-type
118,72	9,09E+03	4,77E+03	1,19E+04	9,48E+03	2,09E+04	1,39E+04
123,04	1,35E+04	8,59E+03	3,59E+04	6,79E+03	4,94E+04	1,39E+04
125,31	1,39E+04	8,96E+03	3,00E+04	7,51E+03	4,39E+04	1,53E+04
126,66	1,40E+04	1,12E+04	2,12E+04	4,16E+03	3,52E+04	1,49E+04
151,06	1,70E+04	1,54E+04	1,44E+04	1,30E+04	3,15E+04	2,83E+04
174,94	1,02E+04	9,87E+03	6,94E+03	6,37E+03	1,71E+04	1,62E+04
195,05	6,55E+03	4,91E+03	5,76E+03	3,86E+03	1,23E+04	8,41E+03
230,84	4,60E+03	4,80E+03	2,98E+03	2,21E+03	7,58E+03	6,72E+03
279,23	1,39E+03	9,59E+02	9,78E+02	4,77E+02	2,37E+03	1,44E+03

Tableau 7 : Valeurs des concentrations moyennes en Cytarabine (fraction libre, encapsulée et totale), en fonction du temps chez des patients atteints de LAM-MRC.

117,65	1,11E+04	5,32E+03	1,15E+04	4,54E+03	2,18E+04	9,06E+03
123,21	1,07E+04	5,08E+03	3,97E+04	2,78E+04	6,10E+04	2,12E+04
124,99	1,12E+04	1,06E+04	2,33E+04	6,46E+03	4,00E+04	1,21E+04
126,29	1,33E+04	1,31E+04	2,14E+04	1,55E+03	3,65E+04	1,72E+04
135,42	1,53E+04	8,00E+03	2,34E+04	2,24E+04	3,77E+04	2,81E+04
158,68	1,12E+04	7,45E+03	1,26E+04	5,71E+03	2,38E+04	1,32E+04
183,65	1,00E+04	6,64E+03	6,89E+03	5,80E+03	1,63E+04	8,98E+03
208,03	5,13E+03	2,75E+03	4,10E+03	3,31E+03	1,02E+04	6,96E+03
279,32	1,09E+03	1,07E+03	4,98E+02	4,35E+02	1,58E+03	7,04E+02

Tableau 8 : Valeurs des concentrations moyennes en Cytarabine (fraction libre, encapsulée et totale), en fonction du temps chez des patients atteints de LAM-t.

Nous observons des concentrations moyennes totale, libre et encapsulée proches concernant les deux types de LAM, avec des écart-types variables. Au sein de notre cohorte, 3 patients ont reçu de la Vancomycine au cours des 5 jours de traitement par Vyxeos®. Nous avons démontré ultérieurement que la Vancomycine est physiquement incompatible avec le Vyxeos®. Nous avons donc calculé la variabilité des concentrations libres de Vyxeos® en excluant ces patients, et nous avons constaté que cette variabilité de concentration est moindre en comparaison aux patients sans administration de Vancomycine pendant les jours de traitement par Vyxeos®.

Ces résultats sont similaires des valeurs que nous pouvons retrouver dans la littérature, figure 10

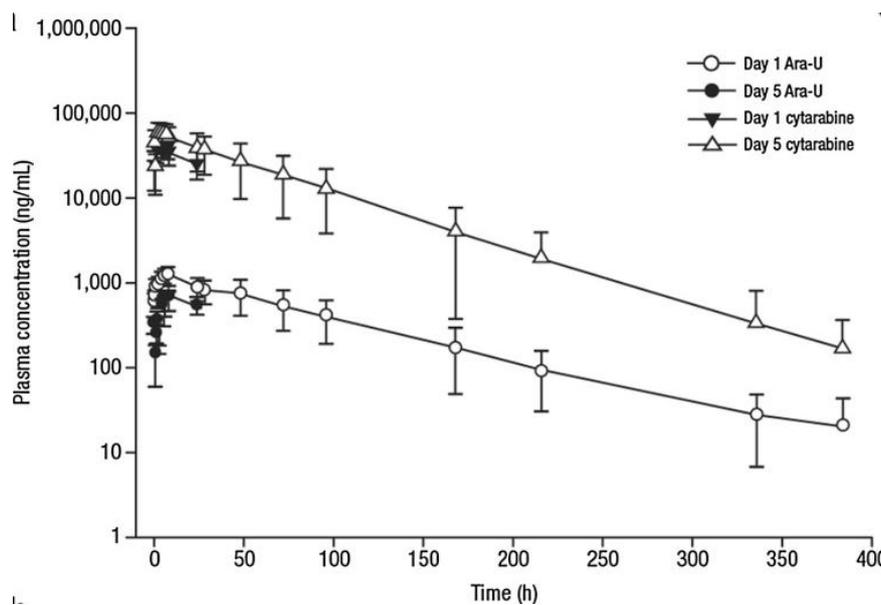


Figure 10 : Concentrations plasmatique de la Cytarabine et de son métabolite (Ara-U) totale à différents jours de traitement (jour 1 et 5) (51).

Nous avons représenté l'exposition plasmatique (AUC ou aire sous courbe) moyenne de la Cytarabine des différentes fractions : libre, encapsulée et totale en fonction du type de LAM des patients. Les résultats sont illustrés sur la figure 11 suivante :

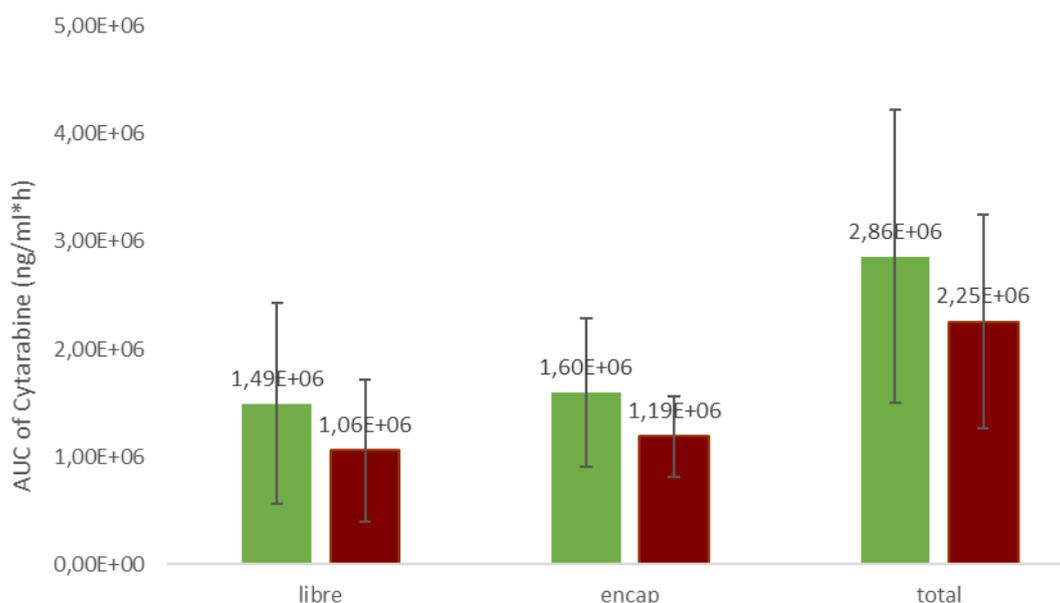


Figure 11 : Histogrammes représentant l'AUC en Cytarabine libre, encapsulée et totale en fonction du type de LAM : LAM-MRC (bordeaux) et LAM-t (vert).

Nous n'observons pas de différence significative entre les AUC moyens concernant les trois fractions, entre les patients LAM-MRC ou LAM-t ($p > 0.05$).

La CDA faisant partie d'une des thématiques majeure de notre équipe de recherche, nous avons décidé de nous intéresser à l'impact que pourrait avoir la CDA sur les profils cinétiques de la Cytarabine au sein du Vyxeos®. De la même manière, nous avons réalisés les profils pharmacocinétiques des fractions libres, encapsulée et totale de la Cytarabine mais cette fois, en fonction du statut CDA du patient. Pour rappel, les patients ayant une $CDA \leq 2$ UI/mg sont considérés comme déficients et ceux ayant un taux de $CDA > 2$ UI/mg sont non-déficients CDA.

Les résultats observés, vous sont présentés sur la figure 11 suivante :

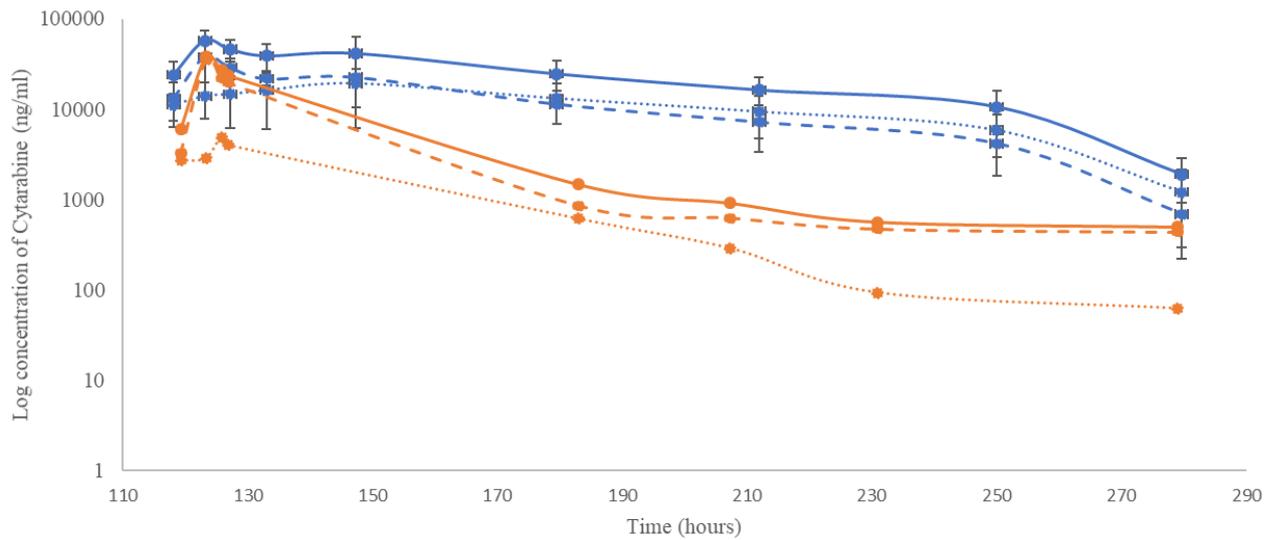


Figure 12 : Représentation des concentrations moyennes de Cytarabine libre (courbe en pointillé), encapsulée (petits traits) et totale (trait plein), en fonction du statut CDA des patients : en orange le patient non-déficient et en bleu les patients déficients.

Nous observons une différence entre les patients déficients et non-déficient pour les concentrations libres et encapsulées, et par conséquent totales. Les patients déficients en CDA semblent être plus exposés à la Cytarabine que le patient non déficient et ce pour une période de 7 jours.

Nous avons aussi représenté l'exposition plasmatique (AUC ou aire sous courbe) moyenne de la Cytarabine des différentes fractions en fonction du statut CDA des patients. Les résultats sont illustrés sur la figure suivante :

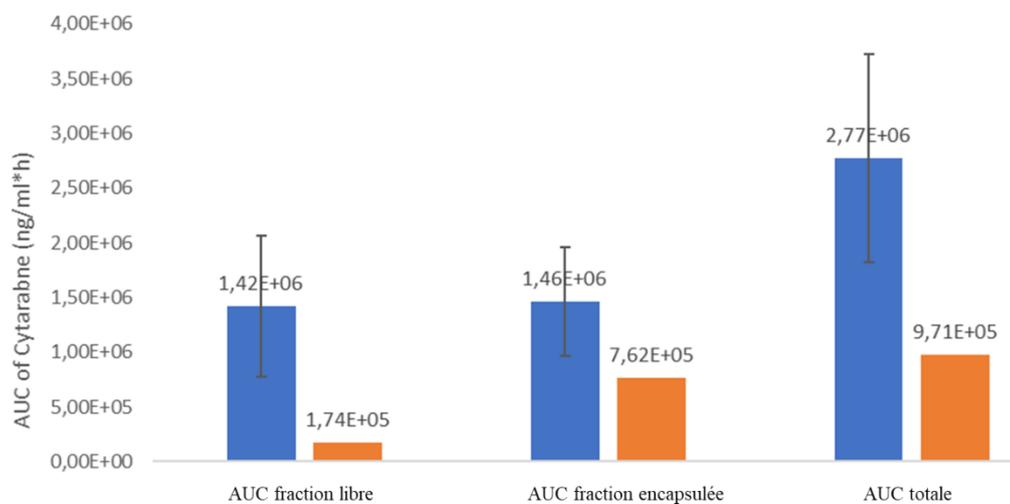


Figure 13 : Représentation des AUC des fractions libres, encapsulées et totales de la Cytarabine en fonction du statut CDA du patient.

Nous pouvons constater que les patients déficients en CDA ont une exposition plasmatique à la Cytarabine plus importante que le patient non déficient, et ce, concernant les 3 fractions étudiées. Cependant, nous notons une différence moins importante entre l'exposition plasmatique en Cytarabine fraction libre et fraction encapsulée chez les patients déficients que chez le patient non-déficient.

La modification des paramètres pharmacocinétiques engendrée par cette nouvelle forme liposomale nous a été mentionnée dans le tableau 2. Mais quand est-il chez le patient ? Pour répondre à cette question, nous avons comparé les profils PK de la Cytarabine entre les patients traités par une induction de Vyxeos® et ceux par une induction standard « 7+3 », avec de la Cytarabine à 200 mg/m²/j pendant 7 jours. Les résultats sont présentés sur la figure 14.

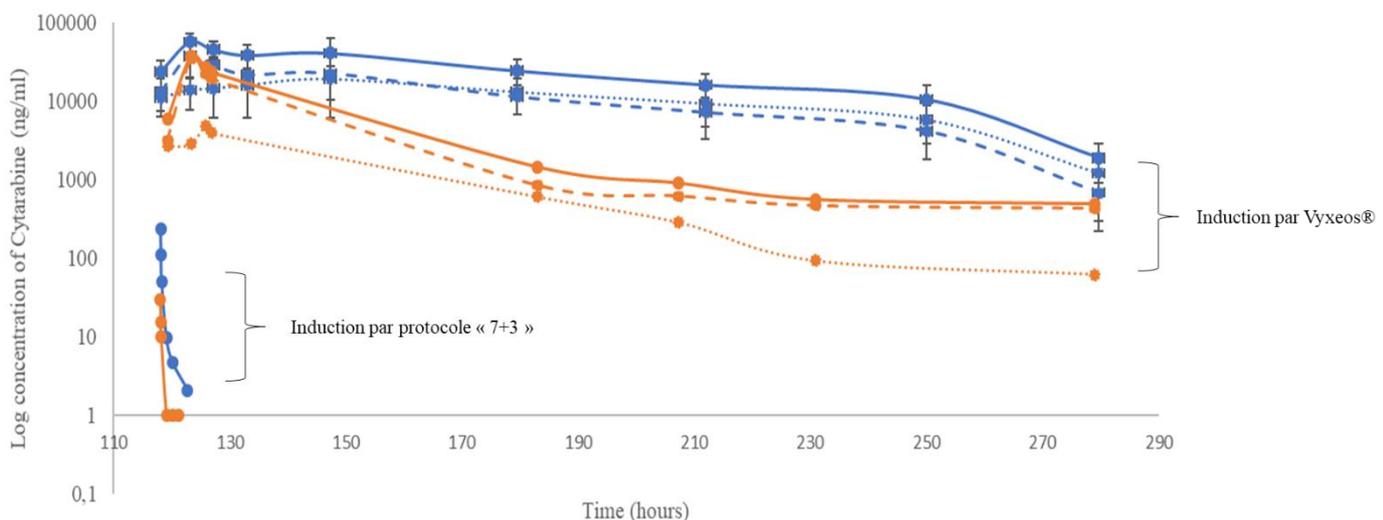


Figure 14 : Comparaison des profils pharmacocinétiques entre une induction par Vyxeos® ou par le protocole standard « 7+3 » en dissociant les patients déficients en CDA (en bleu), et les non-déficients (en orange).

La différence de profil PK est flagrante entre les deux types d'induction, ces courbes confirment non seulement les données de la littérature mais également les connaissances acquises quant au bénéfice des formes vectorielles dans la modification des profils PK.

PARTIE V : Discussions et perspectives

Depuis plus de 40 ans la Cytarabine est utilisée dans le traitement des LAM. Le protocole « 7+3 » reste le protocole standard international de première ligne de prise en charge de la LAM(26). De nombreuses études (Mylotarg®) évaluent actuellement des alternatives possibles à ce schéma parmi lesquels le Vyxeos®. Ces alternatives demeurent pour autant toutes centrées sur la Cytarabine qui reste la molécule clef dans le traitement des LAM.

En 2018 le Vyxeos® a fait son apparition en France. Cette formulation innovante a permis d'associer la Cytarabine et la Daunorubicine ensemble au sein d'un liposome. Cette nouvelle molécule est donc venue, certes dans des indications bien spécifiques, concurrencer le protocole standard « 7+3 »(33)(34).

En effet, avec cette nouvelle formulation, le Vyxeos® confère aux molécules encapsulées en son sein des propriétés tout autre. Le Vyxeos® est décrit comme comportant un tropisme pour la MO(38). Ce tropisme permettrait aux molécules encapsulées au sein du liposome d'avoir une activité ciblée comparativement au schéma standard de traitement d'induction. Cette activité ciblée permettrait de réduire les toxicités majeures qui accompagnent les cures d'induction et qui peuvent parfois être fatales. Nous avons observé la présence de Vyxeos® sur les lames de MO au J15 des patients traités à l'APHM, avec une accumulation des particules de Vyxeos® autour des macrophages. Nous ne pouvons toutefois pas conclure sur le tropisme du Vyxeos® dans la MO sur cette simple observation microscopique. En effet, nous ne savons pas si la présence du Vyxeos® est due à ce tropisme ou à une concentration plasmatique très élevée voire saturante permettant ce passage au sein de la MO.

Concernant la structure du Vyxeos®, celui-ci fait partie des nanomédicaments dits de première génération (liposome). La taille des particules décrite est de 107nm(44). Nous avons réalisé cette mesure sur une solution diluée de Vyxeos® au DLS, au cours du temps. Au cours de cette étude de stabilité de T0 à T120h, les tailles que nous avons retrouvées pour la solution diluée de Vyxeos® au sein des poches PVC (117.73 ± 1.89), ainsi que celles contenues dans les flacons en verre (119.1 ± 4.30) possédaient une différence de taille minimale en comparaison à celle décrite dans la littérature. De plus, la variation de la taille des particules que nous avons mesurées au cours du temps n'étaient pas significativement différentes entre le T0 et la fin de l'analyse T120H quel que soit le contenant concernant les poches PVC ainsi que les flacons en verre. En revanche, nous constatons des fluctuations plus importantes du PDI au sein des poches PVC, même si ce dernier demeure inférieur à 0.2, ce qui pourrait se

traduire par un début de déstabilisation. Ce qui a terme pourrait avoir un impact sur le ratio fraction libre et fraction encapsulée. En dépit de cette différence de taille en comparaison à celle décrite dans la littérature, nous pouvons dire que la structure des particules de Vyxeos® dans le temps reste stable et unimodale, au moins pendant 120H quel que soit le contenant.

Le laboratoire commercialisant le Vyxeos® décrit une stabilité de la solution reconstituée dans le flacon et de la solution diluée pour perfusion pour une durée de 4 heures(7). Nous avons dosé la Cytarabine dans les poches de PVC et les flacons en verre à des temps définis, et ce sur une durée de 120H. Concernant la solution diluée pour perfusion dans les poches PVC, nous n'avons pas retrouvé de différence significative concernant les concentrations en Cytarabine totale en comparaison à celle que nous aurions dû retrouver théoriquement sur une durée de 8H. La concentration moyenne de Cytarabine totale mesurée dans les flacons en verre n'est pas significativement différente de celle théoriquement retrouvée et ce, pour une durée de 72H.

Actuellement au sein de l'APHM, la fabrication des poches de Vyxeos® pour perfusion se fait en « décalage » des autres poches de chimiothérapie comportant des durées de stabilité connues et plus longues, permettant, suite à la fabrication, le transit immédiat de la poche : du site de fabrication au service pour l'administration au patient. Suite aux dosages réalisés au sein de notre équipe, il semblerait que la durée de stabilité du Vyxeos® dans les poches en PVC soit le double que celle annoncée. Ces données pourraient permettre de rendre la durée du processus de fabrication et d'administration moins drastique. De plus, à l'heure actuelle, lorsque la solution reconstituée dans le flacon est faite, les reliquats sont détruits, ce qui engendre pour le séjour d'un patient une perte d'argent financière non négligeable compte tenu du coût du flacon 3600 euros. Pourtant, nous avons aussi mis en évidence le fait que la solution reconstituée dans le flacon de Vyxeos® garde une concentration totale en Cytarabine stable au moins 72 heures. Le schéma thérapeutique d'administration du Vyxeos® se faisant au J1, J3 et J5 pour le traitement d'induction, il semblerait possible de conserver le reliquat, afin de l'utiliser pour la fabrication de la poche du jour de traitement suivant, et ainsi faire des économies. Une recommandation que l'on pourrait alors faire serait de conserver le Vyxeos dans des contenant en verre afin d'assurer une durée de stabilité longue et ainsi d'éviter des destructions du produit inutile.

Cependant nous allons pour l'heure modérer notre propos, en effet n'ayant pas encore réalisé les études concernant les variations de la concentration totale en Daunorubicine, et sans cette

étude, il n'est pas envisageable pour le moment de conclure sur une utilisation d'un reliquat de flacon ou même de la stabilité de la poche sur une durée de plus de 4h.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à la compatibilité physicochimique de la solution de Vyxeos®. Actuellement, il n'y a pas de donnée existante concernant les incompatibilités relatives à l'administration par voie intra-veineuse du Vyxeos®. Seules des incompatibilités dans la littérature pour la Cytarabine et la Daunorubicine sont décrites (46)(47).

Le laboratoire recommande que le Vyxeos® soit administré seul, pendant une durée d'administration de 90min. (7) Pour cette étude, nous nous sommes focalisés sur les molécules les plus prescrites au sein du service d'hématologie de la Conception (45). Parmi les 33 molécules testées nous avons retrouvé 7 molécules incompatibles et 2 pour lesquelles nous avons obtenu des incompatibilités variables. Dans la plupart des cas, concernant les molécules incompatibles, nous avons observé visuellement l'apparition de précipités. Au DLS, nous avons observé soit une augmentation de la taille (décalage du pic vers la droite), parfois même une diminution (décalage du pic vers la gauche), ou encore une disparition de celui-ci (plus de particule détectée). Ces résultats ont été confrontés aux observations faites après coloration négative et visualisation au microscope électronique. La variation concernant la taille des particules pouvait se traduire visuellement par la formation d'un agglomérat de particules de Vyxeos® comme avec le Bactrim®. Nous avons aussi observé des incohérences entre l'observation visuelle, au DLS et au microscope électronique comme avec le Paracétamol par exemple. Toutes ces informations renforcent l'importance de respecter les recommandations d'administration du Vyxeos®, ainsi que l'importance du rinçage de la tubulure en fin d'administration. La question se pose concernant les molécules administrées en IV continue telle que la Vancomycine. En effet, les patients disposent souvent d'une seule voie d'administration, cependant aux vues des résultats présentés précédemment, et du RCP du Vyxeos®, il est impossible d'administrer les 2 molécules simultanément. Alors, faut-il arrêter l'administration de la Vancomycine durant celle du Vyxeos® ou encore administrer le Vyxeos® sur une voie qui lui est réservée ? En pratique toutes ces questions font parties d'une problématique difficile à gérer au sein d'un service. De plus, il reste à définir l'impact de la modification de la structure du Vyxeos® sur l'effet thérapeutique retrouvé. En tant que pharmacien nous pourrions proposer des alternatives thérapeutiques, avec par exemple un switch de la Vancomycine par le Zyvoxid®, mais cette étude mériterait d'être complétée afin d'avoir si possible une alternative thérapeutique à proposer au clinicien en fonction des

molécules incontournables à la prise en charge du patient, avec des modèles in vitro par exemple.

Le dernier versant de l'étude concernait le profil pharmacocinétique de la Cytarabine contenue dans le Vyxeos®. Entre janvier 2019 et janvier 2020, 9 patients ont été traités par cette nouvelle formulation au sein du service d'hématologie de la Conception. Ces patients ont été différenciés en fonction du type de LAM : LAM-MRC ou LAM-t. Nous n'avons pas observé de différence concernant les besoins transfusionnels entre ces deux groupes. Cependant, concernant la durée d'aplasie, les patients atteints de LAM-MRC, sembleraient mettre plus de temps à retrouver un taux de PNN > 0.5 G/L. Nous avons observé des toxicités cutanées dans la plupart des cas, mais aussi des saignements de type rectorragie, secondaire à l'apparition d'hémorroïdes, ou encore des infections (pulmonaires le plus souvent). Ces toxicités cutanées sont retrouvées et décrites lors du traitement d'induction avec un schéma standard « 7+3 ». Cependant, nous observons plus de toxicités digestives (mucites, diarrhées, vomissement) avec une induction standard « 7+3 ». Pourtant les données de la littérature démontrent que les toxicités de grade 3 à 5 étaient similaires entre les deux groupes (Vyxeos vs schéma « 7+3 »), à la différence que pour la Daunorubicine et la Cytarabine sous forme liposomale, ont été observés une cytopénie prolongée et un risque d'hémorragie élevé (36). Le Vyxeos® de par sa formulation innovante semble protéger le tractus digestif en comparaison au schéma « 7+3 ». Les patients bénéficiant dans la suite de leur prise en charge d'une allogreffe suite au traitement par Vyxeos®, ont vu leur mortalité à 30 et 60 jours diminuer par rapport au protocole « 7+3 » (36) Ce constat pourrait être traduit par l'hypothèse que cette nouvelle formulation préserverait la flore intestinale et de ce fait pourrait préserver l'immunité, mais ces hypothèses restent à être confirmées. 100% de nos patients atteints d'une LAM-t ont obtenu une réponse complète à la suite du traitement d'induction et ont bénéficié d'une cure de consolidation, contre 60% avec une LAM-MRC. L'essai de Phase III a montré que le Vyxeos® améliorait la survie globale (OS : 9.56 vs 5.96 mois) et le taux de réponse (RC+RCi : 48% vs 33%) avec une toxicité tolérable en comparaison au schéma d'induction standard (52). Il est toutefois important de noter que dans cette étude la dose administrée de Cytarabine est de 100 mg/m²/j pendant 7 jours pour leur protocole standard, alors qu'en France, notre dose de Cytarabine standard administrée est de 200 mg/m²/j. C'est pourquoi ces données ne sont pas superposables aux données françaises.

Concernant les profils pharmacocinétiques de la Cytarabine, nous n'avons pas observé de différences marquantes selon le type de LAM. Ces profils ressemblaient à ceux décrits dans la

littérature (51), du moins concernant la concentration totale en Cytarabine. En effet, nous n'avons pas trouvé de données exposant les cinétiques des fractions libres et encapsulées de Cytarabine après administration de Vyxeos® chez les patients. L'exposition plasmatique calculée n'était significativement pas différente concernant les 2 fractions étudiées, et ce dépendamment des 2 types de LAM. Serait-il possible d'identifier des co-variables modifiant le profil PK du Vyxeos®, comme le statut immunitaire sur la PK de la forme vectorielle.

Le constat est tout autre concernant l'impact de la CDA sur le profil PK du Vyxeos®. En effet, il semblerait que les patients déficients soient plus exposés en Cytarabine, et ce pour toutes ses formes, avec entre autres, une surexposition à la fraction libre, pouvant être la cause de survenue de toxicités. Malheureusement, par manque de patient (1 seul patient non-déficient), nous ne pouvons pas conclure statistiquement sur cette observation. Le constat de l'impact du statut CDA sur le risque de survenue de toxicité a déjà été montré au sein de notre équipe, par une étude portant sur des patients atteints de LAM traités par Cytarabine, schéma « 7+3 »(24). Il semblerait, aux vues de ces premiers résultats que le profil PK de la Cytarabine du Vyxeos® puisse aussi être impacté par ce statut CDA. Ce constat ne semblerait pas si surprenant, compte tenu de la forme liposomale (de première génération) du Vyxeos®, avec un captage hépatique, et le fait que la CDA soit, certes ubiquitaire, mais avec une activité au sein du foie importante.

La problématique majeure que rencontre actuellement le Vyxeos® réside dans son prix. En effet, le laboratoire n'a pas obtenu de remboursement en sus de sa molécule (ASMR IV), ce qui impact fortement les dépenses du service directement et limite de fait la prescription. De plus, le Vyxeos® augmente la durée d'aplasie des patients et par conséquent le séjour du patient (et ce pour un montant de groupe homogène de séjour GHS inchangé induction de LAM) ce qui engendre également un coût supplémentaire direct : pour le séjour du patient et indirect avec moins de patient pris en charge sur une même période. Afin de le prescrire au sein de l'APHM, le Vyxeos® nécessite une demande au préalable auprès des autorités compétentes, le Comité de Sécurisation des Produits de Santé (COSEPS) de l'institution.

Pour conclure, le Vyxeos® est une forme liposomale qui est structurellement très stable dans le temps. Le type de contenant peut influencer sa stabilité, ainsi que la co-administration d'autres molécules, avec tout un travail qu'il reste à faire sur l'impact de l'effet thérapeutique que peut engendrer la déstabilisation de cette forme liposomale. Grâce à cette formulation, le laboratoire a su optimiser les paramètres PK de la Cytarabine et ce pour une dose moindre (réduction de 50%), en comparaison au schéma standard « 7+3 ». Ce point est essentiel d'un

point de vue thérapeutique mais également au plan de la recherche compte tenu de la difficulté pour ces nanomédicaments de voir le jour. Cependant, au vu du caractère innovant de cette molécule de nombreuses questions émergent : avec notamment la compréhension de son tropisme médullaire, l'étude de sa PK au sens large, basée sur les concentrations plasmatiques de Cytarabine et de Daunorubicine, avec une question qui demeure, le schéma tel que désigné actuellement est-il optimal ? En effet, nous avons montré le niveau de surexposition des patients après traitement par Vyxeos vs Cytarabine conventionnelle (170 fois plus). Enfin, pour notre équipe de recherche, la question du rôle et de l'impact du statut CDA chez les patients traités par Vyxeos® demeure, au vu du très faible nombre de patient non déficient dans cette cohorte de patient.

Je suis heureuse d'avoir eu l'opportunité de travailler sur un nouveau médicament, le Vyxeos®, comportant une formulation innovante, indiqué dans une pathologie au pronostic sombre, où l'enjeu est bien réel. Ces travaux m'ont permis de m'apercevoir que de nombreuses questions demeurent encore en suspens, mais aussi de rencontrer de nombreuses équipes (cliniciens, pharmaciens, et biologistes), qui m'ont offert une très belle opportunité de travail.

BIBLIOGRAPHIE :

1. Narayanan D, Weinberg OK. How I investigate acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2019 Dec 10;
2. Hematopathology - 2nd Edition [Internet]. [cited 2019 Dec 20]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/hematopathology/jaffe/978-0-323-29613-7>
3. Murphy T, Yee KWL. Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert Opin Pharmacother*. 2017 Nov;18(16):1765–80.
4. Luger SM. How can one optimize induction therapy in AML? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2017;30(4):301–5.
5. Saygin C, Carraway HE. Emerging therapies for acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2017 18;10(1):93.
6. Emerging drug profile: CPX-351 (vyxeos) in AML. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31547736>
7. VYXEOS 44 mg/100 mg poudre pour solution à diluer pour perfusion - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cited 2019 Dec 21]. Available from: <https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/ATU-arretees/Liste-des-ATU-arretees/VYXEOS-44-mg-100-mg-poudre-pour-solution-a-diluer-pour-perfusion>
8. VYXEOS [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cited 2020 Jan 6]. Available from: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2910492/fr/vyxeos
9. Advances in treatment formulations for acute myeloid leukemia. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29870791>
10. Feldman EJ, Kolitz JE, Trang JM, Liboiron BD, Swenson CE, Chiarella MT, et al. Pharmacokinetics of CPX-351; a nano-scale liposomal fixed molar ratio formulation of cytarabine:daunorubicin, in patients with advanced leukemia. *Leuk Res*. 2012 Oct;36(10):1283–9.
11. Lancet JE, Uy GL, Cortes JE, Newell LF, Lin TL, Ritchie EK, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2018 10;36(26):2684–92.
12. [cited 2019 Dec 20]. Available from: <http://sfh.hematologie.net/intra01/fic/actualites/R%E9f%E9rentielsSFHEdit.Nov.06.pdf>
13. Godwin JE, Smith SE. Acute myeloid leukemia in the older patient. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003 Oct 15;48(Suppl):S17–26.
14. Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011 Feb 10;29(5):487–94.

15. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cited 2019 Dec 21]. Available from: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/hematologie-et-pathologie-generale/28-leucemies-aigues-myeloides>
16. [cited 2019 Dec 21]. Available from: <http://www.antalvite.fr/pdf/SCORE%20OMS.pdf>
17. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010 Jan 21;115(3):453–74.
18. Résumé des caractéristiques du produit - CYTARABINE ACCORD 100 mg/ml, solution injectable ou pour perfusion - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cited 2019 Dec 20]. Available from: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/affichageDoc.php?specid=63318475&typedoc=R>
19. VIDAL - Cytarabine [Internet]. [cited 2019 Dec 20]. Available from: <https://www.vidal.fr/substances/1167/cytarabine/>
20. Cytarabine. In: Wikipédia [Internet]. 2020. Available from: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Cytarabine&oldid=165970179>
21. Navaratnam N, Sarwar R. An overview of cytidine deaminases. *Int J Hematol*. 2006 Apr;83(3):195–200.
22. Steuart CD, Burke PJ. Cytidine deaminase and the development of resistance to arabinosyl cytosine. *Nature New Biol*. 1971 Sep 22;233(38):109–10.
23. Momparler RL, Onetto N, Momparler LF, Gyger M, Leclerc JM, Rivard GE. Drug sensitivity test for patients with acute leukemia on high-dose ara-C therapy. *Semin Oncol*. 1985 Jun;12(2 Suppl 3):31–3.
24. CDA as a predictive marker for life-threatening toxicities in patients with AML treated with cytarabine. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29490977>
25. VIDAL - Anthracyclines et apparentés : intercalants : Classification Vidal [Internet]. [cited 2019 Dec 20]. Available from: <https://www.vidal.fr/classifications/vidal/c:304/n:Anthracyclines%2Bet%2Bapparent%25C3%25A9s%2B%253A%2Bintercalants/>
26. Bertoli S, Récher C. Nouvelles approches thérapeutiques dans les leucémies aiguës myéloïdes. *Rev Francoph Lab*. 2015 Apr 1;2015(471):65–73.
27. Gardin C, Chevret S, Pautas C, Turlure P, Raffoux E, Thomas X, et al. Superior long-term outcome with idarubicin compared with high-dose daunorubicin in patients with acute myeloid leukemia age 50 years and older. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Jan 20;31(3):321–7.
28. [cited 2019 Dec 21]. Available from: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/plan_2017-2021_pour_la_greffe_de_cellules_souches_hematopietiques.pdf

29. A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m² vs 60 mg/m² in AML induction: results from the UK NCRI AML17 trial in 1206 patients. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A+randomized+comparison+of+daunorubicin+90+mg%2Fm2+vs+60+mg%2Fm2+in+AML+induction%3A+results+from+the+UK+NCRI+AML17+trial+in+1206+patients>
30. [cited 2020 Jan 8]. Available from: <http://www2.cnrs.fr/sites/communique/fichier/07pcouvreur.pdf>
31. Semple SC, Chonn A, Cullis PR. Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. *Biochemistry (Mosc)*. 1996 Feb 27;35(8):2521–5.
32. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1763060>
33. Tolcher AW, Mayer LD. Improving combination cancer therapy: the CombiPlex® development platform. *Future Oncol Lond Engl*. 2018 Jun;14(13):1317–32.
34. Brunetti C, Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Albano F. CPX-351 in acute myeloid leukemia: can a new formulation maximize the efficacy of old compounds? *Expert Rev Hematol*. 2017;10(10):853–62.
35. [cited 2019 Dec 20]. Available from: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2018/20180823141901/anx_141901_fr.pdf
36. Kim M, Williams S. Daunorubicin and Cytarabine Liposome in Newly Diagnosed Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia (AML) or AML With Myelodysplasia-Related Changes. *Ann Pharmacother*. 2018;52(8):792–800.
37. Preparation & Administration | VYXEOS® (daunorubicin and cytarabine) [Internet]. [cited 2019 Dec 20]. Available from: <https://vyxeospro.com/dosing-ordering/preparation/>
38. Anonymous. Vyxeos liposomal (previously known as Vyxeos) [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cited 2019 Dec 20]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vyxeos-liposomal>
39. VYXEOS® Mechanism of Delivery – Secondary AML Treatment | VYXEOS® (daunorubicin and cytarabine) HCP [Internet]. [cited 2020 Jan 14]. Available from: <https://vyxeospro.com/mechanism-of-delivery/>
40. Bernard L, Eljezi T, Clauson H, Lambert C, Bouattour Y, Chennell P, et al. Effects of flow rate on the migration of different plasticizers from PVC infusion medical devices. *PloS One*. 2018;13(2):e0192369.
41. Référence 146706 - Concentrateur 5000 Daltons Vivaspin 6 - Dominique DUTSCHER - Matériel de laboratoire [Internet]. [cited 2020 Jan 9]. Available from: <https://www.dutscher.com/frontoffice/article/146706>

42. Manaia EB, Abuçafy MP, Chiari-Andréo BG, Silva BL, Oshiro Junior JA, Chiavacci LA. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:4991–5011.
43. Donnette M, Solas C, Giocanti M, Venton G, Farnault L, Berda-Haddad Y, et al. Simultaneous determination of cytosine arabinoside and its metabolite uracil arabinoside in human plasma by LC-MS/MS: Application to pharmacokinetics-pharmacogenetics pilot study in AML patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019 Sep 15;1126-1127:121770.
44. Dicko A, Kwak S, Frazier AA, Mayer LD, Liboiron BD. Biophysical characterization of a liposomal formulation of cytarabine and daunorubicin. *Int J Pharm*. 2010 May 31;391(1-2):248–59.
45. Sicard G, Venton G, Farnault L, Costello R, Fanciullino R, Gensollen S. Mise en place d'un outil d'aide à la détection des interactions physico-chimiques en Y des médicaments injectables : analyse rétrospective des prescriptions dans un service d'hématologie. *Pharm Hosp Clin*. 2019 Dec 1;54(4):348–55.
46. Chan P, Heatherly K, Kupiec TC, Trissel LA. Compatibility of caspofungin acetate injection with other drugs simulated y-site coadministration. *Int J Pharm Compd*. 2008 Jun;12(3):276–8.
47. King Guide IV Drug Compatibility Wall Charts [Internet]. [cited 2019 Dec 20]. Available from: <http://kingguide.com/charts.html>
48. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Dec 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28761340>
49. [cited 2020 Jan 10]. Available from: https://www.eortc.be/services/doc/ctc/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf
50. Peters GJ, Honeywell RJ, Maulandi M, Giovannetti E, Losekoot N, Etienne-Grimaldi M-C, et al. Selection of the best blood compartment to measure cytidine deaminase activity to stratify for optimal gemcitabine or cytarabine treatment. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2014;33(4-6):403–12.
51. Lin TL, Newell LF, Stuart RK, Michaelis LC, Rubenstein E, Pentikis HS, et al. A phase 2 study to assess the pharmacokinetics and pharmacodynamics of CPX-351 and its effects on cardiac repolarization in patients with acute leukemias. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2019 Jul;84(1):163–73.
52. Faderl S, Cortes JE, Ritchie EK, Ryan RJ, Chiarella M, Schiller GJ. Outcomes in Older Adults with Newly Diagnosed, High-Risk/Secondary Acute Myeloid Leukemia (AML) Who Achieved Remission with CPX-351 Versus 7+3 Induction: Exploratory Analysis of a Phase 3 Study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019 Sep 1;19:S206–7.

ANNEXES :

Annexe 1 : Protocole de dosage de la Cytarabine en LC-MS/MS

1) Echantillons:

- Avant analyse : les tubes de plasma sont conservés dans le C14 à -35°C au fond du couloir. Prendre la quantité de plasma suffisant pour la manipulation.
- Les aliquots de ARA-C et ARA-U à 1 mg/ml sont conservés dans la laverie dans le congélateur à -80°C.
- Les aliquots de la gamme sont conservés dans la laverie dans le congélateur à -80°C.

2) Réactifs:

- Phase mobile : H₂O MilliQ à 0.05%ml d'acide formique.
- Phase organique : Méthanol pour LCMS à 0.05%ml d'acide formique.
- Phase de rinçage : H₂O MilliQ/méthanol
- Solution de précipitation avec étalon interne (EI) : conservation 3 mois dans le R26 (frigo dans le laboratoire de Madeleine) : 10 µL de la solution à 100 ng/µL de Maraviroc D6 QSP 100 ml d'acétonitrile.

3) Méthodologie :

3-1) Obtention des solutions filles : (faire 4 Sf pour l'ARA-C et 2 Sf pour l'ARA-U pour les points de gamme, et 4 Sf pour l'ARA-C et 2 Sf pour l'ARA-U pour les Cqs. Cette dernière sera effectuée sur une autre paillasse avec des µpipettes contrôlées)

3-1-a) Pour l'ARA-C : (faire 2 séries, une pour la gamme et une pour les Cqs)

-Pour la solution fille à 100 ng/µL (Sf1) : prendre 50 µL de ARA-C_{SM} et compléter avec 450µL d'H₂O.

-Pour la solution fille à 10 ng/µL (Sf2) : prendre 100 µL de S1 et compléter avec 900 µL d'H₂O.

-Pour la solution fille à 1 ng/µL (Sf3) : prendre 100 µL de S2 et compléter avec 900 µL d'H₂O.

-Pour la solution fille à 0.1 ng/µL (Sf4) : prendre 100 µL de S3 et compléter avec 900 µL de H₂O.

3-1-b) Pour l'ARA-U : (faire 2 séries, une pour la gamme et une pour les Cqs)

-Pour la solution fille à 100 ng/µL (Sf1) : prendre 50 µL de ARA-U_{SM} et compléter avec 450µL d'H₂O.

-Pour la solution fille à 10 ng/µL (Sf2) : prendre 100 µL de S1 et compléter avec 900 µL d'H₂O.

3-2) Obtention de la droite d'étalonnage :

-Avant utilisation du plasma blanc mis à décongeler sur les blocs chauffants, le mettre à centrifuger avec le programme 4 (4000 tr/min pendant 5min à 8°C), dans la centrifugeuse à côté des évaporateurs.

Puis réalisation d'une gamme commune ARA-C et ARA-U, selon le tableau suivant :

Points de gamme	[ARA-C] ng/ml	V en μL ([Sf])	[ARA-U] ng/ml	V en μL ([Sf])	V (μL) plasma blanc
1	1	10 (0.1)	250	25 (10)	965
2	5	50 (0.1)	500	50 (10)	900
3	10	10 (1)	750	75 (10)	915
4	25	25 (1)	1000	10 (100)	965
5	50	50 (1)	2500	25 (100)	925
6	100	10 (10)	5000	50 (100)	940
7	500	50 (10)	7500	75 (100)	875

3-3) Obtention des points Cq :

-Pour ces différents Cqs, prendre les Sf faites pour les Cq avec les μ pipettes adéquates.

Cq (ng/ml)	[ARA-C] ng/ml	V μL ([Sf])	[ARA-U] ng/ml	V μL ([Sf])	V (μL) plasma blanc
Cq B	2.0	20 (0.1)	300	30 (10)	950
Cq M	25	25 (1)	800	80 (10)	895
Cq H	250	25 (10)	4000	40 (100)	935

3-4) Procédure de dosage :

-Prendre 100 μL de chaque préparation (blanc, gamme, Cqs, patients) et mettre dans un eppendorf.

-Ajouter dans chaque eppendorf 400 μL de solution précipitante de l'EI

-Vortexer 2mn au vortex de paillasse

-Centrifuger 15min dans la petite centrifugeuse dans le laboratoire de Madeleine (15 min).

-Récupérer 600 μL de la phase supérieure dans des tubes à hémolyse de 5 ml

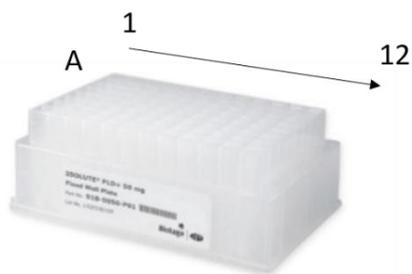
-Evaporer au bloc chauffant sous courant d'azote (47°C). Pour l'ouverture des robinets se référer au schéma ci-dessous.



-Reprendre le résidu sec par 400 μL d' H_2O MQ.

-Transférer ce volume dans des eppendorfs et les mettre à centrifuger 10 min a 15000tr/min

-Transférer tout le volume dans les puits de la plaque de l'injecteur, sur laquelle vous devez indiquer au préalable sur le côté en face de la case A1 (où présence de l'étiquette sur l'illustration ci-dessous) « Cytarabine et la date du jour de manipulation ».



- Refermer la plaque avec le support en silicone en vérifiant que tous les trous de la plaque soient bouchés +++
- Injecter 10 μ L.
- Glisser la plaque sur le portoir 2 (à droite) et le reclipser à la LC-MS (il faut entendre un clips). Faire attention que la machine ne soit pas en train d'injecter +++.

4) Informatique :

4-1) Création de la liste d'échantillons :

Télécharger la méthode en allant dans :

-file>open project>cytarabine>mettre yes à la fenêtre qui s'ouvre pour nous demander de changer de programme.

Remplir les colonnes correctement :

- penser à remplir les dilutions et concentrations
- charger la bonne méthode
- changer la date de la manip et faire « file series »
- pour les blancs (faire « file down »).
- faire attention que les numéros des échantillons soient les bons

Une fois la préparation du tableau terminée, faire « save as » et mettre la date du jour de la manipulation (sous la forme ddmmyyyy).

Sélectionner tous les échantillons (ou aucun) et appuyer sur la touche .

4-2) Interprétation technique de l'analyse :

Ouvrir le projet : File > Open project> cytarabine pro

Le tableau enregistré de la veille apparaît, tout sélectionner en cliquant sur la case en haut à gauche du tableau (tout le tableau se noircit) et appuyer sur « process sample ».

Traiter les chromatogrammes un par un et en regardant les % de variation : <15% premier point de gamme et <20% les autres points.

Une fois les changements fait, aller dans File >save as > mettre la date de la manipulation (forme : ddmmyy la même que précédemment).

Faire File > file report> cliquer sur calibration > compound summary report

Faites « OK »

Appuyer sur l'imprimante en haut à droite de l'écran, sélectionner « all » et imprimer

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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