



HAL
open science

Étude préclinique et clinique de la relation pharmacocinétique – pharmacodynamique d'un inhibiteur de la voie Hedgehog, le vismodégib

Pierre Mora

► **To cite this version:**

Pierre Mora. Étude préclinique et clinique de la relation pharmacocinétique – pharmacodynamique d'un inhibiteur de la voie Hedgehog, le vismodégib. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-03722699

HAL Id: dumas-03722699

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03722699v1>

Submitted on 13 Jul 2022

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.

Université de Bordeaux
U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2019

Thèse n° 97

THÈSE POUR L'OBTENTION DU
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 18 Octobre 2019 par

Pierre MORA

Né le 07/12/1991 à Dax (40)

**Étude préclinique et clinique de la relation
pharmacocinétique – pharmacodynamique d'un
inhibiteur de la voie Hedgehog, le vismodégib**

Co-directeurs de thèse :

Madame le Dr Sarah DJABAROUTI, MCU-PH

Monsieur le Dr Fabien XUEREB, MCU-PH

Membres du Jury

Pr Pascale DUFOURCQ, PU	Présidente
Pr Marie BEYLOT-BARRY, PU-PH	Juge
Dr Catherine DONAMARIA, PH	Juge
Dr Florent PUISSET, MCU-PH	Juge

Résumé

Titre :

Étude préclinique et clinique de la relation pharmacocinétique – pharmacodynamique d'un inhibiteur de la voie Hedgehog, le vismodégib

Résumé :

Ce travail est la synthèse des études préclinique et clinique réalisées au sein de l'unité INSERM 1034 et au sein du CHU de Bordeaux concernant le vismodégib, le premier inhibiteur de la voie Hedgehog, commercialisé sous le nom ERIVEDGE®.

Le vismodégib est indiqué chez les patients adultes présentant un carcinome basocellulaire métastatique symptomatique ou un carcinome basocellulaire localement avancé pour lequel la chirurgie ou la radiothérapie ne sont pas appropriées. Le seul schéma posologique validé est de 150 mg par jour par voie orale. Son efficacité remarquable chez les patients répondeurs et l'absence d'alternatives thérapeutiques sont contrebalancées par une toxicité non-négligeable conduisant à l'interruption thérapeutique pour environ un tiers des patients.

La partie préclinique consiste à développer un modèle d'administration continue par voie orale, permettant une exposition plus constante au médicament au cours du nyctémère chez la souris et à rechercher des toxicités neurologiques et vasculaires, objectivées par des tests biologiques et comportementaux, chez des animaux exposés au vismodégib à différentes doses pendant quatre mois avec ce nouveau modèle.

La partie clinique correspond à une analyse pharmacocinétique / pharmacodynamique en vie réelle des patients traités par vismodégib en vue de proposer un nouveau schéma thérapeutique, mieux toléré chez l'homme. L'objectif principal est l'analyse de la relation entre les concentrations plasmatiques en vismodégib et la toxicité. Les objectifs secondaires sont l'analyse des variabilités pharmacocinétiques intra et interindividuelles et la recherche des covariables d'intérêt, expliquant ces variabilités.

Mots-clés :

spectrométrie de masse ; mode d'administration chez la souris ; toxicités neurologiques et vasculaire ; pharmacocinétique – pharmacodynamique ; vismodégib

Title :

Preclinical and clinical pharmacokinetic - pharmacodynamic study of Hedgehog pathway inhibitor, vismodegib

Abstract :

This document presents the results of preclinical and clinical studies carried out in INSERM 1034 unit and Bordeaux University Hospital concerning the vismodegib, first hedgehog inhibitor, commercialized under the licensed name ERIVEDGE®.

Vismodegib is indicated for patients with symptomatic metastatic basal cell carcinoma (BCC), or for advanced BCC when surgery and radiotherapy are not appropriate. Currently, standard dosing regimen of 150 mg per day is the only recommended. Efficacy of vismodegib in responder patients and lack of alternatives are counterbalanced by intolerance and heavy side effects leading to therapeutic discontinuation for 30 % of patients.

The preclinical part of this work is the development and validation of a novel approach for oral delivery of drug permitting a more constant exposition of animals through the day. This new method will allow us to identify neurologic and vascular side effects of vismodegib, assessed with biological and comportemental tests in mice receiving various doses of vismodegib for four month.

The clinical study is a real-world pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis in patients treated with vismodegib in order to validate a better-tolerated dosing regimen. The primary outcome is to evaluate the relationship between plasma concentrations of vismodegib and tolerance. The secondary outcomes are the evaluation of interindividual and intraindividual pharmacokinetic variabilities and the evaluation of the impact of parameters and covariates on vismodégib concentrations.

Keywords :

mass spectrometry ; administration route in murine model ; neurologic and vascular toxicity ; pharmacokinetic – pharmacodynamics ; vismodegib

Table des matières

RESUME	1
TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES ABREVIATIONS	11
PARTIE I - INTRODUCTION	14
PARTIE II - GENERALITES.....	16
I. Le carcinome basocellulaire	17
1. Classification clinique et histologique.....	18
2. Stade et grade.....	20
3. Facteurs favorisants	22
4. Diagnostic.....	23
5. Traitement	23
II. Voie Hedgehog.....	25
1. Synthèse des ligands	25
2. Voie canonique	27
3. Facteurs de transcriptions GLI	30
4. Voie non canonique et non classique	31
III. Vismodégib	32
1. Caractéristiques physico-chimique	33
2. Caractéristiques pharmacocinétiques	33
3. Données précliniques.....	35
4. Données cliniques	38
PARTIE III - DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN VISMODEGIB.....	41
I. Introduction.....	42
II. Matériel et méthode.....	42
1. Fourniture	42
2. Instrumentation	44
3. Conditions analytiques.....	44

4.	Préparations des références et des contrôles qualités.....	45
5.	Extraction en phase solide	45
6.	Carryover.....	46
7.	Validation analytique	50
III.	Résultats.....	50
1.	Fragmentation des ions	50
2.	Validation analytique de la méthode	51
3.	<i>Carryover</i>	52
IV.	Discussion.....	55
PARTIE IV - ÉTUDE PRECLINIQUE DU VISMODEGIB CHEZ UN MODELE MURIN.....		56
I.	Introduction.....	57
II.	Matériel et méthode.....	58
1.	Prise en charge des animaux et groupes de traitement	58
2.	Administration par gavage.....	58
3.	Administration par gel	58
4.	Sacrifice et collection d'organe.....	61
5.	Mesure d'exposition au vismodégib	62
6.	Tests comportementaux	64
III.	Résultats.....	65
1.	Développement de l'administration par gel	65
2.	Analyse concentration plasmatique	68
3.	Expression de GII	71
4.	Mesure de l'expression des protéines de jonction au niveau du cerveau.....	73
5.	Tests comportementaux	75
IV.	Discussion.....	78
PARTIE V - ÉTUDE CLINIQUE.....		80
I.	Introduction.....	81
1.	Hypothèse de la recherche	81
2.	Objectifs.....	81
II.	Matériel et méthode.....	82
1.	Schéma de la recherche	82
2.	Traitements, stratégies et procédures.....	83
III.	Résultats.....	84
1.	Caractéristiques des patients à l'inclusion.....	84
2.	Caractéristiques de la maladie à l'inclusion	84
3.	Variabilité pharmacocinétique.....	87
4.	Analyse en sous-groupe	88
5.	Recherche de corrélation avec les valeurs biologiques	89
IV.	Discussion.....	98

BIBLIOGRAPHIE.....	101
SERMENT DE GALIEN.....	108

Liste des tableaux

TABLEAU 1 CLASSIFICATION DES SOUS-TYPES CLINIQUES DE CARCINOMES BASOCELLULAIRES PROPOSEE PAR L'ANAES ²	18
TABLEAU 2 CLASSIFICATION DES SOUS-TYPES HISTOLOGIQUES DE CARCINOMES BASOCELLULAIRES PROPOSEE PAR L'ANAES ²	19
TABLEAU 3 STRATIFICATION DES PATIENTS A FAIBLE RISQUE ET A HAUT RISQUE SELON LE NCCN ³	20
TABLEAU 4 STRATIFICATION PRONOSTIQUE DES CARCINOMES BASOCELLULAIRES SELON L'ANAES ²	21
TABLEAU 5 PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES APRES ADMINISTRATION D'UNE DOSE UNIQUE DE VISMODEGIB CHEZ DIFFERENTES ESPECES ANIMALES ⁴³	35
TABLEAU 6 DONNEES DE TOXICITE DU VISMODEGIB DECLAREES DANS LE DOSSIER D'AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE AMERICAIN ⁴⁷	38
TABLEAU 7 RESULTATS DES ESSAIS CLINIQUES ERIVANCE ET STEVIE ⁵⁰	39
TABLEAU 8 SEQUENCE DE PROGRAMMATION SIMPLIFIEE DE L'AUTOSAMPLER AGILENT 1260 INFINITY SUR LE LOGICIEL ANALYST V1.5.1	47
TABLEAU 9 RESULTATS DES CONTROLES QUALITES DE LA VALIDATION DE METHODE ANALYTIQUE DE DOSAGE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES TOTALES DE VISMODEGIB CHEZ L'HOMME	51
TABLEAU 10 DESCRIPTION DES CONDITIONS DE LAVAGE TESTEES DE L'AUTOSAMPLER 1260 INFINITY	52
TABLEAU 11 DESCRIPTION DES CONDITIONS DE LAVAGE TESTEES DU <i>MANIFOLD</i>	54
TABLEAU 12 CONSOMMATION DES DIFFERENTS GELS TESTES PAR SOURIS PAR 24 HEURES	65
TABLEAU 13 RESULTATS DE LA COURBE DE CALIBRATION DE LA METHODE ANALYTIQUE DE DOSAGE DU VISMODEGIB DANS LES GELS	66
TABLEAU 14 RESULTATS DE L'ETUDE DE STABILITE A SEPT JOURS DU VISMODEGIB EN SUSPENSION DANS LA GELATINE 10 %	66

TABLEAU 15 COMPARAISON DE L'HOMOGENEITE DU VISMODEGIB DANS LES BARRES DE GELATINE 10 % SELON DEUX PROCESSUS DE FABRICATION TESTES	67
TABLEAU 16 CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES ET ANTHROPOMETRIQUES DES PATIENTS INCLUS DANS L'ETUDE	84
TABLEAU 17 CARACTERISTIQUES DE LA MALADIE CHEZ LES PATIENTS A L'INCLUSION	85

Liste des figures

FIGURE 1 COUPE HISTOLOGIQUE DE LA PEAU.	17
FIGURE 2 SCHEMA GENERAL DE MATURATION DES LIGANDS HH	26
FIGURE 3 ÉTAPES PERMETTANT LA SECRETION DES PROTEINES HH	27
FIGURE 4 SCHEMA DE LA VOIE HEDGEHOG EN L'ABSENCE DE LIGANDS	28
FIGURE 5 SCHEMA DE LA VOIE HEDGEHOG EN PRESENCE DE LIGANDS	29
FIGURE 6 REPRESENTATIONS DES ISOFORMES DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION GLI1, GLI2 ET GLI3 ¹⁰	30
FIGURE 7 FORMULE DEVELOPEE PLANE DU VISMODEGIB	43
FIGURE 8 FORMULE DEVELOPEE PLANE DU [¹³ C ₇ , ² H ₃]-VISMODEGIB (ETALON INTERNE DE LA TECHNIQUE ANALYTIQUE)	43
FIGURE 9 DIRECTION DU FLUX DE PHASE MOBILE LORSQUE LA VALVE EST EN POSITION <i>MAINPASS</i>	46
FIGURE 10 DIRECTION DU FLUX DE PHASE MOBILE LORSQUE LA VALVE EST EN POSITION <i>BYPASS</i>	47
FIGURE 11 SCHEMA DE MONTAGE DU MANIFOLD	49
FIGURE 12 RESULTATS DE LA COURBE DE CALIBRATION DE LA METHODE ANALYTIQUE DE DOSAGE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES TOTALES EN VISMODEGIB	52
FIGURE 13 ÉVOLUTION DU <i>CARRYOVER</i> DE L' <i>AUTOSAMPLER</i> SELON LES CONDITIONS DE RINÇAGE TESTEES	54
FIGURE 14 ÉVOLUTION DU <i>CARRYOVER</i> DU <i>MANIFOLD</i> SELON LES CONDITIONS DE LAVAGE TESTEES	54
FIGURE 15 COUPE TRANSVERSALE DES CAGES UTILISEES ET POSITIONNEMENT DU GEL DE VISMODEGIB	59
FIGURE 16 PRINCIPE DU TEST D'HOMOGENEITE DES BARRES DE GEL DE VISMODEGIB	61
FIGURE 17 VEINES FACIALES DE LA SOURIS	62
FIGURE 18 PRINCIPE DU TEST D'ALLODYNIE DE VON FREY. EXEMPLE DE REPONSE NEGATIVE.	64

FIGURE 19 COURBE D'ETALONNAGE DE LA METHODE DE DOSAGE DU VISMODEGIB DANS LA GELATINE 10 %	66
FIGURE 20 PROFIL PHARMACOCINETIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN VISMODEGIB APRES ADMINISTRATION PAR GAVAGE INTRAGASTRIQUE	68
FIGURE 21 PROFIL PHARMACOCINETIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN VISMODEGIB LORS D'UNE ADMINISTRATION PAR GEL	69
FIGURE 22 COMPARAISON DES PROFILS PHARMACOCINETIQUES DU VISMODEGIB OBTENUS APRES ADMINISTRATION DE 25MG.KG ⁻¹ DE VISMODEGIB PAR GAVAGE INTRAGASTRIQUE <i>VERSUS</i> ADMINISTRATION PAR GEL	70
FIGURE 23 COMPARAISON DES PROFILS PHARMACOCINETIQUES DU VISMODEGIB OBTENUS APRES ADMINISTRATION DE 75MG.KG ⁻¹ DE VISMODEGIB PAR GAVAGE INTRAGASTRIQUE <i>VERSUS</i> ADMINISTRATION PAR GEL	70
FIGURE 24 EXPRESSION GENIQUE DE GLI AU NIVEAU DU CERVEAU (A), DU POUMON (B) ET DE LA LANGUE (C) APRES ADMINISTRATION DE 30MG.KG ⁻¹ DE VISMODEGIB PENDANT 5 JOURS PAR VOIE INTRAGASTRIQUE	71
FIGURE 25 EXPRESSION GENIQUE DE GLI AU NIVEAU DE LA LANGUE (A) ET DU CERVEAU (B) APRES ADMINISTRATION DE VISMODEGIB PENDANT 4 MOIS PAR GEL	72
FIGURE 26 EXPRESSION PROTEIQUE DE GLI AU NIVEAU DU CERVEAU APRES ADMINISTRATION DE VISMODEGIB PENDANT 4 MOIS PAR GEL	73
FIGURE 27 EXPRESSION PROTEIQUE DES PROTEINES DE JONCTION VCAM-1 (A), ZO-1 (B) ET JAM-A (C) AU NIVEAU DU CERVEAU APRES ADMINISTRATION DE VISMODEGIB PENDANT 4 MOIS PAR GEL	75
FIGURE 28 TEST DE DYSGUEUSIE. COMPARAISON DES RATIOS EAU / SUBSTANCES A TESTER ENTRE LES GROUPES. A : SUBSTANCES A TESTER = DENATONIUM BENZOATE. B : SUBSTANCE A TESTER = SUCROSE.	76
FIGURE 29 TEST D'ALLODYNIE DE VON-FREY. NOMBRE MOYEN DE REPETITIONS POSITIVES PAR SOURIS PAR GROUPES.	77
FIGURE 30 DUREE SOUS VISMODEGIB (SEMAINES) PAR PATIENT AU MOMENT DE L'INCLUSION.	85
FIGURE 31 CONCENTRATION RESIDUELLE MOYENNE PAR PATIENTS +/- ECART-TYPE.	87
FIGURE 32 ANALYSE EN SOUS-GROUPE DES CONCENTRATIONS RESIDUELLES MOYENNES PAR PATIENT SELON LE SEXE..	88

FIGURE 33 ANALYSE EN SOUS-GROUPE DES CONCENTRATIONS RESIDUELLES EN VISMODEGIB SELON LE POIDS INFERIEUR OU SUPERIEUR A 75KG AU MOMENT DU PRELEVEMENT.	89
FIGURE 34 CORRELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS RESIDUELLES TOTALES EN VISMODEGIB ET LE POIDS.	90
FIGURE 35 CORRELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS RESIDUELLES TOTALES EN VISMODEGIB ET L'AGE.	90
FIGURE 36 CORRELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS RESIDUELLES TOTALES EN VISMODEGIB ET LA CONCENTRATION PLASMATIQUE EN ALPHA-1-GLYCROPROTEINE ACIDE.	91
FIGURE 37 CORRELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS RESIDUELLES TOTALES EN VISMODEGIB ET LA CONCENTRATION PLASMATIQUE EN ALBUMINE.	91
FIGURE 38 CORRELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS RESIDUELLES TOTALES EN VISMODEGIB ET LA CONCENTRATION PLASMATIQUE EN CREATININE.	93
FIGURE 39 CORRELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS RESIDUELLES TOTALES EN VISMODEGIB ET LE DEBIT DE FILTRATION GLOMERULAIRE.	93
FIGURE 40 CORRELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS RESIDUELLES TOTALES EN VISMODEGIB ET LA CONCENTRATION PLASMATIQUE EN ASPARTATE AMINOTRANSFERASE.	95
FIGURE 41 CORRELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS RESIDUELLES TOTALES EN VISMODEGIB ET LA CONCENTRATION EN ALANINE AMINOTRANSFERASE.	95
FIGURE 42 CORRELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS RESIDUELLES TOTALES EN VISMODEGIB ET LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN GAMMA-GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE	96
FIGURE 43 CORRELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS RESIDUELLES TOTALES EN VISMODEGIB ET LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN BILIRUBINE TOTALE.	97
FIGURE 44 CORRELATION ENTRE LES CONCENTRATIONS RESIDUELLES TOTALES EN VISMODEGIB ET LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN PHOSPHATASE ALCALINE.	97

Liste des Abréviations

AAD	American Academy of Dermatology
ADN	Acide désoxyribonucléotidique
AGP ou AAG	Alpha-1 Glycoprotéine acide(ou orosomucoïde)
AJCC	American Joint Comitee on Cancer
ALAT	Alanine Aminotransferase
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANAES	Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé
ASAT	Aspartate Aminotransferase
ASMR	Amélioration du Service Médical Rendu
AUC	Area Under the Curve
BL6	Black 6
BOC	Brother Of CDO
CBC	Carcinome basocellulaire
CK1	Casein Kinase 1
CI	Clairance
CLS	Ciliary Localization Sequence
CMC	Carboxyméthylcellulose
CR	Complete Response
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CUR	Curtain Gas
CV	Coefficient de Variation
DB	Dénatonium Benzoate
DC	C' degron
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
Dhh	Desert Hedgehog
DISP	Dispatched
DMSO	Diméthylsullfoxyde
DN	N' degron
DP	Declustering Potential

ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EFSAL	Établissement français du sang Aquitaine Limousin
FDA	Food and Drug Administration
GRK2	G protein-coupled Receptor Kinase 2
GS1 et GS2	Ion Source Gas 1 et ion Source Gas 2
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
Hh	Hedgehog
HHAT	Hedgehog Acyl Transferase
IC50	half maximal Inhibitory Concentration
ICH	International Council for Harmonisation
Ihh	Indian Hedgehog
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IUCC	International Union for Cancer Control
JAM-A	Junctional Adhesion Molecule A
LC	Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NCI	National Cancer Institute
NES	Nuclear Export Sequence
NLS	Nuclear Localization Sequence
NVB	Naevomatose basocellulaire
OCT	Optical Coherence Tomography
ORR	Overall Response Rate
OS	Overall Survival
PAL	Phosphatase Alcaline
PD	Progressive disease
PFS	Progression Free Survival
PKA	Protein Kinase A
PR	Partial Response
PS	Performance Status
PTCH	Patched

QC	Quality Control
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RCM	Reflectance Confocal Microscopy
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
RD	Repressor Domain
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
SD	Stable Disease
Shh	Sonic Hedgehog
SIC	SUFU-interacting site in C terminal region
SIN	SUFU-interacting site in N terminal region
SMR	Service Médical Rendu
SNC	Système Nerveux Central
SRM	Selected Reaction Monitoring
SRP	Signal Recognition Particle
SSC	Surface sous la Courbe
TAD	Transactivation Domain
TEM	Temperature
UPS	Ubiquitin Proteasome System
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VSS	Volume at Steady State
ZNF	Zinc-Finger
ZO-1	Zonula Ocludens-1
β TrCP	Beta Transducing repeat-Containing Protein
γ GT	gamma-glutamyltranspeptidase

Partie I - Introduction

Ce document est la synthèse de travaux hospitalo-universitaires réalisés au sein de l'unité INSERM 1034 *Biology of Cardiovascular Diseases* et plus précisément du groupe *Hedgehog and vessel diseases*, et du CHU de Bordeaux, notamment de l'équipe d'onco-dermatologie, en collaboration avec l'Université de Bordeaux.

La thématique de l'équipe de recherche, la voie Hedgehog, nous a amené à nous intéresser au premier inhibiteur de cette voie commercialisée, le vismodégib (Erivedge[®]).

Après une première partie de généralités sur la pathologie et le médicament et son développement, nous décrirons la méthode analytique de dosage des concentrations plasmatiques en vismodégib que nous avons mise au point et qui comprend une partie innovante de décontamination physico-chimique de l'appareillage.

Nous aborderons ensuite l'aspect préclinique avec le développement d'un mode d'administration continu par voie orale permettant une inhibition de la voie sur la totalité du nycthémère, ce qui n'était pas possible avec les procédés utilisés lors du développement du médicament.

Nous étudierons également dans cette partie la toxicité neuro-vasculaire de ce produit, non encore décrite à notre connaissance.

Enfin, nous présenterons les premiers résultats d'une étude clinique, toujours en cours à l'heure actuelle, portant sur la relation pharmacocinétique – pharmacodynamique du vismodégib.

Partie II - Généralités

I. Le carcinome basocellulaire

Les carcinomes cutanés représentent 90% des cancers de la peau. Ils figurent parmi les cancers les plus fréquents malgré une incidence probablement sous-estimée en raison d'une sous-déclaration importante.

On distingue deux grands types de carcinomes cutanés : le carcinome spinocellulaire (ou épidermoïde) et le carcinome basocellulaire (CBC).

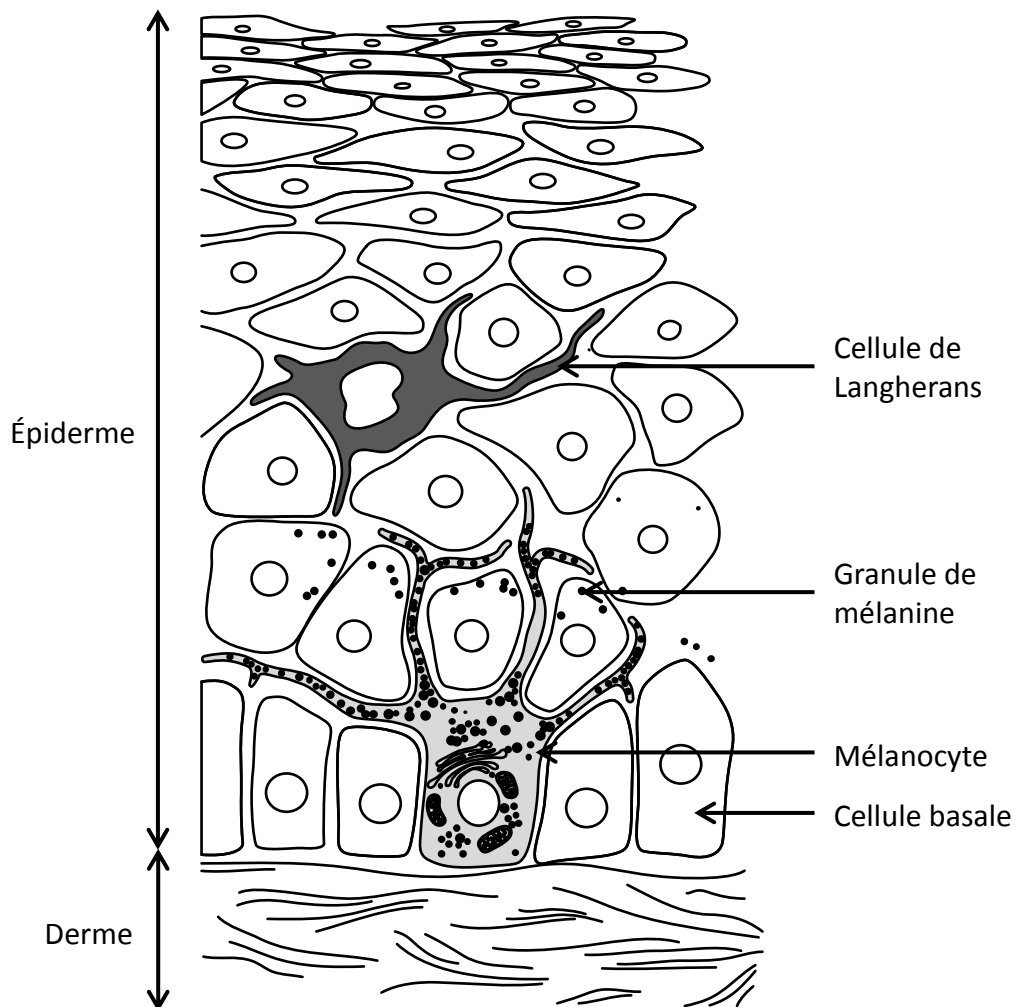


Figure 1 Coupe histologique de la peau.

Le carcinome basocellulaire est une tumeur épithéliale, survenant de novo, qui se développe au niveau des zones photo-exposées à partir des cellules basales (Figure 1 Coupe

histologique de la peau.). Leur localisation peut donc entraîner un préjudice fonctionnel et esthétique important¹.

1. Classification clinique et histologique

Il existe de très nombreuses classifications histologiques des carcinomes basocellulaires, proposées par différents ouvrages de référence, différentes sociétés savantes ou recommandations.

L'Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé (ANAES) a proposé en 2004 une simplification de cette classification et recommande la distinction de trois sous-types cliniques (Tableau 1) et quatre sous-types histologiques (Tableau 2)².

Tableau 1 Classification des sous-types cliniques de carcinomes basocellulaires proposée par

l'ANAES²

Sous-type cliniques	Définition
CBC nodulaire	Papule ou un nodule lisse, translucide, grisâtre et télangiectasique constituant la lésion élémentaire ou perle. La lésion croît progressivement et atteint une taille variable avec une périphérie faite de succession de perles. La forme dite « à bordure perlée » ou « plan cicatriciel » constitue une variété de CBC nodulaire avec extension centrifuge.
CBC superficiel	Plaque rouge plane, bien limitée, à extension très lentement centrifuge. Elle est parfois recouverte de petites squames ou de croûtes. Les perles caractéristiques ne sont en règle générale pas visibles à l'œil nu. Le CBC superficiel peut être multiple d'emblée. Il prédomine en zone de peau couverte.
CBC sclérodermiforme	Plaque dure, brillante, mal limitée et déprimée, souvent difficile à voir en l'absence d'ulcération et qui ressemble à une cicatrice blanche. Elle évolue lentement de façon centrifuge. Les limites de la tumeur sont très difficiles à préciser. Cette lésion peut rester longtemps méconnue et finir par être très étendue.

Tableau 2 Classification des sous-types histologiques de carcinomes basocellulaires proposée
par l'ANAES²

Sous-type histologiques	Définition
CBC nodulaire	Présence, dans le derme, d'un ou de plusieurs massifs ou lobules larges et bien circonscrits, constitués de cellules basaloïdes dont les noyaux sont agencés en palissade en périphérie. Des artefacts de rétraction sont habituellement présents.
CBC superficiel	Présence d'un nid tumoral appendu à l'épiderme et/ou aux follicules pileux. Ce foyer tumoral est constitué de cellules basaloïdes dont les noyaux sont agencés en palissade en périphérie. Des artefacts de rétraction sont habituellement présents et séparent les cellules tumorales du stroma. Le plus souvent, les foyers tumoraux paraissent multiples, séparés par des intervalles de peau normale.
CBC infiltrant	<p>Terme aux CBC trabéculaire ou micronodulaire.</p> <p>Dans sa forme trabéculaire, il est défini par la présence de foyers tumoraux de petite taille, mal limités, intradermiques ou parfois dermo-hypodermiques. Ces foyers, peu cellulaires, ont une architecture variée, en îlots irréguliers ou en travées. L'agencement palissadique des noyaux périphériques est souvent discret ou absent. La prolifération tumorale s'étend dans le derme avec des limites floues selon un mode très infiltrant.</p> <p>Dans sa forme micronodulaire, il est caractérisé par une multitude de foyers tumoraux de petite taille formant des lobules bien limités. Aucune limite chiffrée validée n'a pu être retenue pour définir la taille de ces foyers. L'agencement palissadique des noyaux en périphérie est parfois discret.</p>
CBC sclérodermiforme	Cordons effilés, parfois représentés par une seule assise cellulaire. Les cellules tumorales sont peu différenciées et l'agencement palissadique périphérique est absent. La tumeur infiltre un stroma tumoral très scléreux. Les éléments tumoraux occupent habituellement toute la hauteur du derme, parfois s'étendent à l'hypoderme.

Ces différents sous-types peuvent s'associer. Le sous-type de plus mauvais pronostic doit alors être retenu.

Certaines formes histologiques sont également individualisées : les CBC métatypiques et les carcinomes mixtes.

2. Stade et grade

Peu de classifications par stade et grade sont disponibles dans la littérature concernant spécifiquement le carcinome basocellulaire.

Les classifications TNM publiées par l'*American Joint Comitee on Cancer (AJCC)* et par l'*International Union for Cancer Control (IUCC)* sont les classifications par stade les plus utilisées en cancérologie.

Ils existent cependant plusieurs limites concernant l'utilisation de cette classification dans le CBC.

Premièrement, elle regroupe toutes les tumeurs cutanées qui ne sont pas des mélanomes.

Deuxièmement elle intègre la notion de métastase là où l'incidence des CBC métastatiques est extrêmement faible.

Ces raisons font que la classification TNM est très peu utilisée en pratique et les recommandations ne reposent donc pas sur cette classification.

Tableau 3 Stratification des patients à faible risque et à haut risque selon le NCCN³

Aire H = nez et zones péri-orificielles de l'extrémité céphalique.

Aire M = front, joue, menton, cuir chevelu et cou.

Aire L = tronc et membres.

	Faible risque	Haut risque
Clinique		
Localisation	Aire L < 20 mm Aire M < 10 mm	Aire L > 20 mm Aire M > 10mm Aire H
Bordure	Bien définie	Mal définie

Rechute	NON	OUI
Immunosuppression	NON	OUI
Site de radiothérapie antérieure	NON	OUI
Pathologie		
Croissance	Nodulaire, superficiel	Agressif
Invasion périneurale	NON	OUI

La classification la plus utile selon les recommandations de 2018 de l'*American Academy of Dermatology* (AAD) est la classification du *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) qui intègre des données cliniques et pathologiques et qui différencie les CBC à faible risque de rechute et les CBC à haut risque de rechute (Tableau 3)³.

En 2004, l'Agence Nationale pour l'Accréditation et l'Évaluation en Santé (ANAES) a également proposé sa classification en trois groupes pronostics (bon pronostic, mauvais pronostic et pronostic intermédiaire) en fonction du risque de récurrence, du risque d'envahissement local en cas de récurrence et de la difficulté de prise en charge thérapeutique en cas de récurrence (Tableau 4)².

Tableau 4 Stratification pronostique des carcinomes basocellulaires selon l'ANAES²

Groupe pronostic	Description
Mauvais pronostic	Les formes cliniques sclérodermiformes ou mal limitées et les formes histologiques agressives. Les formes récidivées (à l'exception des CBC superficiels). Les CBC nodulaires de la zone à haut risque de récurrence et de taille supérieure à 1 cm.
Pronostic intermédiaire	Tous les CBC superficiels primaires et la tumeur de Pinkus. Les CBC nodulaires primaires, bien limités, de moins de 1 cm sur la zone à risque intermédiaire de récurrence et de moins de 2 cm sur la zone à bas risque de récurrence.
Bon pronostic	Les CBC superficiels récidivés. Les CBC nodulaires < 1 cm sur la zone à haut risque de récurrence, > 1 cm sur la zone à risque intermédiaire de récurrence et > 2 cm sur la zone à bas risque de récurrence.

3. Facteurs favorisants

On distingue deux grands types de facteurs de risques : des facteurs intrinsèques et des facteurs extrinsèques².

Facteurs de risque Intrinsèques

Nombreux facteurs de risques intrinsèques ont été décrits dans la littérature^{4,1,3}.

Les phototypes clairs (type I et II), de par leur type de peau, sont plus sensibles aux rayons UV et donc plus à même de développer des CBC. Le phototype est le facteur de risque intrinsèque principal de développer un CBC.

Les CBC peuvent être liés à des maladies génétiques germinales telles que le *xeroderma pigmentosum* ou la naevomatose basocellulaire (NVB) également appelé Syndrome de Gorlin.

Le *xeroderma pigmentosum* correspond à une mutation sur les enzymes de réparations de l'ADN, notamment sur les enzymes participant à la réparation par excision de nucléotides qui est le seul système de réparation des dimères de pyrimidines induits par les UV.

La naevomatose basocellulaire ou syndrome de Gorlin correspond à une mutation sur le gène PTCH1 qui entraîne le développement de nombreux CBC chez les patients.

Facteurs de risque extrinsèques

Le type de mutations retrouvées dans les CBC (dimère de pyrimidine) et leurs localisations (partie du corps exposées) confirme les données épidémiologiques qui font de l'exposition solaire un facteur majeur dans la physiopathologie du CBC^{1,3}.

L'exposition à certaines substances chimiques, arsenic, hydrocarbures polycycliques, peuvent également intervenir.

L'immunodépression, chimio-induite (greffes) ou lors d'infection par le VIH, a également été bien décrite. L'incidence du CBC est ainsi 10 fois plus élevée chez les patients greffés rénaux.

L'impact de la radiothérapie reste mal connu dans la survenue des CBC. Cependant des cas ont été décrits dans la littérature et le *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* fait figurer les radiations naturelles et thérapeutiques dans les facteurs de risques de CBC.

4. Diagnostic

Dans la majorité des cas le diagnostic positif du CBC se base sur l'examen clinique : sur zone photo-exposée, jamais sur les muqueuses ; lésion perlée (papule rosée arrondie avec télangiectasies ; mesurant de quelques millimètres à plusieurs centimètres de diamètre.

Le diagnostic est ensuite confirmé après exérèse chirurgicale et envoi de la pièce anatomique dans un laboratoire d'anatomo-pathologie.

L'ANAES, en 2004, recommande la réalisation d'une biopsie avant traitement dans les cas suivants : lorsque le diagnostic est incertain ; lorsque le traitement proposé n'est pas chirurgical ; pour les formes cliniques de mauvais pronostic et lorsque le geste chirurgical demande une reconstruction importante².

Il est à noter que certaines techniques non invasives, par imagerie, se développent pour le diagnostic du CBC.

La « *Reflectance Confocal Microscopy* » (RCM) et l'« *Optical Coherence Tomography* » (OCT) utilisent l'infrarouge et permettent une analyse non invasive, en temps réel, des lésions suspectes.

Le coût de l'équipement et le nécessaire apprentissage de ces nouvelles techniques diagnostiques sont cependant un frein à leur déploiement.

5. Traitement

Le but du traitement est d'enlever complètement la tumeur tout en préservant les tissus sains.

L'approche chirurgicale est très souvent la technique la plus efficace mais la décision thérapeutique se base sur le risque pronostic de rechute et sur le stade du CBC. Il convient également de tenir compte de facteurs indépendants de la maladie, tels que : choix du

patient ; état général et espérance de vie ; pronostic esthétique et fonctionnel ; traitements et pathologies associés ; disponibilité des techniques ; compétence du praticien^{3,5}.

Traitement de première ligne du faible risque selon le NCCN

Le curetage et l'électrodessiccation sont possibles dans les zones non poilues et si le tissu adipeux n'est pas atteint

La chirurgie classique doit être effectuée avec une marge clinique de 4 mm. Si l'analyse de la marge en anatomo-pathologie revient positive, une seconde chirurgie pourra avoir lieu, une radiothérapie si le patient n'est pas éligible à la chirurgie ou une chirurgie micrographique de Mohs si la technique est disponible.

La radiothérapie peut être effectuée en première intention si le patient n'est pas éligible à la chirurgie.

Traitement de première ligne du risque élevé selon le NCCN

La chirurgie micrographique de Mohs peut être proposée en première intention dans les CBC à risque élevé de rechute. Cette technique est plus coûteuse mais considérée comme le meilleur traitement des CBC. Une analyse des marges doit-être effectuée en post-opératoire⁶.

La chirurgie standard peut également être proposée avec une marge clinique plus large (5 – 10 mm selon l'ANAES² ; pas de valeur recommandée selon le NCCN) et une analyse de celle-ci en post-opératoire.

La radiothérapie est l'alternative en cas de non faisabilité de la chirurgie.

Si l'analyse des marges revient négative, une radiothérapie peut être proposée.

Si l'analyse des marges revient positive après une chirurgie standard, une chirurgie micrographique de Mohs ou une radiothérapie doivent être proposées.

Dans tous les cas, si les traitements de première ligne s'avèrent inefficaces, le dossier doit passer en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP) et une inclusion dans un essai-clinique doit être envisagée.

Traitement des rechutes

En cas de rechute locale, le traitement est identique à un traitement de première ligne.

En cas de découverte d'atteinte ganglionnaire ou de métastase à distance, le dossier doit passer en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP) et un traitement par inhibiteur de la voie Hedgehog pourra être proposé.

II. Voie Hedgehog

La voie Hedgehog (Hh) a été découverte dans les années 70 par Christiane NUSSLEIN-VOLHARD et Éric WIESCHAUS chez la drosophile lors de leurs études sur les mutants de polarité segmentaire, ce qui leur a valu un Prix Nobel de physiologie et médecine en 1995.

La voie Hedgehog et ses trois ligands décrits, Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) et Indian Hedgehog (Ihh), interviennent lors du développement embryonnaire et possèdent un rôle primordial dans la morphogénèse et la polarisation dorso-ventrale⁷.

Chez l'adulte, l'implication de la voie Hh en cancérogénèse ainsi que dans le maintien de l'intégrité tissulaire (notamment vasculaire) a été bien démontrée. Il existe trois voies décrites : une voie canonique, une voie non canonique et une voie non classique⁸.

1. Synthèse des ligands

Découverte chez les invertébrés, lors d'expérience sur la drosophile, le gène Hedgehog est un gène de polarité segmentaire (*i.e.* impliqué dans la définition des composants antérieurs et postérieurs du corps). En effet, la mutation du gène Hh entraînait l'émergence d'un phénotype de larve de drosophile « en hérisson » ce qui a donné son nom à la protéine (hérisson en anglais).

Ce gène fut par la suite retrouvé chez les invertébrés qui possèdent trois gènes homologues du gène Hedgehog : Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog et Desert Hedgehog⁹.

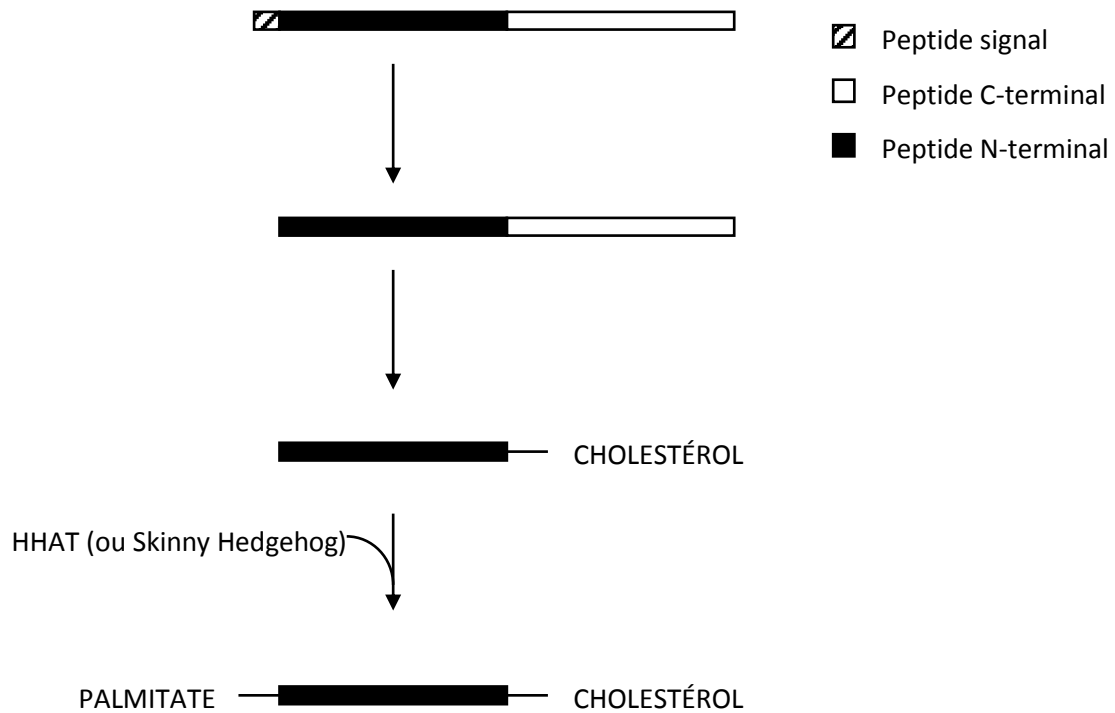


Figure 2 Schéma général de maturation des ligands Hh

Le gène le plus étudié est Sonic Hedgehog, son expression aboutit à la formation d'un précurseur de 45 kDa, contenant un peptide signal à sa partie N-terminale qui est reconnu par la particule de reconnaissance du signal (SRP) et permet sa translocation dans le réticulum endoplasmique¹⁰. Une fois la préprotéine transloquée, la séquence signal est supprimée grâce à une enzyme appelée *signal peptidase*.

L'autoprotéolyse du précurseur aboutit à la formation de deux peptides correspondants aux parties N-terminale (Hh-N) et C-terminale (Hh-C).

Cette autoprotéolyse est catalysée par la partie C-terminale du précurseur, qui agit comme une intéine (segment de protéine capable de s'exciser lui-même), et par une *cholesterol transferase* qui en transférant une molécule de cholestérol sur une liaison thioester entraîne sa rupture¹¹.

La rupture de la liaison thioester libère le peptide Hh-N, couplé à une molécule de cholestérol en C-terminal, et le peptide Hh-C, qui n'a pas de fonction connue¹⁰.

Une molécule d'acide palmitique est ensuite fixée sur la partie N-terminale du peptide Hh-N par une enzyme la HHAT (*Hedgehog Acyl Transferase*), aussi appelée SKI (*Skinny Hedgehog*), pour donner le peptide final, hydrophobe et actif (Figure 2) : Hh-Np^{12,13}.

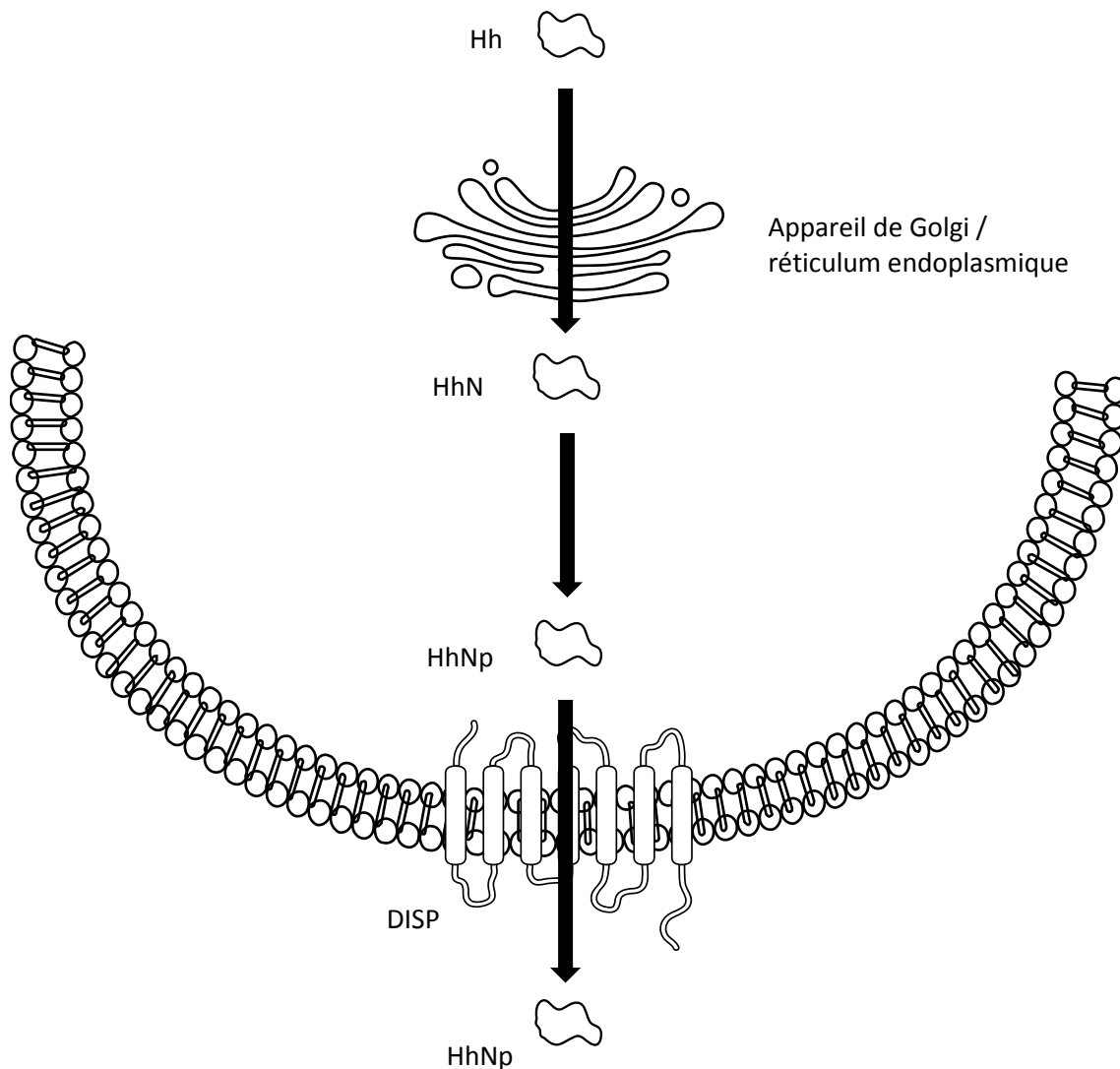


Figure 3 Étapes permettant la sécrétion des protéines Hh

Le passage transmembranaire du peptide final HhNp s'effectue par l'intermédiaire d'une protéine à 12 domaines transmembranaires, Dispatched (DISP) (Figure 3)¹⁴.

2. Voie canonique

Les trois ligands de la voie Hedgehog, Shh, Ihh et Dhh, possèdent la même voie de signalisation intracellulaire.

L'activation de cette voie aboutit à la transcription de gènes cibles qui participent à la prolifération cellulaire, la différenciation et au rétrocontrôle de la voie.

Le rétrocontrôle intervient notamment via la protéine *Human Hedgehog Interacting Protein* (HHIP)^{15,16}.

Les ligands de la voie Hh se fixent sur le récepteur transmembranaire Patched (PTCH 1 et 2). Cette liaison est facilitée par la présence d'un domaine sensible aux stérols sur le récepteur PTCH et par l'existence de co-récepteurs, CDO et BOC¹⁷, possédant des fragments d'immunoglobulines et de fibronectines à leurs extrémités¹⁸.

Il existe un rétrocontrôle négatif de la voie Hh sur ces co-récepteurs¹⁹.

En l'absence de ligands Hh

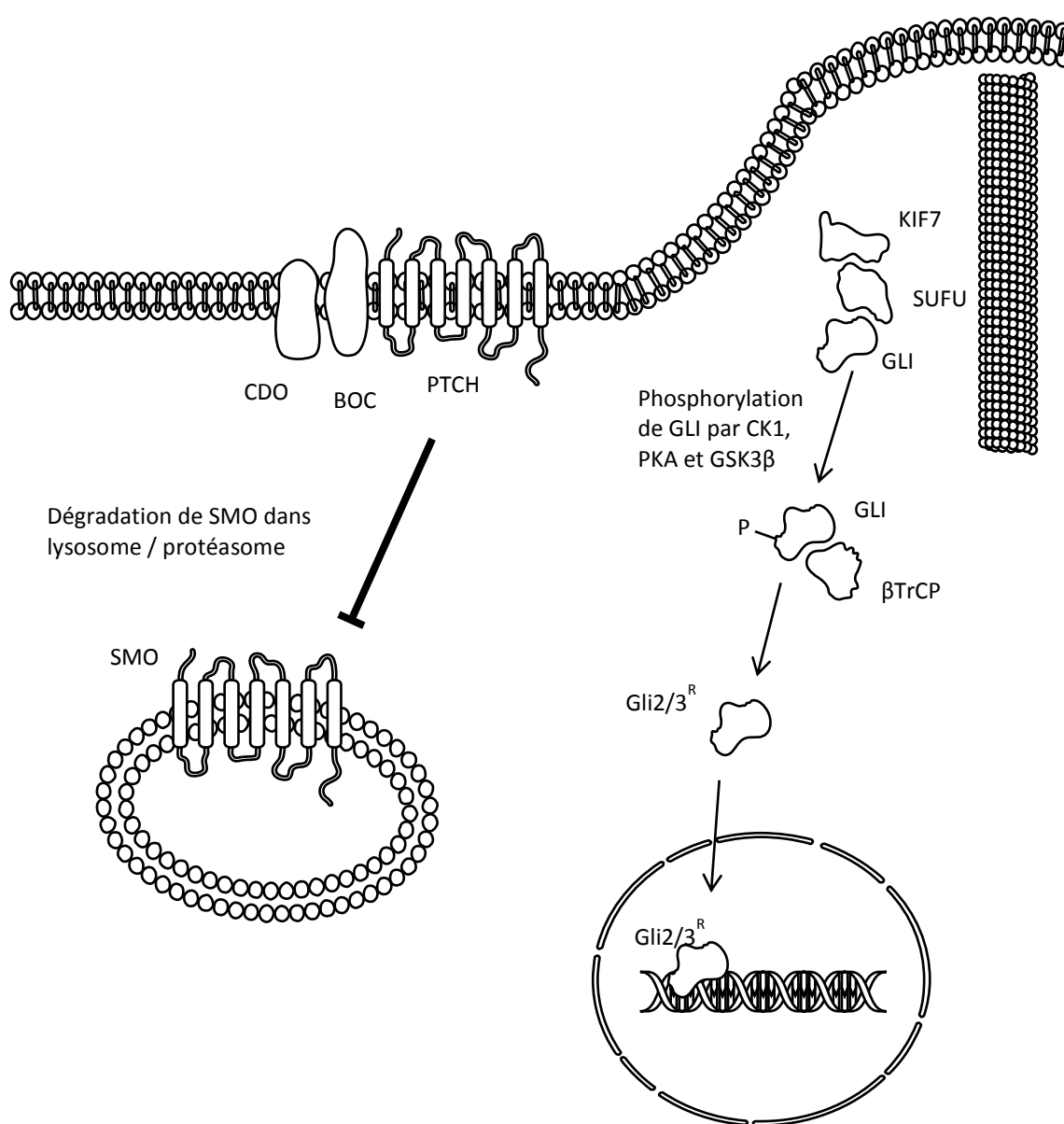


Figure 4 Schéma de la voie Hedgehog en l'absence de ligands

En l'absence de ligands, PTCH se situe à la base des cils primaires où se déroule la majorité de la voie Hedgehog²⁰. Il est constitutivement actif et inhibe une autre protéine transmembranaire, SMO²¹⁻²³. GLI est séquestré dans le cytoplasme par le complexe KIF7/SUFU²⁴.

La *Protein Kinase A* (PKA), la *Casein Kinase 1* (CK1) et la *Glycogen Synthase Kinase 3 beta* (GSK3 β) phosphorylent GLI2 et GLI3²⁵ qui sont reconnus par une protéine à boîte F, *beta-Transducing repeat-Containing Protein* (β TrCP)²⁶.

Dans le cytoplasme, GLI2 et GLI3 sont protéolysées pour donner des formes inhibitrices, tronquées en C-terminal, GLI^R. GLI1 n'est pas clivé mais dégradé au niveau du protéasome par l'intermédiaire de l'*Ubiquitin Proteasome System* (UPS) qui reconnaît deux signaux de dégradations (*degrons*) faisant partie de la séquence de GLI (Figure 4)²⁷.

En présence de ligands Hh

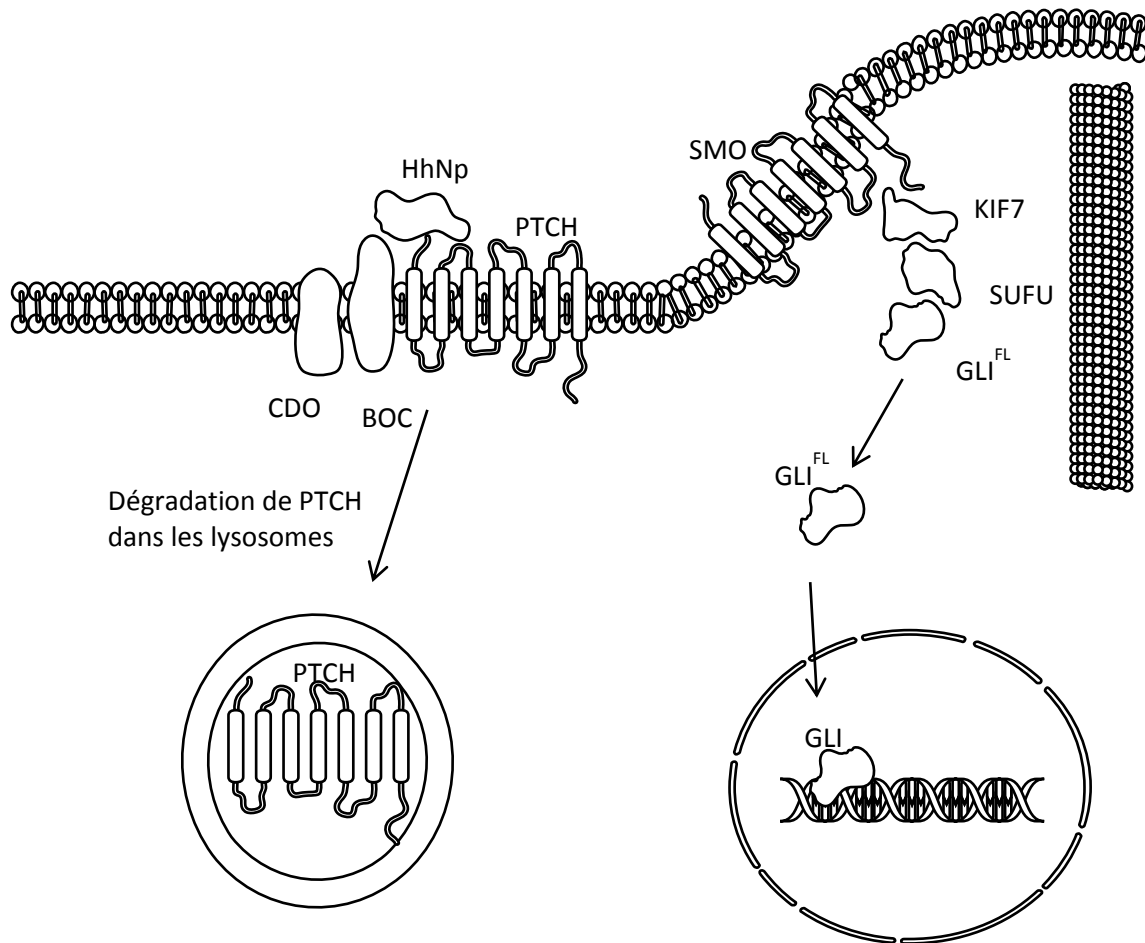


Figure 5 Schéma de la voie Hedgehog en présence de ligands

La fixation des ligands de la voie Hh déplace PTCH des cils primaires, induit son internalisation et sa dégradation dans les lysosomes. Ceci aboutit à la levée d'inhibition de SMO et à son expression à la surface cellulaire, au niveau des cils primaires. Pour être actif, SMO nécessite une phosphorylation par différentes protéines kinases, *Protein Kinase A* (PKA), *Casein Kinase 1* (CK1) et *G protein-coupled Receptor Kinase 2* (GRK2)²⁸, qui entraîne un changement de conformation au niveau de sa partie C-terminale. C'est la conformation « ouverte ».

SMO activé permet la dissociation de GLI du complexe Kif7 / SUFU et son activation. GLI^A, *i.e.* la forme totale (*full length*) et active de GLI, migre ensuite dans le noyau (Figure 5)²⁹.

3. Facteurs de transcriptions GLI

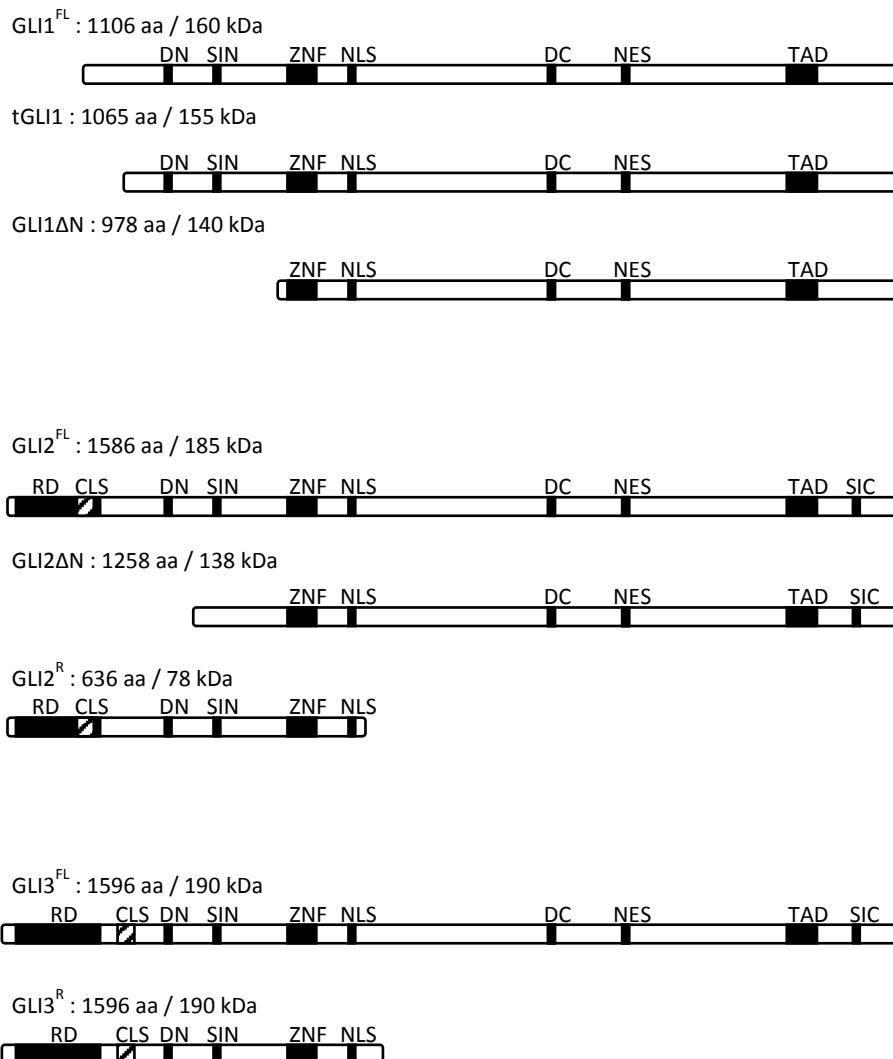


Figure 6 Représentations des isoformes des facteurs de transcription GLI1, GLI2 et GLI3¹⁰

GLI2/3^R = GLI2/3 *repressor* ; GLI1/2/3^{FL} = GLI1/2/3 *full length* ; GLI1/2ΔN = GLI1/2 avec délétion en N terminal ; tGLI1 = *truncated* GLI1

Les protéines GLI sont des membres de la famille de facteurs de transcription en doigt de zinc GLI-Kruppel³⁰. Elles possèdent cinq motifs en doigt de zinc de type C₂H₂-Kruppel qui constituent le domaine de liaison à l'ADN²⁴.

Deux séquences, *Nuclear export sequence* (NES) et *Nuclear localisation sequence* (NLS) assurent le transport nucléaire.

Le *SUFU-interacting site* en N-terminal (SIN), assure la liaison à SUFU et donc la rétention cytoplasmique de GLI.

GLI2 et GLI3 possèdent également un site de liaison à SUFU en C-terminal (SIC).

Si toutes les protéines GLI possèdent un *Transactivation Domain* en C-terminal, seuls GLI2 et GLI3 possèdent un domaine inhibiteur en C-terminal et peuvent fonctionner à la fois comme activateurs et inhibiteurs selon le contexte. Ce domaine inhibiteur est responsable de la moindre activité de GLI2 et GLI3. La perte du domaine inhibiteur en N-terminal de GLI2 peut cependant donner une forme complètement active (Figure 6).

Deux isoformes de GLI1 ont été écrits, GLI1ΔN et tGLI1.

GLI1ΔN est un variant correspondant à la perte d'un degron et du site d'interactions avec SUFU en N-terminal. Cette délétion empêche la liaison à SUFU et la dégradation de GLI1.

L'expression du variant GLI1ΔN dans les tissus tumoraux n'a cependant pas été démontrée à l'heure actuelle.

A l'inverse, le deuxième variant décrit, tGLI1, est retrouvé de manière importante dans les tissus tumoraux. Il correspond à la perte de 41 acides aminés en N-terminal, sans perte de domaine fonctionnel parmi ceux décrits précédemment (Figure 6).

4. Voie non canonique et non classique

La voie Hedgehog non canonique correspond à l'activation d'une partie de la voie Hedgehog mais n'implique pas l'activité transcriptionnelle de GLI³¹.

La voie non classique implique l'activité transcriptionnelle de GLI mais indépendamment de l'axe Hh-PTCH-SMO.

Il est à noter que la nomenclature de ces voies dans la littérature est parfois conflictuelle et la voie non classique est appelée voie non-canonique d'activation de GLI.

Activation de GLI indépendante de l'axe Hh-PTCH-SMO : voie non classique

L'activation des facteurs de GLI indépendamment de l'axe Hh-PTCH-SMO est principalement due à l'intrication des différentes voies de signalisation cellulaire³¹.

L'implication de nombreuses cytokines et chemokines, notamment produites par le microenvironnement tumoral ou la tumeur elle-même, sur l'activité de GLI a été démontrée¹⁰.

L'existence de ces voies, indépendantes de SMO, pourrait compromettre l'utilisation des médicaments inhibiteurs de SMO.

Voie non canonique dépendant de PTCH : type I

PTCH semble impliqué dans la prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules, indépendamment de SMO. Les protéines identifiées à l'heure actuelle sont la cycline B1 et la caspase 9³².

Voie non canonique dépendant de SMO : type II

Les effets de SMO indépendants de GLI sont très variés. SMO jouerait un rôle sur le métabolisme et la contraction cellulaire ainsi que sur le réarrangement du cytosquelette³³.

Ces effets seraient dus à la structure de SMO qui agirait comme un récepteur couplé aux protéine G et ciblerait ainsi d'autres protéines que celles de la voie canonique³².

III. Vismodégib

Le vismodégib ERIVEDGE®, nom de développement GDC-0449, est le premier inhibiteur de la voie Hh commercialisé.

Il a obtenu son autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2013 en France pour les patients atteints de carcinomes basocellulaires métastatiques (CBCm) symptomatiques et les carcinomes basocellulaires localement avancés (CBCla) pour lesquels la chirurgie ou la radiothérapie ne sont pas appropriées.

Dans son avis, publié le 18 décembre 2013, la commission de la transparence a attribué un service médical rendu (SMR) important et une amélioration du service médical rendu (ASMR) mineure (ASMR IV)³⁴.

La commission a également donné un avis favorable à l'inscription sur la liste des spécialités remboursables aux assurés sociaux et sur la liste des médicaments agréés aux collectivités. Elle précise que le vismodégib est un traitement de recours dont l'initiation doit être décidée en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP)³⁴.

1. Caractéristiques physico-chimique

Les caractéristiques physico-chimiques ont été calculées en utilisant le logiciel de calcul Chemicalize, développé par CHEMAXON^{35,36}.

Le vismodégib ($C_{19}H_{14}Cl_2N_2O_3S$) est une base cristalline.

Le point isoélectrique est à 6,72, le pKa acide le plus fort est de 3,10 et le pKa basique le plus fort est de 3,87.

La solubilité est faible et dépendante du pH, $\log S = - 5,49$.

Le vismodégib est une molécule lipophile, $\log P = 3,79$.

Sa masse molaire est de 421,29 g.mol⁻¹.

2. Caractéristiques pharmacocinétiques

Les caractéristiques pharmacocinétiques ont été étudiées chez le volontaire sain (n = 6 par groupe) après administration unique de 150 mg de vismodégib et après administrations quotidiennes de 150 mg³⁷.

Absorption

La biodisponibilité du vismodégib est faible, 31,8 % (CV = 14,5 %) après administration unique et 7,4 % (CV = 34,4 %) après administration quotidienne. La résorption du vismodégib est saturable, pas d'augmentation des concentrations pour des prises supérieures à 150 mg par jour³⁸.

Ceci s'explique par la faible hydrophilie et la solubilité dépendante du pH³⁷.

Distribution

Le volume de distribution du vismodégib est faible, 16,4 L (CV = 11,3 %) après administration unique et 26,8 L (CV = 21,7 %). C'est un médicament très fortement lié aux protéines plasmatiques, principalement à l' α 1 Glycoprotéine Acide (AGP). Le pourcentage de fixation protéique est de 97 % in vitro³⁹.

Métabolisation - Élimination

La métabolisation hépatique fait intervenir des phénomènes d'oxydation, glucurono-conjugaison et des ruptures du cycle pyridine⁴⁰.

L'élimination est lente, la demi-vie est de 11,3 jours (CV = 20,4 %) après administration d'une dose unique et 9,92 jours (CV = 24,5 %) après administrations répétées³⁷.

La voie d'excrétion majoritaire est la voie hépatique avec 82 % de la dose administrée retrouvée dans les selles⁴¹.

Pharmacocinétique de population⁴²

Une étude semi-mécanistique de pharmacocinétique de population a été publiée par Lu et al. L'analyse porte sur les échantillons combinés de 5 essais cliniques de phase I et II.

Le modèle décrivant le mieux la pharmacocinétique du vismodégib était un modèle à un compartiment, une cinétique d'absorption d'ordre 1, une cinétique d'élimination de la forme libre d'ordre 1 et une liaison saturable à l'AGP.

L'analyse des covariables d'intérêt a retenu l'âge et le poids. La clairance de la forme libre est plus lente quand l'âge augmente. Le volume central de distribution est plus important quand le poids augmente.

La variabilité interindividuelle était de 48,7 % pour la clairance apparente de la forme libre, de 45,5 % pour le volume central de distribution et de 19,7 % pour le coefficient d'affinité à l'AGP.

La variabilité résiduelle (*i.e.* la variabilité intra-individuelle) était de 26,7 % pour la concentration totale en vismodégib et de 42,4 % pour la concentration en forme libre.

3. Données précliniques

a. Pharmacocinétique et allométrie

Lors d'une étude préclinique, les paramètres pharmacocinétiques du vismodégib ont été estimés chez quatre espèces : la souris (n = 27), le rat (n = 3), le singe (n = 3) et le chien (n = 3).

Chaque espèce recevait 1 mg.kg⁻¹ de vismodégib par voie intraveineuse et 2 mg.kg⁻¹ (chien et singe) ou 5 mg.kg⁻¹ (souris et rat) par voie orale.

Le vismodégib avait une faible clairance hépatique chez la souris, le rat et le chien. Chez le singe, la clairance était modérée. La demi-vie s'étalait de 0,976 heure chez la souris à 41,8 heures chez le chien (Tableau 5).

Après administration par voie orale, la biodisponibilité allait de 13 à 53 %⁴³.

Tableau 5 Paramètres pharmacocinétiques après administration d'une dose unique de vismodégib chez différentes espèces animales⁴³

	Souris	Rat	Chien	Singe
Administration par voie intraveineuse				
Nombre d'animaux	27	3	3	3
Dose (mg.kg ⁻¹)	1	1	1	1
Cl (mL.min ⁻¹ .kg ⁻¹)	23,00	4,65	0,34	19,30

$t_{1/2}$	0,98	1,32	41,80	0,58
VSS (L.kg ⁻¹)	1,68	0,49	1,03	0,98
Administration par voie orale				
Nombre d'animaux	27	3	3	3
Dose (mg.kg ⁻¹)	5	5	2	2
Biodisponibilité (%)	19,20	52,90	32,90	13,40

Une estimation de la clairance, du volume de distribution et de la demi-vie chez l'homme a été effectuée en utilisant une échelle allométrique simple.

Le volume de distribution prédit chez l'humain était de 0,766 L.kg⁻¹, la clairance de 0,096 mL.min⁻¹.kg⁻¹ après exclusion du singe et la demi-vie de 92,1 heures après exclusion du singe.

Les paramètres prédits par allométrie simple sont éloignés des paramètres retrouvés chez l'homme, détaillés ci-dessus. Cette différence s'explique par la pharmacocinétique complexe du vismodégib⁴⁴ et par les différences physiologiques inter-espèces³⁹.

b. Efficacité

L'efficacité du vismodégib a été testée en préclinique grâce à deux types de modèles murins tumoraux : un modèle dépendant des ligands et un modèle mutationnel⁴⁵.

Modèle mutationnel

Le modèle mutationnel de méduloblastome correspond à un modèle d'allogreffe en série à des souris CD1 *nude* de tumeurs du système nerveux central (SNC) générées spontanément chez des souris mutés PTCH1+/-.

Les souris recevaient du vismodégib quotidiennement par voie orale en une fois par jour à des doses allant de 0,3 mg.kg⁻¹ à 75 mg.kg⁻¹ pendant 14 jours.

Une régression du volume tumoral était observée à partir de la dose 25 mg.kg⁻¹. Cet effet n'augmentait pas avec la dose⁴⁶.

Modèle dépendant des ligands

Les modèles dépendants des ligands (D5123 et 1040830) correspondent à des xénogreffes de tumeurs colo-rectales récupérées chez des patients et implantées à des souris CD1 *nude*.

Les souris recevaient du vismodégib deux fois par jour par voie orale à des doses allant de 23 à 92 mg.kg⁻¹ pendant 18 à 21 jours.

La dose nécessaire pour observer une inhibition de la croissance tumorale était de 46 mg.kg⁻¹ deux fois par jour⁴⁶.

Relation pharmacocinétique-pharmacodynamique

Les souris allogreffées (méduloblastome) étaient réparties en trois groupes de doses (1, 10 et 50 mg.kg⁻¹) et un groupe placebo. Le vismodégib était administré en dose unique par voie orale.

L'expression de GLI1 était mesurée par qPCR de 2 à 32 heures après l'administration.

L'inhibition maximale de GLI1 apparaissait pour des doses allant de 3,2 à 13 µmol.L⁻¹. Les concentrations inférieures à 0,1 µmol.L⁻¹ ne permettaient pas une inhibition de la voie.

Les souris xénogreffées recevaient du vismodégib deux fois par jour par voie orale pendant 5 jours à des doses allant de 11,5 à 92 mg.kg⁻¹.

Une inhibition significative de GLI1 était observée pour des concentrations plasmatiques de 7,2 à 10,1 µmol.L⁻¹⁴⁶.

La différence d'efficacité observée dans ces deux modèles, modèle mutationnel et modèle dépendant des ligands, s'explique par les types de tumeurs impliquées : modèle tumoral mutationnel d'un côté avec activation autocrine de la voie Hh, modèle tumoral dépendant des ligands de l'autre avec activation paracrine, les ligands étant sécrétés par le stroma.

L'estimation de l'IC 50 dans les modèles d'allogreffe et de xénogreffe étaient cependant proches, respectivement 0,165 µmol.L⁻¹ et 0,267µmol.L⁻¹.

4. Données cliniques

Tolérance

Les données de tolérance proviennent de 4 études menées chez des patients présentant des CBC localement avancés qui ont reçus du vismodégib à des doses supérieures ou égales à 150 mg par jour⁴⁷.

Sur les 138 patients, 64 % était des hommes. La médiane d'âge était de 61 ans.

Les effets indésirables survenant chez plus de 10 % des patients sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 6).

Tableau 6 Données de toxicité du vismodégib déclarées dans le dossier d'autorisation de mise sur le marché américain⁴⁷

Vismodégib 150 mg Q1D (n = 138)			
Effets indésirables	Tous grades	Grade 3	Grade 4
Affections gastro-intestinales			
Nausée	30%	0,70%	
Diarrhée	29%	0,70%	
Constipation	21%		
Vomissement	14%		
Troubles généraux			
Fatigue	40%	5%	0,40%
Perte de poids	45%	7%	
Troubles du métabolisme et de la nutrition			
Perte d'appétit	25%	2,20%	
Affections musculosquelettique			
Spasme musculaires	72%	3,60%	
Arthralgies	16%	0,70%	
Affections du système nerveux			
Dysgueusie	55%		
Agueusie	11%		

Affections de la peau

Alopécie 64%

La fréquence de ces effets indésirables est cohérente avec celle retrouvée dans les essais cliniques menés ultérieurement, ERIVANCE et STEVIE.

Lors de l'étude ERIVANCE, la totalité des patients ont présenté des effets indésirables et 17,3 % ont arrêté le traitement pour cette raison⁴⁸.

Lors de l'étude STEVIE, 98 % des patients ont déclarés des effets indésirables⁴⁹.

Efficacité

L'efficacité du vismodégib à la dose de 150 mg par jour a été évaluée dans les études ERIVANCE et STEVIE. Les patients étaient traités jusqu'à progression ou toxicité. Des interruptions de traitement de 4 à 8 semaines étaient permises dans le *design* des études⁵⁰.

Les patients devaient avoir reçu une radiothérapie, sauf contre-indication, et avoir une contre-indication ou être non éligible à la chirurgie.

Tableau 7 Résultats des essais cliniques ERIVANCE et STEVIE⁵⁰

ORR = Overall Response Rate ; CR = Complete Response ; PR = Partial Response ; SD = Stable Disease ; PD = Progressive disease ; PFS = Progression Free Survival ; OS = Overall Survival ; CBCla = Carcinome BasoCellulaire localement avancé ; CBCm = Carcinome BasoCellulaire métastatique

Cohorte	Nombre de patients	Taux de réponse (%)					PFS (mois)	OS (%)	
		ORR	CR	PR	SD	PD		1 an	2 ans
Essai ERIVANCE (follow up > 39 mois)									
CBCla									
	63	60,3	31,7	28,6	23,8	9,5	12,9	93,2	85,5
CBCm									
	33	48,5	0,0	48,5	42,4	6,1	9,3	78,7	62,3
Essai STEVIE (follow up > 12 mois)									

CBCla	1077	68,5	33,4	35,1	25,1	1,9	23,2	NA	NA
CBCm	84	36,9	4,8	32,1	46,4	10,7	13,1	NA	NA

Le taux de réponse dans ces deux études était élevé, 60,3 % pour ERIVANCE et 68,5 % pour STEVIE pour les CBCla (Tableau 7).

Une analyse en sous-groupe a montré que les patients atteints de Syndrome de Gorlin répondait mieux, taux de réponse de 80 %.

Une explication apportée par les investigateurs est le plus jeune âge, un meilleur état général et des tumeurs plus petites dans cette population⁵⁰.

Partie III - Développement et validation d'une méthode d'analyse des concentrations plasmatiques en vismodégib

I. Introduction

Le développement d'une méthode de dosage analytique des concentrations plasmatiques en vismodégib était indispensable pour ce projet, tant pour la partie préclinique que pour la partie clinique.

La méthode de dosage permettra une étude du profil pharmacocinétique sur 24 heures chez les souris soit après administration par gavage intragastrique soit après administration avec le nouveau mode d'administration développé pour la partie préclinique et une étude de la variabilité intra et interindividuelle des concentrations plasmatiques totales résiduelles en vismodégib pour la partie clinique.

Face à ces utilisations très différentes, il était nécessaire de créer une méthode de dosage ayant une gamme de concentration large avec des concentrations attendues de l'ordre du nanogramme par millilitres jusqu'au microgramme par millilitres.

Face à une gamme aussi large, il faut alors tenir compte de la contamination possible de l'appareillage, en fonction des caractéristiques physico-chimiques du médicament, lors du traitement des échantillons à fortes concentrations tout en préservant une sensibilité suffisante pour permettre la détection des faibles concentrations.

En cas de contamination, les échantillons dosés après un échantillon concentré seront pollués et les concentrations surévaluées. C'est le *carryover*.

II. Matériel et méthode

1. Fourniture

L'eau ultrapure est produite grâce à un système de déminéralisation et de filtration Aquadem EFP310 de Chez Veolia Water STI.

L'acétonitrile et le méthanol, gamme Chromasolv, de qualité LC-MS, proviennent de chez Honeywell.

L'ammoniaque et l'acide formique, grade AnalaR Normapur, proviennent de chez VWR.

Le dichlorométhane, qualité HPLC, provient de chez Fischer Scientific.

Le plasma humain poolé, fourni par l'établissement français du sang Aquitaine Limousin (EFSAL, Bordeaux, France), provient de volontaire sain.

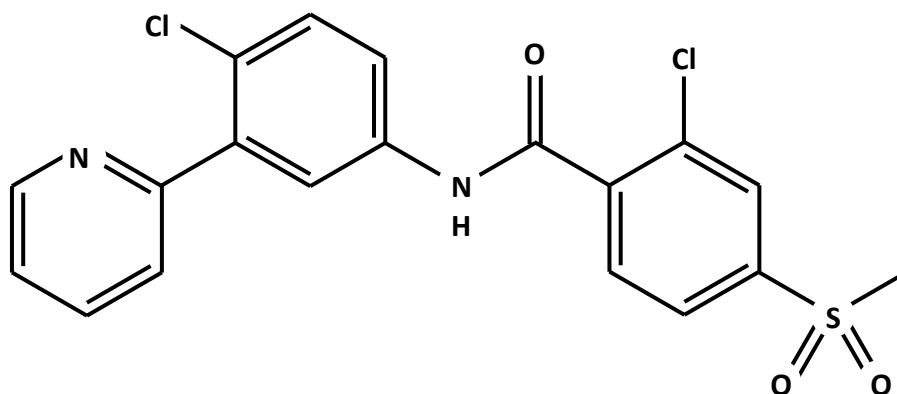


Figure 7 Formule développée plane du vismodégib

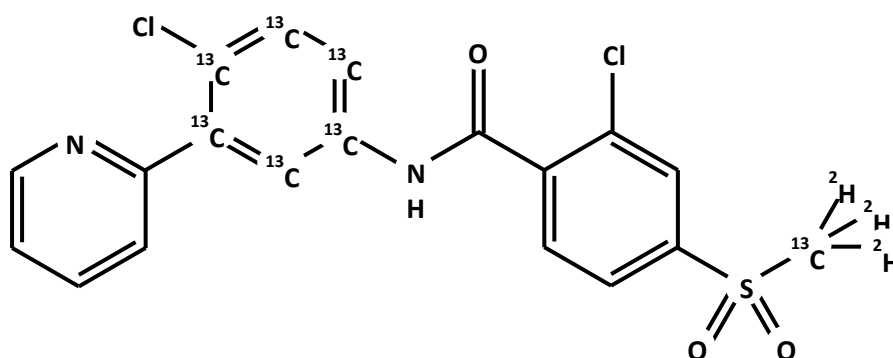


Figure 8 Formule développée plane du [¹³C₇, ²H₃]-vismodégib (étalon interne de la technique analytique)

Le vismodégib (Figure 7) et l'étalon interne (Figure 8) proviennent de chez Alsachim. L'étalon interne est du [¹³C₇, ²H₃]-vismodégib, *i.e.* du vismodégib marqué au carbone 13 et au deutérium. Les masses molaires du vismodégib et de l'étalon interne sont respectivement de 421,30 et 431,26 g.mol⁻¹.

2. Instrumentation

Le système LC-MS/MS est composé d'une chaîne HPLC 1260 infinity Agilent Technologies, d'un spectromètre de masse API3200 équipé d'une source d'ionisation par électroébuliseur Turbo Ionspray V de chez AB Sciex.

Le pilotage des modules de l'HPLC et du spectromètre de masse ainsi que l'acquisition de données sont effectués sur le logiciel Analyst version 1.5.1 de chez AB Sciex.

L'extraction en phase solide est effectuée sur des cartouches échangeuses de cation Strata-X-C 33µm, 30mg/1mL et un manifold de vide 12 puits de chez Phenomenex.

L'évaporation à sec est réalisée avec un évaporateur rotatif RC10-10 et un piège réfrigéré RCT 90 de chez Jouan. Le vide est obtenu grâce à une pompe à vide RV5 de chez Edwards.

3. Conditions analytiques

Les phases mobiles sont de l'acétonitrile (phase mobile A), de l'eau – acide formique 0,1 % (phase mobile B) et de l'eau (phase mobile C).

Les échantillons sont analysés par chromatographie liquide en phase inverse avec une colonne C18 AQ 150 x 2 mm ; taille des particules : 3 µm sphérique et taille des pores : 120 Å de chez Bischoff Chromatography. Un fritté inox 0,5 µm est positionné en ligne.

Les échantillons sont élués en conditions isocratiques (80 % de phase mobile A et 20 % de phase mobile B) à 200 µL.min⁻¹ pendant 5 minutes.

La colonne est ensuite rincée en conditions isocratiques (100% de phase mobile A) à 200 µL.min⁻¹ pendant 40 minutes.

La colonne est ensuite équilibrée en conditions isocratiques (80 % de phase mobile A et 20 % de phase mobile B) à 200 µL.min⁻¹ pendant 15 minutes.

L'optimisation des paramètres du spectromètre de masse a été faite grâce à une solution de référence de vismodégib et une solution de référence d'étalon interne par infusion directe et ionisées par *Electrospray Ionization* (ESI) en mode positif.

Les analyses sont faites en mode SRM en utilisant les transitions suivantes, respectivement pour l'analyte et l'étalon interne : m/z 421,1 -> m/z 139,2 et m/z 431,1 -> m/z 139,2. Le *dwell time* est fixé à 250ms.

Les valeurs de gaz 1 et 2 (GS1 et GS2) sont respectivement de 60 et 20 psi. L'alimentation *Curtain Gaz* (CUR) est de 10 psi. La tension *IonSpray* (IS) est de 5500 V. La température de la source (TEM) est de 400°C.

Le potentiel de défragmentation (DP) est de 50 V.

4. Préparations des références et des contrôles qualités

Toutes les solutions de références ont été faites par dissolution du vismodégib dans du DMSO à la concentration de 1 mg.mL⁻¹ puis aliquotées en *cryovial* et stockées à -20°C. Les références de calibration sont ensuite préparées par dilution de la solution stock dans du plasma humain pour obtenir 8 points de concentrations entre 500 et 30 000 ng.mL⁻¹ : 500 ng.mL⁻¹ ; 1 000 ng.mL⁻¹ ; 5 000 ng.mL⁻¹ ; 10 000 ng.mL⁻¹ ; 20 000 ng.mL⁻¹ et 30 000 ng.mL⁻¹.

Les contrôles qualités bas, moyen et haut sont préparés par dilution de la solution stock dans du plasma humain aux concentrations respectives de 1 500 ng.mL⁻¹ ; 12 500 ng.mL⁻¹ et 25 000 ng.mL⁻¹.

La solution de travail d'étalon interne a été préparée par dissolution dans du DMSO à la concentration de 2 µg.mL⁻¹ puis aliquotée et stockée à -20°C.

5. Extraction en phase solide

Un volume de 10 µL d'échantillon à doser est dilué dans 500 µL de solution d'eau – acide formique 5 % et 12,5 µL d'étalon interne sont ajoutés.

La cartouche d'extraction est conditionnée avec 1 000 µL de méthanol puis 1 000 µL d'eau – acide formique 5 %.

Les échantillons sont ensuite chargés sur la cartouche.

La cartouche est lavée avec 1 000 µL de solution d'eau - acide formique 5% puis 1 000 µL de méthanol.

La cartouche est ensuite éluée doucement avec 3 x 300 µL de solution de méthanol – ammoniacale 5 %.

L'éluat est ensuite évaporé à sec dans un évaporateur rotatif sous vide thermostaté à 40°C puis reconstitué avec 100 µL de solution d'acétonitrile / eau acide formique 0,1 % (80/20, v/v).

Les échantillons sont ensuite transférés dans des vials bouchés pour analyse en LC-MS/MS.

6. Carryover

Carryover de l'autosampler

Le *carryover* du spectromètre de masse a été vérifié par analyse d'un blanc phase mobile (solution E : acétonitrile / eau acide formique 0,1% (80/20, v/v)) après analyse d'un échantillon de référence aqueux à 30 000 ng.mL⁻¹ dilués au cinquième dans la solution E afin de respecter la dilution inhérente à la préparation d'échantillon. Chaque test est répété trois fois.

Le *carryover* est évalué en mesurant l'aire sous la courbe (AUC) du vismodégib dans le blanc phase mobile.

L'*autosampler* utilisé, 1260 Infinity de chez Agilent, ne disposant pas d'un système de rinçage de l'aiguille, des vials de rinçage, disposés dans l'*autosampler*, ont été utilisés.

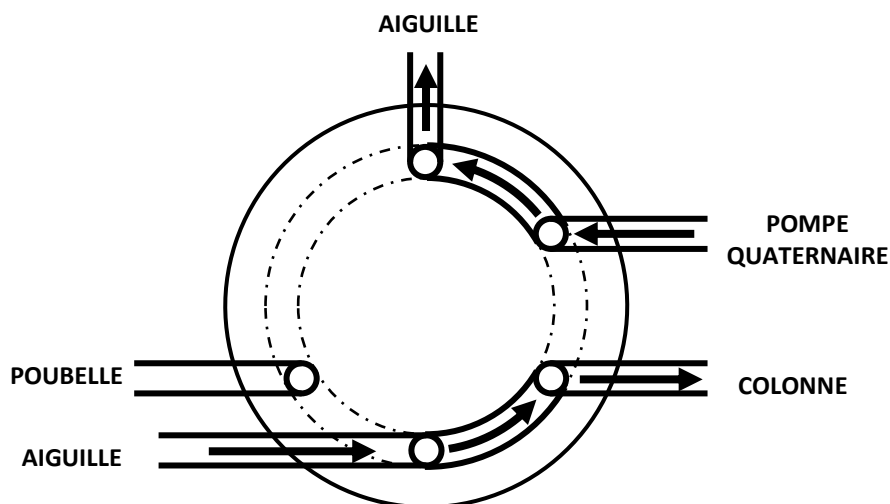


Figure 9 Direction du flux de phase mobile lorsque la valve est en position *mainpass*

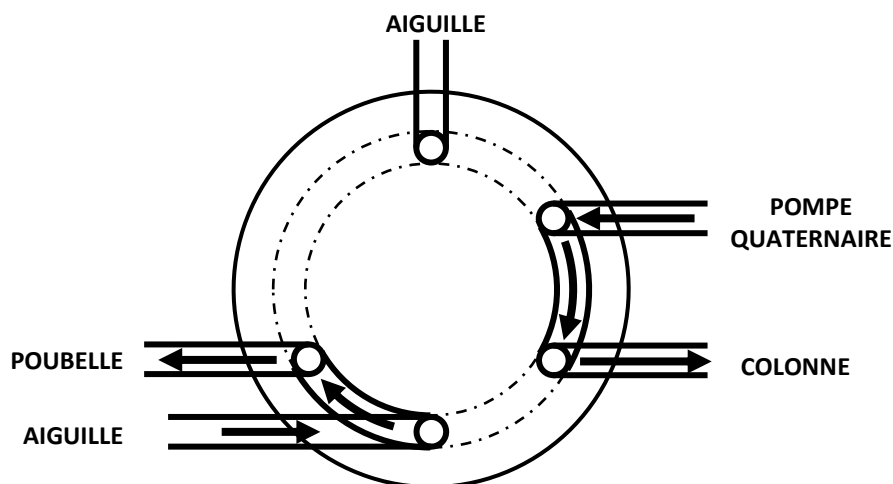


Figure 10 Direction du flux de phase mobile lorsque la valve est en position *bypass*

Afin de rendre la méthode plus maniable, le rinçage de l'aiguille avec les vials de rinçage se fait en même temps que l'analyse. La vanne Valco de l'*autosampler* est programmée pour passer de la position *mainpass* (Figure 9) à la position *bypass* (Figure 10) afin que la solution de rinçage soit éliminée dans la poubelle.

Il n'existe pas de séquence par défaut permettant d'effectuer ces fonctions sur le logiciel Analyst, il a donc été nécessaire de programmer une séquence détaillée (Tableau 8).

Tableau 8 Séquence de programmation simplifiée de l'autosampler Agilent 1260 infinity sur le logiciel Analyst v1.5.1

Step	Function	Value
1	Start request	50*12,5ms
2	Start pulse	50*12,5ms
3	Draw	volume = 20 μ L - speed = 200 μ L.min ⁻¹ - vial location = default
4	Inject	volume = 20 μ L - speed = 200 μ L.min ⁻¹ - vial location = default
5	Repeat	x times
6	Draw vial	volume = 100 μ L - speed = 300 μ L.min ⁻¹ - vial location = y
7	Eject	volume = 100 μ L - speed = 300 μ L.min ⁻¹ - vial location = y

```

8      End repeat
9      Repeat          x times
10     Draw vial       volume = 100µL - speed = 300µL.min-1 -
                        vial location = y
11     Eject          volume = 100µL - speed = 300µL.min-1 -
                        vial location = y
12     End repeat
13     Repeat          x times
14     Draw vial       volume = 100µL - speed = 300µL.min-1 -
                        vial location = y
15     Eject          volume = 100µL - speed = 300µL.min-1 -
                        vial location = y
16     End repeat
17     Repeat          x times
18     Draw vial       volume = 100µL - speed = 300µL.min-1 -
                        vial location = y
19     Inject         volume = 100µL - speed = 300µL.min-1 -
                        vial location = y
20     End repeat

```

Carryover du manifold

Le *carryover* du *manifold* a été vérifié par extraction d'un échantillon plasmatique de référence à 30 000 ng.mL⁻¹ suivi d'une extraction de blanc plasma dans le même puit. Le lavage du *manifold* à tester est réalisé entre les deux extractions.

Le *manifold* est composé de quatre parties démontables (Figure 11). L'embout luer femelle / vis sur lequel se fixe la cartouche pour extraction en phase solide, la plaque support en téflon, l'embout vis / luer mâle qui permet de fixer la dernière partie, l'aiguille.

Afin de limiter le *carryover*, les cônes utilisés sont des aiguilles à usage unique et sont jetées de suite après l'extraction.

Le reste du *manifold* est écouvillonné une première fois assemblé, de suite après l'extraction. Il est ensuite entièrement démonté. Les embouts sont mis aux ultrasons et la plaque support en téflon est de nouveau écouvillonnée.

Les blancs plasmas sont ensuite analysés en série.

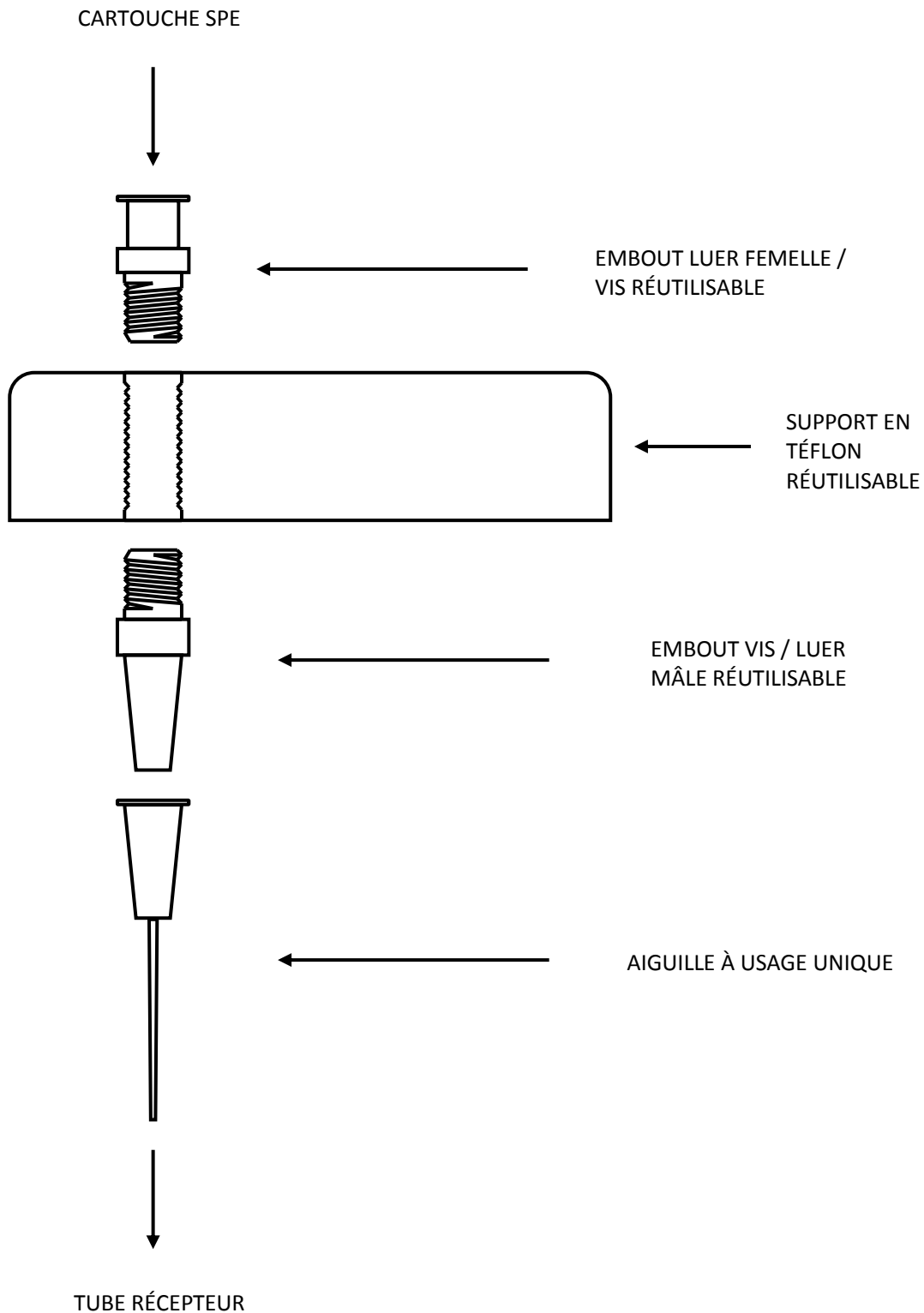


Figure 11 Schéma de montage du manifold

7. Validation analytique

La répétabilité inter et intrajournalière, la fidélité et l'exactitude sont testées par analyse de 6 répétitions de contrôle qualité sur trois jours différents. Selon les recommandations de la *Food and Drug Administration (FDA)*⁵¹ et de l'*International Council for Harmonisation (ICH)*⁵², les coefficients de variation inter et intrajournaliers doivent être inférieurs à 15 % pour tous les contrôles qualités et l'exactitude doit être comprise entre 85 % et 115 %.

La linéarité de la méthode est validée par analyse de trois courbes de calibration trois jours différents.

III. Résultats

1. Fragmentation des ions

La source *Turbo Ionspray* produit des molécules chargées de masse m/z 421,1 pour le vismodégib est m/z 431,1 pour l'étalon interne.

Pour l'analyse quantitative, les transitions utilisées sont m/z 421,1 \rightarrow m/z 139,2 pour le vismodégib et m/z 431,1 \rightarrow m/z 139,2 pour l'étalon interne.

Le temps de rétention moyen sous les conditions analytiques décrites ci-dessus est de 3,25 minutes pour le vismodégib et pour l'étalon interne.

2. Validation analytique de la méthode

Exactitude et précision

Tableau 9 Résultats des contrôles qualités de la validation de méthode analytique de dosage
des concentrations plasmatiques totales de vismodégib chez l'homme

	QC bas (1,5 µg.mL ⁻¹)	QC moyen (12,5 µg.mL ⁻¹)	QC haut (25 µg.mL ⁻¹)
Jour 1			
Concentration moyenne (µg.mL ⁻¹)	1,72	13,70	22,99
Exactitude %	114,90	109,60	91,97
Coefficient de variation (%)	1,65	2,64	10,73
Jour 2			
Concentration moyenne (µg.mL ⁻¹)	1,68	13,69	24,30
Exactitude %	112,37	109,50	97,19
Coefficient de variation (%)	1,62	2,91	3,95
Jour 3			
Concentration moyenne (µg.mL ⁻¹)	1,72	11,27	24,27
Exactitude %	114,60	90,21	97,08
Coefficient de variation (%)	2,50	14,20	3,61
Interjournalier			
Concentration moyenne (µg.mL ⁻¹)	1,71	13,33	23,77
Exactitude %	114,00	106,68	95,10
Coefficient de variation (%)	1,90	2,72	8,03

Concernant la variabilité intrajournalière, la précision va de 1,62 à 14,2 % et l'exactitude de 90,9 % à 114,9 %. L'exactitude est comprise dans l'intervalle de 85 % - 115 % et les coefficients de variations sont inférieurs à 15 % pour la totalité des échantillons.

Pour la variabilité interjournalière, la précision va de 1,90 % pour le QC bas à 8,03 % pour le QC haut. L'exactitude s'échelonne de 95,10 % à 114 %. L'exactitude est comprise dans

l'intervalle de 85 % - 115 % et les coefficients de variations sont inférieurs à 15 % pour la totalité des échantillons (Tableau 9).

Linéarité

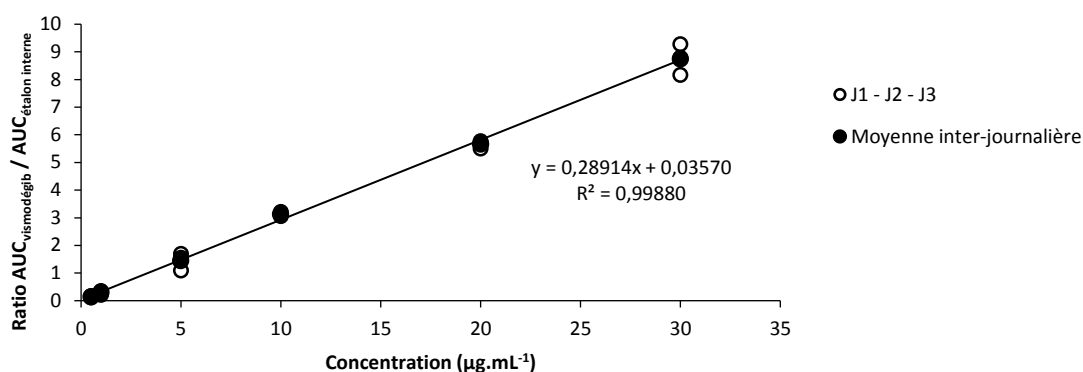


Figure 12 Résultats de la courbe de calibration de la méthode analytique de dosage des concentrations plasmatiques totales en vismodégib

Le coefficient de corrélation de la gamme de validation est supérieur à 0,99 ce qui montre une très bonne corrélation (Figure 12).

3. Carryover

Carryover de l'autosampler

Tableau 10 Description des conditions de lavage testées de l'autosampler 1260 infinity

Rinçage testé	
Condition 1	Pas de rinçage
Condition 2	5 injections de 100 µL d'acétonitrile valve en position <i>bypass</i>
Condition 3	10 injections de 100 µL d'acétonitrile valve en position <i>bypass</i>
Condition 4	5 injections de 100 µL d'acétonitrile valve en position <i>bypass</i> + 5 injections de 100µL d'acétonitrile valve en position <i>mainpass</i>

Condition 5	10 injections de 100 μ L d'acétonitrile valve en position <i>bypass</i> + 5 injections de 100 μ L d'acétonitrile valve en position <i>mainpass</i>
Condition 6	5 injections de 100 μ L de dichlorométhane / méthanol (50/50, v;v) valve en position <i>bypass</i> + 10 injections de 100 μ L d'acétonitrile valve en position <i>bypass</i> + 5 injections de 100 μ L d'acétonitrile valve en position <i>mainpass</i>
Condition 7	10 injections de 100 μ L de dichlorométhane / méthanol (50/50, v;v) valve en position <i>bypass</i> + 10 injections de 100 μ L d'acétonitrile valve en position <i>bypass</i> + 5 injections de 100 μ L d'acétonitrile valve en position <i>mainpass</i>
Condition 8	15 injections de 100 μ L de dichlorométhane / méthanol (50/50, v;v) valve en position <i>bypass</i> + 10 injections de 100 μ L d'acétonitrile valve en position <i>bypass</i> + 5 injections de 100 μ L d'acétonitrile valve en position <i>mainpass</i>

L'enchaînement d'injection de 5 fois 100 μ L d'acétonitrile avec la valve en position *bypass* puis de 5 fois 100 μ L d'acétonitrile avec la valve en position *mainpass* permet une diminution du *carryover* d'un facteur 14.

L'augmentation du nombre d'injection d'acétonitrile avec la valve en position *bypass* à 10 permet une diminution d'un facteur 18 de la contamination par rapport à la condition initiale. Cette séquence de base a donc été conservée.

L'ajout de 5 injections d'une solution de dichlorométhane / méthanol (50/50, v/v) avec la valve en position *bypass* permet de diminuer le *carryover* d'un facteur 46 par rapport à la condition initiale.

Les conditions 7 et 8 donnent des résultats identiques, soit une diminution d'un facteur 75 de la contamination par rapport à la condition initiale, ce sont celles qui permettent d'obtenir la plus grande diminution du *carryover*.

La condition 8 a été retenue, elle n'est pas plus compliquée à mettre en œuvre que la condition 7 et permet de garder une sécurité en cas d'échantillon hyper concentré (Tableau 10 ; Figure 13).

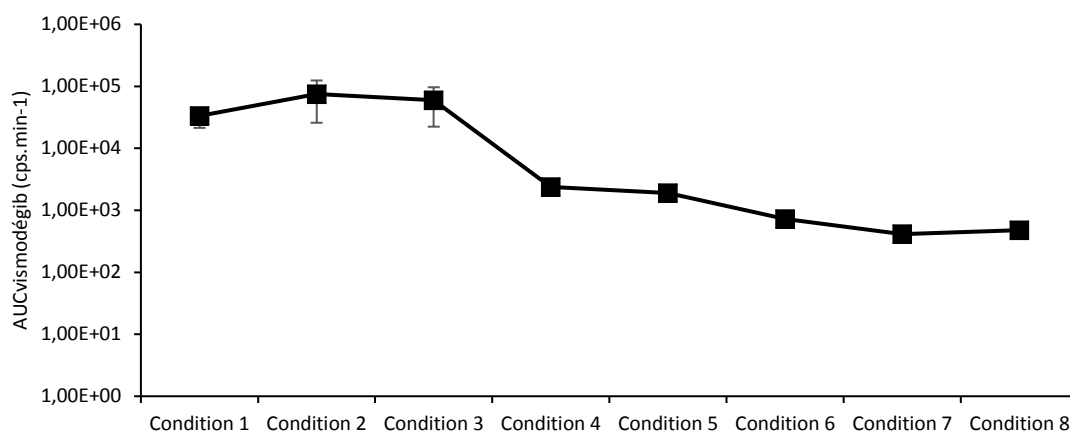


Figure 13 Évolution du *carryover* de l'*autosampler* selon les conditions de rinçage testées

Carryover du manifold

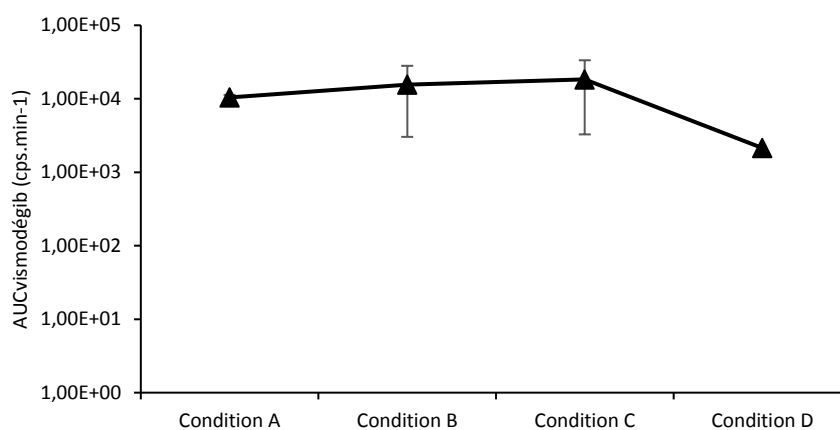


Figure 14 Évolution du *carryover* du *manifold* selon les conditions de lavage testées

Tableau 11 Description des conditions de lavage testées du *manifold*

Lavage testé	
Condition A	Pas de lavage
Condition B	Écouvillonnage solution eau / TFD4 (50/50, v;v) + bain ultrasons 10 minutes dans acétonitrile
Condition C	Écouvillonnage solution eau / TFD4 (50/50, v;v) + bain ultrasons 10 minutes méthanol - NH ₄ 5% + bain ultrasons 10 minutes acétonitrile

Condition D	Lavage acétone + écouvillonnage solution eau / TFD4 (50/50, v;v) + lavage acétone + bain ultrasons 10 minutes méthanol - NH ₄ 5% + bain ultrasons 10 minutes acétonitrile
-------------	--

Afin de limiter la contamination, nous avons décidé de réduire la prise d'essai à 10 µL alors qu'elle était de 50 µL dans les articles publiés jusqu'à présent.

La rédaction d'une procédure de lavage du *manifold* a permis une réduction de la contamination d'un facteur 10 (Figure 14).

Le lavage retenu est celui correspondant à la condition D (Tableau 11).

IV. Discussion

La contamination est un écueil majeur lors du développement de méthode analytique.

Le vismodégib s'est avéré être une molécule se fixant énormément sur les matériaux des appareillages d'extraction et d'analyse utilisés.

Nous avons identifié deux types de contamination : la contamination du *manifold* permettant l'extraction en phase solide lors de la préparation d'échantillon et la contamination de l'*autosampler* de la chromatographie liquide à haute performance.

Concernant le *manifold*, une optimisation de la préparation d'échantillon par diminution de la prise d'essais et une procédure de lavage de l'appareil nous a permis de limiter le *carryover*.

Pour l'*autosampler*, une méthode de rinçage originale par *switching* de la valve des positions *bypass* à *mainpass* a permis une diminution drastique du *carryover*.

Les avantages de cette méthode sont qu'elle est réalisée en même temps que le *run* ce qui est moins chronophage, qu'elle permet une analyse en série et qu'elle est entièrement automatisée.

Partie IV - Étude préclinique du vismodégib chez un modèle murin

I. Introduction

L'implication de la voie Hedgehog dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et hémato-neuronale a été démontrée. L'inhibition génique (souris *Dhh*^{+/-} et *Smoothed floxed*) ou pharmacologique (cyclopamine) de la voie Hh provoque une augmentation de la perméabilité vasculaire au niveau périphérique (nerf sciatique)⁵³ et au niveau central, et une diminution de l'expression des protéines de jonction⁵⁴.

L'augmentation de la perméabilité vasculaire après inhibition de la voie Hh est suffisante pour induire une neuropathie chez la souris⁵³.

Des effets indésirables de types neurologiques et vasculaires suite à l'administration de vismodégib n'ont pas été mis en évidence dans les études précliniques menées jusqu'à présent.

L'administration par gavage intragastrique utilisée chez la souris dans ces études ne permettent cependant pas une inhibition continue de la voie Hedgehog chez cette espèce⁴⁶ en raison d'une demi-vie extrêmement courte⁴⁵. Contrairement à l'homme, chez qui la demi-vie est beaucoup plus longue⁴⁷.

Nous avons donc développé une méthode d'administration continue par voie orale à type de gel remplaçant l'eau de boisson.

L'objectif principal est d'étudier la relation entre les doses administrées et les concentrations plasmatiques totales mesurées et entre les doses administrées et l'intensité des effets indésirables.

L'objectif est également d'étudier l'apparition d'effets indésirables de type neurologiques et vasculaires après administration chronique de vismodégib en utilisant un mode d'administration adaptée, permettant une inhibition continue de la voie Hedgehog, plus proche du profil retrouvé chez l'homme avec ce médicament.

II. Matériel et méthode

1. Prise en charge des animaux et groupes de traitement

Les animaux utilisés sont des souris consanguines C57/BL6 réparties en 4 groupes de 12 souris : un groupe « contrôle », un groupe recevant le vismodégib à 12,5 mg.kg⁻¹, un groupe recevant le vismodégib à la dose de 25 mg.kg⁻¹ et un groupe recevant le vismodégib à la dose de 75 mg.kg⁻¹. Les souris sont placées dans des cages ventilées dans une pièce avec traitement d'air et thermostatée à 25°C. Les animaux sont pris en charge selon les recommandations approuvées par l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)⁵⁵.

Deux modèles d'administration du vismodégib ont été appliqués à ces souris, un premier modèle par gavage, puis un second modèle par gel, développé pour cette étude.

2. Administration par gavage

Le vismodégib est mis en suspension extemporanément dans une solution de 0,5 % carboxyméthylcellulose (CMC) et de 0,2 % Tween 80. Un volume de 100 µL de suspension de médicament est ensuite administré par voie intragastrique au moyen d'une canule de gavage pendant 5 jours.

3. Administration par gel

a. Principe

Les animaux n'ont pas d'eau à disposition durant l'expérience, l'hydratation étant fournie par le gel contenant le vismodégib. Le gel est changé tous les jours ouvrables par précaution (afin de limiter les contaminations bactériennes et le dessèchement), et il est exceptionnellement laissé pour deux jours les week-ends ou les jours fériés.

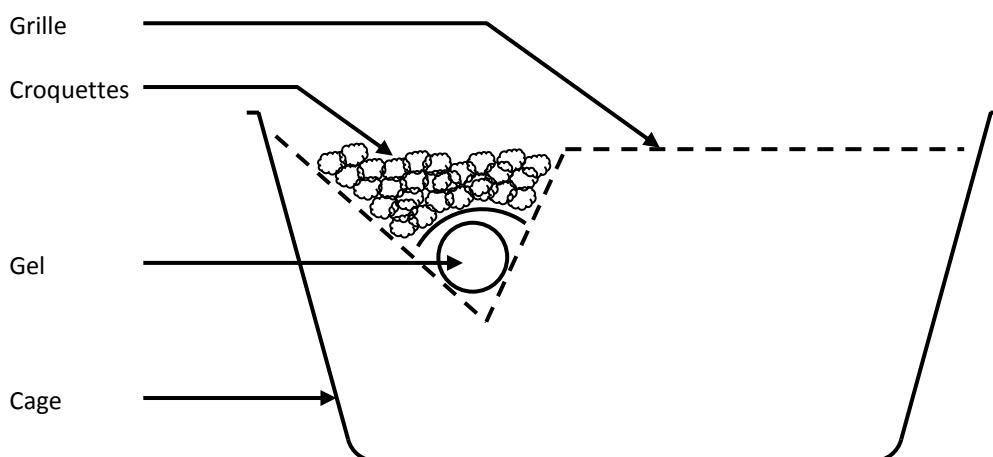


Figure 15 Coupe transversale des cages utilisées et positionnement du gel de vismodégib

Le gel est placé directement sur la grille de la cage au fond du compartiment à croquettes, protégé par un hémicylindre en plastique qui permet d'éviter le contact du gel avec les croquettes. Les croquettes sont ensuite ajoutées au-dessus du gel permettant de maintenir le gel plaqué contre la grille à disposition des souris (Figure 15).

Les souris ont été exposées au gel pendant une durée de 4 mois consécutifs.

b. Choix de l'agent gélifiant

Différents essais d'agents gélifiants (agar-agar, gélatine porcine, préparation pour dessert gélifié à la pêche) ont été effectués sur pailleasse. Après une première étude des caractères de chaque gels (tenue, texture, composition, ...), huit préparations ont été testées sur des souris (n = 6) pendant 24 heures.

c. Protocole de fabrication du gel

La fabrication de gel au vismodégib est réalisée sous hotte à flux laminaire vertical afin d'en limiter le risque de contamination bactérienne. L'agitation est maintenue durant toute la préparation afin d'obtenir une suspension homogène.

Une quantité d'eau adéquate est portée à 70°C sur plaque chauffante. La gélatine en poudre est ensuite ajoutée. Une fois la dissolution complète obtenue, le chauffage est éteint afin de faire décroître la température. Lorsque la température a atteint 45°C, le vismodégib

est ajouté sous forme de suspension dans de l'eau pour préparation injectable. Lorsque la température a atteint 35°C, le gel est coulé dans des tubes Falcon® stériles de 50 mL qui sont immédiatement placés dans un bain d'eau glacée au réfrigérateur. Lorsque les gels sont arrivés à l'état solide, ils sont stockés dans les tubes Falcon® au réfrigérateur à + 4°C.

Les gels sont fabriqués par lots pour une semaine de traitement des souris.

d. Mesure de la concentration en vismodégib des gels

Le dosage du vismodégib en suspension dans le gel afin d'effectuer la validation des gels est effectué par spectrophotométrie UV à 260 nm, maximum d'absorbance du vismodégib, après dissolution de 200 mg de gel dans 2 mL de DMSO et passage aux ultrasons pendant 3 fois 10 minutes.

Les standards de calibration sont réalisés à partir d'une solution mère de vismodégib dissoute dans du DMSO à la concentration de 3 g.L⁻¹. La solution mère est ensuite ajoutée à 200 mg de gélatine porcine 10% et dissoute grâce à l'ajout de DMSO.

La gamme de concentration comprend 5 points de concentrations : 15 µg.g⁻¹, 45 µg.g⁻¹, 90 µg.g⁻¹, 180 µg.g⁻¹ et 360 µg.g⁻¹. La validation se fait sur 4 jours, chaque mesure est répétée trois fois.

Pour valider la méthode, des tests de linéarité et de répétabilité inter et intrajournalière ont été réalisés. Un coefficient de variation maximal de 15 % a été fixé pour les tests de répétabilité.

e. Stabilité

Une étude de stabilité a été réalisée sur sept jours afin de valider la stabilité du gel au cours du temps. La stabilité du gel pour les trois concentrations utilisées a été étudiée sur une semaine. Les gels sont préparés et dosés à J₀ puis stockés à +4°C et dosés à J₇. Chaque mesure est répétée trois fois. Les coefficients de variation sont inférieurs à 15 %.

f. Homogénéité

L'homogénéité du gel a été testée après introduction du vismodégib soit sous forme de poudre, soit sous forme de suspension dans de l'eau pour préparation injectable. La concentration étudiée est celle correspondant au risque de précipitation le plus important, soit $75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Le gel est séparé en trois tronçons ; trois prises d'essai de 200 mg sont prélevées dans chaque tronçon puis dosées (Figure 16).

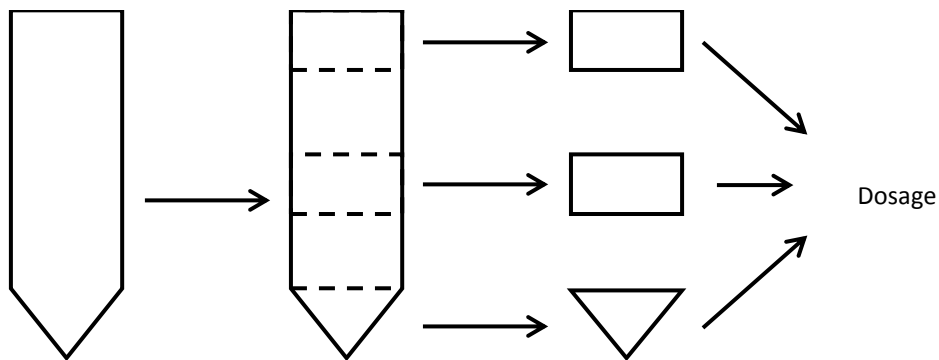


Figure 16 Principe du test d'homogénéité des barres de gel de vismodégib

4. Sacrifice et collection d'organe

Au bout de 4 mois de traitement par le vismodégib administré sous forme de gel, les souris sont sacrifiées.

Les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale de pentobarbital. Le dos des souris est tondu puis le reste de poils est retiré par application d'une crème dépilatoire.

Les vaisseaux de souris sont ensuite lavés par injection intracardiaque à cœur battant de chlorure de sodium 0,9 % afin d'éliminer l'albumine des vaisseaux.

Le crâne des souris est ensuite découpé en deux au scalpel afin de séparer et de recueillir les deux lobes des cerveaux. Une moitié de cerveau, destiné au Western Blot, est jetée dans l'azote liquide et l'autre est fixé dans du méthanol pendant 24 heures puis inclus en paraffine pour analyse histologique.

La langue, destinée à la PCR, est ensuite recueillie et jetée dans l'azote liquide.

Une bande de peau épilée est ensuite prélevée et fixée dans du méthanol pendant 48 heures puis incluse en paraffine pour analyse histologique.

5. Mesure d'exposition au vismodégib

a. Prélèvement sanguin

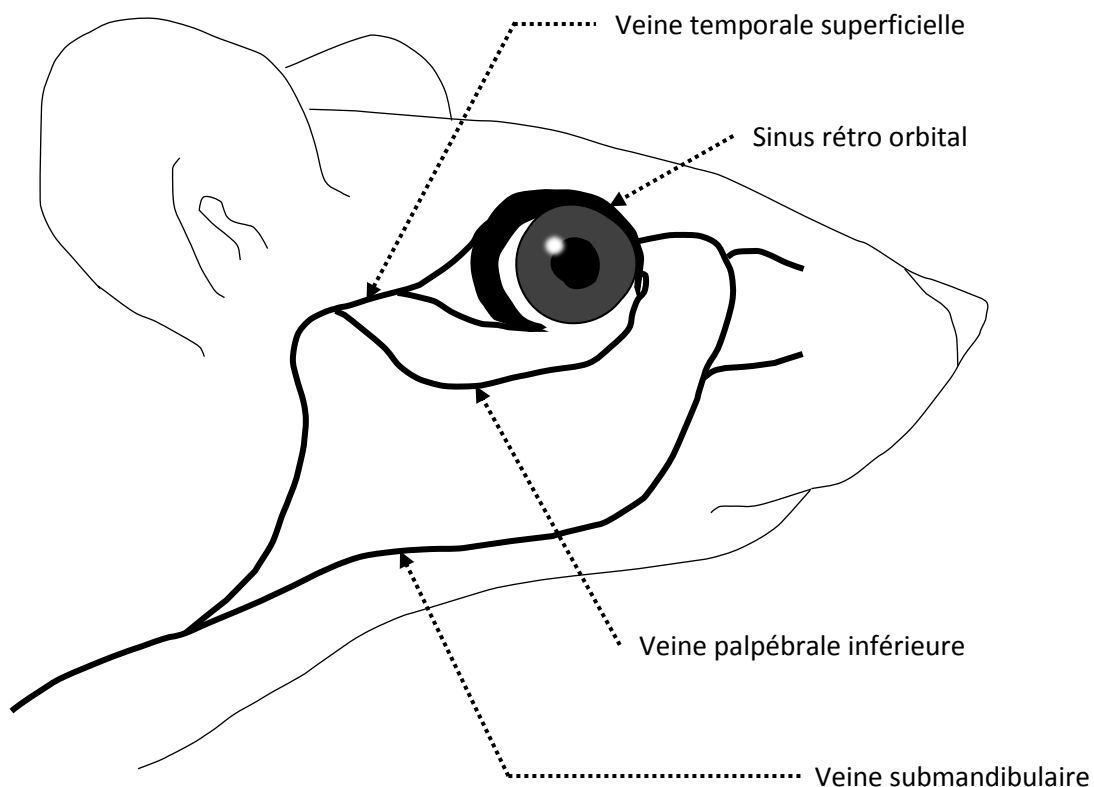


Figure 17 Veines faciales de la souris

Les prélèvements sanguins sont effectués au niveau de la veine submandibulaire (Figure 17). Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane puis piquées au niveau de la veine submandibulaire à l'aide d'une aiguille stérile à usage unique (taille 23G½) préalablement trempée dans de l'EDTA. Un volume de 200 μL de sang est ensuite recueilli dans un tube imprégné d'EDTA puis centrifugé 12 min à 3000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$. Une fois séparé du culot cellulaire, au moins 50 μL de plasma sont recueillis et placés à -80°C pour conservation avant

dosage par chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse triple quadripôle (LC-MS/MS).

b. Amplification génique de GLI

Expérience préliminaire

Une expérience préliminaire a été effectuée afin de déterminer dans quel organe l'inhibition de GLI par le vismodégib est la plus sensible, l'expression de GLI a été mesurée après 3 jours d'exposition au vismodégib par gavage à la dose de 30 mg.kg⁻¹ par jour. Trois organes ont été testés, le cerveau, le poumon, la langue. Le gène de ménage utilisé est la β -actin.

Expérience finale

Une seconde expérience a ensuite été conduite sur les souris ayant reçu le vismodégib par administration continue sous forme de gel. L'expression de GLI a été mesurée par PCR sur les langues et les cerveaux des souris exposées de manière chronique. Le gène de ménage utilisé est la β -actin.

c. Détection et identification de protéines

Les analyses de l'expression protéique ont été effectuées sur les cerveaux des souris sacrifiées. Les analyses sont faites en Western-Blot en utilisant la tubuline comme témoin de charge.

Les protéines analysées sont GLI, pour l'inhibition de la voie, et les protéines de jonctions *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM), *Junctional Adhesion Molecule A* (JAM-A) et *Zonula Ocludens* (ZO-1) pour l'analyse de la toxicité neuro-vasculaire.

6. Tests comportementaux

a. Dysgueusie

Ce test vise à évaluer la modification du goût chez les souris. Pour cela on compare la consommation de deux substances, une substance sucrée (sucrose 600 mM) et une substance amère (dénatonium benzoate 500 nM).

Dans chaque cage, deux gels sont mis à disposition des souris pour une durée de 24 heures, un gel contenant la substance à tester et un contenant uniquement de l'eau. A la fin des 24 heures, la consommation de chaque gel est évaluée et le rapport consommation substance à tester/consommation d'eau est calculé. Ce test est répété 2 fois.

b. Test d'allodynie de Von frey

Ce test vise à évaluer l'allodynie, qui correspond à une sensation douloureuse déclenchée par un stimulus normalement indolore.

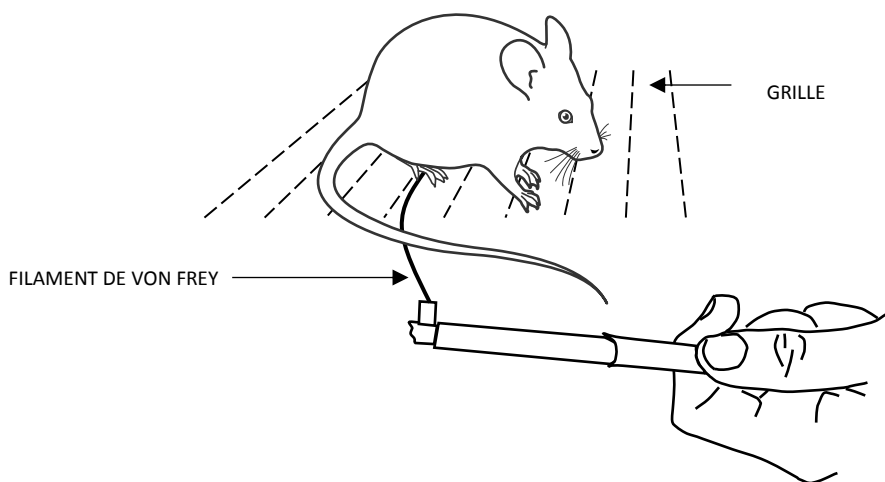


Figure 18 Principe du test d'allodynie de Von Frey. Exemple de réponse négative.

Les filaments de Von Frey sont un jeu de filaments calibrés permettant d'appliquer une force reproductible sur la peau. Une série de 7 filaments de diamètre croissant est appliquée

perpendiculairement sur la plante de la patte arrière de la souris jusqu'à plicature du filament à 7 reprises en respectant un intervalle d'une minute entre deux applications (Figure 18).

Le test de sensibilité est positif si la souris réagit par un soulèvement et une agitation de la patte sur laquelle le filament est appliqué.

III. Résultats

1. Développement de l'administration par gel

a. Choix de l'agent gélifiant

Tableau 12 Consommation des différents gels testés par souris par 24 heures

	Quantité consommée (g) par souris par 24 heures			
	Agar-agar 1%	Agar-agar 2%	Gélatine 10%	Gélatine 15%
Avec glucose 1%	9,35	4,84	5,94	4,79
Sans glucose	8,12	4,77	6,06	3,28

L'ajout de glucose n'augmentait que peu la consommation de gel par les souris. Par soucis de stabilité (physico-chimique et microbiologique) et pour simplification de la préparation, l'ajout de glucose n'a pas été retenu (Tableau 12).

La gélatine 10 % sans glucose a été retenue en raison de son coût, de la facilité de préparation et de sa bonne consommation par les souris.

b. Méthode analytique

Pour valider la méthode, des tests de linéarité et de répétabilité inter et intrajournalière ont été réalisés.

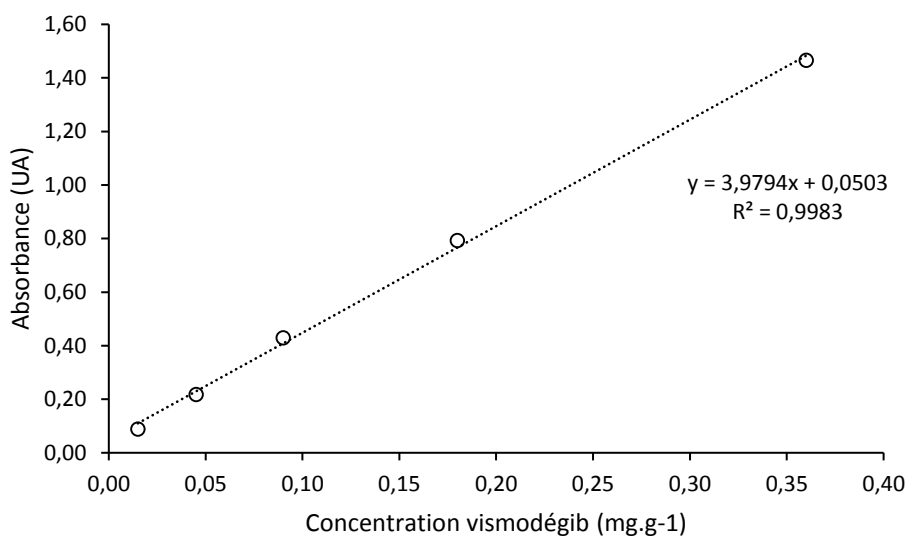


Figure 19 Courbe d'étalonnage de la méthode de dosage du vismodégib dans la gélatine 10

%

Tableau 13 Résultats de la courbe de calibration de la méthode analytique de dosage du vismodégib dans les gels

	C1	C2	C3	C4	C5
Concentration vismodégib (mg.g⁻¹)	0,02	0,05	0,09	0,18	0,36
Moyenne absorbance (UA)	0,09	0,22	0,43	0,79	1,47
Écart-type	0,01	0,02	0,02	0,00	0,02
Coefficient de variation (%)	13,59	8,40	4,52	0,43	1,59

Les coefficients de variation étaient inférieurs à la limite fixée (15 %) pour les tests de répétabilité (Tableau 13). Le coefficient de corrélation était > 0,99 (Figure 19).

Tableau 14 Résultats de l'étude de stabilité à sept jours du vismodégib en suspension dans la gélatine 10 %

	Concentration basse	Concentration haute
Moyenne absorbance J0	0,166	1,246
Moyenne absorbance J7	0,174	1,269
Pourcentage de recouvrement (%)	104,771	101,901

La stabilité du gel pour les trois concentrations utilisées a été étudiée sur une semaine. Les gels sont préparés et dosés à J₀ puis stockés à + 4°C et dosés à J₇. Chaque mesure est répétée trois fois. Les coefficients de variation sont inférieurs à 15% (Tableau 14).

Tableau 15 Comparaison de l'homogénéité du vismodégib dans les barres de gélatine 10 % selon deux processus de fabrication testés

		Absorbance (UA)	
		Processus suspension	Processus poudre
Tronçon haut	Prise d'essai 1	2,048	1,497
	Prise d'essai 2	1,996	1,625
	Prise d'essai 3	2,235	1,986
Tronçon milieu	Prise d'essai 1	2,080	1,560
	Prise d'essai 2	1,821	1,698
	Prise d'essai 3	1,963	1,591
Tronçon bas	Prise d'essai 1	1,879	1,281
	Prise d'essai 2	1,880	1,914
	Prise d'essai 3	2,003	1,914
Moyenne		1,989	1,674
Écart-type		0,125	0,229
Coefficient de variation (%)		6,291	13,707

Les coefficients de variation observés pour les deux processus testés, ajout du vismodégib sous forme de poudre, et ajout du vismodégib sous forme de suspension, étaient respectivement de 13,3 % et de 6 % (Tableau 15).

Le protocole retenu est donc celui pour lequel le vismodégib est rajouté sous forme de suspension.

2. Analyse concentration plasmatique

a. Administration par gavage

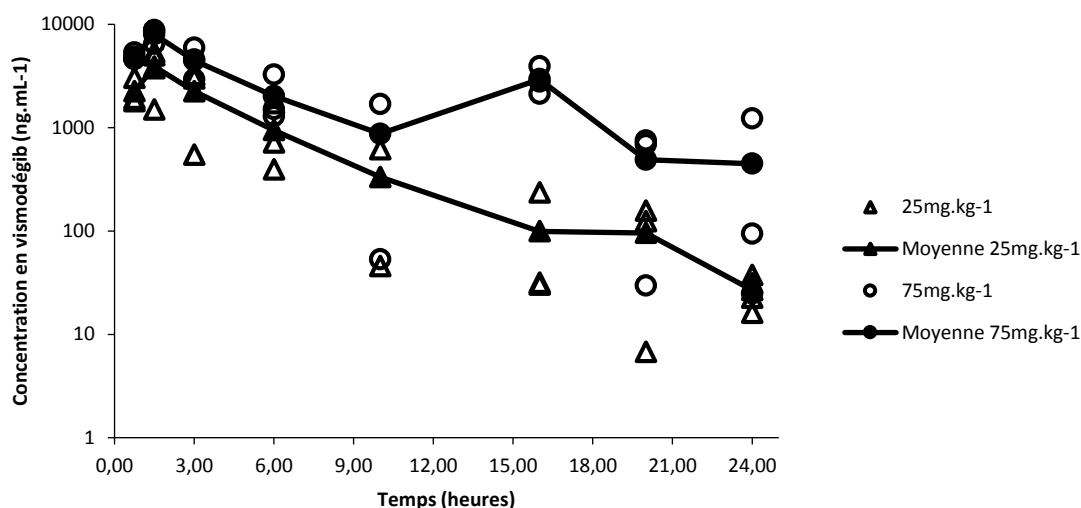


Figure 20 Profil pharmacocinétique des concentrations plasmatiques en vismodégib après administration par gavage intragastrique

Les C_{max}, obtenues au bout de 1 heure 30 après l'administration du vismodégib, étaient de 3 902 ng.mL⁻¹ et 7 972 ng.mL⁻¹ respectivement pour les souris traitées par 25 mg.kg⁻¹ et 75 mg.kg⁻¹ (Figure 20).

Les surfaces sous la courbe (AUC) étaient de 16 201 ng.mL⁻¹.h pour le groupe 25 mg.kg⁻¹ et de 49 846 ng.mL⁻¹.h pour le groupe 75 mg.kg⁻¹.

Elles étaient cohérentes avec celles obtenues dans la littérature⁴³.

b. Administration par gel

Lors de l'administration par gel, l'exposition est moindre au cours de la journée, les AUC sont respectivement de 493 ng.mL⁻¹.h, 4 808 ng.mL⁻¹.h et 13 475 ng.mL⁻¹.h pour les groupes 12,5 mg.kg⁻¹, 25 mg.kg⁻¹ et 75 mg.kg⁻¹ (Figure 21).

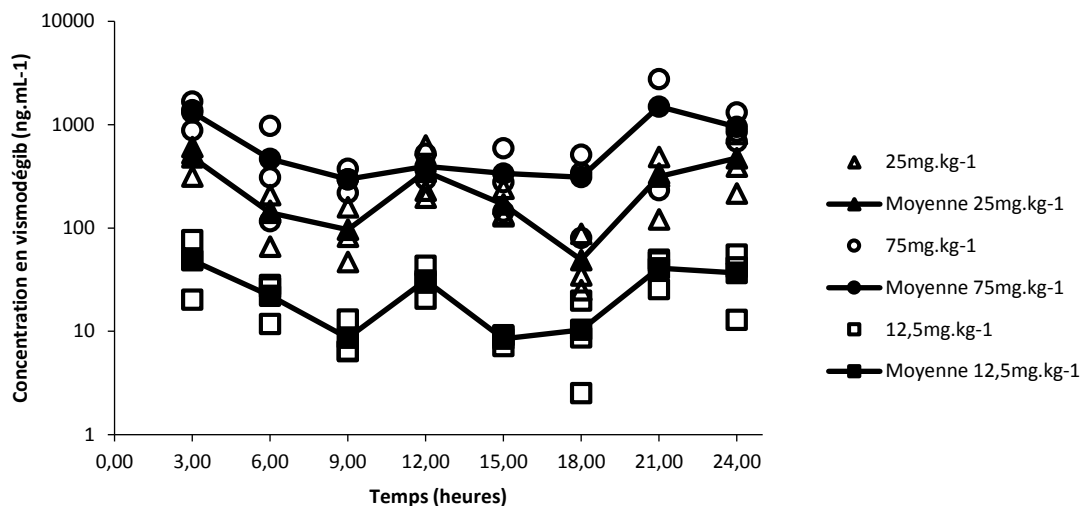


Figure 21 Profil pharmacocinétique des concentrations plasmatiques en vismodégib lors d'une administration par gel

c. Comparaison des deux méthodes d'administration

Le mode d'administration par gel, malgré l'exposition moindre, permet d'obtenir des concentrations plus constantes dans le temps qu'avec le gavage, ce qui est cohérent avec la volonté d'inhiber la voie Hedgehog de manière continue sur le nyctémère.

En effet, pour le groupe 25 mg.kg⁻¹, 34 % des concentrations mesurées après administration par gel sont supérieures à 300 ng.mL⁻¹, soit la concentration moyenne obtenue 10 heures après gavage, et 75% des concentrations mesurées sont supérieures à 100 ng.mL⁻¹, soit la concentration moyenne obtenue 16 heures après gavage (Figure 22).

Les concentrations mesurées dans le groupe traité à 75 mg.kg⁻¹ sont quant à elles très supérieures à celle permettant une inhibition de la voie Hedgehog calculée lors des études précliniques (Figure 23) ⁵⁶.

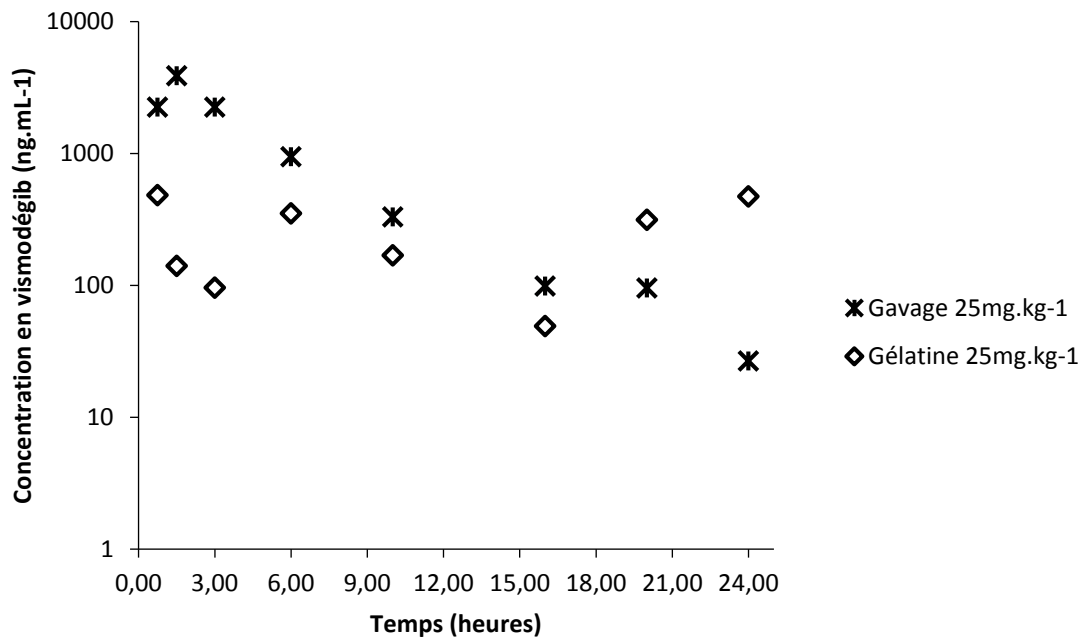


Figure 22 Comparaison des profils pharmacocinétiques du vismodégib obtenus après administration de 25mg.kg⁻¹ de vismodégib par gavage intragastrique *versus* administration par gel

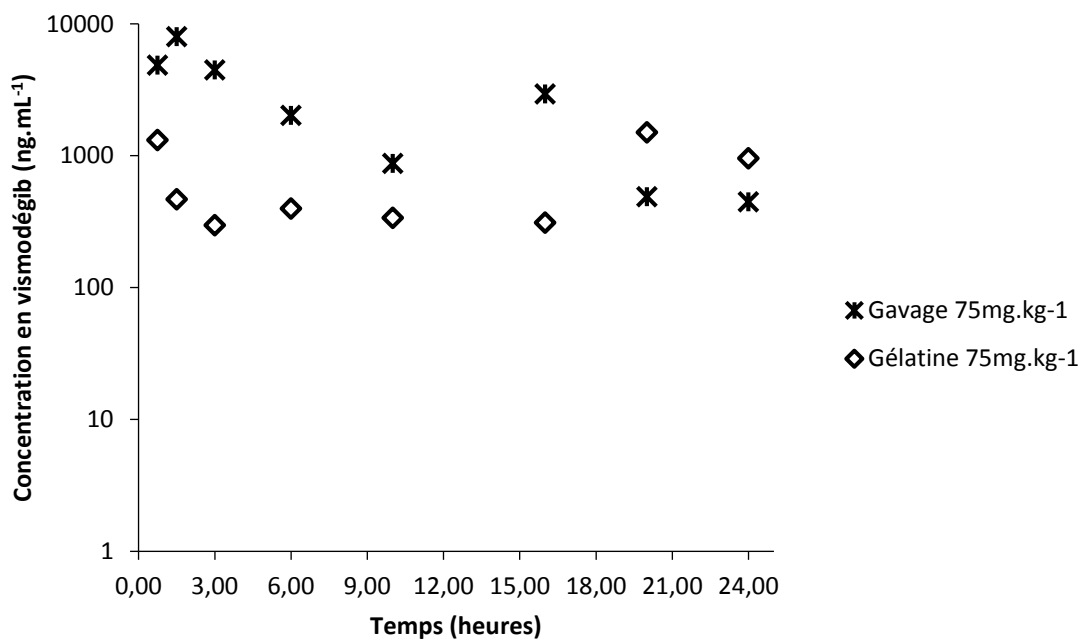


Figure 23 Comparaison des profils pharmacocinétiques du vismodégib obtenus après administration de 75mg.kg⁻¹ de vismodégib par gavage intragastrique *versus* administration par gel

3. Expression de GLI

a. Expérience préliminaire

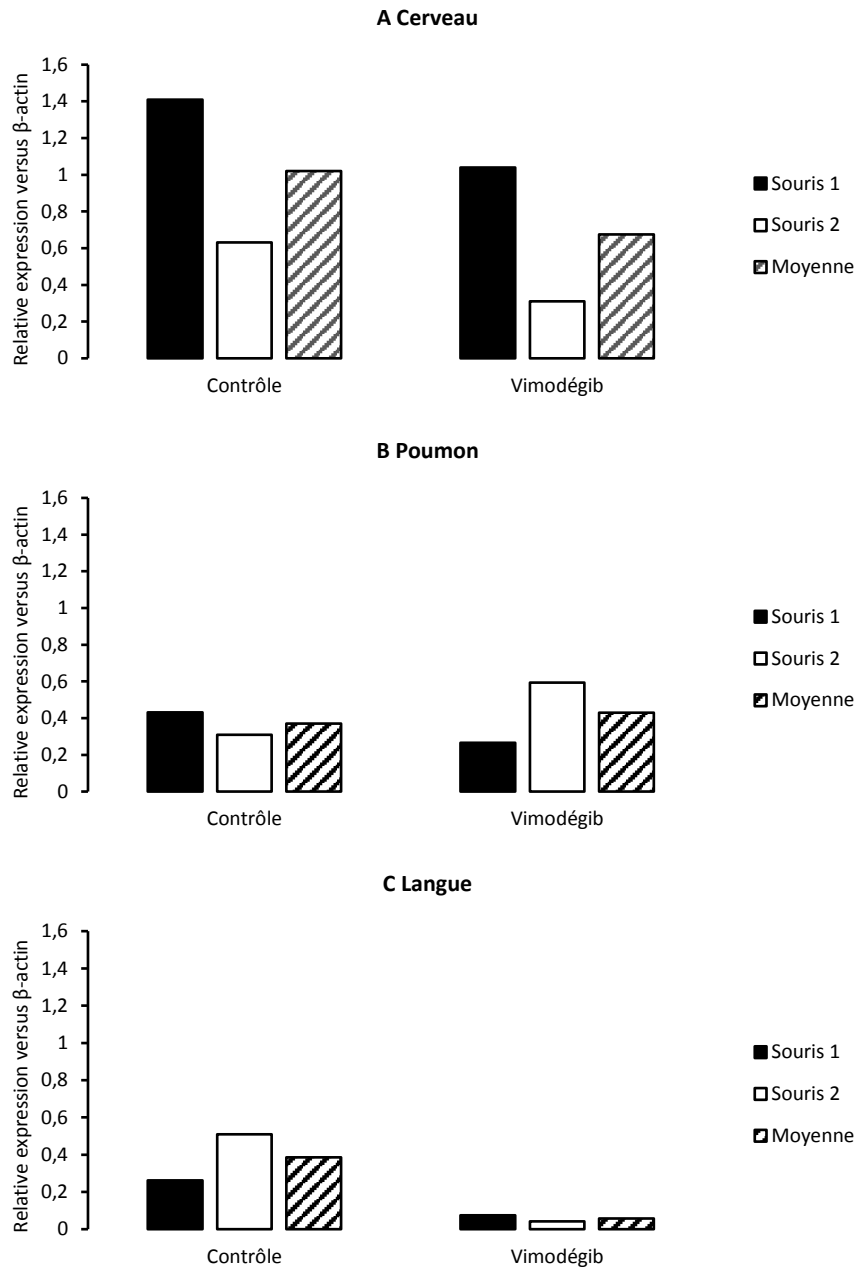


Figure 24 Expression génique de GLI au niveau du cerveau (A), du poumon (B) et de la langue (C) après administration de $30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de vismodégib pendant 5 jours par voie intragastrique

L'organe dans lequel l'inhibition de GLI1 est la plus importante était la langue lors de l'expérience préliminaire (pour rappel : mesure après gavage intra gastrique à 30 mg.kg⁻¹ pendant 3 jours) (Figure 24).

b. Expérience finale

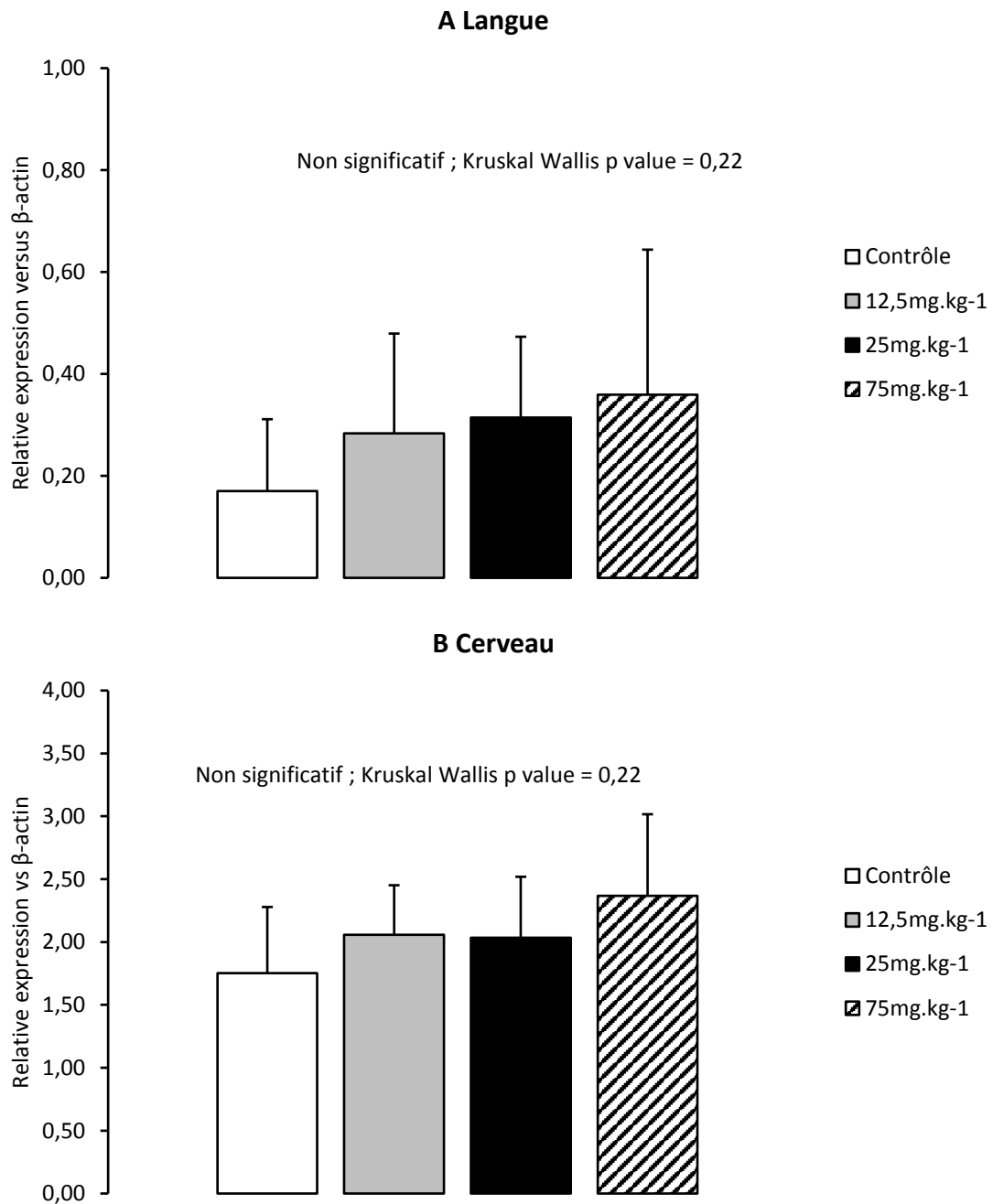


Figure 25 Expression génique de GLI au niveau de la langue (A) et du cerveau (B) après administration de vismodégib pendant 4 mois par gel

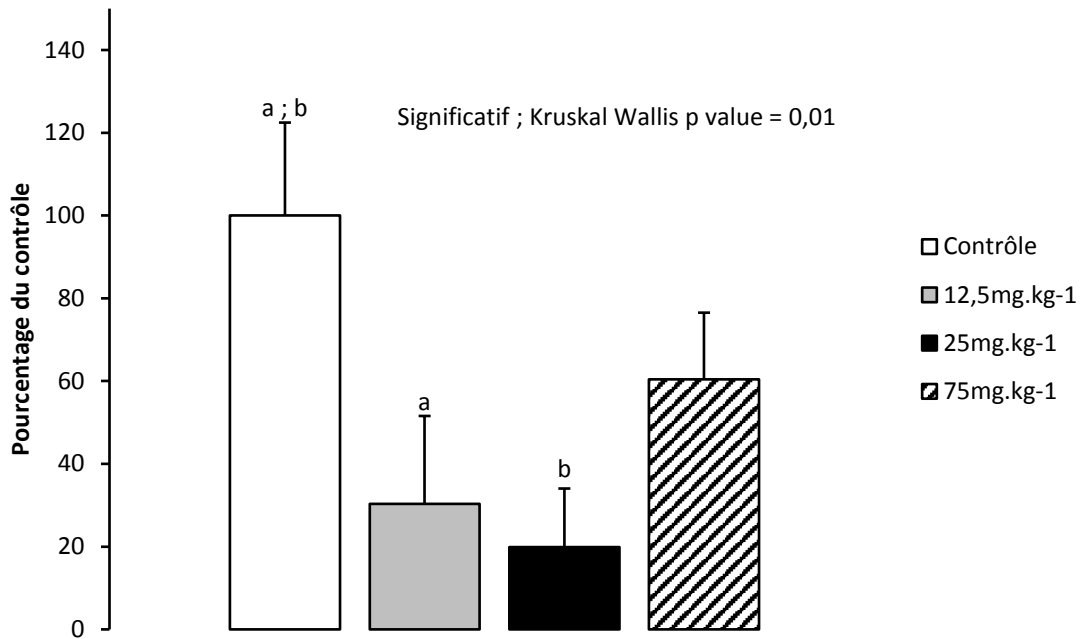


Figure 26 Expression protéique de GLI au niveau du cerveau après administration de vismodégib pendant 4 mois par gel

Chez les souris exposées pendant quatre mois au vismodégib, il n’y a pas de différence significative au niveau de l’expression génique de GLI au niveau de la langue et au niveau du cerveau (Figure 25) alors que l’on observe une différence significative concernant l’expression protéique entre les groupes de dose au niveau du cerveau (Figure 26).

En appliquant un test *post hoc* de comparaison par paire (test de Dunn), il s’avère que les groupes « contrôle » et 12,5 mg.kg⁻¹ et les groupes « contrôle » et 25 mg.kg⁻¹ sont significativement différents avec des *p-value* respective de 0,0045 et 0,0018.

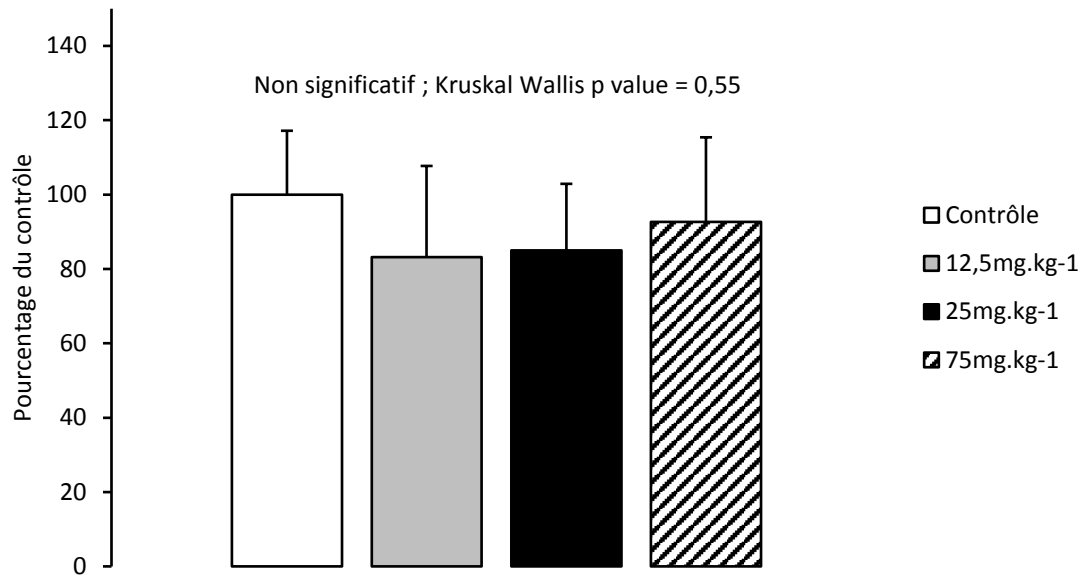
4. Mesure de l’expression des protéines de jonction au niveau du cerveau

L’expression protéique de VCAM-1 au niveau du cerveau n’est pas modifiée chez les souris traitées par vismodégib.

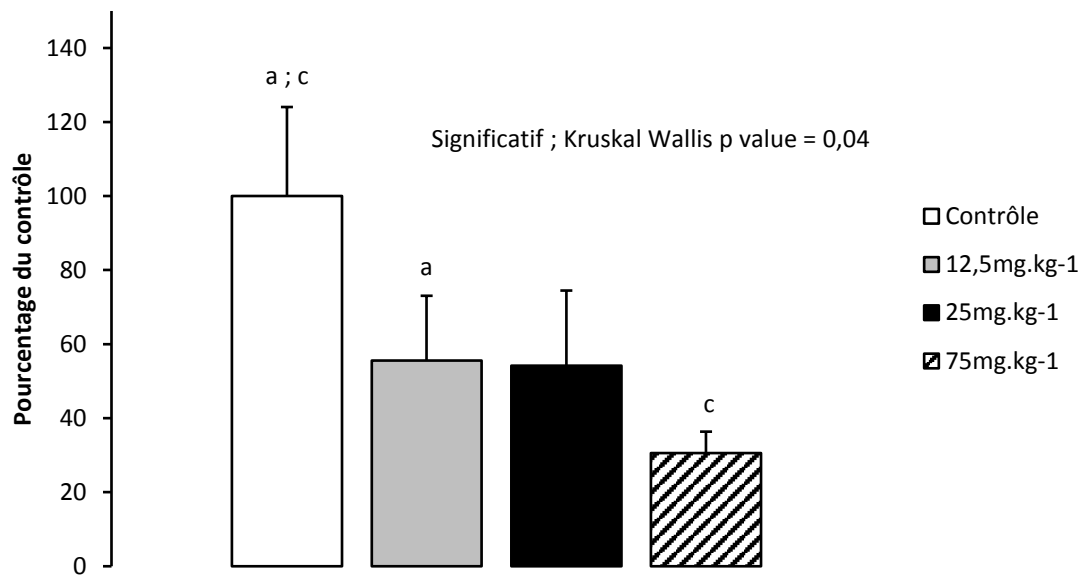
Pour ZO-1, on observe une différence significative entre les groupes contrôle et 12,5 mg.kg⁻¹ ($p = 0,0229$) et les groupes contrôle et 75 mg.kg⁻¹ ($p = 0,0030$).

Dû à un problème technique, le calcul de l’expression protéique de JAM-A n’a été possible que sur deux échantillons par groupe. Une analyse statistique n’était donc pas possible. On observe toutefois une tendance à la diminution avec la dose (Figure 27).

A VCAM-1



B ZO-1



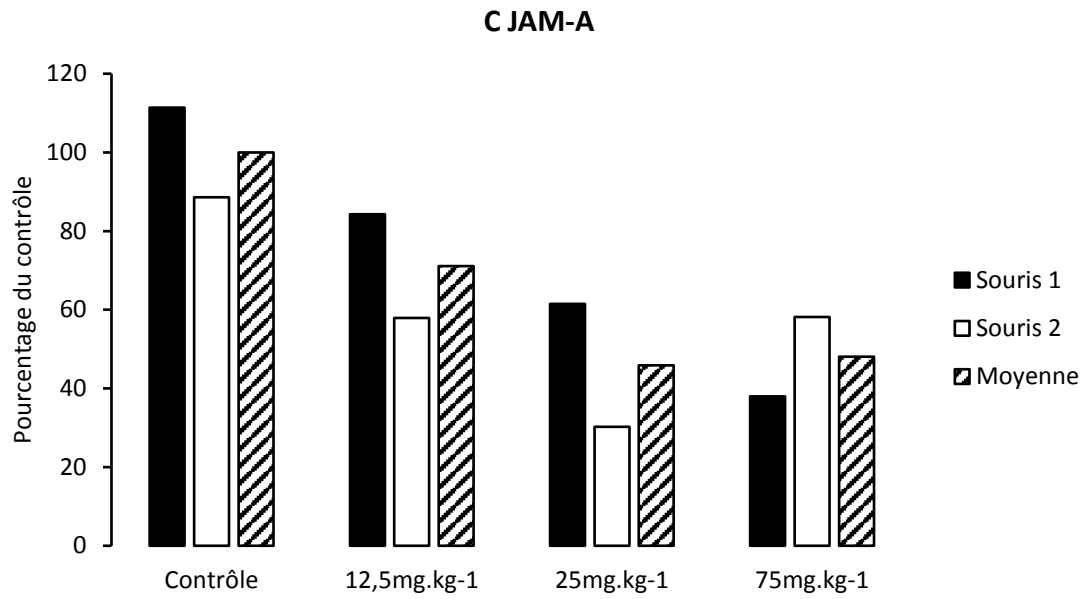
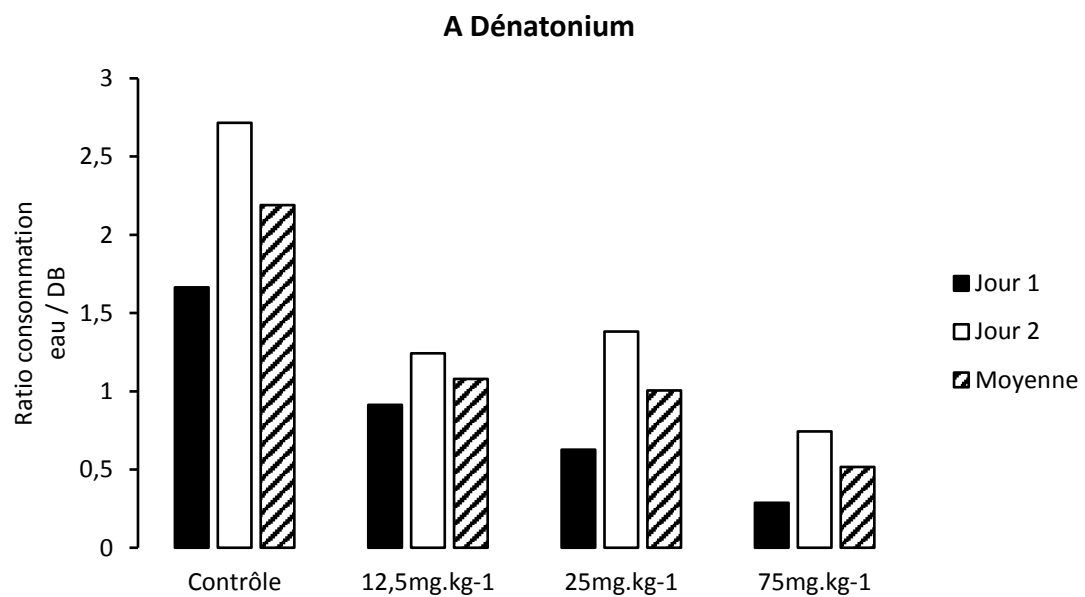


Figure 27 Expression protéique des protéines de jonction VCAM-1 (A), ZO-1 (B) et JAM-A (C) au niveau du cerveau après administration de vismodégib pendant 4 mois par gel

5. Tests comportementaux

a. Test de dysgueusie



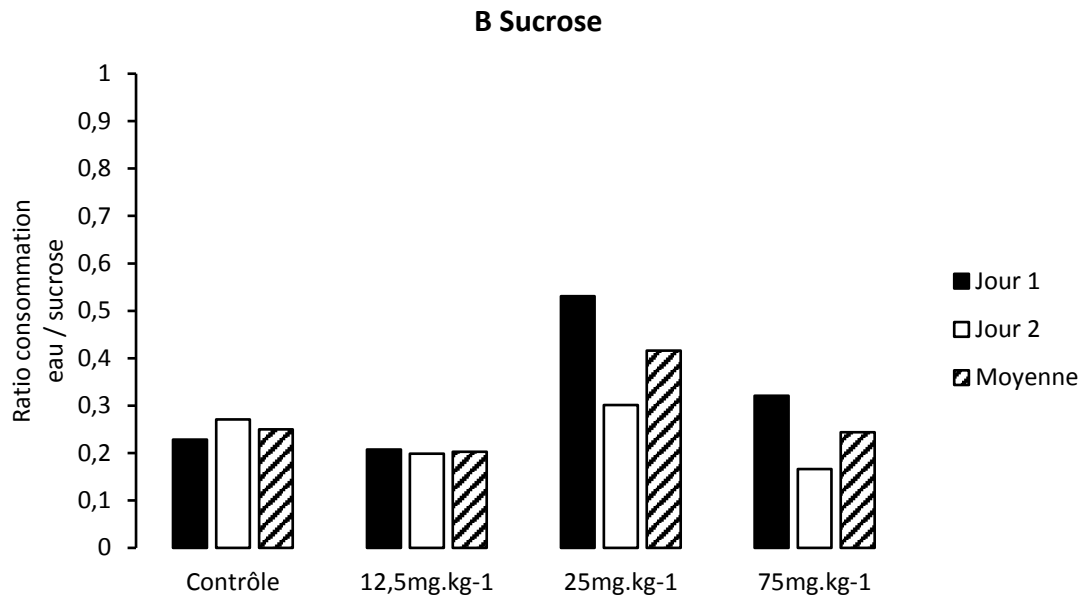


Figure 28 Test de dysgueusie. Comparaison des ratios eau / substances à tester entre les groupes. A : substances à tester = dénatonium benzoate. B : substance à tester = sucrose.

Les souris traitées par vismodégib consomment plus de dénatonium benzoate que les souris du groupe « contrôle » ce qui met en évidence une altération du goût amer.

Les souris du groupe « contrôle » consomment deux fois plus de gel « contrôle » que de gel dénatonium.

Les souris des groupes 12,5 mg.kg⁻¹ et 25 mg.kg⁻¹ consomment autant de gel « contrôle » que de gel dénatonium.

Les souris du groupe 75 mg.kg⁻¹ consomment plus de gel dénatonium (Figure 28).

Le goût sucré semble lui intact chez les souris traitées par vismodégib. Tous les groupes de souris consomment plus de gel sucré que de gel « contrôle » (Figure 28).

b. Test d'allodynie de Von frey

Les nombres de répétitions positives sont significativement différents entre les 4 groupes pour toutes les forces de filament, excepté le filament 4 grammes.

Les forces nécessaires pour obtenir plus de la moitié de réponse positive sont respectivement de 1,4 g, 1 g, 0,6 g et 0,6 g pour le groupe contrôle, le groupe 12,5 mg.kg⁻¹, le groupe 25 mg.kg⁻¹ et le groupe 75 mg.kg⁻¹ (Figure 29).

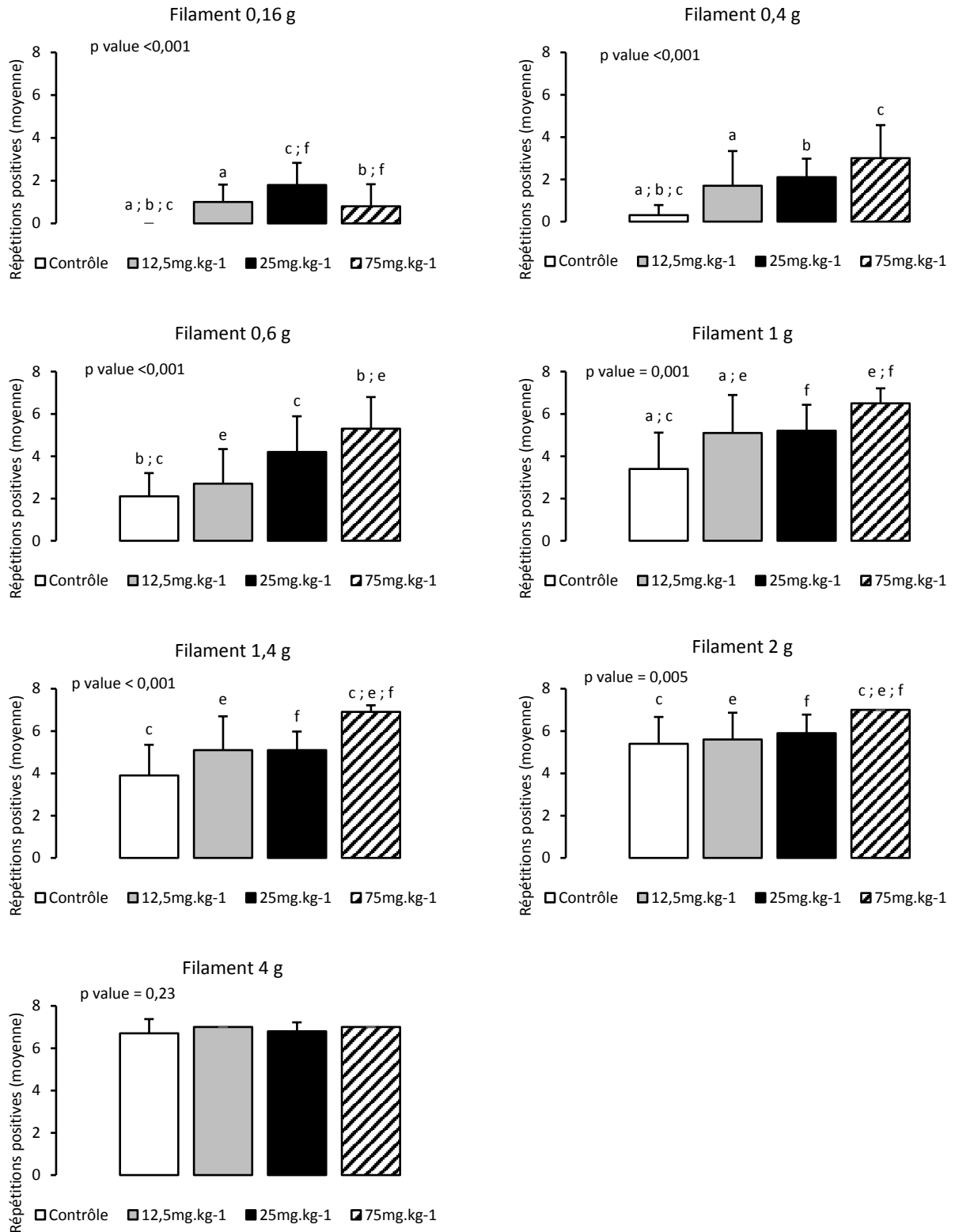


Figure 29 Test d'allodynie de Von-Frey. Nombre moyen de répétitions positives par souris par groupes.

IV. Discussion

Le mode d'administration par gel développé a permis dans cette étude d'obtenir des concentrations plasmatiques beaucoup plus constantes qu'avec une administration par gavage intragastrique.

L'administration *ad libidum* du gel permet également un traitement moins stressant pour l'animal car il évite les manipulations traumatisantes, inhérentes au gavage intragastrique.

Plusieurs problématiques ont dû être prises en compte afin de rendre la méthode de préparation des gels et les calculs de préparation plus fiables et plus robustes. Nous avons principalement travaillé sur la différence de poids des souris ainsi que le séchage des gels dans les cages.

Concernant le poids des souris, les animaux ont été pesés chaque semaine, avant préparation des gels. Le poids moyen par groupe était utilisé pour calculer la dose. Les souris de chaque groupe recevaient donc la même dose, définie pour la semaine.

Pour tenir compte du séchage des gels dans la cage (environ 25 % de perte sur gel intact par 24 heures), les gels étaient récupérés quotidiennement après exposition dans la cage et mis à l'étuve pour évaporation à sec.

Le rapport du résidu sec après exposition dans la cage sur la masse sèche introduite dans la préparation initiale permettait donc de calculer une consommation moyenne pour chaque groupe de souris par jour.

Pour chaque groupe de dose, la consommation moyenne quotidienne ainsi calculée sur la semaine n-1 servait à définir la concentration en vismodégib des gels à préparer pour la semaine n.

Ce nouveau mode d'administration nous a permis de mettre en évidence que l'inhibition de la voie Hedgehog par le vismodégib provoquait chez l'animal une perturbation de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique avec une diminution de certaines protéines de jonction, notamment ZO-1.

Ces effets neurologiques et vasculaires sont confirmés par les tests comportementaux effectués chez les souris après quatre mois d'exposition au médicament. On observe une

dysgueusie avec une consommation de substance amère plus importante que dans le groupe « contrôle » et une allodynie avec une sensibilité accrue à un *stimulus* normalement indolore.

De manière surprenante, on observe une diminution de l'expression protéique de GII au niveau des cerveaux mais pas de différences concernant l'expression génique au niveau de la langue et du cerveau.

Les hypothèses pouvant expliquer ces résultats sont l'utilisation de souris saines, sans surexpression pathologique de GII, ou la mise en place de mécanismes compensatoires, indépendants de SMO.

L'exposition au vismodégib (*AUC* moyenne) est proportionnelle aux doses administrées par gavage. Pour l'administration par gel, l'exposition (*AUC* moyenne) était proportionnelle aux doses pour les groupes 25 mg.kg⁻¹ et 75 mg.kg⁻¹ mais pas pour le groupe 12,5 mg.kg⁻¹.

Pour la quasi-totalité des effets indésirables testés, soit par méthodes biologiques soit par tests comportementaux, on observe une relation ou une tendance entre la dose administrée et l'intensité.

Ces observations justifient l'hypothèse qu'une diminution des doses et donc des concentrations plasmatiques totales en vismodégib entraînerait, chez les patients, une diminution des effets indésirables.

Partie V - Étude clinique

I. Introduction

1. Hypothèse de la recherche

Le vismodégib, utilisé dans le traitement des carcinomes basocellulaires (CBC) métastatiques symptomatiques et les CBC localement avancés non éligibles à une thérapeutique conventionnelle à type de chirurgie ou de radiothérapie, présente de nombreux effets indésirables dont les plus fréquents sont : dysgueusie, asthénie, spasmes musculaires, alopecie, perte de poids⁴⁷.

Ces effets indésirables sont à l'origine d'un grand nombre d'interruptions thérapeutiques temporaires voire définitives.

Lors d'une étude descriptive réalisée au sein du service de dermatologie cancérologique du CHU de Bordeaux, 30% des patients avaient arrêté leur traitement prématurément⁵⁷.

Dans l'étude multicentrique STEVIE, 98 % des patients avaient présenté au moins un effet indésirable. La toxicité inacceptable était la cause principale d'arrêt du traitement⁴⁹.

Une seule posologie est validée pour l'ensemble des patients soit 150 mg par jour³⁸. L'hypothèse de la recherche est que cette posologie n'est pas adaptée à l'ensemble des patients et que l'augmentation des concentrations chez certains patients serait à l'origine d'une partie des effets indésirables.

2. Objectifs

Objectif principal

L'objectif principal de l'étude est de déterminer s'il existe une relation entre la concentration plasmatique en vismodégib et la survenue d'effets indésirables de grade supérieur ou égal à trois.

Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires sont au nombre de trois.

Le premier est d'évaluer les variabilités inter et intra*individuelles des concentrations plasmatiques résiduelles à l'équilibre puis d'évaluer l'effet de différentes covariables sur ces variabilités.

Le deuxième consiste à déterminer s'il existe une relation entre les concentrations plasmatiques en vismodégib et l'efficacité dans les 6 mois après la mise sous traitement.

Enfin le troisième consiste à créer un modèle pharmacocinétique / pharmacodynamique intégrant les covariables d'intérêt

II. Matériel et méthode

1. Schéma de la recherche

L'étude clinique « OPTIVISMO » est une étude descriptive de type cohorte, monocentrique, prospective, dont le promoteur est le CHU de Bordeaux (NCT03610022).

Cette étude est toujours en cours et ouverte aux inclusions. Le premier patient a été inclus le 03 septembre 2018. La période d'inclusion étant de 18 mois. La fin du recrutement est prévue pour le 03 mars 2020.

Pour être inclus dans l'essai, les patients doivent présenter un carcinome basocellulaire localement avancé ou métastatique ou un carcinome annexiel, histologiquement prouvé, pour lesquels la chirurgie ou la radiothérapie ne sont pas adaptées, et être traités par vismodégib.

La période d'inclusion s'étale sur 18 mois et chaque patient est suivi 6 mois soit une durée totale d'étude de 24 mois.

L'objectif est de 30 patients inclus à la clôture.

Le traitement par vismodégib peut être initié à l'inclusion dans l'étude ou avoir déjà débuté (le premier prélèvement doit avoir lieu au moins 21 jours après l'initiation).

Les patients doivent avoir 18 ans ou plus et avoir donné leur consentement libre, éclairé et écrit.

A l'inclusion les données suivantes sont recueillies : caractéristiques du cancer (histologie, localisation, taille, ...), traitements antérieurs, comorbidités et données démographiques.

2. Traitements, stratégies et procédures

Le vismodégib en gélule est administré quotidiennement, en une prise, à la dose de 150mg par jour jusqu'à progression de la maladie ou toxicité inacceptable et selon les habitudes de prescriptions.

Les patients sont vus en consultation une fois par mois.

Les données de tolérance selon les critères NCI-CTCAE (*Common Terminology Criteria for Adverse Events* version 5.0 du *National Cancer Institute*) et d'efficacité selon les critères RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*), le statut de performance de l'ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) ainsi que les données clinico-biologiques sont recueillies à l'occasion de chaque visite.

Les prélèvements sanguins sont effectués mensuellement. Deux tubes sont prélevés, un pour le dosage du vismodégib et un pour le dosage de l'alpha-1-glycoprotéine acide (AGP).

Le dosage du vismodégib concerne la concentration résiduelle, le prélèvement sanguin est réalisé immédiatement avant la prise du médicament, à l'équilibre, c'est-à-dire après une durée minimum de traitement de 21 jours.

III. Résultats

1. Caractéristiques des patients à l'inclusion

Tableau 16 Caractéristiques démographiques et anthropométriques des patients inclus dans l'étude

	Tous patients n = 16
Femme, n (%)	8 (50)
Homme, n (%)	8 (50)
Âge, moyenne (écart-type)	72 (10)
Âge > 60 ans, n (%)	14 (88)
Âge < 60 ans, n (%)	2 (12)
Taille en cm, moyenne (écart-type)	168 (7)
Poids en kg, moyenne (écart-type)	69 (16)

Lors de l'analyse des données, 17 patients étaient inclus dans l'étude. Un patient est finalement sorti d'étude pour refus de la prise de vismodégib.

La répartition des sexes dans l'étude était homogène avec un ratio homme / femme, *sex-ratio*, à 1.

On remarque que l'âge moyen était quant à lui élevé, 72 ans, par rapport aux patients inclus dans les essais cliniques antérieurs^{48,58} avec seulement deux patients ayant moins de 60 ans (Tableau 16).

2. Caractéristiques de la maladie à l'inclusion

A l'inclusion, 8 patients n'étaient pas sous vismodégib. Les autres prenaient du vismodégib depuis 5 semaines pour le plus récent à 35 semaines pour le plus ancien (Figure 30).

A l'inclusion, tous les patients prenaient le vismodégib à la posologie standard, soit 150 mg une fois par jour.

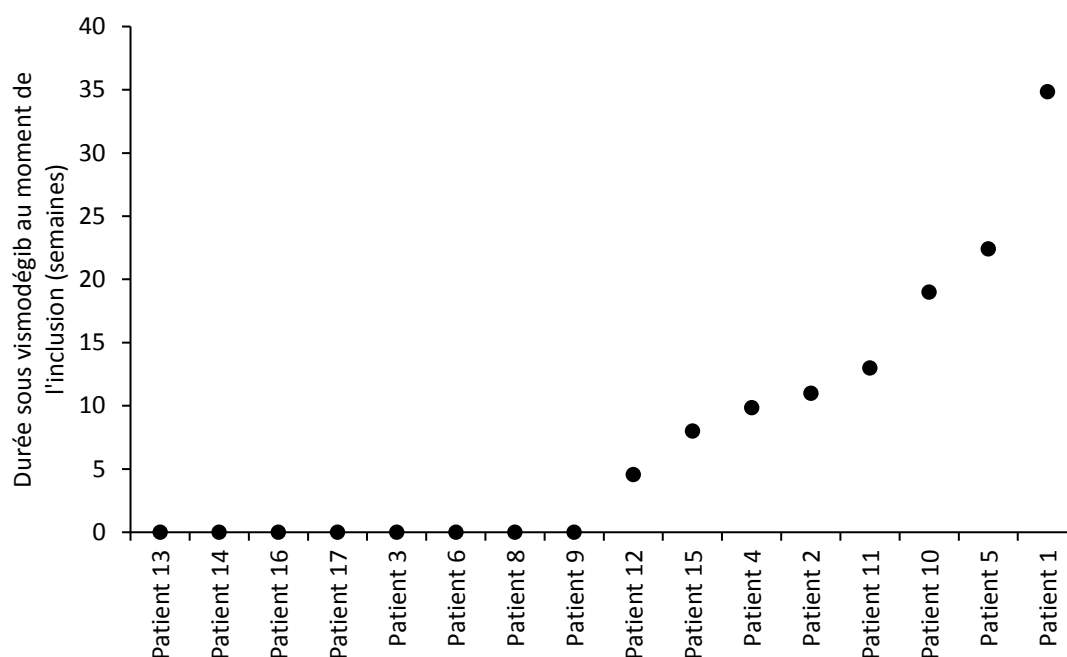


Figure 30 Durée sous vismodégib (semaines) par patient au moment de l'inclusion.

Au moment de l'analyse des données, 6 patients avaient arrêté la prise du vismodégib, un patient a repris un schéma séquentiel, soit 150 mg par jour 7 jours sur 28, après un mois de pause. Un autre patient est passé directement du schéma standard au schéma séquentiel, sans pause.

Tableau 17 Caractéristiques de la maladie chez les patients à l'inclusion

	Tous patients n = 16
ECOG PS	
Grade 0	7 (44)
Grade 1	8 (50)
Grade 2	1 (6)
Histologie	
Carcinome basocellulaire	15 (94)

Carcinome annexiel	1 (6)
Sous-type histologique	
Nodulaire	4 (25)
Non connu (NC)	4 (25)
Infiltrant	3 (19)
Sclérodermiforme	3 (19)
Superficiel	1 (6)
Composite	1 (6)
Type de lésion	
Primitif	7 (44)
Récidive	9 (56)
Stade	
Localement avancé	16 (100)
Métastatique	0 (0)

A l'inclusion, parmi les 16 patients, 9 présentaient une altération de l'état général avec un statut de performance supérieur ou égal à 1. Sur ces 9 patients, 5 n'étaient pas sous vismodégib au moment de l'inclusion, patients naïfs ou réintroduction.

La quasi-totalité des patients inclus étaient traités pour un carcinome basocellulaire (94 %) et tous les patients étaient à un stade localement avancé.

La répartition entre les lésions primitives et les récidives étaient homogènes, respectivement 44 et 56 % des patients (Tableau 17).

3. Variabilité pharmacocinétique

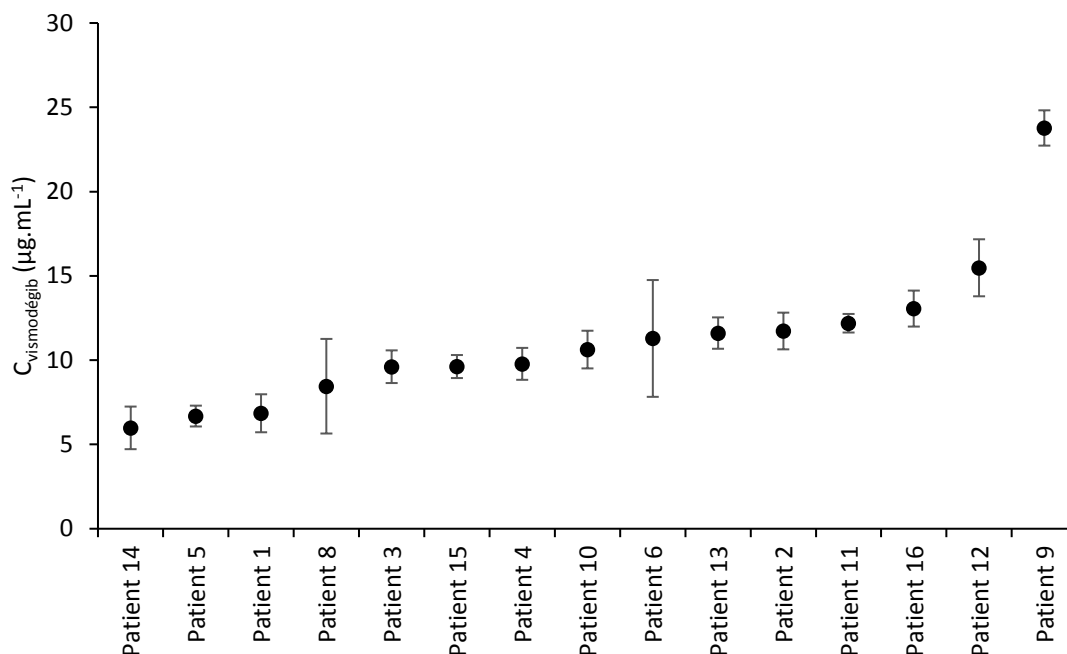


Figure 31 Concentration résiduelle moyenne par patients +/- écart-type.

a. Variabilité interindividuelle

La variabilité interindividuelle était importante dans notre échantillon avec un coefficient de variation de 39 %.

Les concentrations plasmatiques résiduelles en vismodégib moyennes par patient s'étaient de 6 µg.mL⁻¹ à 24 µg.mL⁻¹ avec une moyenne de 11 µg.mL⁻¹ et un écart-type de 4,3 µg.mL⁻¹ (Figure 31).

b. Variabilité intra-individuelle

La variabilité intra-individuelle des concentrations plasmatiques en vismodégib à l'équilibre était faible, 10 des 16 patients avaient un coefficient de variation inférieur à 10 %.

Deux patients présentaient un coefficient de variation important, supérieur à 30 % (Figure 31).

4. Analyse en sous-groupe

Lors d'une étude de pharmacocinétique de population, deux covariables d'intérêt avaient été identifiées, l'âge supérieur à 60 ans et le poids supérieur à 75 kg⁴².

L'âge dans notre échantillon étant élevé, une analyse en sous-groupes des patients de plus ou moins de 60 ans n'était pas possible.

a. Comparaison selon le sexe

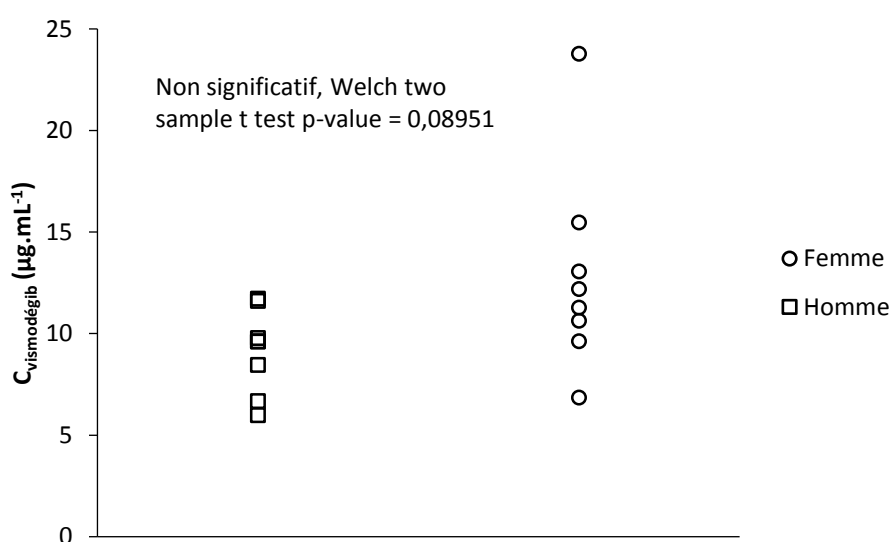


Figure 32 Analyse en sous-groupe des concentrations résiduelles moyennes par patient selon le sexe..

L'analyse des concentrations moyennes selon le sexe des patients ne semblent pas pertinente, la différence entre ces deux sous-groupes était non-significative (Figure 32).

b. Comparaison selon le poids

La différence de concentration en vismodégib entre les patients ayant un poids supérieur et inférieur à 75 kilogrammes était significative (*p-value* du test t avec correction de Welch = 0,01) (Figure 33).

Cela est cohérent avec la publication de pharmacocinétique de population de Lu *et al.* qui identifiait le poids comme une covariable d'intérêt.

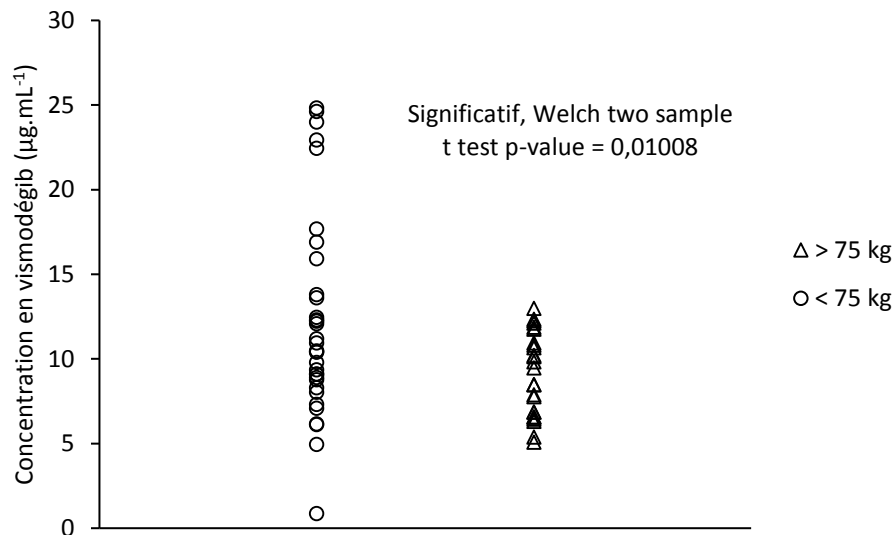


Figure 33 Analyse en sous-groupe des concentrations résiduelles en vismodégib selon le poids inférieur ou supérieur à 75kg au moment du prélèvement.

5. Recherche de corrélation avec les valeurs biologiques

a. Données démographiques

Les tests de corrélation avec les données démographiques confirment l'analyse en sous-groupe ci-dessus.

Le poids des patients au moment du prélèvement est significativement corrélé avec la concentration résiduelle totale en vismodégib (Figure 34).

Le test avec l'âge n'est pas significatif mais comme expliqué ci-dessus, notre échantillon est plus âgé que les patients inclus dans les études lors du développement du médicament⁵⁸ (Figure 35).

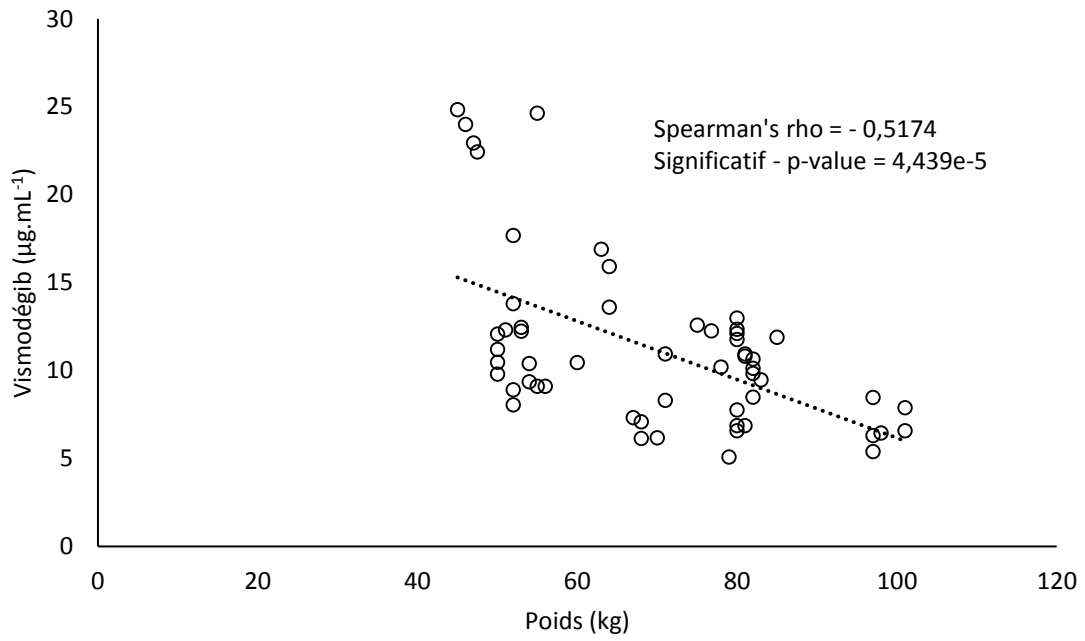


Figure 34 Corrélation entre les concentrations résiduelles totales en vismodégib et le poids.

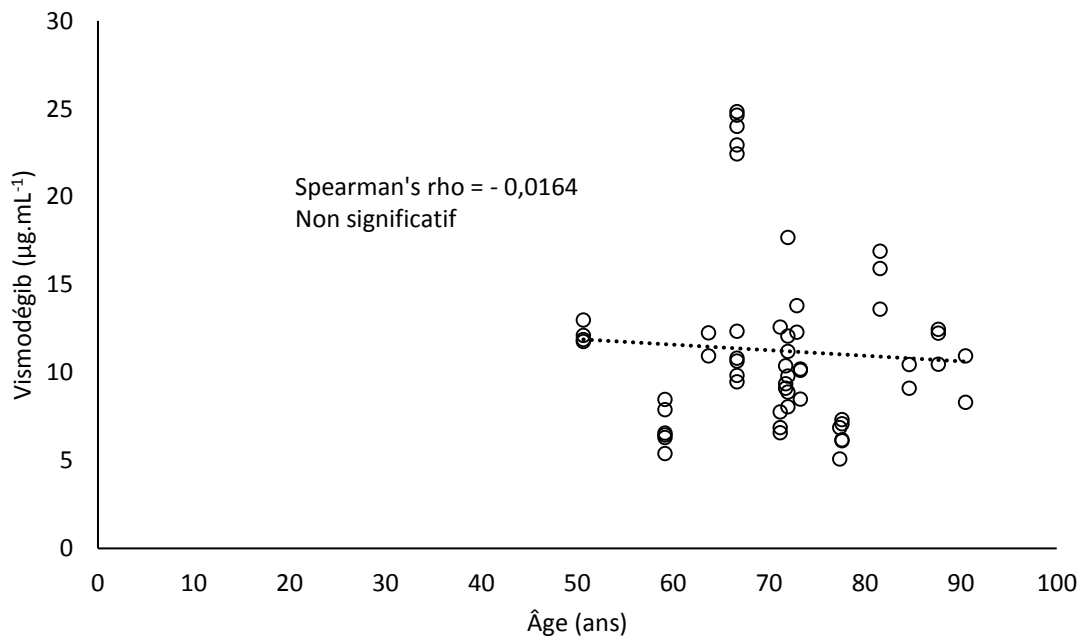


Figure 35 Corrélation entre les concentrations résiduelles totales en vismodégib et l'âge.

b. Protéines plasmatiques

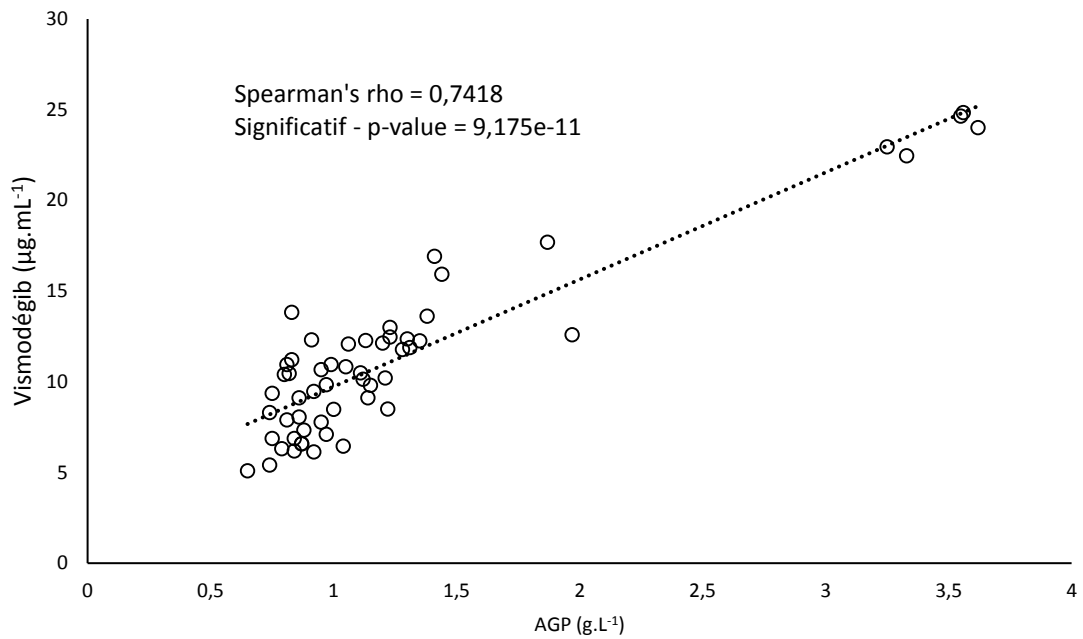


Figure 36 Corrélation entre les concentrations résiduelles totales en vismodégib et la concentration plasmatique en alpha-1-glycoprotéine acide.

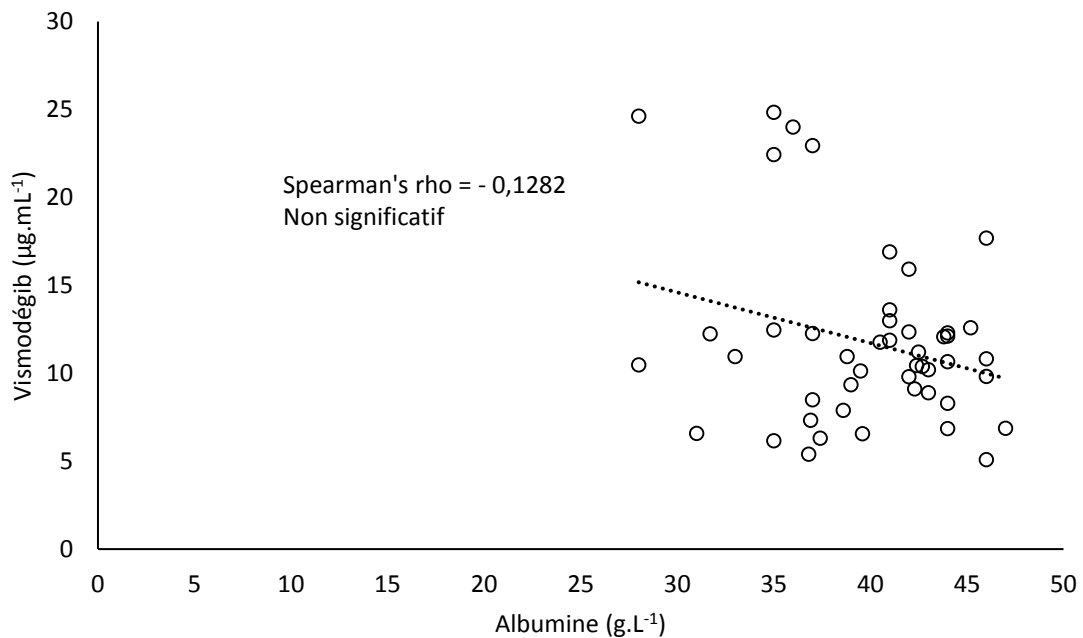


Figure 37 Corrélation entre les concentrations résiduelles totales en vismodégib et la concentration plasmatique en albumine.

La corrélation entre la concentration en AGP et les concentrations plasmatiques résiduelles en vismodégib est statistiquement significative (Figure 36) ce qui est cohérent avec la liaison très importante et saturable du vismodégib à cette molécule. Cette corrélation avait déjà été décrite dans la littérature⁵⁹.

Contrairement à la liaison à l'AGP, la liaison du vismodégib à l'albumine est de type compétitif et possède une très faible affinité⁴². Dans notre échantillon la concentration totale en vismodégib n'était pas corrélée à la concentration en albumine (Figure 37).

c. Fonction rénale

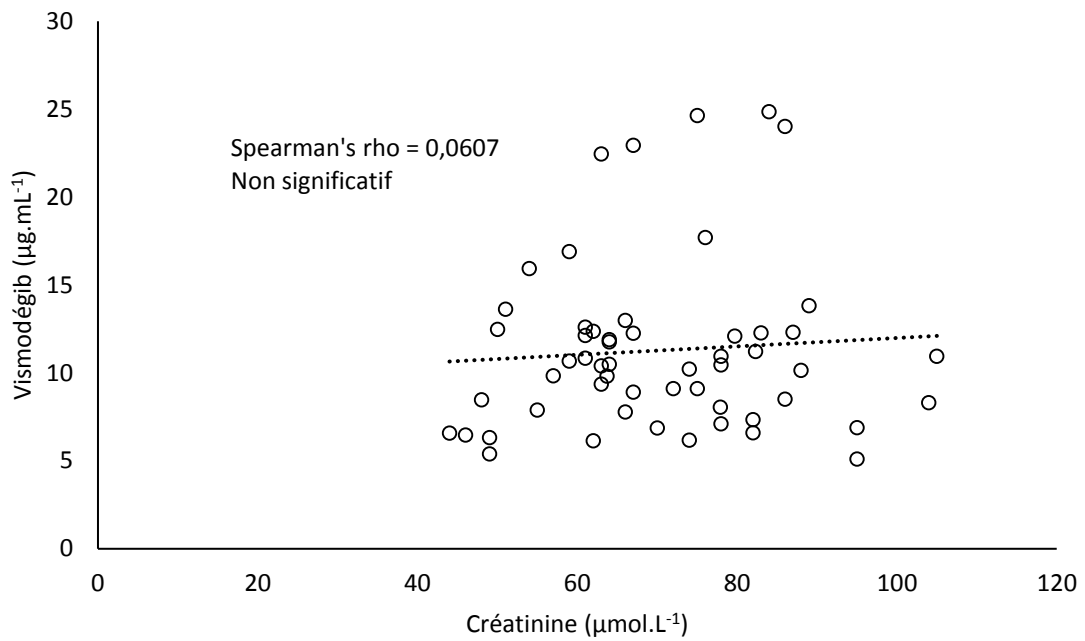


Figure 38 Corrélation entre les concentrations résiduelles totales en vismodégib et la concentration plasmatique en créatinine.

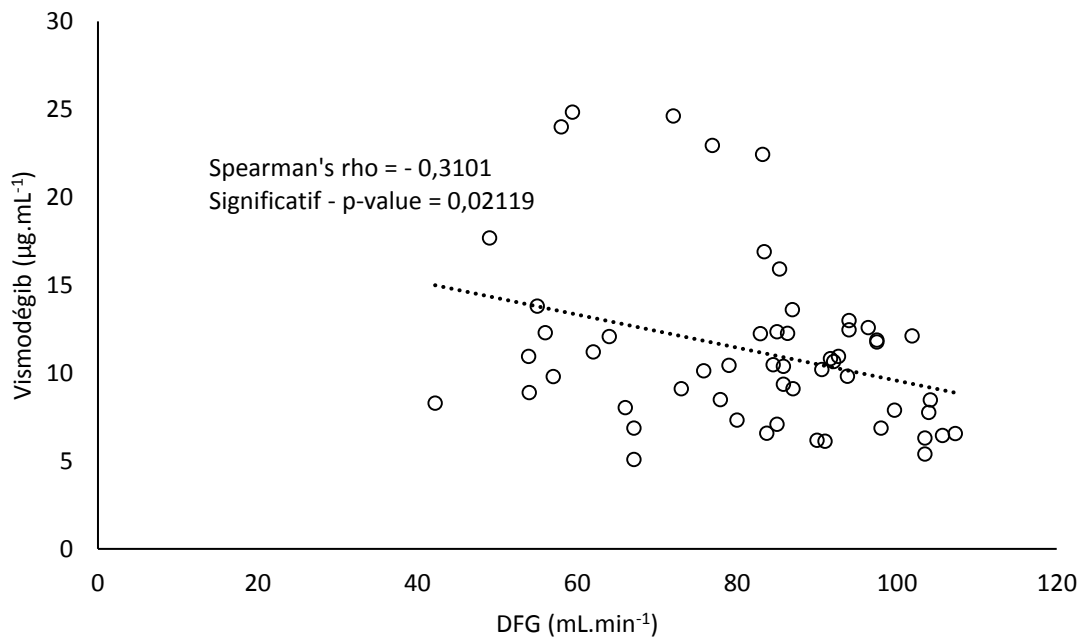


Figure 39 Corrélation entre les concentrations résiduelles totales en vismodégib et le débit de filtration glomérulaire.

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) est significativement corrélé à la concentration totale en vismodégib (Figure 39) contrairement à la concentration en créatinine (Figure 38).

L'élimination rénale du vismodégib est négligeable (4,4%) et les paramètres utilisés lors du calcul du DFG, notamment le poids, sont certainement un biais influant sur cette corrélation.

Une analyse statistique plus poussée, de type multivariée, devra être effectuée pour statuer sur la présence ou non d'une association entre la concentration en vismodégib et ces variables.

d. Fonction hépatique

Une étude sur la pharmacocinétique du vismodégib chez les patients présentant une altération de la fonction hépatique n'avait pas retrouvé de modification des paramètres pharmacocinétique chez ces patients malgré une élimination majoritairement hépatique du médicament⁶⁰.

Dans notre échantillon, tous les patients avaient une fonction hépatique normale.

Nous avons testé la corrélation entre les concentrations totales en vismodégib et les valeurs biologiques d'un bilan hépatique de routine.

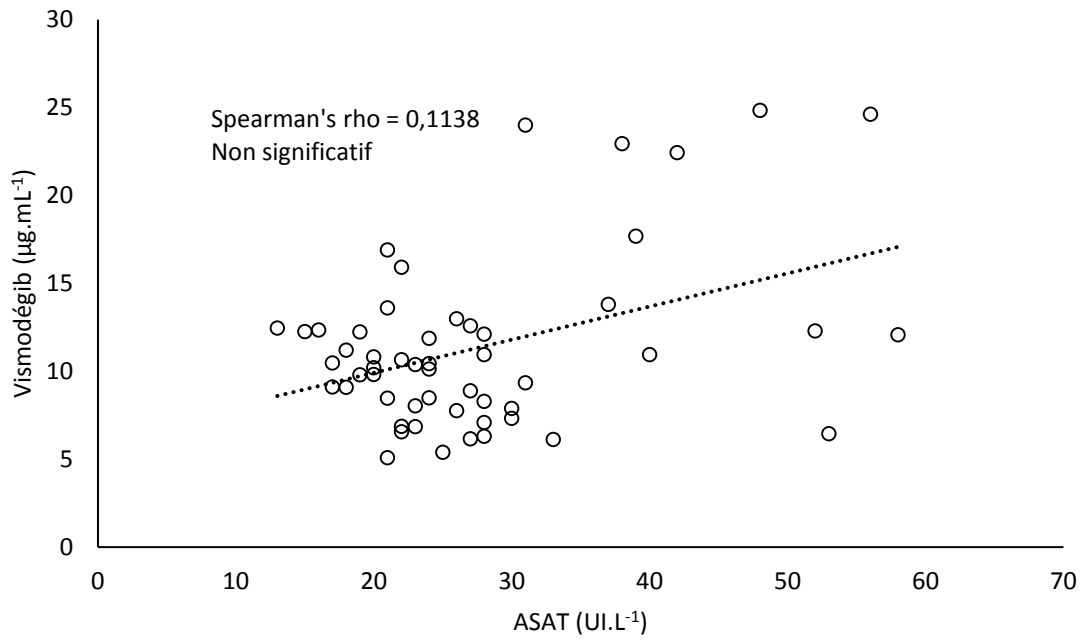


Figure 40 Corrélation entre les concentrations résiduelles totales en vismodégib et la concentration plasmatique en aspartate aminotransférase.

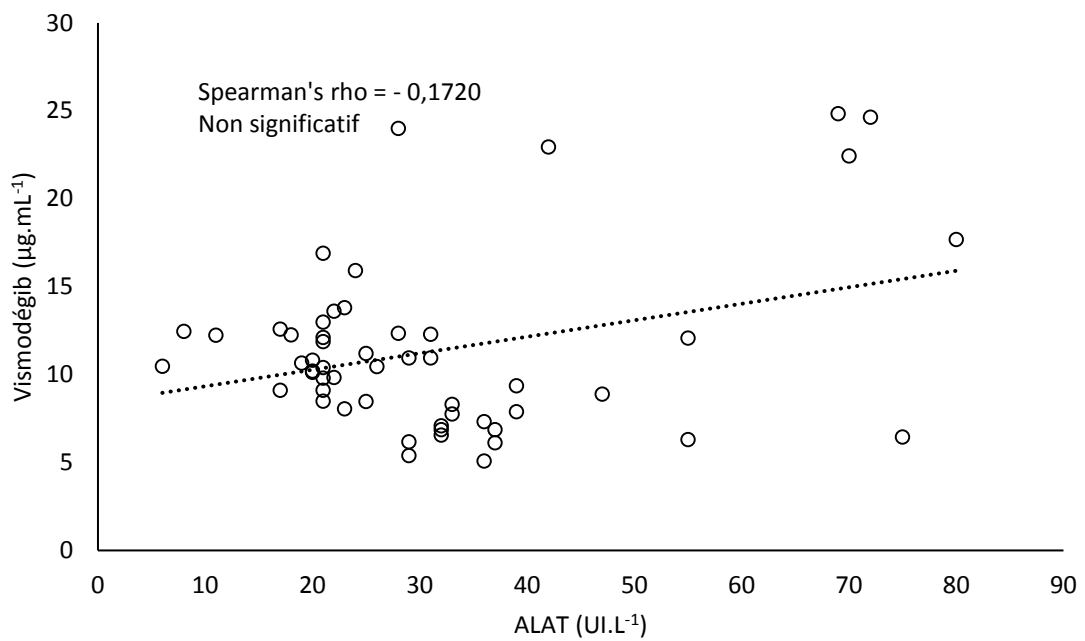


Figure 41 Corrélation entre les concentrations résiduelles totales en vismodégib et la concentration en alanine aminotransférase.

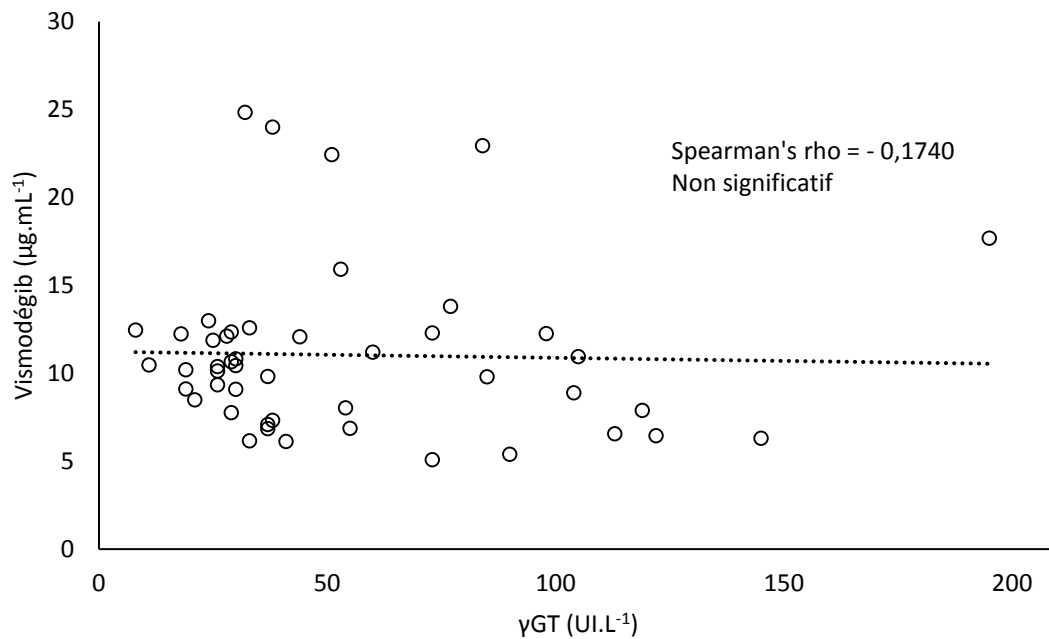


Figure 42 Corrélation entre les concentrations résiduelles totales en vismodégib et les concentrations plasmatiques en gamma-glutamyltranspeptidase

Conformément à la publication d'Abou-Alfa, aucune corrélation n'a été retrouvée entre la concentration totale en vismodégib et les transaminases⁶⁰ (Figure 40 ; Figure 41).

La concentration en γ-GT, non testé dans l'article d'Abou-Alfa, n'était pas non plus corrélée avec la concentration en vismodégib (Figure 42).

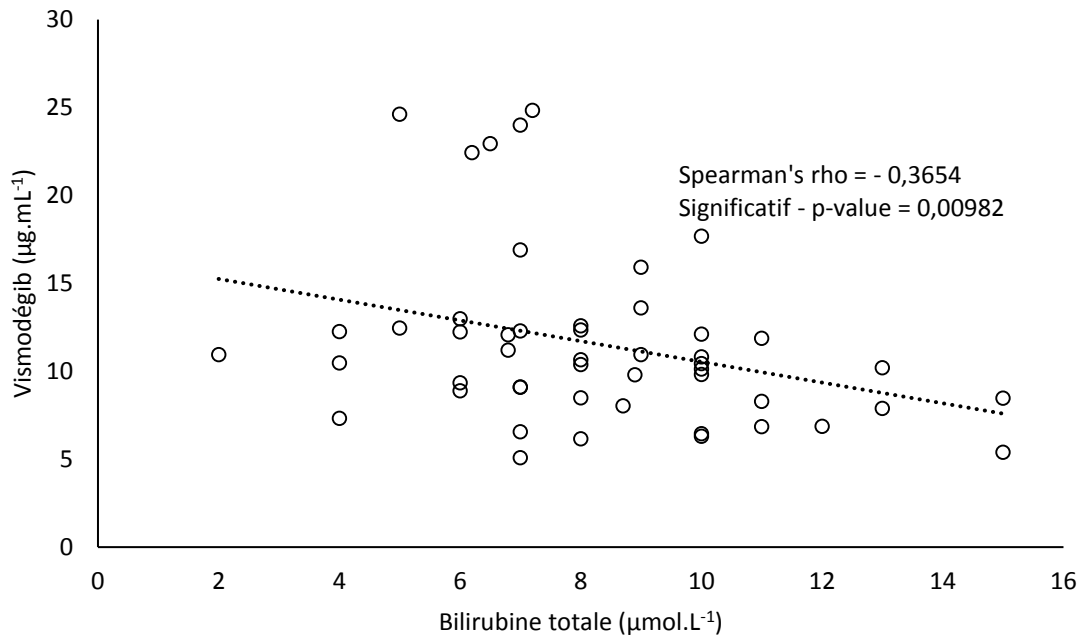


Figure 43 Corrélation entre les concentrations résiduelles totales en vismodégib et les concentrations plasmatiques en bilirubine totale.

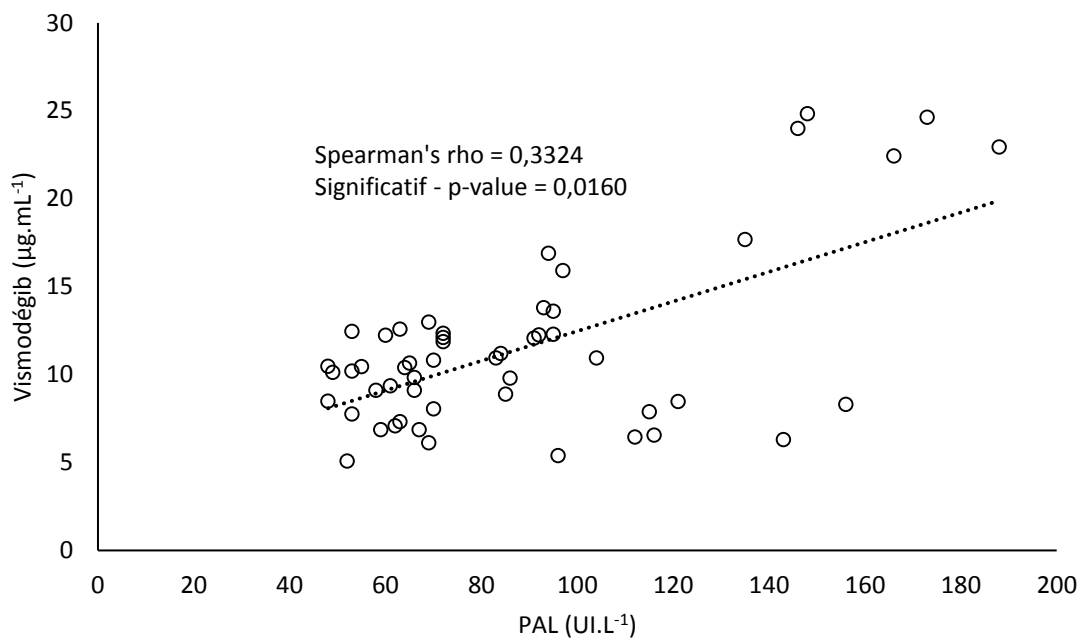


Figure 44 Corrélation entre les concentrations résiduelles totales en vismodégib et les concentrations plasmatiques en phosphatase alcaline.

Deux valeurs biologiques étaient corrélées avec la concentration totale en vismodégib : la bilirubine totale (Figure 43) et les phosphatases alcalines (Figure 44).

Dans la publication d'Abou-Alfa, les concentrations plasmatiques totales en vismodégib des patients présentant une altération de la fonction hépatique, définie en fonction des valeurs de bilirubine totale, n'étaient pas significativement différentes.

Dans notre échantillon, une patiente possède des concentrations plasmatiques résiduelles en vismodégib importantes ainsi que des valeurs en AGP supérieure à la normale et une cholestase connue.

L'analyse statistique de la corrélation entre les PAL et le vismodégib et entre la bilirubine totale et le vismodégib après exclusion des valeurs de cette patiente ne confirme pas l'association retrouvée précédemment, *p-value* du rho de Spearman respectivement de 0,4789 et 0,06048.

Comme pour le DFG, une analyse statistique multivariée confirmera la présence ou l'absence de corrélation entre les valeurs du bilan biologique hépatique et les concentrations en vismodégib.

IV. Discussion

À ce jour, 17 patients étaient inclus dans l'étude dont une patiente ayant refusé la prise de vismodégib après signature du consentement.

L'analyse des patients inclus jusqu'à présent met en évidence une population âgée, présentant une altération de l'état général, traitée majoritairement pour carcinome basocellulaire localement avancé.

La variabilité intra-individuelle des patients est globalement faible, deux tiers des patients présentant une variabilité des concentrations inférieures à 10 %.

La variabilité interindividuelle s'élève quant à elle à 39 %.

Cette étude confirme pour l'instant le poids et la concentration en alpha-1-glycoprotéine acide comme des variables étroitement liées à la concentration plasmatique totale en vismodégib.

Des analyses statistiques plus poussées permettront de déterminer si le débit de filtration glomérulaire ou les éléments du bilan hépatique sont réellement corrélés aux concentrations totales en vismodégib.

Les analyses de relation entre les concentrations en vismodégib et les données d'efficacité et de tolérance semblent peu pertinentes à ce stade et seront réalisées en fin d'étude.

Une analyse des concentrations en forme libre du vismodégib est également prévue après développement d'une méthode analytique de dosage de la fraction libre du vismodégib dans le plasma.

Les méthodes les plus utilisées pour la séparation des formes libres et liées sont : l'ultracentrifugation, l'ultrafiltration et la dialyse à l'équilibre (*rapid equilibrium dialysis*).

Les essais que nous avons réalisés sur le plasma de souris avec une méthode par ultrafiltration sont pour l'instant décevants : les concentrations en formes libres n'étaient pas corrélées à la dose de vismodégib et le pourcentage de fixation aux protéines plasmatiques était plus faible que dans la littérature.

L'optimisation de la méthode, tel que le pré-traitement des filtres avec des détergents ou des protéines afin de limiter le *carryover*, l'incubation à 37°C avant analyse ou le test de différentes vitesses et durées de rotation n'ont pas permis de retrouver un pourcentage de fixation cohérent avec ceux publiés jusqu'à l'heure pour le vismodégib.

Nous sommes en train de développer une méthode de séparation des formes libres et liées en vismodégib par dialyse à l'équilibre, méthode de référence plus fiable et moins sensible au *carryover* mais également plus longue et plus coûteuse.

Bibliographie

1. Cordova, M., Nehal, K. S. & Rossi, A. M. Basal cell carcinoma Epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes ; and disease associations. *J. Am. Dermatology* **80**, 303–317 (2019).
2. Agence Nationale pour l'Accréditation et l'Évaluation en Santé (ANAES). Prise en charge diagnostique et thérapeutique du carcinome basocellulaire de l'adulte. (2004).
3. National Comprehensive Cancer Network. *NCCN Basal Cell Skin Cancer Guidelines Version 1*. (2018).
4. Ortonne, N. Histopathologie des carcinomes. *Images en Dermatologie VII*, 12–19 (2014).
5. Bichakjian, C. *et al.* Guidelines of care for the management of basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **78**, 540–559 (2018).
6. Hoc, A. *et al.* ACADEMY AAD / ACMS / ASDSA / ASMS 2012 appropriate use criteria for Mohs micrographic surgery : A report of the American Academy of Dermatology , American College of Mohs Surgery , American Society for Dermatologic Surgery Association , and the American. *J. Am. Acad. Dermatology* **67**, 531–550 (2012).
7. Nüsslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795–801 (1980).
8. Varjosalo, M. & Taipale, J. Hedgehog : functions and mechanisms. 2454–2472 (2008). doi:10.1101/gad.1693608
9. Bürglin, T. R. Protein family review The Hedgehog protein family. *Genome Biol.* 1–9 (2008). doi:10.1186/gb-2008-9-11-241
10. Pietrobono, S., Gagliardi, S. & Stecca, B. Non-canonical Hedgehog Signaling Pathway in Cancer: Activation of GLI Transcription Factors Beyond Smoothed. *Front. Genet.* **10**, 1–20 (2019).
11. Eaton, S. Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway. *Nat. Rev. Mol.*

- Cell Biol.* **9**, (2008).
12. Vincent, S., Thomas, A., Brasher, B. & Benson, J. D. Targeting of proteins to membranes through hedgehog auto-processing. *Nat. Biotechnol.* **21**, 936–940 (2003).
 13. Chamoun, Z. *et al.* Skinny Hedgehog , an Acyltransferase Required for Palmitoylation and Activity of the Hedgehog Signal. *Science (80-.)*. **2080**, (2014).
 14. Burke, R. *et al.* Dispatched , a Novel Sterol-Sensing Domain Protein Dedicated to the Release of Cholesterol-Modified Hedgehog from Signaling Cells. *Cell* **99**, 803–815 (1999).
 15. Bishop, B. *et al.* Structural insights into hedgehog ligand sequestration by the human hedgehog-interacting protein HHIP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, (2009).
 16. Chuang, P. & McMahon, A. P. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 617–621 (1999).
 17. Zhang, W., Kang, J., Cole, F., Yi, M. & Krauss, R. S. Cdo Functions at Multiple Points in the Sonic Hedgehog Pathway , and Cdo-Deficient Mice Accurately Model Human Holoprosencephaly. *Dev. Cell* 657–665 (2006). doi:10.1016/j.devcel.2006.04.005
 18. Chen, Y. & Jiang, J. Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. *Cell Res.* **23**, 186–200 (2013).
 19. Tenzen, T. *et al.* The Cell Surface Membrane Proteins Cdo and Boc Are Components and Targets of the Hedgehog Signaling Pathway and Feedback Network in Mice. *Dev. Cell* 647–656 (2006). doi:10.1016/j.devcel.2006.04.004
 20. Goetz, S. C. & Anderson, K. V. The primary cilium : a signalling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.* **11**, (2010).
 21. Alcedo, J. *et al.* The Drosophila smoothed Gene Encodes a Seven-Pass Membrane Protein , a Putative Receptor for the Hedgehog Signal. *Cell* **86**, 221–232 (1996).
 22. Van Den Heuvel, M. & Ingham, P. W. smoothed encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature* **382**, (1996).

23. Boone, D. R. *et al.* Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse patched Mutants. *Science* (80-.). **277**, (1997).
24. Pavletich, N. P. & Pabo, C. Crystal Structure of a Five-Finger GLI-DNA Complex : New Perspectives on Zinc Fingers. *Science* (80-.). **261**, (1993).
25. Price, M. A. & Kalderon, D. Proteolysis of the Hedgehog Signaling Effector Cubitus interruptus Requires Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell* **108**, 823–835 (2002).
26. Bhatia, N. *et al.* Gli2 Is Targeted for Ubiquitination and Degradation by Beta-TrCP Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.* **281**, 19320–19326 (2006).
27. Østerlund, T. & Kogerman, P. Hedgehog signalling : how to get from Smo to Ci and Gli. **16**, (2006).
28. Shi, Q. *et al.* Hedgehog-induced phosphorylation by CK1 sustains the activity of Ci / Gli activator. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2014). doi:10.1073/pnas.1416652111
29. Scales, S. J. & Sauvage, F. J. De. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. 303–312 (2009). doi:10.1016/j.tips.2009.03.007
30. Ruppert, J. M. *et al.* The GLI-Kruppel Family of Human Genes. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3104–3113 (1988).
31. Brennan, D., Chen, X., Cheng, L., Mahoney, M. & Riobo, N. A. *Noncanonical Hedgehog Signaling. Vitamins and Hormones* **88**, (Elsevier Inc., 2012).
32. Teperino, R., Aberger, F., Esterbauer, H., Riobo, N. & Andrew, J. Canonical and non-canonical Hedgehog signalling and the control of metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1–12 (2014). doi:10.1016/j.semcd.2014.05.007
33. Faria, A. V. D. S., Akyala, A. I., Parikh, K. & Brüggemann, L. W. Smoothed - dependent and independent pathways in mammalian non-canonical Hedgehog signaling. (2019). doi:10.1074/jbc.RA119.007956
34. Erivedge 150mg, gélule. Avis de la comission de la transparence. *Haute Autorité de*

- Santé* 1–18 (2013).
35. Chemaxon. Chemicalize, calculation module developed by Chemaxon. (2019). Available at: <https://chemicalize.com/>.
 36. Dockendor, C. *et al.* Macrocyclic Hedgehog Pathway Inhibitors: Optimization of Cellular Activity and Mode of Action Studies. (2012).
 37. Graham, R. A. *et al.* Single and multiple dose intravenous and oral pharmacokinetics of the hedgehog pathway inhibitor vismodegib in healthy female subjects. (2012). doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04281.x
 38. European Medicine Agency. Erivedge, INN Vismodegib - Summary of Product Characteristics. *Eur. Public Assessment Rep. European p*, 1–38
 39. Giannetti, A. M. *et al.* Identification , Characterization , and Implications of Species-Dependent Plasma Protein Binding for the Oral Hedgehog Pathway Inhibitor Vismodegib (GDC-0449). 2592–2601 (2011).
 40. Khojasteh, S. C. *et al.* Investigations into the Mechanisms of Pyridine Ring Cleavage in Vismodegib s. (2014).
 41. Yue, Q. *et al.* Absorption, distribution, metabolism, and excretion of [¹⁴ C]GDC-0449 (vismodegib), an orally active hedgehog pathway inhibitor, in rats and dogs: A unique metabolic pathway via pyridine ring opening. *Drug Metab. Dispos.* **39**, 952–965 (2011).
 42. Lu, T. *et al.* Semi-Mechanism-Based Population Pharmacokinetic Modeling of the Hedgehog Pathway Inhibitor Vismodegib. 680–689 (2015). doi:10.1002/psp4.12039
 43. Wong, H. *et al.* Preclinical assessment of the absorption, distribution, metabolism and excretion of GDC-0449 (2-chloro- *N* -(4-chloro-3-(pyridin-2-yl)phenyl)-4-(methylsulfonyl)benzamide), an orally bioavailable systemic Hedgehog signalling pathway inhibitor. *Xenobiotica* **39**, 850–861 (2009).
 44. Sharma, V. & Mcneill, J. H. To scale or not to scale : the principles of dose

- extrapolation. 907–921 (2009). doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00267.x
45. Gould, S. E. *et al.* Discovery and preclinical development of vismodegib. *Expert Opin. Drug Discov.* **9**, 969–984 (2014).
 46. Wong, H. *et al.* Pharmacokinetic – Pharmacodynamic Analysis of Vismodegib in Preclinical Models of Mutational and Ligand-Dependent Hedgehog Pathway Activation. *Clin. Cancer Res.* **17**, 4682–4692 (2011).
 47. Genentech. Erivedge : Highlights of prescribing information. *U.S. Food Drug Adm.* (2012).
 48. Sekulic, A., Migden, M. R., Lewis, K. & Hainsworth, J. D. Pivotal ERIVANCE basal cell carcinoma (BCC) study : 12-month update of efficacy and safety of vismodegib in advanced BCC. *J. Am. Dermatology* **72**, 1021–1026.e8 (2015).
 49. N. Basset-Seguin *et al.* Vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma : Primary analysis of STEVIE , an international, open-label trial. *Eur. J. Cancer* **86**, 334–348 (2017).
 50. Frampton, J. E. & Basset-Séguin, N. Vismodegib: A Review in Advanced Basal Cell Carcinoma. *Drugs* **78**, 1145–1156 (2018).
 51. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. (2018).
 52. International Council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use. Bioanalytical Method Validation M10. *ICH Harmon. Guidel.* (2019).
 53. Chapouly, C. *et al.* Impaired Hedgehog signalling-induced endothelial dysfunction is sufficient to induce neuropathy: Implication in diabetes. *Cardiovasc. Res.* **109**, 217–227 (2016).
 54. Alvarez, J. I. *et al.* The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* **334**, 1727–31 (2011).
 55. Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche &

Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale. 1–4 (2014).

56. Wong, H. *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of vismodegib in preclinical models of mutational and ligand-dependent Hedgehog pathway activation. *Clin. Cancer Res.* **17**, 4682–4692 (2011).
57. Streicher, C. Le vismodegib : revue de la littérature et expérience dans la prise en charge du cancer basocellulaire au CHU de Bordeaux. *Thèse* 1–99
58. Basset-seguin, N. *et al.* Vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma (STEVIE): a pre-planned interim analysis of an international , open-label trial. *Lancet Oncol.* (2015). doi:10.1016/S1470-2045(15)70198-1
59. Graham, R. A. *et al.* Pharmacokinetics of Hedgehog Pathway Inhibitor Vismodegib (GDC-0449) in Patients with Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors : the Role of Alpha-1-Acid Glycoprotein Binding. *Clin. Cancer Res.* **17**, 2512–2520 (2011).
60. Alfa, G. K. A. *et al.* Pharmacokinetics and safety of vismodegib in patients with advanced solid malignancies and hepatic impairment. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (2017). doi:10.1007/s00280-017-3315-8

Serment de Galien

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

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) 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.

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 et méprisé de mes confrères si j'y manque.