



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

2011

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE

**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de PHARMACIE HOSPITALIERE et des
COLLECTIVITES**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 17 octobre 2011

par Melle Mathilde PERISSUTTI

née le 25/09/1983

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE

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

Etude de la stabilité d'une solution de bortézomib à 1 mg/mL conditionnée
en seringue de polypropylène – Application à la production quotidienne
d'une unité centralisée de préparation de cytotoxiques pour le service
d'hospitalisation de jour d'Hématologie

Président du jury : M. Jean-Louis Merlin,

Juges : M. Jean Vigneron,
M. Dominique Decolin,
M. Philippe Fagnoni,
M. Cyrille Hulin,

Professeur, Nancy

Pharmacien hospitalier, Nancy
Maître de conférences, Nancy
Maître de conférences, Dijon
Hématologue, Nancy

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

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Référent de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège
d'Enseignement Pharmaceutique
Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Bertrand RIHN

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

Dominique NOTTER
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ENSEIGNANTS

Section CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU	80	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Gilles AULAGNER	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Max HENRY	87	<i>Botanique, Mycologie</i>
Pierre LABRUDE	86	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Louis MERLIN	87	<i>Biologie cellulaire</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Mariette BEAUD	87	<i>Biologie cellulaire</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>

François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Florence DUMARCA Y	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Hématologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Santé publique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie</i>
Francine KEDZIEREWICZ	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Faten MERHI-SOUSSI	87	<i>Hématologie</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie</i>
Blandine MOREAU	86	<i>Pharmacognosie</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Francine PAULUS	85	<i>Informatique</i>
Christine PERDIAKIS	86	<i>Chimie organique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Gabriel TROCKLE	86	<i>Pharmacologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Mohamed ZAIOU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>
Colette ZINUTTI	85	<i>Pharmacie galénique</i>

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	<i>Sémiologie</i>
--------------------	----	-------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	<i>Anglais</i>
--------------------	----	----------------

SERMENT DES APOTHICAIRES

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

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

Ð'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.

Ðe 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.

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

REMERCIEMENTS

A mon président de jury,

Monsieur Jean-Louis Merlin,

Professeur des Universités à la faculté de pharmacie de Nancy,

Vous me faites l'honneur de présider cette soutenance, recevez toute ma reconnaissance

A mon directeur de thèse,

Monsieur Jean Vigneron,

Pharmacien Hospitalier à l'hôpital de Brabois,

Pour la confiance que vous m'avez accordée en me proposant ce sujet, pour vos conseils et votre disponibilité, je vous remercie et vous adresse mon plus grand respect

A mes juges,

Monsieur Dominique Decolin,

Maître de conférences à la faculté de pharmacie de Nancy,

J'ai découvert la chimie analytique à vos côtés, je vous remercie vivement aujourd'hui d'avoir accepté de juger mon travail

Monsieur Philippe Fagnoni,

Maître de conférences à la faculté de pharmacie de Dijon,

Vous avez accepté sans hésitation la participation à ce jury, je vous remercie très sincèrement

Monsieur Cyrille Hulin,

Médecin Hématologue à Brabois,

Votre présence pour cette soutenance est un honneur pour moi, recevez tous mes remerciements

A Hubert, Nathalie et Franck,

Pour vos conseils, vos connaissances, votre disponibilité et votre patience, pour avoir répondu à chacun de mes appels au secours... Un grand Merci !

A toute personne ayant contribué de près ou de loin à ce travail,

Merci

A mes parents Marie-Hélène et Bruno,

En espérant être à la hauteur de tout ce que vous m'offrez continuellement, votre amour, votre soutien, vos encouragements... Vous êtes de belles et formidables personnes, Merci mille fois

A ma petite sœur Margot et son Rémi,

Merci tout simplement d'être là, je suis si fière de vous avoir à mes côtés

A Baptiste,

Pour ces années passées ensemble, pour ton amour, tes encouragements, ta présence au fil de ces longues études, reçois tout mon amour, du fond du coeur

A toute ma famille, papi, mamies, oncles, tantes, cousins, cousines, et à ma belle-famille,

Merci de votre présence et de vos encouragements

A mes « vieilles » amies,

Le temps passe, l'amitié reste...

A mes amis de fac, Binôme, Christelle, Claire, Emilie mama, FH, Lucie, Made, Marie-E, Shuny, Tom-Tom... et aux compagnons Esstiniens et autres...

Pour tous les bons moments passés et futurs, les fous rires que l'on vit ensemble, Vous tenez une grande place dans mon coeur

A mes amis spinaliens,

Merci d'être là

A tous les internes, externes, préparateurs, pharmaciens que j'ai eu la chance de rencontrer,

Le temps passe si vite !!! Merci pour tout

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	6
 1ère partie MYELOME MULTIPLE ET BORTEZOMIB	7
I. Le myélome multiple.....	7
I.1. Définition	7
I.2. Epidémiologie	7
I.3. Physiopathologie	7
I.4. Clinique	8
I.5. Diagnostic.....	8
I.6. Classification	9
I.7. Facteurs pronostiques	9
I.8. Stratégie thérapeutique et traitement	10
I.8.1. Traitement de 1ère ligne.....	12
I.8.1.1. Patient de moins de 65 ans et éligible à une autogreffe de CSP.....	12
I.8.1.2. Patient de plus de 65 ans ou moins de 60 ans et inéligible à une autogreffe de CSP	13
I.8.2. Myélome en rechute ou réfractaire	13
I.8.3. Essais cliniques	13
I.8.4. Traitements de support.....	14
II. Le Bortézomib	15
II.1. Historique	15
II.2. Nomenclature et classe thérapeutique	15
II.3. Caractéristiques chimiques du bortézomib	15
II.4. Présentation pharmaceutique.....	16
II.5. Mécanisme d'action et propriétés pharmacologiques.....	16
II.6. Indications	17
II.7. Posologie.....	17
II.7.1. Posologie en monothérapie	17
II.7.2. Posologie en association	18

II.8. Mode d'administration	18
II.9. Pharmacocinétique.....	19
II.10. Pharmacodynamie.....	19
II.11. Contre-indications.....	20
II.12. Interactions médicamenteuses.....	20
II.13. Précautions d'emploi et effets indésirables	20
II.14. Grossesse, allaitement	22
II.15. Données administratives	22
 2ème partie BILAN D'UTILISATION DU BORTÉZOMIB.....	24
I. Evolution des consommations.....	24
II. Bilan d'utilisation au CHU de Nancy	25
II.1. Objectif	25
II.2. Matériel et Méthode.....	25
II.3. Résultats.....	25
II.3.1. Caractéristiques des patients	25
II.3.2. Histoire de la maladie	27
II.3.3. Instauration du Velcade® et nombre de lignes thérapeutiques	27
II.3.4. Traitements concomitants.....	28
II.3.4.1. Le Thalidomide	28
II.3.4.2. Le Lénalidomide	28
II.3.4.3. Corticoïdes	29
II.3.4.4. Facteurs de croissance hématopoïétique	29
II.3.4.5. Antinauséux.....	29
II.3.4.6. Antibioprophylaxie	29
II.3.5. Velcade®.....	30
 3ème partie ETUDE DE STABILITE	31
I. Rationnel de l'étude.....	31
I.1. Etat actuel de la question	31
I.2. But du projet.....	31
II. Matériel et méthode.....	32
II.1. Choix de la méthode.....	32

II.2. Matériel et réactifs	33
II.2.1. Système de chromatographie liquide haute performance	33
II.2.2 Matériel de laboratoire	34
II.2.3.Réactifs.....	34
III. Validation de la méthode	35
III.1. Conditions chromatographiques	35
III.2. Grandeurs chromatographiques	36
III.2.1. Temps de rétention.....	36
III.2.2. Volume mort	36
III.2.3. Facteur de capacité	37
III.2.4. Résolution.....	37
III.2.5. Sélectivité	37
III.2.6. Efficacité	38
III.2.7. Facteur de symétrie	38
III.3. Etalonnage	38
III.4. Précision ou fidélité	40
III.4.1. Répétabilité.....	40
III.4.2. Fidélité intermédiaire	41
III.5. Exactitude.....	41
III.6. Spécificité	41
III.6.1. Spécificité vis-à-vis de l'excipient	42
III.6.2. Spécificité vis-à-vis des solvants utilisés	42
III.6.3. Spécificité vis-à-vis des produits de dégradation.....	42
III.6.3.1. Dégradation en milieu acide chaud	42
III.6.3.2. Dégradation en milieu basique	43
III.6.3.3. Dégradation en milieu oxydant	43
III.6.2.4. Dégradation à la chaleur.....	43
IV. Stabilité de la solution de bortézomib.....	43
IV.1. Définition de la stabilité	43
IV.2. Préparation des seringues	44
IV.3. Réalisation de l'étude	45
IV.4. Stabilité physique	45
IV.5. Stabilité chimique	45

V. Résultats	46
V.1. Validation de la méthode.....	46
V.1.1. Qualification de la colonne	46
V.1.2. Grandeurs chromatographiques.....	47
V.1.3. Etalonnage	50
V.1.4. Précision	54
V.1.4.1. Répétabilité	54
V.1.4.2. Fidélité intermédiaire	55
V.1.5. Etude de la spécificité par rapport aux solvants et excipients	59
V.2. Etude de la dégradation forcée du bortézomib.....	61
V.2.1. Produits de dégradation connus.....	61
V.2.2. Dégradation forcée.....	61
V.3. Etude de la stabilité.....	66
V.3.1. Aspect physique	66
V.3.2. La stabilité chimique.....	66
V.3.2.1. Etude de la concentration de bortézomib	66
V.3.2.2. Etude des produits de dégradation	68
VI. Discussion.....	72
VI.1. Validation de la méthode de dosage	72
VI.2. Produits de dégradation	72
VI.3. Etude de stabilité.....	73
VI.4. Applications.....	74
CONCLUSION	75
LISTE DES FIGURES.....	76
LISTE DES TABLEAUX.....	78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	79

LISTE DES ABREVIATIONS

ClCr : Clairance à la créatinine

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CSP : Cellules Souches Périphériques

EPO : Erythropoïétine

G-CSF : Facteurs de Croissance Granuleux

GHS : Groupe Homogène de Séjour

HCl : Acide chlorhydrique

ICH : International Conference on Harmonisation

IFM : Intergroupe Francophone du Myélome

IMWG: International Myeloma Working Group

ISS: International Staging System

MGUS: Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance

MP: Melphalan/Prednisone

MP-thal: Melphalan/Prednisone/Thalidomide

MPV : Melphalan/Prednisone/Velcade®

NaCl : Chlorure de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium

Nbre : Nombre

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

SFH : Société Française d'Hématologie

Tps : Temps

VTD : Velcade®/Thalidomide/Dexaméthasone

VTP : Velcade®/Thalidomide/Prednisone

INTRODUCTION

La découverte du bortézomib, premier inhibiteur du protéasome, a révolutionné la prise en charge du myélome multiple. En France, son association avec d'autres thérapeutiques anticancéreuses est actuellement le traitement de référence. C'est un produit coûteux dont la stabilité de la solution reconstituée, conditionnée en seringue, n'est que de 8h à 25°C selon le laboratoire et de 5 jours lors de la conservation à 5°C selon la publication d'André et al, Ann Pharmacotherapy 2005;39:1462-66. Ceci confronte le pharmacien hospitalier à deux problèmes : l'impossibilité de préparer les seringues à l'avance, ce qui permettrait de raccourcir le temps d'attente du patient et de « désengorger » le service d'hospitalisation de jour, et l'impossibilité de conserver, même selon une procédure sécurisée, une seringue dont l'administration serait reportée. Valider la stabilité de cette préparation sur une période plus longue permettrait d'anticiper la préparation des seringues et de travailler à l'avance :

- en dose banding : dose standardisée non nominative ou
- en préparation standardisée nominative

La standardisation se faisant alors par palier de 0,2 mg avec des préparations allant de 1,6 mg à 2,6 mg de bortézomib.

Ces deux procédés permettent une disponibilité immédiate de la préparation et donc très peu d'attente du patient pour son traitement. La standardisation des doses et la procédure de réattribution sécurisée autoriseraient également l'utilisation d'une seringue, lors d'un report ou d'un arrêt de cure, pour un autre patient sans problème lié à la stabilité.

Différentes études ont été menées sur cette stabilité, mais les méthodologies suivies, les conditionnements utilisés ne permettent pas de répondre à nos attentes. Nous allons, après un rappel sur la prise en charge du myélome et l'utilisation du bortézomib au CHU de Nancy, présenter une étude de stabilité effectuée sur une solution de bortézomib à une concentration de 1 mg/mL conservée dans une seringue de polypropylène, telle qu'elle est préparée lors du travail de routine pour le service d'Hématologie, sur une durée de 35 jours.

I. Le myélome multiple

I.1. Définition

Le myélome multiple, appelé aussi maladie de Kahler, est une hémopathie maligne, chronique et incurable, caractérisée par une prolifération médullaire plasmocytaire avec sécrétion de toute ou partie d'une immunoglobuline monoclonale et par la synthèse de stimulateurs de la résorption osseuse responsables de lacunes osseuses et d'hypercalcémie.

I.2. Epidémiologie

Le myélome multiple représente près d'1% des pathologies cancéreuses et 13% des cancers hématologiques, c'est le 2^{ème} plus important en nombre après les lymphomes. [1,2] L'incidence est estimée à 5,6 cas pour 100 000 habitants, soit 3000 à 4000 nouveaux cas par an en France, et plusieurs études rapportent une augmentation de celle-ci. L'âge moyen au diagnostic est de 70 ans mais 40% des patients ont moins de 65 ans et 2% moins de 40 ans. La fréquence de la maladie augmente avec l'âge. La survie à 10 ans est actuellement, lors d'une prise en charge optimale, de 30% lors de la découverte de maladie chez les patients de moins de 60 ans. [1]

I.3. Physiopathologie

Il existe une translocation chromosomique dans le plasmocyte, qui juxtapose alors les promoteurs des gènes de synthèse d'immunoglobuline à des oncogènes. Cette translocation constante confère à la cellule son « immortalité ». Il y a ensuite prolifération de cette cellule qui va produire une immunoglobuline monoclonale. [3] S'ensuit une

instabilité chromosomique, avec apparition d'anomalies numériques et de nouvelles mutations qui permettent la prolifération de ces cellules cancéreuses. L'interaction de ces cellules avec le microenvironnement et la sécrétion de nombreuses cytokines, dont l'IL 6, le VEGF, ou encore l'ILGF1 va permettre la croissance, la survie, la migration des cellules, et leur éventuelle résistance au médicament. [1]

I.4. Clinique

Au diagnostic, 20% des patients sont asymptomatiques et plus de 50% présentent des douleurs osseuses. Selon différentes études, près de 70% des patients sont anémiques par infiltration médullaire ou insuffisance rénale, plus de 80% des patients ont des lésions osseuses et 20 à 40% présentent des insuffisances rénales. [1] On note également une altération de l'état général, des douleurs osseuses diffuses et fractures, l'absence de fièvre, et des signes d'insuffisance médullaire : anémie (pâleur, fatigue, dyspnée), thrombopénie (épistaxis, hémorragie) et neutropénie (sensibilité aux infections). Des complications peuvent survenir lors de l'évolution de la maladie : céphalées, vertiges dus à l'hyperviscosité sanguine, manifestations neurologiques par tassement vertébral et compression des nerfs, ou encore polydipsie, polyurie, nausées, vomissements provoqués par l'hypercalcémie et complications rénales multifactorielles (dépôt des chaînes légères d'immunoglobuline). [4]

I.5. Diagnostic

Il repose sur la mise en évidence de l'immunoglobuline monoclonale et la prolifération des plasmocytes dans la moelle osseuse. Il convient donc de faire les examens suivants :

- Hémogramme avec frottis sanguin, dosage de la calcémie et de la créatininémie.
- Myélogramme : infiltration plasmocytaire quantitativement et/ou qualitativement anormale.
- Etude immunochimique : électrophorèse et l'immuno-électrophorèse ou immuno-fixation des protides sanguins et urinaires, qui permet la détection, caractérisation et la quantification de l'immunoglobuline monoclonale mais aussi celles des immunoglobulines physiologiques.

- Bilan radiologique du squelette axial : permet de visualiser des géodes d'ostéolyse, des lacunes à l'emporte-pièce, des aspects d'ostéoporose diffuse ou encore des tassements vertébraux. [5]

Le diagnostic est basé sur une infiltration plasmocytaire de la moelle supérieure à 10% et la présence de protéine monoclonale dans le sérum ou les urines. Pour les patients atteints d'un myélome non-sécrétant, l'infiltration doit être supérieure à 30% ou le myélome est prouvé par biopsie du plasmocytome. [1]

I.6. Classification

Il existe une classification selon l'International Myeloma Working Group (IMWG) qui permet de répartir la maladie en myélome asymptomatique, symptomatique et gammapathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS). [6] (annexe1). Elle utilise différents critères tels que la présence d'un composant monoclonal sérique ou urinaire, l'absence ou présence d'hypercalcémie, l'insuffisance rénale avec la créatininémie, le taux d'hémoglobine...

L'électrophorèse et l'immuno-électrophorèse des protéines plasmatiques et urinaires permettent également de séparer le myélome multiple en différentes classes selon le type d'immunoglobuline monoclonale synthétisée. Nous distinguons ainsi le myélome multiple :

- à Ig G : le plus fréquent, environ 65% des cas,
- à Ig A, qui représente 20% des cas,
- à chaînes légères, 15 % des cas,
- à Ig D, moins de 5% des cas [2]

I.7. Facteurs pronostiques

Il existe une grande disparité dans l'agressivité du myélome. Certains seront latents pendant plusieurs années et d'autres d'évolution très rapide.

La classification de Salmon et Durie, basée sur l'appréciation de la masse tumorale en fonction de différents paramètres (annexe 2), était utilisée dès 1975, mais depuis 2005, de nombreuses études se basent sur l'International Staging System (ISS) (annexe 3) qui utilise seulement les dosages de la $\beta 2$ microglobuline et de l'albumine, deux paramètres dont la mesure simple et reproductible permet de classer le myélome en trois stades selon la médiane de survie. Plus récemment, l'étude cytogénétique des plasmocytes tumoraux, l'identification d'anomalies de nombre ou de structure a permis une nouvelle stratification du pronostic. La présence d'une hyperploïdie est plutôt favorable, alors que la délétion (17p), la translocation t(4 ;14) ou t(14 ;16) sont plutôt associées à un pronostic défavorable.

I.8. Stratégie thérapeutique et traitement

L'incidence du myélome est en continuelle augmentation, ceci étant dû à l'allongement de la durée de vie des personnes mais on note une évolution et une amélioration de la survie au cours des vingt dernières années. Historiquement, l'utilisation du melphalan à forte dose et de l'autogreffe de moelle osseuse dans les années 1990 a permis d'augmenter la médiane de survie de 4 à 5 ans chez le sujet jeune. De même, l'utilisation d'immunomodulateurs comme le thalidomide dans les années 90, l'apparition du bortézomib, inhibiteur du protéasome en 2003 ou encore du lénalidomide en 2005 ont permis une amélioration de la survie globale. [7]

Les myélomes symptomatiques doivent être traités d'emblée, alors que les patients ne présentant pas de symptômes seront soumis à une simple surveillance, quelque soit l'âge, puisque le traitement précoce de la maladie n'a pas montré de bénéfice. [1]

Le bortézomib est le premier inhibiteur de protéasome mis sur le marché en France en 2004. Ce fut une véritable avancée dans la thérapeutique ciblée anticancéreuse et les données sur son efficacité préclinique dans différents modèles ont engendré de nombreux essais cliniques sur son utilisation, seul ou en association dans différents types de cancers. Nous avons recensé quelques essais ayant permis au bortézomib d'être actuellement indiqué comme traitement de référence dans le myélome multiple. [8]

Dans le myélome multiple naïf de traitement, le MMY-3002, essai de phase III, randomisé et ouvert, a comparé le traitement melphalan/prednisone (MP) et melphalan/prednisone/bortézomib (MPV) chez des patients non éligibles à un traitement intensif suivi d'autogreffe. 682 patients recevaient neuf cycles de 6 semaines, avec du melphalan 9 mg/m² et de la prednisone 60 mg/m² de J1 à J4, plus ou moins du bortézomib à 1,3 mg /m² à J1, 4, 8, 11, 22, 25, 29 et 32 durant les cycles 1 à 4 et J1, 8, 22 et 29 pour les cycles 5 à 9. Les résultats, en terme de survie sans progression, de réponse partielle et réponse complète, sont meilleurs dans le bras MPV, mais avec une apparition d'effets indésirables de grade 3 plus importante. [9]

Un second essai, randomisé et ouvert, compare l'efficacité de MPV et VTP (bortézomib/thalidomide/prednisone) chez des patients non éligibles à un traitement intensif suivi d'autogreffe. 260 patients ont été inclus et ont reçu du melphalan 9 mg /m² et de la prednisone 60 mg/m² de J1 à J4, et soit du bortézomib à 1,3 mg/m² deux fois par semaine pendant 6 semaines pour le premier cycle, puis 1 fois par semaine pendant 5 semaines, soit du thalidomide 100 mg/jour. 178 des patients ont suivi ensuite un traitement de maintenance par bortézomib/prednisone ou bortézomib/thalidomide. Les résultats concernant l'induction montrent plus de rémission complète, mais aussi plus d'effets indésirables avec le protocole VTP qu'avec le VMP, et pour la phase de maintenance, le taux de rémission complète est plus important avec l'association bortézomib/thalidomide que bortézomib/prednisone. [10]

Un essai de phase II, ouvert et multicentrique, évalue l'efficacité du bortézomib associé au melphalan dans le conditionnement des autogreffes. Le bortézomib était prescrit à une posologie de 1 mg/m² à J-6, J-3, J1 et J4, et le melphalan à une dose de 200 mg/m² à J-2, J0 étant le jour de réinjection des cellules souches périphériques (CSP). Les résultats ont ensuite été comparés aux résultats obtenus lors d'un essai antérieur qui évaluait l'efficacité du melphalan seul. Le pourcentage de réponse complète est apparu supérieur dans le bras contenant le bortézomib. [11]

Enfin un essai sur le bortézomib comme seul agent de traitement d'induction, de maintenance et de réinduction chez des patients ayant un myélome de haut risque a été

mis en place. Cette étude montre que le taux de réponse globale est de 51%, mais que le bortézomib n'est pas suffisant en monothérapie. [12]

Pour le myélome réfractaire ou en rechute, plusieurs essais cliniques ont été menés, dont l'essai APEX, de phase III, randomisé, qui a inclus 669 patients en rechute ou réfractaire et qui montre un bénéfice supérieur de l'usage du bortézomib à la dexaméthasone seule à haute dose en terme de temps sans progression, de survie à 1 an, de survie globale et de taux de réponse. [13]

Un essai allemand et suisse a quant à lui évalué l'efficacité et la sécurité d'emploi d'un retraitement par bortézomib chez des patients ayant un myélome en rechute et qui ont eu du bortézomib lors d'un traitement initial. Les résultats montrent que les patients conservent une sensibilité au bortézomib et ne présentent pas de toxicité particulière lors de la reprise. [14]

Après ces différentes études, les recommandations actuelles de la Société Française d'Hématologie (SFH) ainsi que celles de l'Intergroupe Francophone du Myélome (IFM) [5, 6] sont les suivantes :

I.8.1. Traitement de 1ère ligne

I.8.1.1. Patient de moins de 65 ans et éligible à une autogreffe de CSP

- Induction: par bortézomib et fortes doses de corticoïdes avec possibilité d'incorporer de nouvelles molécules

Selon les recommandations de l'IFM : 3 cycles de chimiothérapie de type VTD(Annexe 4)

- La collecte de CSP : effectuée sous cyclophosphamide 3 g/m² ou GCSF 5 µg/kg/jr (Un nombre de CD 34 ≥ à 5 X 10⁶/kg avant congélation devra être obtenu sur l'ensemble des collectes)

- Intensification : Autogreffe avec un conditionnement par melphalan 200 mg/m²

- Consolidation par 2 cycles de VTD après l'autogreffe

I.8.1.2. Patient de plus de 65 ans ou moins de 60 ans et inéligible à une autogreffe de CSP

Le traitement de référence est une chimiothérapie conventionnelle de type MP thal (melphalan/prednisone/thalidomide) ou MPV (melphalan/prednisone/Velcade®) (Annexe 4), de 9 à 12 cures au total, toutes les 6 semaines. Il y a bien sûr possibilité de maintenir le MP en cas de comorbidités ou d'intolérance aux nouvelles molécules.

I.8.2. Myélome en rechute ou réfractaire

Il n'y a pas actuellement de traitement standard. Le dossier doit être discuté en réunion de concertation pluridisciplinaire et prendre en compte plusieurs paramètres, notamment l'âge du patient, ses comorbidités, les traitements antérieurs...

Différentes options sont alors envisageables : l'abstention thérapeutique, l'utilisation de corticoïdes à haute dose, d'alkylants (comme le cyclophosphamide ou la bendamustine), de bortézomib seul ou en association, ou encore de lénalidomide associé à la dexaméthasone.

I.8.3. Essais cliniques

Afin de rechercher les meilleurs traitements et d'assurer la meilleure prise en charge des maladies, la participation des patients aux essais cliniques en cours est primordiale. Au CHU de Nancy, dans le cas d'un myélome multiple naïf de traitement, il faut à l'heure actuelle proposer au patient l'inclusion dans le protocole IFM/DFCI 2009, essai clinique de phase III comparant un traitement conventionnel comportant une association de lénalidomide, bortézomib et dexaméthasone à un traitement haute dose avec autogreffe de CSP. Le protocole CARMYSAP est quant à lui actuellement proposé, chez des patients âgés (>65 ans), non préalablement traités, atteints d'un myélome multiple. C'est une étude de phase I/II associant carfilzomib, nouvel inhibiteur du protéasome, melphalan et prednisone.

En ce qui concerne le myélome en rechute ou réfractaire à une première ligne de traitement, l'essai IFM 2009-01, de phase II et en ouvert, évalue actuellement la réponse globale de l'association bendamustine/bortezomib/dexaméthasone chez le patient de plus de 65 ans. De même, l'essai PANORAMA, de phase III, randomisé, en double aveugle contrôlé versus placebo évalue l'efficacité de l'association du panobinostat/bortezomib/dexaméthasone par rapport au bras placebo / bortezomib/dexaméthasone. Ces deux essais cliniques sont actuellement en cours au CHU de Nancy

I.8.4. Traitements de support

Le myélome est caractérisé par la synthèse de facteurs ostéoclastiques, responsables de la destruction progressive de l'os et de l'apparition d'une hypercalcémie. Les biphosphonates sont alors une classe médicamenteuse très importante. Ils sont indiqués dans la prévention des complications osseuses (fractures pathologiques, compression médullaire, irradiation ou chirurgie osseuse, hypercalcémie induite par des tumeurs) chez des patients atteints de pathologie maligne à un stade avancé avec atteinte osseuse et dans le traitement de l'hypercalcémie induite par des tumeurs. Ils sont utilisés sous forme injectable le plus souvent à un rythme d'une perfusion mensuelle, mais il existe des formes orales en prise quotidienne. Ils agissent en inhibant la résorption osseuse et permettent ainsi d'abaisser la calcémie ou de la maintenir à un taux normal.

Le myélome est également caractérisé par une infiltration plasmocytaire de la moelle, qui en général « étouffe » le développement des autres lignées. Ceci associé à une chimiothérapie pouvant être hématotoxique, il est parfois nécessaire de recourir à des traitements de support, en particulier aux facteurs de croissance hématopoïétiques de type EPO ou G-CSF, ou encore à des supports transfusionnels.

II. Le Bortézomib

II.1. Historique

Le maintien de l'homéostasie au sein de la cellule et sa capacité à répondre aux signaux environnementaux dépend essentiellement de la dégradation de ses protéines de régulation et des inhibiteurs de celle-ci. Le protéasome, qui est responsable de l'élimination de plus de 80% des protéines cellulaires, est apparu comme une excellente cible dans la thérapeutique anticancéreuse, d'autant plus que les cellules tumorales se sont montrées plus sensibles à l'effet pro-apoptotique produit par l'inhibition du protéasome que les cellules saines dans les études précliniques. [16].

II.2. Nomenclature et classe thérapeutique [17]

Classe pharmacothérapeutique : autres agents antinéoplasiques

Code ATC : Antinéoplasiques et immunomodulateurs : L

Antinéoplasiques : L01

Autres antinéoplasiques : L01X

Autres antinéoplasiques : L01XX

Bortézomib : L01312

II.3. Caractéristiques chimiques du bortézomib

Nom chimique : acide [(1R)-3-méthyl-1-[[[(2S)-3-phényl-2-(pyrazine-2-carbonylamino)propanoyl]amino]butyl]boronique

Formule chimique brute : C₁₉H₂₅BN₄O₄

Formule chimique développée :

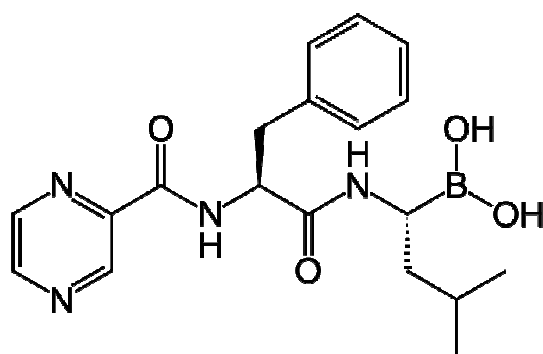


Figure 1. Structure du bortézomib

Masse molaire : $384,237 \pm 0,026$ g·mol⁻¹

N°CAS : [179324-69-7](#)

Excipient de la spécialité : mannitol

Toxicité pour le manipulateur : oui

pKa : 13,82

Spectre UV-visible : pic d'absorption à 270 nm

Produits de dégradation : deux référencés

[18]

II.4. Présentation pharmaceutique

Le bortézomib est commercialisé sous le nom de Velcade®. Il est disponible sous forme de poudre blanche à blanc cassé, dans des flacons dosés à 1 mg ou 3,5 mg sous forme d'ester boronique, avec le mannitol pour excipient. Il nécessite une reconstitution avec une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 0,9%. [17,19]

II.5. Mécanisme d'action et propriétés pharmacologiques

Le bortézomib est un inhibiteur du protéasome, large complexe protéique dégradant les protéines, qui inhibe l'activité chymotrypsine-like du protéasome 26S des cellules des mammifères. La voie ubiquitine-protéasome joue un rôle essentiel dans la régulation du renouvellement des protéines spécifiques, maintenant ainsi l'homéostasie à l'intérieur des cellules. L'inhibition du protéasome 26S empêche cette protéolyse ciblée et affecte de multiples cascades de signaux à l'intérieur de la cellule, entraînant finalement

l'apoptose de la cellule cancéreuse. Elle provoque l'altération des protéines régulatrices qui contrôlent la progression du cycle cellulaire et l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF-kB), facteur de transcription dont l'activation est nécessaire dans de nombreux aspects de la genèse tumorale, notamment la croissance et la survie cellulaire, la néo-angiogenèse, les interactions entre les cellules et les métastases. Le bortézomib entraîne une réduction de la croissance tumorale in vivo dans de nombreux modèles précliniques de tumeurs, dont le myélome multiple où certaines données ont suggéré en plus une augmentation de la différenciation et de l'activité ostéoblastique ainsi qu'une inhibition de la fonction ostéoclastique. [16]

II.6. Indications

Le bortézomib est utilisé pour traiter le myélome multiple et son autorisation de mise sur le marché (AMM) a été accordée pour deux indications : [17]

- Associé au melphalan et à la prednisone chez les patients naïfs de traitement et non éligibles à une chimiothérapie intensive suivie de greffe de moelle osseuse.
- En monothérapie chez les patients en progression ayant reçu un traitement antérieur et qui ont déjà eu ou ne peuvent pas avoir de greffe de moelle osseuse.

Il faut savoir que la découverte du bortézomib a engendré de nombreuses études cliniques sur le myélome, mais aussi sur d'autres cancers hématologiques, de type lymphome ou leucémie aigue, et sur des tumeurs solides (pancréas, sein, poumon...)

II.7. Posologie

II.7.1. Posologie en monothérapie

La posologie initiale recommandée de bortézomib est de 1,3 mg/m² de surface corporelle à J1, 4, 8 et 11, suivi d'une période de 10 jours sans traitement (J12 à J21). La durée du cycle de traitement est de 21 jours.

Deux doses consécutives de Velcade® doivent être séparées d'au moins 72 heures.

En ce qui concerne la durée de traitement, il est recommandé pour les patients en rémission complète d'avoir deux cycles de consolidation supplémentaires une fois la

réponse confirmée, et pour les patients répondeurs mais sans rémission complète d'avoir au total huit cycles de Velcade®. [17]

Le bortézomib est un médicament non dénué d'effets indésirables, en particulier neurologiques et hématologiques. L'apparition de toxicité non hématologique de grade 3 ou hématologique de grade 4 doit faire interrompre le traitement. L'apparition ou l'aggravation de neuropathies périphériques doivent être surveillées de façon étroite. Pour pallier ces problèmes, il est recommandé une adaptation posologique quantitative, où la posologie est baissée de 25% par rapport à la posologie initiale, soit 1 mg/m², puis à 0,7 mg/m² si les lésions persistent. Il existe aussi une adaptation posologique temporelle, qui est souvent utilisée chez la personne âgée, avec des injections prévues à J1, 8, 15 et 22, ce qui permet une récupération hématologique.

II.7.2. Posologie en association

Le bortézomib est administré, en association au melphalan par voie orale et à la prednisone par voie orale sur 9 cycles thérapeutiques de 6 semaines dans le protocole MPV. Au cours des cycles 1 à 4, Velcade® est administré deux fois par semaine (aux jours 1, 4, 8, 11, 22, 25, 29 et 32). Au cours des cycles 5 à 9, Velcade® est administré une fois par semaine à J1, 8, 22 et 29 et le melphalan et la prednisone doivent être administrés par voie orale à J1, 2, 3 et 4 de la première semaine de chaque cycle. [17]

II.8. Mode d'administration

Les flacons de 1 mg et 3,5 mg sont reconstitués respectivement avec 1 mL et 3,5 mL d'une solution de NaCl 0,9%. La dissolution complète demande moins de deux minutes. La solution obtenue a une concentration de 1 mg/mL et un pH compris entre 4 et 7. Elle doit être claire, incolore et exempte de particule.

L'administration se fait sous contrôle d'un médecin spécialiste, en bolus intraveineux de 3 à 5 secondes dans un cathéter périphérique ou central, suivi d'un rinçage avec une solution de NaCl 0,9%. [17]

II.9. Pharmacocinétique

Les différentes étapes de la pharmacocinétique ont été étudiées [17]:

Le volume de distribution moyen du bortézomib est élevé, de 1500 à 3000 L après une injection unique ou des injections répétées de 1 mg/m² ou 1,3 mg/m² chez des patients avec un myélome multiple. Il est donc largement distribué dans les tissus périphériques. La liaison aux protéines in vitro est proche en moyenne de 83 % dans le plasma humain. Le pourcentage de bortézomib lié aux protéines plasmatiques n'est pas concentration-dépendant.

Le bortézomib est ensuite métabolisé en premier lieu par les voies oxydatives via les enzymes du cytochrome P450, 3A4, 2C19 et 1A2. La voie métabolique principale est la déboronation pour former deux produits déboronés qui subissent ensuite une hydroxylation en plusieurs métabolites. Les métabolites déboronés du bortézomib sont inactifs en tant qu'inhibiteur du protéasome 26S.

La demi-vie d'élimination moyenne ($t_{1/2}$) du bortézomib après administrations multiples varie de 40 à 193 heures. Le bortézomib est éliminé plus rapidement après la première injection par rapport aux injections suivantes. Les moyennes de clairance corporelle totale étaient de 102 et 112 L/h après la première injection pour des doses de 1 mg/m² et 1,3 mg/m² respectivement et variaient de 15 à 32 L/h et de 18 à 32 L/h après les injections suivantes pour des doses respectives de 1 mg/m² et 1,3 mg/m².

II.10. Pharmacodynamie

Le bortézomib inhibe de façon très sélective le protéasome puisqu'à des concentrations de 10 µmol/L, il n'exerce aucune inhibition sur une large variété de récepteurs et de protéases sélectionnés, et il est 1 500 fois plus sélectif pour le protéasome que pour l'enzyme présentant l'affinité la plus proche. Le bortézomib se dissocie du protéasome avec un $t_{1/2}$ de 20 minutes, démontrant ainsi que l'inhibition du protéasome par le bortézomib est réversible. [17]

II.11. Contre-indications

Elles sont peu nombreuses : l'hypersensibilité au bortézomib, ou l'un de ses excipients, l'insuffisance hépatique sévère, la pneumopathie infiltrative diffuse aigue et l'atteinte péricardique. [17]

II.12. Interactions médicamenteuses

Des études in vitro indiquent que le bortézomib est un faible inhibiteur des isoenzymes 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 et 3A4 du cytochrome P450 (CYP). Par contre, les patients qui reçoivent du bortézomib en association avec des inhibiteurs puissants du CYP3A4 (exemple : kétoconazole, ritonavir) doivent être étroitement surveillés, de même qu'en association avec des inducteurs puissants du CYP3A4 (exemple : rifampicine) car aucune donnée d'étude n'a été établie. Les patients sous antidiabétiques oraux peuvent nécessiter une surveillance étroite de leur glycémie et une adaptation de la dose de leurs antidiabétiques. [17]

II.13. Précautions d'emploi et effets indésirables

Il existe des précautions d'emploi et des mises en garde pour trois populations particulières.

- En cas d'insuffisance hépatique :

Le bortézomib n'a pas été étudié chez les patients présentant une insuffisance hépatique. Si elle est significative, elle peut avoir un impact sur l'élimination du bortézomib et peut augmenter ainsi le risque d'interactions avec d'autres substances actives. Les patients dont la fonction hépatique est altérée doivent donc être traités avec prudence et une réduction de la dose doit être envisagée.

- En cas d'insuffisance rénale :

Il faut noter que l'une des complications fréquentes du myélome multiple est l'insuffisance rénale, notamment par précipitation des chaînes légères d'immunoglobulines monoclonales.

- chez les patients présentant une insuffisance rénale légère à modérée (ClCr > 20 ml/min) la pharmacocinétique du bortézomib n'est pas influencée, le bortézomib est prescrit à posologie usuelle.
- chez les patients insuffisants rénaux sévères (ClCr < 20 ml/min) la cinétique n'est pas connue.
- chez le patient dialysé le bortézomib doit être administré après la dialyse.

- Dans la population pédiatrique :

La sécurité et l'efficacité chez les enfants de moins de 18 ans n'ont pas été établies.

Plusieurs toxicités ont été identifiées lors de l'utilisation du bortézomib, certaines très fréquentes, comme la toxicité gastro-intestinale, avec nausées, diarrhées, vomissements et constipation, ou des toxicités hématologiques qui touchent les trois lignées, avec thrombocytopénie, neutropénie et anémie. La thrombopénie est la plus fréquente, avec un nadir plaquettaire au jour 11 de chaque cycle de traitement, et une moyenne de 40% du taux plaquettaire initial. Avant chaque administration de Velcade®, le taux de plaquettes devra être surveillé et le traitement sera adapté, reporté ou suspendu.

Le bortézomib est aussi très fréquemment associé à des neuropathies périphériques, principalement sensitives dont les symptômes sont sensations de brûlures, hypo ou hyperesthésie, gêne, faiblesse musculaire. L'incidence de ces neuropathies périphériques augmente dès le début du traitement et atteint un pic au cours du cycle 5. Le traitement nécessite une évaluation neurologique qui peut amener à des modifications de la posologie et du schéma thérapeutique. Les informations disponibles sur les atteintes du système nerveux autonome et leur rôle dans les effets indésirables de type hypotension orthostatique ou constipation sévère avec iléus sont limitées.

La prophylaxie antivirale doit être envisagée chez les patients traités par Velcade® puisque des études ont montré une fréquence globale supérieure de réactivation chez les patients traités avec le bortézomib par rapport à ceux traités par melphalan/prednisone seulement.

De nombreuses autres mises en garde ont été émises, dont la liste comprend, entre autres, le risque d'hypotension, de crise convulsive, d'insuffisance cardiaque, de désordre pulmonaire ou encore de syndrome de lyse tumorale chez les patients à forte masse tumorale initiale...

II.14. Grossesse, allaitement

Le potentiel tératogène du bortézomib n'a pas été complètement étudié. Le bortézomib ne doit donc pas être utilisé au cours de la grossesse à moins que l'état clinique de la femme ne nécessite ce traitement. Les patients hommes et femmes en période d'activité génitale doivent avoir une contraception efficace durant le traitement et pendant les 3 mois qui suivent le traitement.

Il n'a pas été établi que le bortézomib soit excrété dans le lait humain. Compte tenu du risque d'effets indésirables graves chez les nourrissons allaités, par principe de précaution, l'allaitement doit être interrompu au cours d'un traitement par Velcade®.

II.15. Données administratives

Velcade® a obtenu une AMM européenne centralisée le 26 avril 2004, avec pour seule indication le traitement des patients atteints de myélome multiple ayant reçu au moins deux traitements antérieurs et ayant présenté une progression de la maladie lors du dernier traitement. Cette indication s'appuie sur le rapport d'évaluation et sur l'avis favorable adopté par le comité des spécialités pharmaceutiques (CPMP) le 21 janvier 2004. En avril 2005, la Commission Européenne autorise l'utilisation de Velcade® en première rechute chez les patients atteints de myélome multiple. Il est désormais indiqué pour le traitement du myélome multiple en progression chez des patients ayant reçu au moins un traitement antérieur et qui ont bénéficié ou qui sont éligibles pour une greffe

de moelle osseuse. Une nouvelle extension d'AMM autorisée par l'EMA en juillet 2008 permet aujourd'hui son utilisation en association au melphalan et à la prednisone pour le traitement des patients atteints de myélome multiple non traité au préalable, non éligibles à la chimiothérapie intensive accompagnée d'une greffe de moelle osseuse. [20, 21]

C'est un médicament de liste I soumis à prescription hospitalière, réservée aux spécialistes en oncologie ou en hématologie. Il est inscrit sur la liste de rétrocession et est pris en charge en sus des GHS.

I. Evolution des consommations

Grâce aux données de consommation extraites du logiciel Pharma®, nous pouvons constater que la consommation de Velcade® ne cesse d'augmenter depuis sa mise sur le marché. Rappelons que seul Velcade® 3,5 mg est référencé sur le CHU de Nancy, mais qu'il existe un dosage à 1 mg. Nous pouvons regarder l'évolution des consommations et les coûts induits de 2006 à 2010, en rappelant que l'AMM a été modifiée et a élargi les indications en 2005 et 2008.

Tableau I. Consommation et coût du Velcade® de 2006 à 2010

	2006	2007	2008	2009	2010
Consommation de Velcade® 3,5mg (nbre de flacons)	462	593	701	602	1115
Coût de Velcade® 3,5mg TTC (€)	518 301	665 266	786 427	675 362	1 250 879

Nous avons recueilli les chiffres de 2011 sur les 6 premiers mois de l'année, où la consommation de flacons s'élève à 654 unités pour un coût de 733 699 euros TTC, ce qui confirme une augmentation très importante de l'utilisation depuis 2010. Les causes de cette augmentation, sont de façon indirecte l'augmentation de l'espérance de vie, puisqu'en effet la population vieillit donc les pathologies cancéreuses en général ont une incidence qui augmente, mais aussi le bon état général des patients, les limites de décision de traitement, notamment par chimiothérapie lourde, qui sont réévaluées, et les recommandations, qui évoluent chaque année selon les résultats d'essais cliniques en cours. Nous nous apercevons que les quantités d'unités dispensées ont plus que doublé entre 2006 et 2010, soit sur une période de 4 ans.

II. Bilan d'utilisation au CHU de Nancy

II.1. Objectif

L'objectif de cette partie est de faire un bilan de l'utilisation du Velcade® dans le service d'Hématologie à l'Hôpital Brabois Adultes du CHU de Nancy sur une période de 6 mois, soit du 1er janvier 2011 au 30 juin 2011.

II.2. Matériel et Méthode

Nous avons étudié les différents dossiers de chimiothérapie accessibles à la pharmacie ainsi que les dossiers patients présents dans le service d'hématologie. Notre grille de recueil comporte 4 items et nous a permis de relever les informations suivantes :

Tableau II. Grille de recueil

Caractéristiques des patients	Sexe, âge
Histoire de la maladie	Diagnostic Date de diagnostic Délai d'instauration du 1er traitement Délai d'instauration du bortézomib
Traitements	Nombre de lignes thérapeutiques utilisées
Utilisation du bortézomib	Début de traitement Posologie Durée de traitement Evolution de la maladie

II.3. Résultats

II.3.1. Caractéristiques des patients

Pour le service d'Hématologie de Brabois Adultes à Nancy, nous avons comptabilisé 74 patients qui ont bénéficié de Velcade® sur cette période. Trente six patients (soit 49%) sont des hommes et 38 sont des femmes (soit 51%).

En ce qui concerne leur âge en 2010, nous trouvons les résultats présentés dans le tableau III.

Tableau III. Répartition des âges des patients en 2010

Tranche d'âge (années)	< 50	[50; 60[	[60; 70[	[70; 80[	≥80
Effectifs	3	20	18	16	17

Nous pouvons constater que la répartition des patients est assez homogène au-delà de 50 ans car, comme nous l'avons vu, Velcade® a une AMM dans le traitement du myélome multiple, qui est une maladie du sujet âgé. Il est alors intéressant de regrouper les patients par type de myélome traité puisque qu'il existe des myélomes à chaînes lourdes (Ig A, D, G, E, M) ou à chaînes légères (κ , λ).

Tableau IV. Répartition des effectifs et âge moyen

	Effectifs	Hommes	Femmes	Age moyen en 2010
Ig G	35	20	15	65
Ig A	12	6	6	75
Ig M	1	1	0	60
CL λ	12	5	7	67
CL κ	14	4	10	68
Total	74	36	38	67

La répartition des types de myélomes traités par bortézomib se fait de la façon suivante :

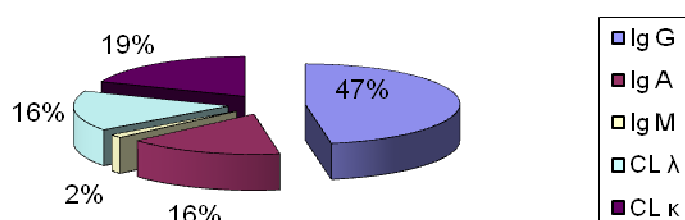


Figure 2. Répartition des types de myélomes traités par bortézomib

II.3.2. Histoire de la maladie

Pour chaque patient nous avons recherché la date de diagnostic de la maladie. Cela nous a permis de voir le délai d'instauration du premier traitement et le délai d'instauration du bortézomib.

Ainsi nous voyons que le délai moyen entre le diagnostic et le 1er traitement est de 5,9 mois mais avec des extrêmes allant de 2 semaines à 92 mois. Ceci dépend du mode de découverte, selon la présence de symptômes ou la découverte sur bilan systématique, et de l'évolution agressive ou lente de la maladie. Nous pouvons alors plutôt répartir les personnes en deux groupes. Le groupe 1, constitué par les patients qui nécessitent une prise en charge immédiate, est représenté par 59 patients dont le 1er traitement a été mis en place dans les 3 mois. A noter que nous avons, pour certains, évalué de façon arbitraire la prise en charge à 2 semaines quand les données nous révélaient un diagnostic et un traitement dans le même mois (C'est le temps supposé nécessaire au bilan diagnostique et pré-thérapeutique). Le 2ème groupe représente les patients dont le 1er traitement est instauré dans les 6 à 92 mois, puisque, rappelons le, le standard de prise en charge lors d'un diagnostic de stade 1 est l'abstention thérapeutique et la surveillance jusqu'à évolution.

II.3.3. Instauration du Velcade® et nombre de lignes thérapeutiques

Pour chaque type de myélome nous avons regardé le nombre de lignes thérapeutiques que les patients ont eu avant l'instauration du bortézomib. Nous avons comme précédemment séparé les types de myélomes pour pouvoir comparer au mieux les résultats fournis.

Pour le myélome à Ig G : les patients ont en moyenne 0,88 soit une ligne de traitement prescrite en moyenne avant l'utilisation du bortézomib. Vingt ont celui-ci comme 1er traitement, selon les dernières recommandations, les autres patients ayant été traité par d'autres thérapeutiques comme le protocole Alexanian, qui associe le melphalan et la prednisone, ou encore le MP-thal.

Pour le myélome à chaîne légère κ : 13 patients ont eu le bortézomib en 1ère ligne, et un seul ne l'a eu qu'en deuxième ligne.

Pour le myélome à chaîne légère λ : la moyenne du nombre de ligne thérapeutique utilisée est de 0,66.

Pour le myélome à Ig A : 7 des 12 patients a bénéficié en 1ère ligne du bortézomib.

Enfin pour le seul cas de myélome à Ig M, le patient a été traité directement avec le bortézomib.

Rappelons que le traitement de référence en 2011 pour un myélome de stade différent de 1 est le VTD, s'il n'y a pas de contre-indication à l'utilisation du bortézomib ou du thalidomide (comme la présence de neuropathie périphérique). Les patients ayant eu plusieurs lignes thérapeutiques sont ceux qui ont nécessité un traitement avant la mise sur le marché du Velcade®, les patients inclus dans des protocoles d'essais cliniques, ou encore les patients ayant une contre-indication à l'utilisation en 1ère ligne du Velcade®, mais dont la prise en charge a été réévaluée après réunion de concertation pluridisciplinaire.

II.3.4. Traitements concomitants

II.3.4.1. Le Thalidomide

Le thalidomide est un immuno-modulateur qui a été utilisé chez 36 de nos patients au total, dont 17 ont bénéficié du protocole VTD. La posologie initiale est de 100 mg/j en traitement continu, à administrer le soir. Etant neurotoxique, une surveillance étroite doit être mise en place afin de voir tout apparition de neuropathie, risque augmenté par l'association au bortézomib. Si besoin, la posologie peut être abaissée à 50 mg par jour, voire 1 jour sur 2.

II.3.4.2. Le Lénalidomide

Le lénalidomide a été prescrit chez 28 patients, mais il n'est actuellement utilisé en association avec le bortézomib que dans le cadre de l'essai clinique IFM/DFCI 2009 au

CHU de Brabois. Il est prescrit à une dose initiale de 25 mg/jour 3 semaines sur 4, associé à de la dexaméthasone. Deux de nos patients participent à cet essai.

II.3.4.3. Corticoïdes

Deux types de corticoïdes sont utilisés en association avec le bortézomib selon le protocole de traitement : la prednisone, dans les protocoles de type MPV, à une posologie de 2 mg/kg 4 jours/mois, et la dexaméthasone, dans le protocole VD, VTD ou VRD habituellement en dose hebdomadaire de 20 ou 40 mg selon l'âge du patient.

II.3.4.4. Facteurs de croissance hématopoïétique

Comme la plupart des agents anticancéreux, l'utilisation du bortézomib entraîne une toxicité hématologique avec thrombocytopénie, neutropénie et anémie. La plus fréquente est la thrombopénie transitoire ce qui ne permet pas de traitement autre la transfusion de concentré plaquettaire.

II.3.4.5. Antinauséeux

Le bortézomib est classé dans le groupe des cytotoxiques à potentiel faiblement émétisant. La fréquence des vomissements étant inférieure à 10%, les anti nauséeux ne sont pas utilisés en systématique. Six patients ont notifié des troubles digestifs de types nausées/vomissements, contrôlés par du métoclopramide (Primpéran®), mais aussi des diarrhées, résolutive sous diosmectite (Smecta®). Certains de ces patients avaient en association du melphalan ou du cyclophosphamide, ce qui peut aussi expliquer ces troubles.

II.3.4.6. Antibioprophylaxie

L'utilisation du Velcade® nécessite de prévenir les infections, en particulier la toxoplasmose cérébrale, la pneumocystose pulmonaire et les réactivations virales qui peuvent apparaître lors de la neutropénie, par la prescription de Sulfaméthoxazole/Triméthoprime (Bactrim forte®) à la posologie de 3 comprimés par

semaine (1 comprimé le matin les lundi, mercredi et vendredi) ainsi que de Valaciclovir (Zelitrex®) 500mg, 1 comprimé matin et soir en continu.

II. 3.5. Velcade®

La posologie usuelle du bortézomib est de 1,3 mg/m², à J1, 4, 8 et 11 d'un cycle de 21 jours.

Nous avons regardé les prescriptions de nos 74 patients, afin de voir les prescriptions initiales et leur évolution en terme d'adaptation temporelle ou quantitative.

En ce qui concerne la fréquence des injections, 38 patients ont commencé par un schéma de type J1, 4, 8 et 11 mais six patients ont eu un changement du schéma d'injection, avec une allongement du temps entre les injections et 36 patients ont immédiatement débuté par un schéma J1, 8, 15, 22, en particulier des patients âgés.

Pour les adaptations posologiques, 25 des 74 patients ont eu des cycles de bortézomib à une dose de 1,3 mg/m² alors que 42 ont eu une dose réduite à 1 mg/m² et 9 patients à 0,7 mg/m²

En ce qui concerne les effets indésirables, les cures de Velcade ® ont une tolérance immédiate satisfaisante mais sept patients ont présenté des neuropathies périphériques de différents grades, apparues ou aggravées.

I. Rationnel de l'étude

I.1. Etat actuel de la question

Le laboratoire commercialisant le bortézomib (Velcade®) indique dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) une stabilité physique et chimique de 8h à 25°C après reconstitution en flacon ou en seringue. [17] Cette stabilité ne permet pas de préparer les doses de produit à administrer à l'avance, ni de conserver une seringue dont l'administration serait reportée.

I.2. But du projet

Le but de ce travail est d'étudier la stabilité physicochimique d'une solution de bortézomib à une concentration de 1 mg/mL dont le solvant est le chlorure de sodium 0,9% dans une seringue polypropylène destinée à l'administration intraveineuse.

En effet, le bortézomib est un produit très coûteux (près de 1 200 euros le flacon de 3,5 mg) et lorsque certaines administrations sont reportées, les seringues sont perdues si elles ne peuvent pas être réutilisées dans les 5 jours [22]. Cette étude va permettre de réévaluer la stabilité en seringue sur une période de 35 jours et d'envisager, si la stabilité le permet, une modification de l'organisation dans l'unité de préparations des cytotoxiques avec :

- préparation de dose standardisée non nominative : « dose-banding »
- préparation de dose standardisée nominative par anticipation
- réattribution des doses selon une procédure sécurisée le cas échéant en cas de non administration dans la limite de la stabilité.

En ce qui concerne la standardisation, les doses sont fabriquées selon des paliers de 0,2 mg sur une gamme allant de 1,6 à 2,6 mg de bortézomib. En effet, le pourcentage d'erreur due à la manipulation a été quantifié et permet un biais maximal de 6,6%. (Annexe 5)

Les deux améliorations attendues sont donc :

- une réduction du temps d'attente du patient et donc de l'encombrement du service d'hospitalisation de jour
- une diminution des pertes financières dues à l'arrêt ou au report des traitements.

II. Matériel et méthode

II.1. Choix de la méthode

Le bortézomib n'ayant pas de monographie dans la Pharmacopée Européenne, aucune méthode de dosage n'est recommandée. Nous avons choisi notre méthode après analyse des différentes données de la littérature, comme cela est recommandé par l'EMA. [23]

Cinq publications d'étude de stabilité sont disponibles actuellement. La première est publiée par une équipe de recherche allemande [24] et ne correspond pas réellement à une étude de stabilité mais à une recherche sur la stabilité d'une préparation de bortézomib, qui est alors de 42 jours en flacon. La seconde est celle d'André et al [22], dont la méthode peut prêter à discussion. Il a en effet utilisé un étalon interne dont la présence a pu poser problème, son élution ayant pu interférer avec les différents produits de dégradation du bortézomib et sortir en même temps, ce qui peut expliquer la diminution de concentration du bortézomib en seringue observée. Il conclut tout de même à une stabilité de 5 jours du bortézomib à 1 mg/mL conservé à 5°C. Walker et al [25] utilise ensuite la même méthode que André et al, mais sans étalon interne. La stabilité est prouvée jusqu'à 42 jours dans le flacon en verre. La quatrième étude publiée utilise la chromatographie liquide puis la résonance magnétique nucléaire (RMN) qui permettra l'identification de deux produits de dégradation [26]. Enfin la dernière publication en date est de Vanderloo et al [27] analyse la stabilité dans le flacon mais le problème soulevé est l'utilisation de d'échantillons dilués au 1/10 000, qui ne donne aucune précision quant aux résultats obtenus.

Nous choisirons de mener notre étude selon les conditions chromatographiques définies dans la publication de Walker et al [25] :

Colonne : C18

Phase mobile : dihydrogénophosphate de potassium 0,04 mol/L ajusté à pH 7 + méthanol (50/50 vol/vol)

Longueur d'onde : 270 nm

Volume injecté : 50 µL

Débit : 1,4 mL/mn

Température : 23°C

II.2. Matériel et réactifs

II.2.1. Système de chromatographie liquide haute performance

Le matériel utilisé dans notre étude comprend :

- une chaîne de chromatographie liquide ELITE LaChrom de VWR/Hitachi® composée :

- D'un organisateur pour 4 solvants
- D'une pompe quaternaire L-2130
- D'un injecteur automatique thermostaté L-2200
- D'un four à colonnes L-2300
- D'un détecteur à barrette de diodes L-2455

L'acquisition et le traitement des données sont effectués sur l'ordinateur à l'aide du logiciel EZChrom Elite VWR/Agilent®.

- une colonne : en fait nous avons utilisé deux colonnes de chromatographie, l'une ayant servi exclusivement à la phase d'identification des produits de dégradation, la deuxième ayant été utilisée pour la validation de la méthode et l'étude de stabilité.

Colonne UPTISPHERE UP5HDO-25QS INTERCHIM®

Greffage : C18

L = 250 mm

Taille des particules : 5 µm

Diamètre interne : 4,6 mm

II.2.2 Matériel de laboratoire

Plusieurs types de matériel ont été nécessaires pour la réalisation des différentes phases de l'étude :

- une balance Mettler Toledo® AG204 et un enregistreur Mettler Toledo® SQC 14
- un agitateur Rotamag 10- Prolabo®
- un agitateur Cimarec Thermo Scientific®
- un pH mètre Fischer Bioblock® Scientific 93313
- des filtres en nitrocellulose Millipore 0,22µm, type GSWP, lot R9SN76957
- du matériel pour filtration sur Büchner
- une hotte aspirante
- du matériel de laboratoire : béchers, fioles jaugées, pipettes graduées, entonnoir, tube à essais, micropipettes
- une hotte à flux laminaire vertical de type II
- des flacons pour CLHP, 1,8 mL, 12*32mm, teintés
- des bouchons à vis pour CLHP Interchim®
- nécessaire à la gestion des déchets de produits cytotoxiques

Nous avons également utilisé une chambre froide, un congélateur (-70°C) et des thermomètres.

II.2.3.Réactifs

Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique ou pour chromatographie.

- Dihydrogénophosphate de potassium lot 710720147L per : 09/2013
- Hydroxyde de sodium 30% VWR® lot 11A110507 per : 02/2013
- Acide chlorhydrique 37%
- Hypochlorite de sodium 9,6% de chlore actif
- Méthanol VWR® lot 1020086
- Uracile SIGMA® lot 027K0719
- Mélange Uracile/toluene/naphthalene 100111
- Acétonitrile MERCK® lot 1462530847
- Mannitol VWR® lot 09L040010
- Chlorure de sodium 0,9% Macoperf® 100 mL Lot 11A24A per : 01/2013

- Chlorure de sodium 0,9% Aguettant® 20 mL Lot 1002512 per : 05/2013
- Bortézomib Velcade® Lot ADZW800 per : 03/2013
Lot BA2S100 per: 12/2013
- Eau Ultrapure
- Solution tampon standard pH4 BioBlock®
- Solution tampon standard pH7 BioBlock®

Nous avons fabriqué plusieurs produits pour les différentes phases de l'étude :

- Fabrication du tampon dihydrogénophosphate de potassium :
5,44g d' KH_2PO_4 + Eau ultrapure QSP 1L
Ajuster à pH = 7 avec l'hydroxyde de sodium 30%
Filtrer

- Fabrication d'acide chlorhydrique 1N :
4,174 mL d' HCl 37% de chlore actif + H_2O QSP 50mL

- Fabrication d'hydroxyde de sodium 1N :
5 mL de NaOH 30% + H_2O QSP 50mL

III. Validation de la méthode

III.1. Conditions chromatographiques

Avant chaque analyse, le système chromatographique (pompe, injecteur, joints) est purgé puis rincé à l'eau ultrapure durant 20 minutes. Une phase d'équilibrage entre la colonne et la phase mobile est ensuite programmée durant 30 minutes. Les analyses sont débutées après vérification de la ligne de base.

La phase mobile est un mélange de phosphate de 0,04 mol/L fabriqué à partir de 5,444 g de dihydrogénophosphate de potassium dissous avec de l'eau ultrapure en quantité suffisante pour obtenir un volume d'un litre, ajusté à un pH égal à 7 grâce à l'ajout de

NaOH 30% et de méthanol à volume égal (50/50, vol/vol). L'étude se fait en régime isocratique et le débit d'élution est de 1,4 mL/min.

L'analyse de chaque échantillon se fait par injection de 50 µL de solution.

La durée de l'analyse a été déterminée à 40 minutes, après avoir vérifié l'absence de produits de dégradation au-delà et jusqu'à 50 minutes. Les enceintes étant thermostatées et pour garantir le maintien des échantillons dans des conditions optimales, nous avons réglé la température de l'injecteur à 4°C et celle de la colonne à 23°C, ce qui nous a permis de faire les analyses dans des conditions identiques d'environnement.

La détection du signal se fait à la longueur d'onde de 270 nm avec un balayage du spectre allant de 190 à 400 nm.

En fin d'analyse, la colonne est reconditionnée sous mélange acétonitrile/eau selon les données préconisées par le fabricant.

III.2. Grandeurs chromatographiques

Les performances des colonnes sont exprimées en fonction de deux paramètres fondamentaux : l'efficacité et la sélectivité, qui nécessitent la détermination de grandeurs chromatographiques de base que nous allons étudier. [28] Ces grandeurs sont calculées automatiquement par le logiciel lors de la phase de retraitement des données acquises.

III.2.1. Temps de rétention

Chaque composé élué a un temps de rétention caractéristique t_r , qui représente le temps entre l'injection de l'échantillon et la détection de l'apex du pic correspondant. [28]

III.2.2. Volume mort

Le volume mort t_0 représente le temps que met un composé non retenu par la colonne pour traverser le système chromatographique. [28]

III.2.3. Facteur de capacité

Le facteur de capacité **k'** appelé aussi coefficient de distribution massique, permet de vérifier que le système élué correctement un composé par rapport à un produit non retenu.

Il est calculé par l'équation suivante :

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

t_r : temps de rétention du soluté

t_0 : volume mort de la colonne

Les valeurs idéales de k' sont comprises entre 1 et 20. [28]

III.2.4. Résolution

La résolution **R** permet d'apprécier si les composés sont bien séparés. On calcule la résolution par le rapport suivant :

$$R = 2 (t_{r\ 2} - t_{r\ 1}) / (\omega_1 + \omega_2)$$

$t_{r\ 1}$ et $t_{r\ 2}$: temps de rétention des 2 solutés à séparer

ω_1 et ω_2 : largeur de la base des pics des 2 solutés à séparer

La séparation des composés est considérée comme complète lorsque la résolution est supérieure ou égale à 1.

III.2.5. Sélectivité

La sélectivité **α** mesure la capacité du système chromatographique à séparer les composés injectés. Elle est égale à l'équation :

$$\alpha = k'_2 / k'_1$$

k'_1 et k'_2 : facteurs de capacité des 2 solutés à séparer

Les valeurs de α sont en général comprises entre 1,05 et 2, mais peuvent être améliorées en modifiant la composition de la phase mobile et/ou de la phase stationnaire. [28]

III.2.6. Efficacité

L'efficacité de la colonne **N** exprime la finesse des pics des composés sortant de la colonne.

Elle s'exprime en nombre de plateaux théoriques **N**, et se calcule grâce à l'équation suivante :

$$N = 16 (t_r / \omega)^2 = 5,54 (t_r / \omega_{0,5})^2$$

t_r : temps de rétention du soluté mesure a partir de l'injection

ω : largeur de la base du pic

$\omega_{0,5}$: largeur du pic à mi-hauteur

Ces différentes grandeurs chromatographiques sont liées entre elles, suivant la relation :

$$R = 0,25\sqrt{N} [(\alpha-1) / \alpha] [k' / (1+k')]$$

La résolution peut être augmentée en améliorant la sélectivité ou l'efficacité de la colonne.

III.2.7. Facteur de symétrie

Le facteur de symétrie **S** se calcule par le rapport b/a des demi-largeurs à 10 % de la hauteur totale du pic. Si $a=b$, $S = 1$ et le pic est symétrique, ce qui n'est pas toujours le cas. En principe, b/a doit être au maximum de 1,5.

III.3. Etalonnage

Selon les ICH, il est recommandé de faire une gamme d'étalonnage en minimum cinq points de concentrations, et en fabriquant des solutions de concentrations croissantes allant au moins de 80% à 120 % de la valeur cible théorique. [29]

La stabilité du bortézomib est étudiée à une concentration de 1 mg/mL, que l'on mesure après dilution de nos prises d'essai afin d'obtenir une concentration théorique de 100 µg/mL. Notre gamme d'étalonnage comprend des échantillons dosés à 63, 84, 105, 126 et 147 µg/mL.

Habituellement, le coefficient de détermination r^2 , ou le coefficient de corrélation r sont présentés comme des critères efficaces pour vérifier qu'un modèle est bien linéaire et qu'un étalonnage est de bonne qualité. Or il faut plutôt se fier à un test dit « de linéarité » ou d'adéquation à un modèle, qui n'est pas limité au seul modèle linéaire. [30]

Une gamme doit être effectuée chaque jour de manipulation afin de pallier les biais qui peuvent apparaître mais rappelons que nous utilisons un appareil à chromatographie avec enceinte et four thermostaté. Un flacon de Velcade® coûtant près de 1200 euros TTC, nous ne pouvions pas économiquement utiliser un flacon à chaque jour de manipulation pour établir une gamme. Nous avons donc fabriqué une solution-mère de bortézomib à partir d'un flacon dosé à 3,5 mg, reconstitué avec 20 mL de NaCl 0,9% grâce à une fiole jaugée. Nous avons ensuite conditionné cette solution d'une concentration de 175 µg/mL dans six flacons de verre sertis puis conservés à -70°C. Cette manipulation nous a permis ensuite de réaliser une gamme d'étalonnage chaque jour de manipulation.

Tableau V. Préparation de la gamme d'étalonnage du bortézomib

Solution-mère de bortézomib à 175 µg/mL (µL)	360	480	600	720	840
NaCl 0,9% (µL)	640	520	400	280	160
Concentration du standard (µg/mL)	63	84	105	126	147

Ces gammes sont à l'origine d'une droite d'étalonnage. Nous nous sommes servis de 15 points (3 mesures à des jours différents pour chaque concentration), nous permettant de définir une équation. En effet, en analysant les résultats obtenus, nous nous sommes aperçu que notre système a de meilleurs résultats en un mode quadratique que linéaire, dont la formule est $y = a_0 + a_1 x + a_2 x^2$, où x correspond à la concentration du produit étudié et y la surface du pic. Nous verrons que cela n'empêche pas de montrer une corrélation entre ces deux paramètres.

III.4. Précision ou fidélité

La précision d'une méthode analytique, aussi appelée fidélité, est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures répétées d'un même objet, dans des conditions spécifiées. [29, 30]. Elle est caractérisée par deux grandeurs calculables et vérifiables : la répétabilité et la reproductibilité (ou fidélité intermédiaire).

III.4.1. Répétabilité

La répétabilité est définie comme l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'analyse indépendants entre eux obtenus avec la méthode considérée sur un même produit, dans le même laboratoire, avec le même opérateur utilisant le même matériel, dans un court intervalle de temps. [30]

Elle se calcule à partir d'un minimum de 9 déterminations qui couvrent l'ensemble du domaine d'étalonnage étudié et elle est appréciée par la moyenne, l'écart-type de répétabilité et le coefficient de variation intra série. [29]

Nous avons effectué six mesures à trois points de concentration couvrant tout le domaine d'étalonnage : 63, 105 et 147 µg/mL à partir d'une solution-mère à 175 µg/mL obtenue en reconstituant un flacon de Velcade® 3,5 mg avec 20mL de NaCl 0,9%. Ceci nous a permis de vérifier que la méthode utilisée était répétable et donc applicable à notre étude.

III.4.2. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire mesure l'étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues après mesurages répétés du même objet mais dans des lieux, des jours, des opérateurs ou des systèmes de mesure différents. [30] Elle est appréciée par la moyenne, l'écart-type de fidélité intermédiaire et le coefficient de variation inter-série. [29]

Six mesures sont effectuées pour trois points de concentration couvrant tout le domaine d'étalonnage : 63, 105 et 147 $\mu\text{g/mL}$ à partir d'une solution-mère à 175 $\mu\text{g/mL}$ sur trois jours différents.

III.5. Exactitude

Elle est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie de référence. Nous n'avons pas eu à disposition d'échantillon de référence de bortézomib pour permettre cette analyse.

III.6. Spécificité

La spécificité est la capacité d'une méthode à mesurer un analyte particulier dans un échantillon sans qu'il n'y ait d'interférence entre le composé étudié, les excipients, les solvants et les produits de dégradation. [30] En effet, une étude de stabilité doit permettre une analyse qualitative et quantitative du produit étudié, mais elle doit aussi permettre de mettre en évidence et de séparer les produits de dégradation éventuels du composé étudié. Nous avons ainsi validé la Stability Indicating Capability (SIC) de la méthode chromatographique choisie (soit la capacité indicatrice de stabilité), en recherchant les pics distincts des produits susceptibles de changer au cours du temps et d'influencer la qualité, la sécurité ou l'efficacité du médicament. [28] Ces pics sont obtenus par une dégradation forcée, qui a pour but de dégrader 10 à 20% de la molécule initiale et d'obtenir un chromatogramme avec la molécule restante et les produits de dégradation clairement séparés. [29]

III.6.1. Spécificité vis-à-vis de l'excipient

Le mannitol est le seul excipient présent dans la poudre lyophilisée de bortézomib, dans les flacons de Velcade® dosé à 3,5 mg. Nous avons donc analysé une solution de mannitol à 100 mg/L de mannitol pur afin de confirmer l'absence d'interaction avec la composition de la phase mobile.

III.6.2. Spécificité vis-à-vis des solvants utilisés

Nous avons élué dans les conditions chromatographiques de la méthode un échantillon de 50 µL de NaCl 0,9% conditionné en poche Macoperf® de 100 mL et 50 µL de NaCl 0,9% en pipette unidose de 20 mL Aguetant®.

III.6.3. Spécificité vis-à-vis des produits de dégradation

Nous avons pour cela soumis plusieurs de nos échantillons de concentration à 1 mg/mL à des dégradations forcées de deux types : chimique et physique.

- une dégradation chimique : en milieu acide et basique par l'ajout respectivement d'acide chlorhydrique et de soude, ainsi qu'en milieu oxydant avec de l'eau de javel.
- une dégradation physique : par action de la chaleur.

III.6.3.1. Dégradation en milieu acide chaud

Nous avons étudié la dégradation du bortézomib par de l'acide chlorhydrique (HCl) 0,1N laissé en contact durant 16h et 24h à une température de 60°C. La préparation des échantillons s'est faite de la façon suivante : 100 µL de la solution de bortézomib 1 mg/mL auxquels étaient ajoutés 450 µL d'HCl 1N puis l'ensemble est mis au réchauffeur à 60°C. Au terme du temps défini, l'HCl est neutralisé par 450 µL de NaOH 1N. La concentration théorique de l'échantillon est alors de 100 µg/mL.

III.6.3.2. Dégradation en milieu basique

Nous avons pour cela étudié après un temps de contact de 30 minutes, une solution de 100 µL de bortézomib à 1 mg/mL mélangé à 450 µL de NaOH 1N, que nous avons neutralisé avec 450 µL de HCl 1N. L'opération a été reconduite de la même façon avec du NaOH 5N. La concentration théorique est là aussi de 100 µg/mL.

III.6.3.3. Dégradation en milieu oxydant

La préparation des échantillons s'est faite par le mélange de 100 µL de solution de bortézomib à 1 mg/mL avec 5 µL d'hypochlorite de sodium à 0,00096% 0,0096% et 0,096% de chlore actif. Ils ont été fabriqués extemporanément et la mesure s'est faite immédiatement.

III.6.2.4. Dégradation à la chaleur

Nous avons soumis un échantillon de bortézomib 0,1 mg/mL à 60°C pendant 24h.

IV. Stabilité de la solution de bortézomib

Nous avons étudié la stabilité d'une solution de bortézomib à 1 mg/mL conditionnée en seringue de polypropylène telle qu'elle est préparée lors du travail de routine.

IV.1. Définition de la stabilité

La stabilité est définie comme la propriété d'un principe actif ou d'un médicament de conserver ses propriétés dans des conditions spécifiées pendant un temps défini. La stabilité doit tenir compte des aspects chimiques physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques du produit.

Un changement significatif est défini dans les ICH comme une variation de 5% du produit par rapport à la valeur initiale, et par l'apparition de produits de dégradation en quantité supérieure par rapport au critère établi. [31] Rappelons que le bortézomib n'a pas de monographie dans la Pharmacopée Européenne et que nous n'avons pas de critère d'acceptation pour les produits de dégradation. La limite est fixée arbitrairement à 1%.

La stabilité de notre solution de bortézomib à 1 mg/mL conservée en seringue en polypropylène a donc été établie en fonction des aspects physiques, et tant que les variations de concentrations n'excèdent pas 5% par rapport à la concentration initiale. De nombreuses études utilisent une variation de plus ou moins 10%, mais nous préférons nous référer aux recommandations des ICH, plus restrictives, qui fixent cette limite à 5%, puisque la méthode utilisée ainsi que les résultats obtenus comportent déjà des biais que nous ne voulons pas cumuler afin de valider des résultats réellement acceptables.

IV.2. Préparation des seringues

Nous avons suivi le RCP de Velcade® et reconstitué à J0 deux flacons dosés à 3,5 mg avec 3,5 mL de NaCl 0,9% sous une hotte à flux laminaire. Ces flacons ont été identifiés par les lettres A et B. La concentration théorique de la solution obtenue dans chaque flacon est de 1 mg/mL.

Chacune des solutions a été conditionnée dans deux seringues de 1,7 mL, elles-mêmes qualifiées de A et B, mais aussi du mode de conservation, deux seringues (une A et une B) étant mises au réfrigérateur et les deux restantes à température ambiante. En ce qui concerne les relevés de température, nous avons une moyenne de 22 °C pour la température ambiante, et de 5 °C en chambre froide sur toute la durée de l'étude. De la même façon, l'éclairage des seringues à température ambiante était celui naturel du rythme jour/nuit, alors que les seringues conservées en chambre froide étaient dans l'obscurité, avec un éclairage artificiel relativement peu important coïncidant avec la présence d'une personne dans la pièce.

IV.3. Réalisation de l'étude

Une gamme d'étalonnage est effectuée avant chaque prélèvement, à l'aide d'une solution de bortézomib d'une concentration de 175 µg/mL obtenue comme nous l'avons vu en reconstituant un flacon de Velcade® 3,5 mg avec 20 mL de NaCl 0,9%, et conditionnée dans des flacons sertis conservés à une température de -70°C.

Les prélèvements ont été effectués à J0, J2, J4, J7, J14, J21, J28, J35

Nous avons prélevé 200 µL de la solution en seringue que nous avons mis dans un tube à essai. Notre prise d'essai à partir du tube est de 100 µL, que nous avons dilué au 1/10ème en rajoutant 900 µL de NaCl 0,9% dans le flacon de CLHP avant de pouvoir faire nos dosages.

IV.4. Stabilité physique

Avant chaque mesure, nous avons vérifié la stabilité physique en observant les seringues, à la loupe, derrière un fond blanc puis noir, à la recherche de la formation d'un précipité ou d'un changement de couleur.

IV.5. Stabilité chimique

Les temps d'analyse étant longs, les échantillons ont été préparés et traités dans le même ordre à chaque journée de manipulation. Nous avons pour chaque produit analysé le chromatogramme obtenu qui nous indiquait la concentration en bortézomib ainsi que l'apparition et l'évolution de la quantité de produits de dégradation.

V. Résultats

V.1. Validation de la méthode

V.1.1. Qualification de la colonne

Nous avons injecté un mélange de Uracile/Toluène/Naphtalène selon les conditions chromatographiques indiquées dans le rapport délivré par le fabricant et livré avec la colonne.

Les résultats obtenus sont regroupés dans les deux tableaux récapitulatifs VI et VII, ainsi que les deux chromatogrammes obtenus. Les différents paramètres relevés correspondent à ceux indiqués dans les caractéristiques des colonnes fournies par le fabricant. Les colonnes sont donc qualifiées.

Tableau VI. Récapitulatif des grandeurs chromatographiques obtenues avec la colonne 1

	Tps de rétention (min)	Nbre de plateaux théoriques (USP)	Facteur de capacité	Résolution (USP)	Asymétrie
uracile	2,55	7895	0,00	0	1,16
toluène	7,56	19118	1,96	30,08	1,08
naphtalène	9,01	19733	2,53	6,09	1,07

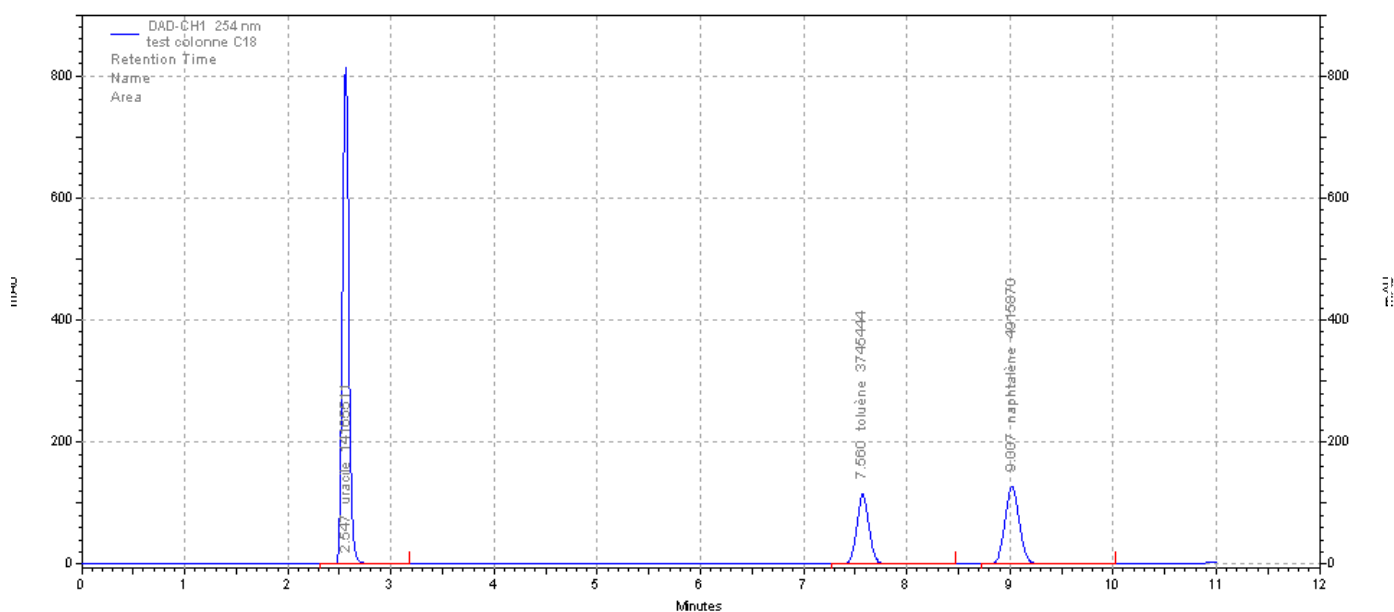
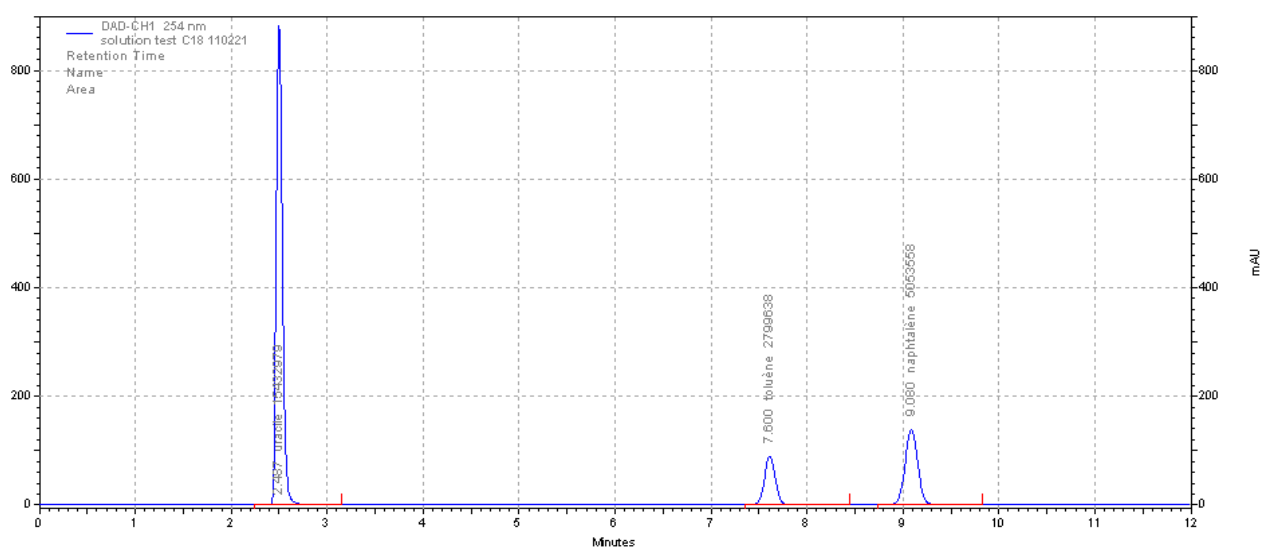


Figure 3. Chromatogramme obtenu lors de la qualification de la colonne 1

Tableau VII. Récapitulatif des grandeurs chromatographiques obtenues avec la colonne 2

	Tps de rétention (min)	Nbre de plateaux théoriques (USP)	Facteur de capacité	Résolution (USP)	Asymétrie
uracile	2,49	7674	-0,01	0	1,23
toluène	7,6	21611	1,98	31,92	1,05
naphtalène	9,08	21960	2,56	6,55	1

**Figure 4. Chromatogramme obtenu lors de la qualification de la colonne 2**

V.1.2. Grandeurs chromatographiques

- Détermination du volume mort

Nous avons injecté une solution d'uracile à 20 mg/L selon les conditions d'analyse du bortézomib pour les deux colonnes. Le pic obtenu pour l'uracile a un temps de rétention de 2,4 minutes pour la colonne 1 et de 2,2 minutes pour la colonne 2. Les chromatogrammes obtenus sont les suivants :

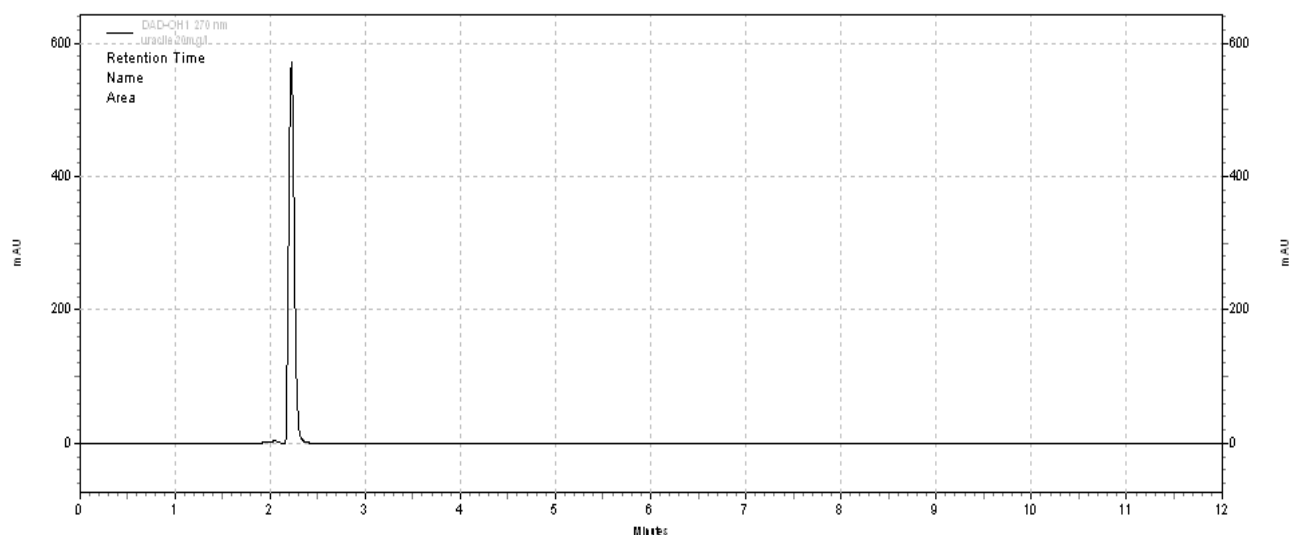


Figure 5. Chromatogramme obtenu après injection de 50 μ L d'uracile à 20 mg/L avec la colonne 1

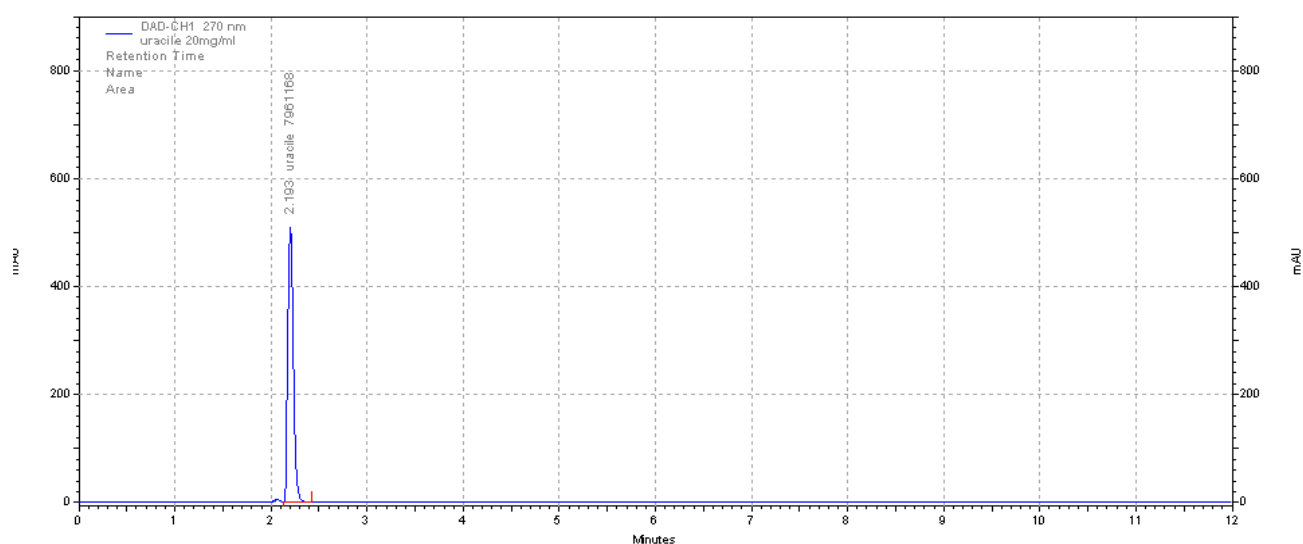


Figure 6. Chromatogramme obtenu après injection de 50 μ L d'uracile à 20 mg/L avec la colonne 2

- Détermination des caractéristiques du pic

Nous avons pour cela injecté 50 μ L d'une solution de bortézomib à 0,1 mg/mL préparée extemporanément et obtenue en diluant une prise d'essai de 1 mL de bortézomib à 1 mg/mL (flacon de 3,5 mg reconstitué avec 3,5 mL de NaCl 0,9%) avec 9 mL de NaCl 0,9%. Les résultats obtenus ont été regroupés et sont présentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII. Récapitulatif des grandeurs expérimentales obtenues avec les colonnes 1 et 2

Pic	Tps de rétention (min)	Nbre de plateaux théoriques (DAB)	Facteur de capacité	Asymétrie
Bortézomib Colonne 1	23,2	4584	9,59	2,36
Bortézomib Colonne 2	23,5	4812	9,73	2,33

Le temps de rétention du bortézomib est de 23,2 minutes pour la colonne 1 et de 23,5 minutes pour la colonne 2.

L'efficacité N de la colonne 1 est de 4584 plateaux théoriques, et de 4812 pour la colonne 2. (Rappelons que plus le nombre est élevé, plus le pic est fin).

Le facteur de capacité k' a une valeur de 9,59 et 9,73, ce qui montre que le produit étudié est correctement élué par rapport au produit non retenu puisque les valeurs idéales sont comprises entre 1 et 20.

En ce qui concerne le facteur de symétrie S, nous nous apercevons qu'il est un peu élevé puisqu'il est de 2,36 et 2,33, ce qui montre que le pic n'est symétrique et présente une « traînée ».

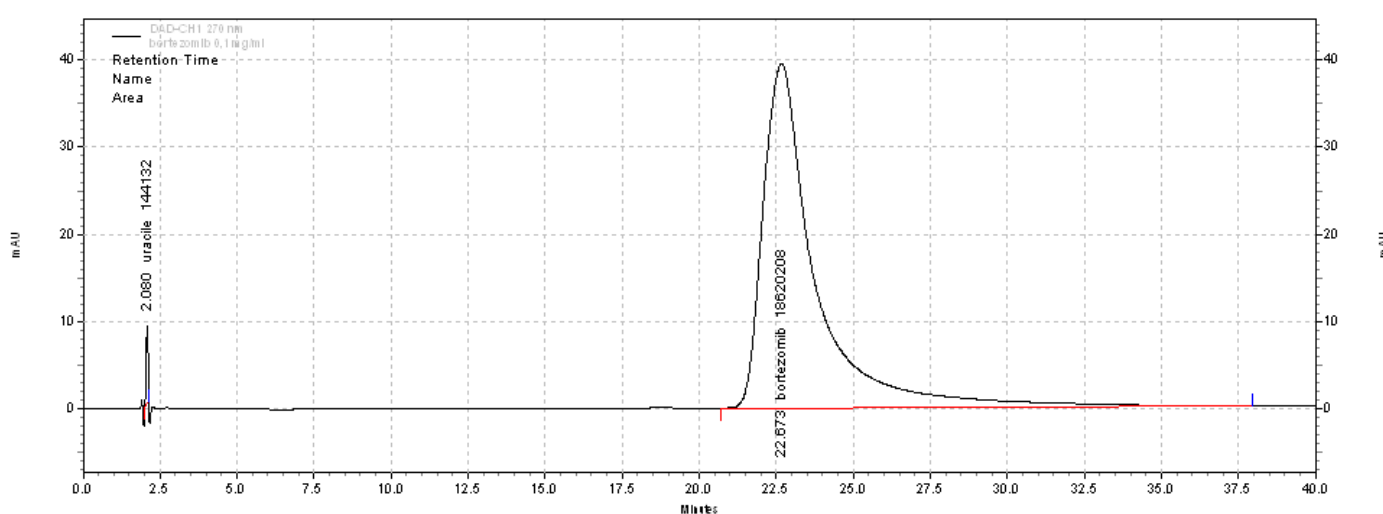


Figure 7. Chromatogramme obtenu après injection de 50 μ L de bortézomib à 0,1 mg/mL

- Etablissement d'un spectre

La méthode de dosage choisie indique une détection à une longueur d'onde de 270 nm. Nous avons établi un spectre d'absorption du bortézomib par spectrophotométrie UV, qui nous montre deux pics d'absorption à 207 et 270 nm. Nous avons retenu une analyse à 270 nm pendant notre étude.

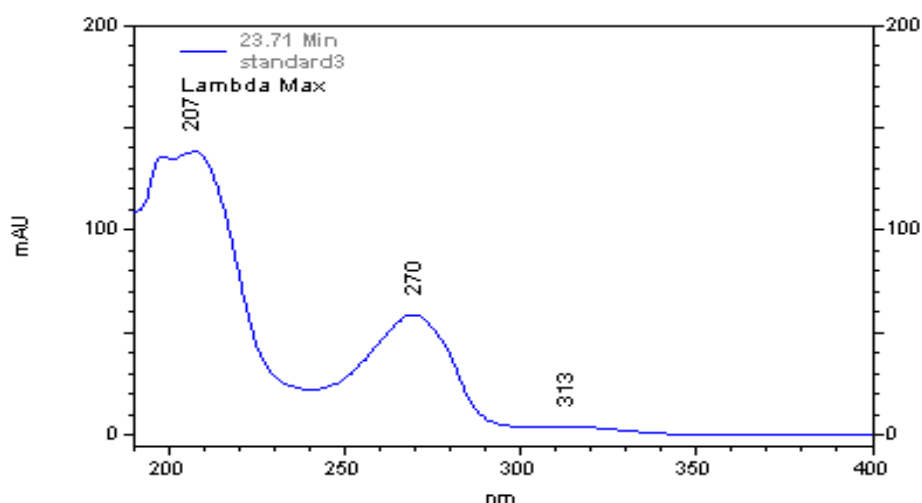


Figure 8. Spectre du bortézomib

- Limite d'exclusion

Nous avons calculé la limite d'exclusion qui correspond à 1/2 000^{ème} de la surface initiale du pic principal de bortézomib. Elle est de 9310.

V.1.3. Etalonnage

Nous avons effectué 3 gammes d'étalonnage sur 3 jours différents. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IX.

Tableau IX. Aires des pics de bortézomib enregistrées lors des gammes d'étalonnage

Séries différentes	63 µg/mL	84 µg/mL	105 µg/mL	126 µg/mL	147 µg/mL
J1 (aire)	11172331	14450900	18536106	22111100	25705585
J2 (aire)	11117458	15088208	18359625	21992742	25296243
J3 (aire)	10903160	14782903	18317724	22224139	25760341

Nous avons testé et comparé les coefficients de détermination obtenus et nous nous sommes aperçus que nos résultats étaient meilleurs lors des calculs en mode quadratique par rapport au mode linéaire. Cela nous a permis de définir pour chaque jour une équation de type $y = a_0 + a_1 x + a_2 x^2$. Toutes nos données ont été regroupées dans le X.

Tableau X. Equations, coefficients de détermination et de corrélation retrouvés lors des gammes d'étalonnage

Séries différentes	$y = a_0 + a_1 x + a_2 x^2$			coefficient de détermination	coefficient de corrélation	CV résiduel
	a_0	a_1	a_2			
J1	21226,1143	171140,1061	18,0790	0,999172	0,999586	1,3%
J2	-858364,9429	201003,1483	-157,5637	0,999538	0,999769	0,8%
J3	-698447,3143	187662,3034	-51,0994	0,999780	0,999890	0,6%

La représentation graphique nous montre une droite entre les valeurs retrouvées et les valeurs théoriques.

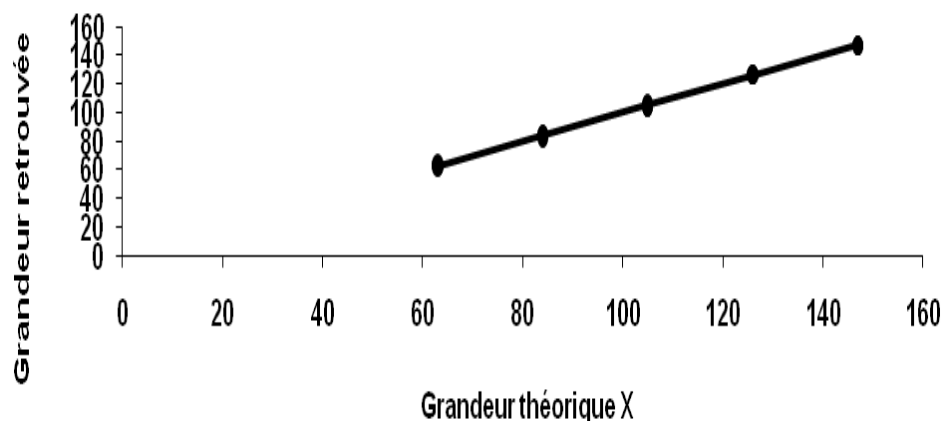


Figure 9. Représentation des grandeurs retrouvées en fonction des grandeurs théoriques

Nous avons fixé un écart maximal acceptable (EMA) à 5%, puis calculé les biais relatifs présentés dans le tableau XI et en représentation graphique sur la figure 10.

Tableau XI. Biais relatifs calculés

Séries différentes		niv1 63	niv2 84	niv3 105	niv4 126	niv5 147
	J1	1,0%	-1,8%	0,8%	0,3%	-0,2%
	J2	-0,5%	1,2%	-0,8%	0,2%	0,0%
	J3	-0,2%	0,5%	-0,7%	0,4%	-0,1%
moyenne		0,1%	0,0%	-0,2%	0,3%	-0,1%
écart-type		0,8%	1,6%	0,9%	0,1%	0,1%
EMA% calculé		2%	3%	2%	1%	0%
EMA% fixé		5%	5%	5%	5%	5%
Conclusion		vérifié	vérifié	vérifié	vérifié	vérifié

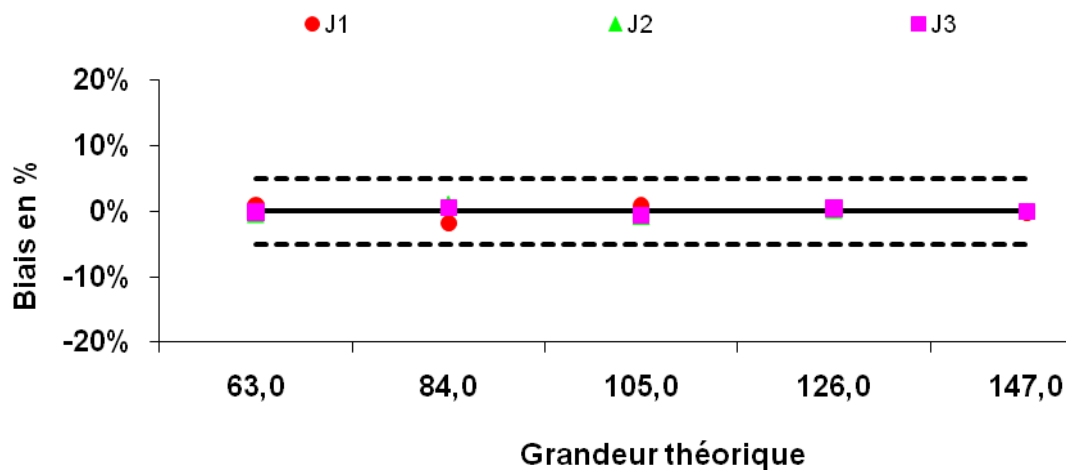


Figure 10. Répartition des biais en pourcentage en fonction des niveaux de concentrations par rapport à l'EMA fixé à 5%

Les biais relatifs calculés pour chaque niveau de concentration sont inférieurs à l'EMA que nous avons fixé à 5%.

Nous avons ensuite calculé les biais absolus qui nous permettront ensuite d'effectuer un test d'adéquation au modèle d'étalonnage en mode quadratique.

Tableau XII. Biais absolus calculés

	Séries différentes	niv1	niv2	niv3	niv4	niv5
		63	84	105	126	147
	J1	0,6126	-1,5191	0,8869	0,3327	-0,3132
	J2	-0,3367	0,9669	-0,8822	0,2104	0,0416
	J3	-0,1006	0,4368	-0,7067	0,5055	-0,1349
	Moyenne	0,0584	-0,0385	-0,2340	0,3495	-0,1355
	Ecart-type	0,4942	1,3094	0,9747	0,1483	0,1774
	EMA calculé	0,9953	2,6199	2,0047	0,7593	0,4465

Pour évaluer l'adéquation au test d'étalonnage, nous devons calculer une valeur F qui sera comparée à une valeur critique retrouvée dans la table de Fisher-Snedecor F (v_1 ; v_2) ayant la probabilité 0,01 d'être dépassée. Elle est de 5,64.

La valeur F correspond au rapport de la variance estimée de l'erreur due au modèle sur la variance estimée de l'erreur expérimentale.

Ces variances sont elles-mêmes respectivement calculées grâce au rapport des sommes des carrés des moyennes des biais absolus et de la somme des carrés des écart-types des biais absolus sur le degré de liberté correspondant.

Les valeurs calculées sont présentées dans le tableau XIII.

Tableau XIII. Récapitulatif des valeurs permettant de calculer F

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance estimée	F	Valeur critique
Erreur due au modèle	0,56094325	5	0,112189	0,20	5,64
Erreur expérimentale	6,03497276	10	0,603497		
Totale	6,59591600	15			

La valeur F est inférieure à la valeur critique de 5,64, le domaine d'étalonnage est validé.

V.1.4. Précision

V.1.4.1. Répétabilité

Nous avons effectué 3 séries de 6 mesures sur trois concentrations de bortézomib couvrant ainsi le domaine d'étalonnage.

Tableau XIV. Récapitulatif des valeurs retrouvées lors du jour 1 de la répétabilité

Jour 1	Concentrations mesurées	Moyenne des concentrations	Ecart-type de répétabilité	Coefficient de variation intra-série (%)
Série1 [] th = 63 µg/mL	59,40	62,56	1,84	2,94
	62,62			
	63,65			
	61,70			
	64,62			
	63,38			
série2 [] th = 105 µg/mL	111,02	108,47	1,50	1,38
	109,47			
	107,12			
	107,51			
	107,50			
	108,17			
série 3 [] th = 147 µg/mL	150,65	150,86	2,04	1,35
	152,44			
	153,06			
	149,86			
	147,43			
	151,72			

Nous avons récapitulé les résultats recueillis à titre indicatif le jour 1 et nous avons suivi le même procédé avec les jours 2 et 3.

Pour le J2, les coefficients de variation intra-série sont pour les concentrations théoriques de 63 ; 105 et 147 µg/mL respectivement de 1,18% ; 0,74% ; 0,76% et pour le J3 de 1,33% ; 0,33% ; 0,33%. Nous remarquons que les coefficients de variation diminuent au fil du temps, ce qui peut correspondre à une meilleure dextérité et une meilleure acquisition des techniques de manipulation.

Pour les trois séries, les coefficients de variation restent inférieurs à 3%. Notre méthode est répétable.

V.1.4.2. Fidélité intermédiaire

Nous avons effectué 6 mesures de 3 concentrations différentes de bortézomib couvrant notre domaine d'étalonnage à trois jours différents.

Nous avons effectué un test de Grubbs, ou test d'homogénéité des moyennes, qui permet de détecter une valeur aberrante dans une série de résultats, et un test de Cochran, ou test d'homogénéité des variances, qui sert à détecter un écart-type aberrant dans une série de plusieurs écart-type lors d'une étude avec plusieurs échantillons pour trois niveaux de concentrations couvrant la gamme.

Le test de Cochran permet de définir si la variance est :

- homogène à un risque $\alpha = 1\%$,
- suspecte : ce qui signifie que la dispersion n'est pas homogène pour un risque $\alpha = 1\%$ mais correcte pour un risque de 5%,
- aberrante : ce qui indique que la dispersion des valeurs n'est pas homogène même pour un risque α de 5%

Les résultats recueillis pour chaque concentration sont présentés sous forme graphique et de tableaux.

- Pour la concentration de bortézomib à 63 µg/mL :

Tableau XV. Valeurs retrouvées lors de l'essai de fidélité intermédiaire pour les échantillons de bortézomib à 63 µg/mL

Conditions de fidélité intermédiaire des séries	Concentrations retrouvées						Nombre de répétitions	Moyenne	Variance des séries
Date	n°1	n°2	n°3	n°4	n°5	n°6	r _i	m	S _i ²
J1	59,40	62,62	63,65	61,70	64,62	63,38	6	62,56	3,37
J2	64,14	64,05	65,18	63,81	62,83	63,77	6	63,96	0,57
J3	62,98	64,57	64,38	65,21	64,65	65,42	6	64,54	0,74

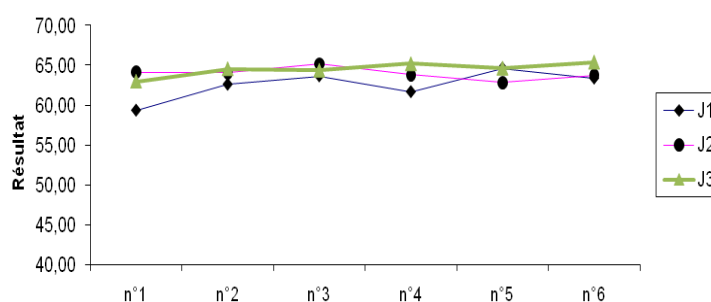


Figure 11. Représentation graphique des résultats pour la concentration de 63 µg/mL

Test de Grubbs	
Homogénéité des moyennes	
Nombre de séries n =	3
Critère observé pour :	
La plus petite	1,108
La plus grande	0,836
Limite pour un risque de 1%	1,155
Limite pour un risque de 5%	1,155
Conclusion	
La plus petite moyenne est acceptable	
La plus grande moyenne est acceptable	

Test de Cochran	
Homogénéité des variances	
Nombre de séries n =	3
Nombre de répétitions par série	6
C observée	0,720
Limite pour un risque de 1%	0,793
Limite pour un risque de 5%	0,707
Conclusion	
La plus grande dispersion est suspecte	

Les deux tests sont validés et indiquent qu'aucune des valeurs trouvées n'est aberrante au risque de 5%.

- Pour la concentration de 105 µg/mL

Tableau XVI. Valeurs retrouvées lors de l'essai de fidélité intermédiaire pour les échantillons de bortézomib à 105 µg/mL

Conditions de fidélité intermédiaire des séries	Concentration retrouvée						Nombre de répétitions	Moyenne	Variance des séries
Date	n°1	n°2	n°3	n°4	n°5	n°6	r_i	m	S_i^2
J1	111,02	109,47	107,12	107,51	107,50	108,17	6	108,465	2,26
J2	103,98	103,89	102,66	104,07	104,24	105,02	6	103,977	0,58
J3	106,61	107,39	107,23	106,58	106,94	107,29	6	107,007	0,12

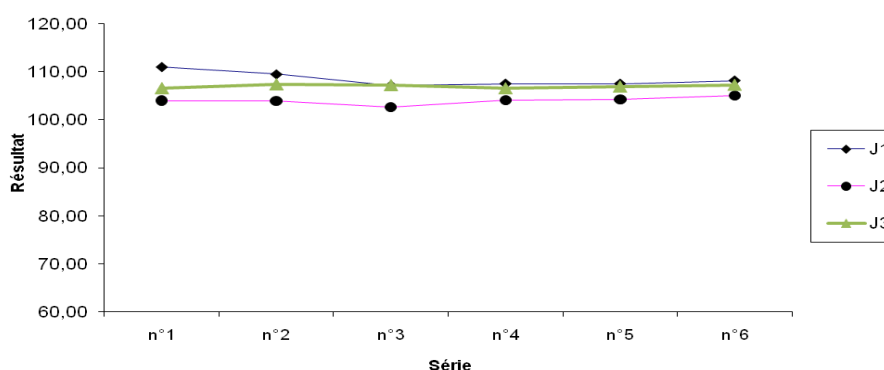


Figure 12. Représentation graphique des résultats pour la concentration de 105 µg/mL

Test de Grubbs	
Homogénéité des moyennes	
Nombre de séries n =	3
Critère observé pour :	
La plus petite	1,095
La plus grande	0,866
Limite pour un risque de 1%	1,155
Limite pour un risque de 5%	1,155
Conclusion	
La plus petite moyenne est acceptable	
La plus grande moyenne est acceptable	

Test de Cochran	
Homogénéité des variances	
Nombre de séries n =	3
Nombre de répétitions par série	6
C observée	0,762
Limite pour un risque de 1%	0,793
Limite pour un risque de 5%	0,707
Conclusion	
La plus grande dispersion est suspecte	

Les deux tests sont validés, il n'y a pas de valeur aberrante au risque $\alpha = 5\%$

- Pour une concentration de 147 µg/mL

Tableau XVII. Valeurs retrouvées lors de l'essai de fidélité intermédiaire pour les échantillons de bortézomib à 147 µg/mL

Conditions de fidélité intermédiaire des séries	Concentration retrouvée						Nombre de répétitions	Moyenne	Variance des séries
Date	n°1	n°2	n°3	n°4	n°5	n°6	r_i	m	S_i^2
J1	150,65	152,44	153,06	149,86	147,43	151,72	6	150,860	4,18
J2	151,91	151,79	149,98	148,97	150,51	151,29	6	150,742	1,31
J3	150,15	149,10	149,64	150,15	149,19	150,15	6	149,730	0,25

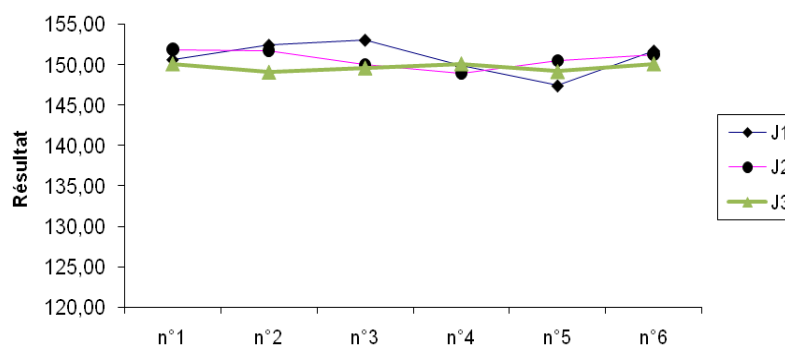


Figure 13. Représentation graphique des résultats pour la concentration de 147 µg/mL

Test de Grubbs	
Homogénéité des moyennes	
Nombre de séries n =	3
Critère observé pour :	
La plus petite	1,149
La plus grande	0,670
Limite pour un risque de 1%	1,155
Limite pour un risque de 5%	1,155
Conclusion	
La plus petite moyenne est acceptable	
La plus grande moyenne est acceptable	

Test de Cochran	
Homogénéité des variances	
Nombre de séries n =	3
Nombre de répétitions par série	6
C observée	0,729
Limite pour un risque de 1%	0,793
Limite pour un risque de 5%	0,707
Conclusion	
La plus grande dispersion est suspecte	

Il n'y a pas de valeur aberrante au risque $\alpha = 5\%$

Nous pouvons calculer l'écart-type et le coefficient de variation de fidélité intermédiaire pour chaque niveau de concentration. Les résultats sont présentés dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII. Récapitulatif des valeurs de fidélité intermédiaire

Nombre de séries n	3	3	3
Nombre de répétitions par série r	6	6	6
Moyenne générale	63,69	106,43	150,44
Ecart-type de fidélité intermédiaire : s_{FI}	1,53	2,46	1,41
CV de fidélité intermédiaire CV_{FI} en %	2,40%	2,31%	0,93%

Les trois coefficients de variations inter-série sont inférieurs à 3 %, la fidélité intermédiaire de la méthode est validée.

V.1.5. Etude de la spécificité par rapport aux solvants et excipients

Cette étape correspond au passage d'un échantillon de tous les réactifs risquant de perturber l'analyse.

- Mannitol 100 mg/L (seul excipient présent dans le flacon de Velcade®)

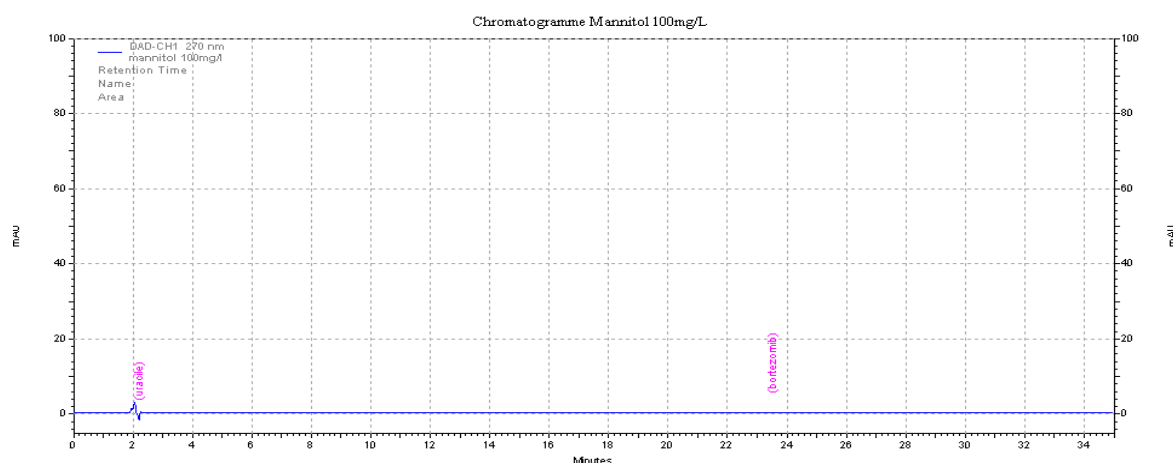


Figure 14. Chromatogramme obtenu après injection de 50 μ L de mannitol 100 mg/L

Le mannitol ne présente pas de pic d'élution dans les conditions chromatographiques de l'étude et ne présente donc pas d'interférence.

- Eau ultrapure

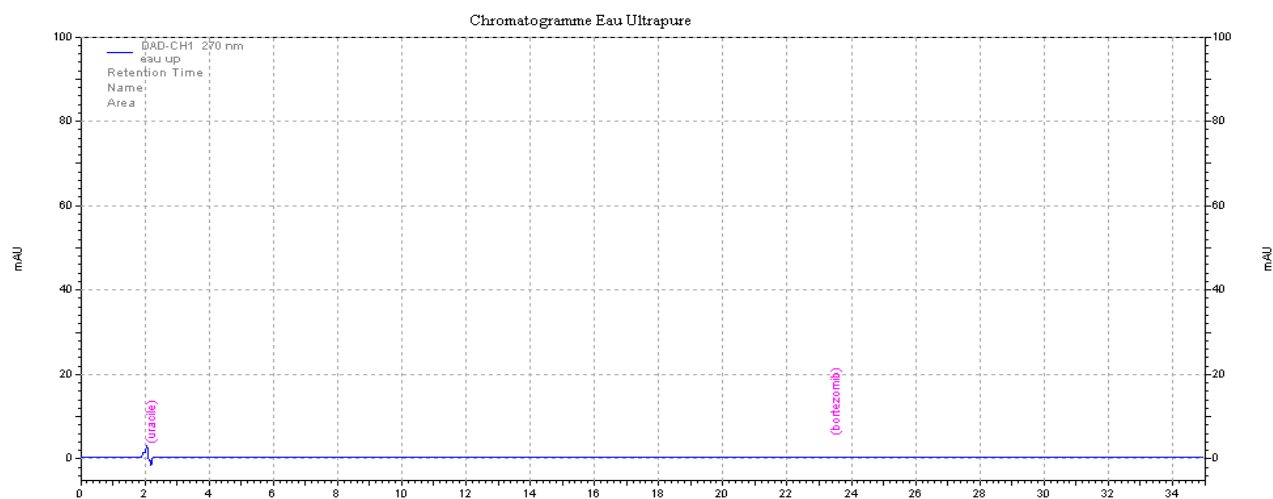


Figure 15. Chromatogramme obtenu après injection de 50 μ L d'eau ultrapure

Comme pour le mannitol, l'eau ultrapure ne montre pas de pic chromatographique.

- NaCl 0,9% Macoperf® 100 mL

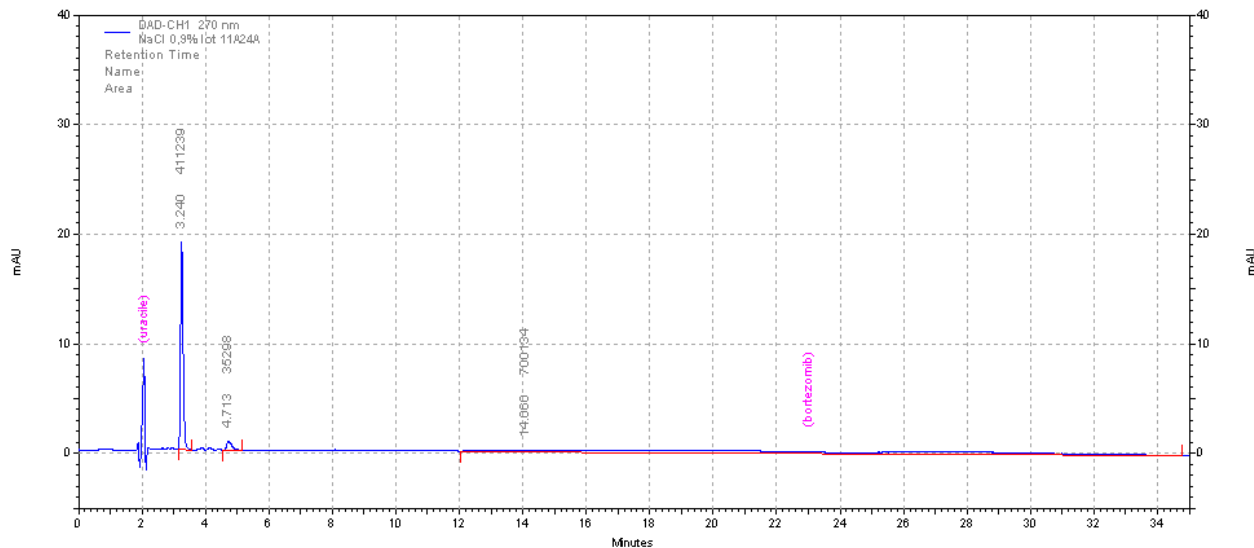


Figure 16. Chromatogramme obtenu après injection de 50 μ L de NaCl 0,9% Macoperf®

Nous retrouvons sur ce chromatogramme deux pics d'origine indéterminée qui apparaissent à un temps de rétention de 3,24 min et 4,71 min. Nous avons effectué plusieurs dosages où nous avons utilisé ce conditionnement, puis pour la suite des manipulations nous avons utilisé des unidoses de NaCl 0,9% 20 mL Aguettant®.

- NaCl 0,9% Aguettant® 20 mL

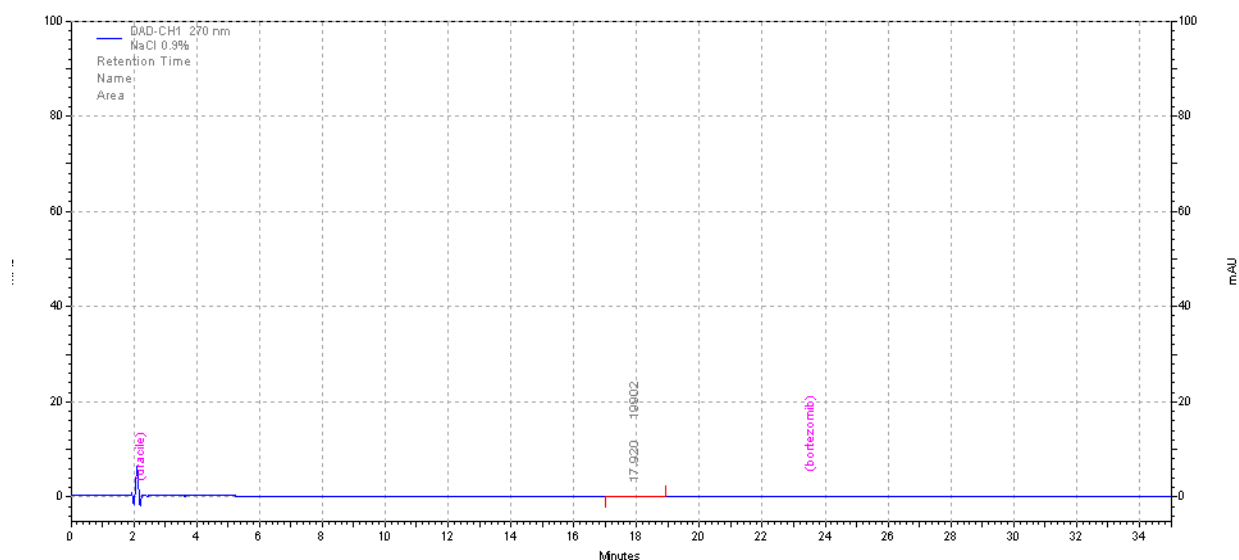


Figure 17. Chromatogramme obtenu après injection de 50 µL de NaCl 0,9% unidose Aguettant®

En conclusion sur la spécificité, l'excipient de la spécialité (mannitol) et les solvants ne présentent pas d'interférence.

V.2. Etude de la dégradation forcée du bortézomib

V.2.1. Produits de dégradation connus

Dans la publication de Bolognese [26], deux produits ont été définis et caractérisés par résonance magnétique nucléaire. Ils ont été appelés BTZ1 et BTZ2, et sont apparus dans des conditions habituelles d'utilisation et à 4°C au bout d'une semaine, où il y a eu une lente déboronation oxydative qui inactive le bortézomib.

V.2.2. Dégradation forcée

Nous avons dans cette partie fait subir à nos échantillons de bortézomib à 0,1 mg/mL des conditions agressives qui nous ont permis de relever la rétention relative des produits de dégradation et ainsi que les cibler durant l'étude de stabilité.

- Dégradation en milieu acide chaud

Nous avons injecté 50 μ L d'une préparation obtenue par le procédé suivant:

100 μ L de bortézomib 1mg/mL + 450 μ L de HCl 1N

Incubation à 60°C

Neutralisation avec 450 μ L de NaOH 1N au bout de 16h et 24h

Injection de 50 μ L

Nous avons superposé les deux chromatogrammes obtenus dans la figure 18.

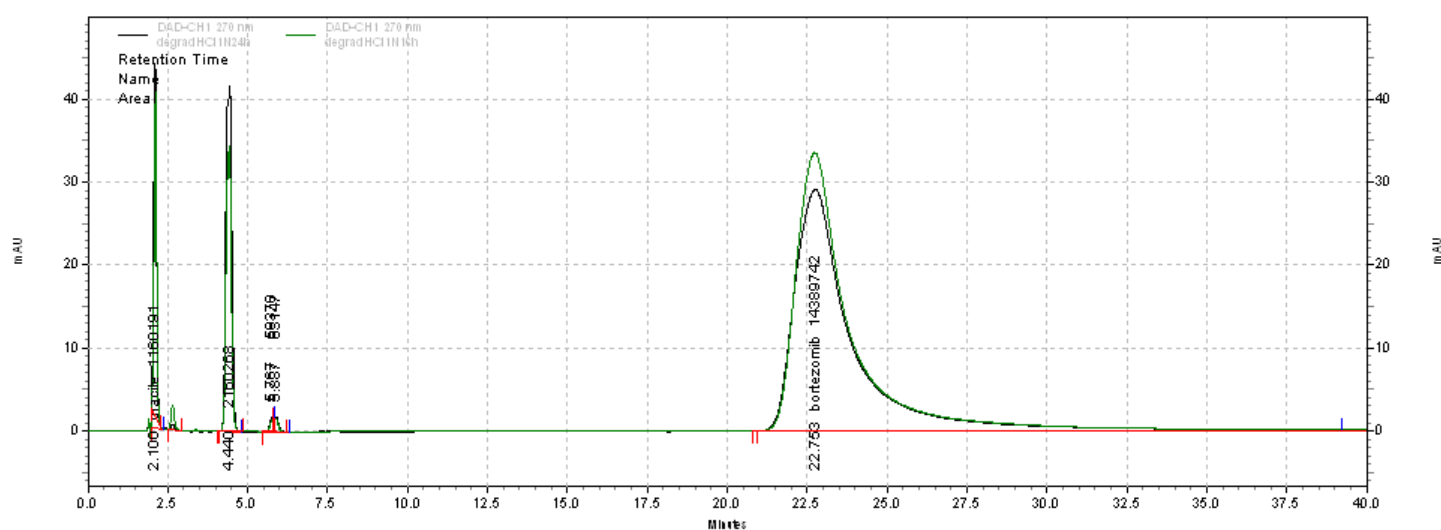


Figure 18. Superposition des deux chromatogrammes obtenus après dégradation du bortézomib par l'HCl 1N après 16h et 24h

Le chromatogramme obtenu nous montre l'apparition d'un pic important à une rétention relative de 0,11 ainsi que quelques pics plus petits, notamment à 0,17 et 0,18

- Dégradation en milieu basique :

Nous avons procédé de la façon suivante :

100 μ L de bortézomib 1mg/mL + 450 μ L de NaOH 1N

Neutralisation avec 450 μ L de HCl 1N au bout de 30min

Injection de 50 μ L

Et

100 μ L de bortézomib 1mg/mL + 450 μ L de NaOH 5N

Neutralisation avec 450 μ L de HCl 5N au bout de 30min

Injection de 50 μ L

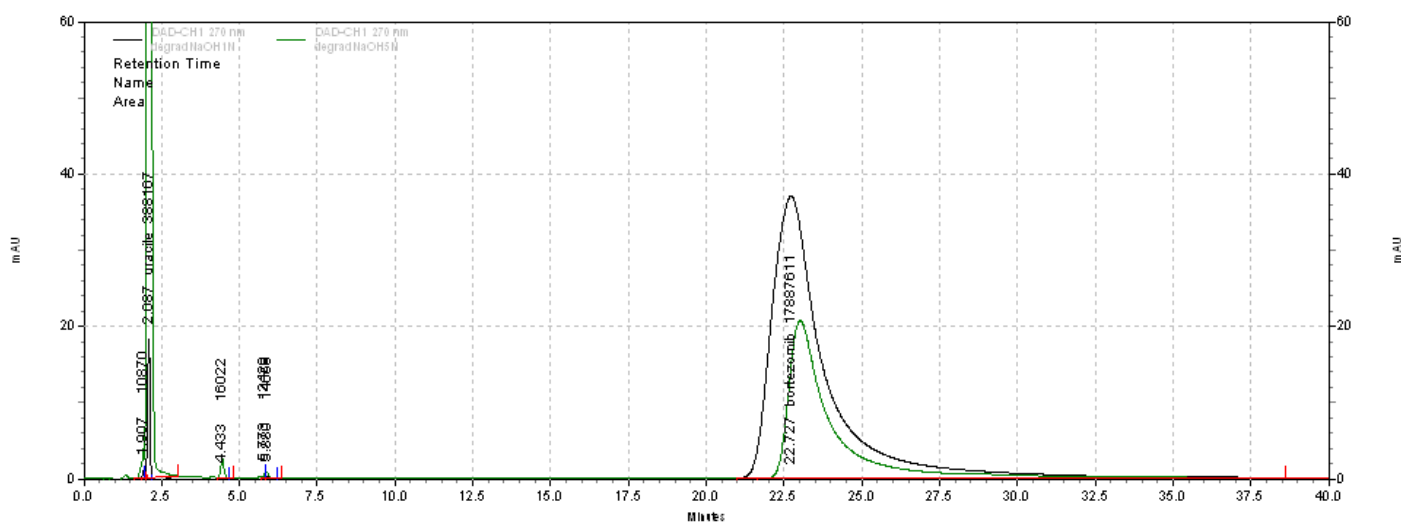


Figure 19. Superposition des chromatogrammes obtenus après dégradation basique du bortézomib par du NaOH 5N et 1N en 30 minutes

Nous retrouvons sur ce chromatogramme l'apparition de quelques pics de dégradation notamment autour d'une rétention relative de 0,15.

- Dégradation par la chaleur

Nous avons analysé 50 μ L de bortézomib 0,1 mg/mL incubé à 60°C pendant 24h

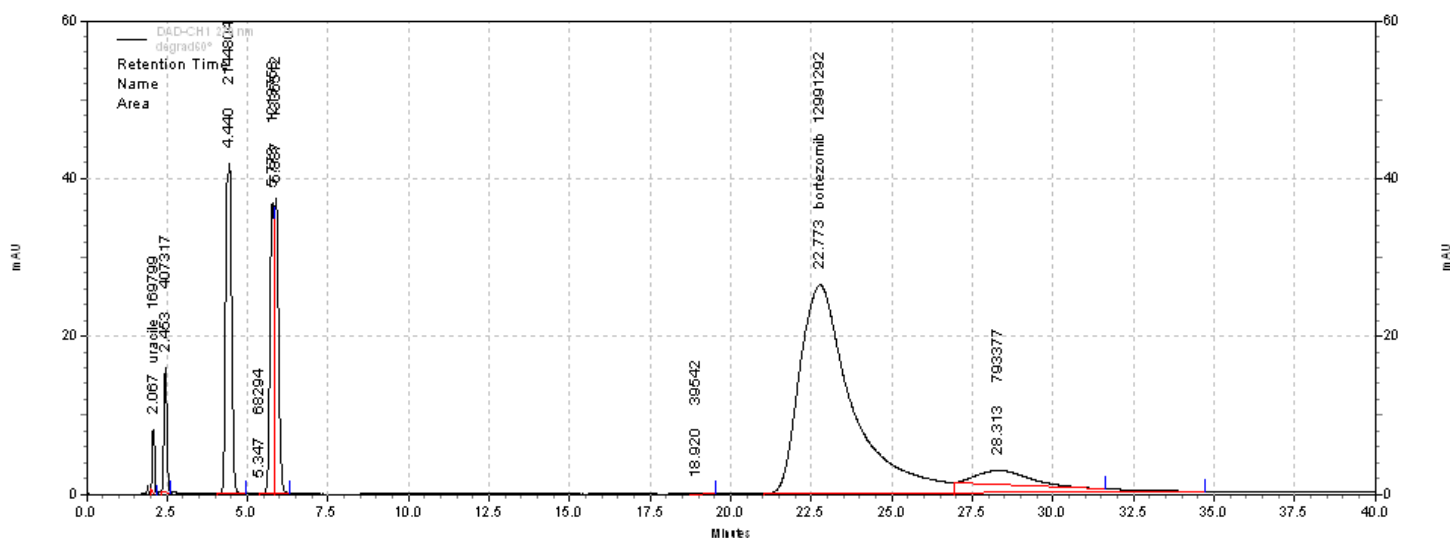


Figure 20. Chromatogramme obtenu après dégradation du bortézomib par la chaleur à 60°C pendant 24 heures

Deux pics importants se dessinent avec une rétention relative de 0,11 et 0,17 ainsi qu'un pic qui apparait après la sortie du bortézomib et qui a une rétention relative de 1,27.

- Dégradation oxydative

Nous avons oxydé nos échantillons en utilisant de l'eau de Javel à différentes concentrations.

- 100µL de bortézomib 0,1mg/mL + 5µL de HClO 0,096% de chlore actif

Injection de 50µL

- 100µL de bortézomib 0,1mg/mL + 5µL de HClO 0,0096% de chlore actif

Injection de 50µL

- 100µL de bortézomib 0,1mg/mL + 5µL de HClO 0,00096% de chlore actif

Injection de 50µL

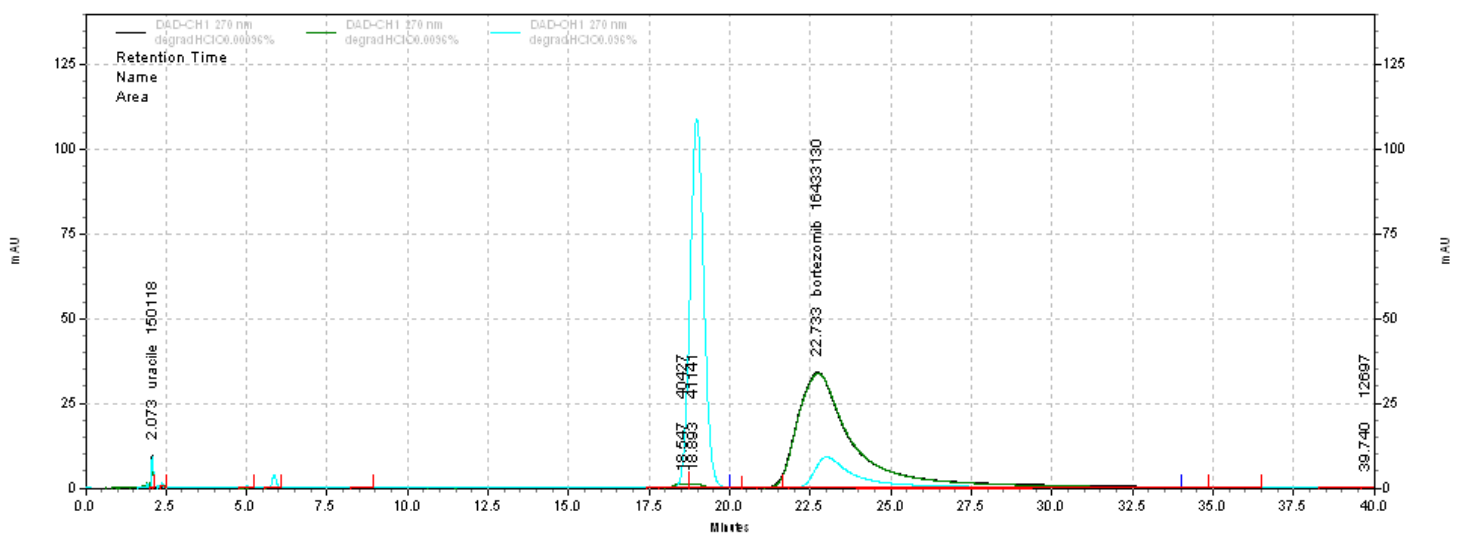


Figure 21. Superposition des chromatogrammes obtenus après oxydation du bortézomib avec du HClO à 0,00096%, 0,0096% et 0,096%

Après tous ces différents procédés de dégradation, nous avons superposé les chromatogrammes obtenus, ce qui nous permet d'avoir une vue d'ensemble des produits à rechercher lors de notre étude de stabilité.

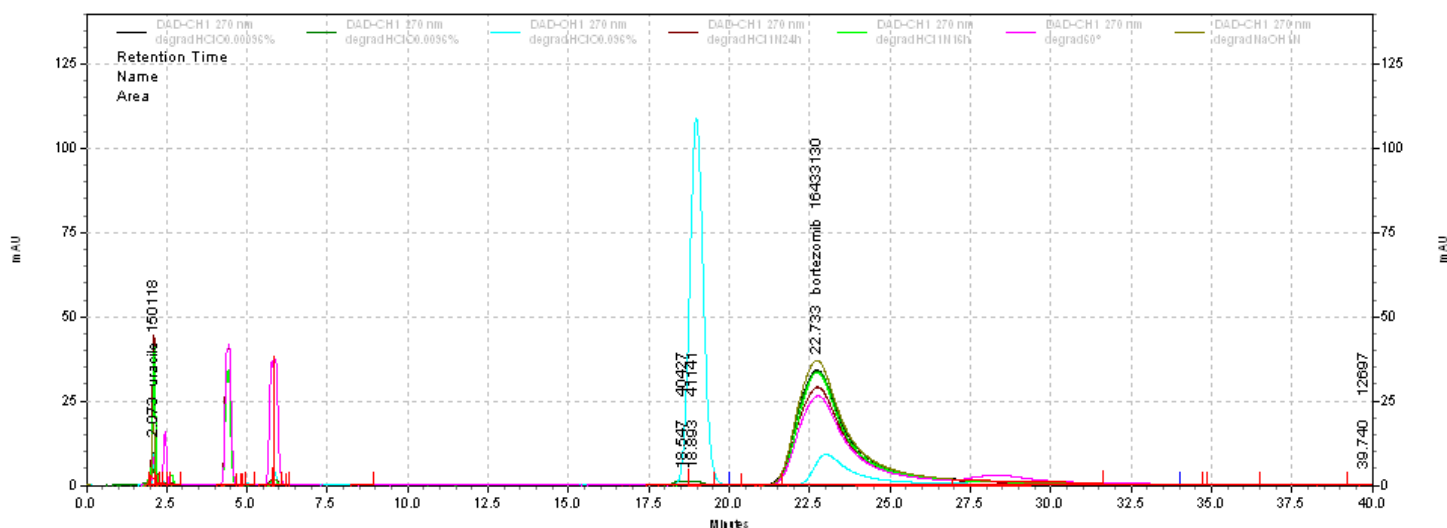


Figure 22. Superposition des chromatogrammes obtenus après chaque type de dégradation du bortézomib

- Rétention relative et bilan massique

Nous avons regroupé toutes les informations recueillies au cours des différentes phases de manipulation, et nous avons procédé à un bilan massique qui est homogène, ce qui signifie que le total des aires des produits présents en fin de dégradation correspond approximativement à l'aire initiale.

Tableau XIX. Bilan massique, temps de rétention et rétention relative des produits de dégradation

Mode de dégradation			sans dégradation	Dégradation 60° 23h	HCl 1N 16h 60°	HCl 1N 24h 60°	HClO 0,00096%	HClO 0,0096%	NaOH 1N 30min
n°pic	TR	RRT							
1	2,08	-0,01	144 132	169 799	891 074	1 160 191	155 850	141 003	388 167
2	2,37	0,01						15 220	
3	2,45	0,01		407 556					
4	2,65	0,02			85 543	23 303			
5	4,45	0,11		2 144 804	1 568 816	2 160 268			16 022
6	5,77	0,17		1 213 758	40 105	59 378			12 429
7	5,89	0,18		2 390 620	56 723	63 147			14 658
8	14,3	0,59		13 570					
9	16,9	0,72		17 199					
10	18,5	0,79					40 427	147 370	
11	18,9	0,81	27 882	39 542	12 112		41 141	152 794	
12	22,7	1,00	18 620 208	12 991 292	15 792 838	14 389 742	16 433 130	16 572 076	17 887 611
13	28,31	1,27		793 377					
Bilan massique			18 792 222	19 388 140	18 447 211	17 856 029	16 670 548	17 028 463	18 318 887

V.3. Etude de la stabilité

V.3.1. Aspect physique

Nous avons à chaque journée d'analyse observer à la loupe, sur fond noir puis blanc, les seringues de bortézomib, à la recherche de la formation de précipité ou d'un changement de couleur. Nous n'avons rien noté de particulier, ni changement de couleur, ni trouble, ni précipité.

V.3.2. La stabilité chimique

V.3.2.1. Etude de la concentration de bortézomib

Les analyses ont été effectuées à J0, J2, J4, J7, J14, J21, J28, J35.

Nous avons regroupé nos résultats dans le tableau XX où sont mentionnées les concentrations retrouvées pour chaque jour de manipulation.

Tableau XX. Concentrations de bortézomib retrouvées aux jours d'analyse

		Concentration de bortézomib mesurée (µg/mL)							
		J0	J2	J4	J7	J14	J21	J28	J35
Conservation au réfrigérateur	Flacon A	98,20	100,66	97,15	96,32	98,12	97,43	100,24	98,68
	Flacon B	103,29	97,59	97,89	98,79	93,76	98,81	95,09	97,37
	Moyenne	100,75	99,13	97,52	97,55	95,94	98,12	97,67	98,03
Conservation à température ambiante	Flacon A	98,20	95,24	97,02	101,10	96,10	97,09	99,33	93,71
	Flacon B	103,29	98,84	96,89	97,91	97,98	97,71	100,07	96,19
	Moyenne	100,75	97,04	96,96	99,51	97,04	97,4	99,7	94,96

Notre concentration initiale théorique est de 100 µg/mL, avec une erreur maximale acceptable de 5%. Nos valeurs brutes initiales sont de 98,2 µg/mL et 103,29 µg/mL, et la moyenne des deux concentrations obtenues à J0 est de 100,75 µg/mL.

Toutes ces valeurs sauf une, de 94,96%, sont comprises dans l'intervalle [95 ; 105] et sont donc acceptables.

Nous avons, pour chaque mesure, calculé la concentration de bortézomib restante par rapport à la valeur initiale. Les résultats sont présentés dans le tableau XXI, ainsi que sur les figures 23 et 24.

Tableau XXI. Pourcentage de bortézomib restant par rapport à la concentration initiale aux jours d'analyse

		Pourcentage de produit restant par rapport à J0							
		J0	J2	J4	J7	J14	J21	J28	J35
Conservation au réfrigérateur	Flacon A	100	102,50	98,92	98,08	99,91	99,21	102,07	100,48
	Flacon B	100	94,48	94,77	95,64	90,77	95,66	92,07	94,27
	Moyenne	100	98,49	96,85	96,86	95,34	97,44	97,07	97,38
Conservation à température ambiante	Flacon A	100	96,99	98,79	103,56	97,86	98,87	101,15	95,42
	Flacon B	100	95,69	93,81	94,79	94,86	94,59	96,89	93,12
	Moyenne	100	96,34	96,30	99,18	96,36	96,73	99,02	94,27

Nous avons décidé selon les ICH [31] de fixer la limite de stabilité à une concentration supérieure à 95% de la concentration initiale. La valeur moyenne la plus basse obtenue est de 94,27% à J35 de la conservation à température ambiante, ce qui n'est acceptable selon nos critères bien que proche de 95%. Les figures 23 et 24 sont les représentations graphiques des résultats obtenus.

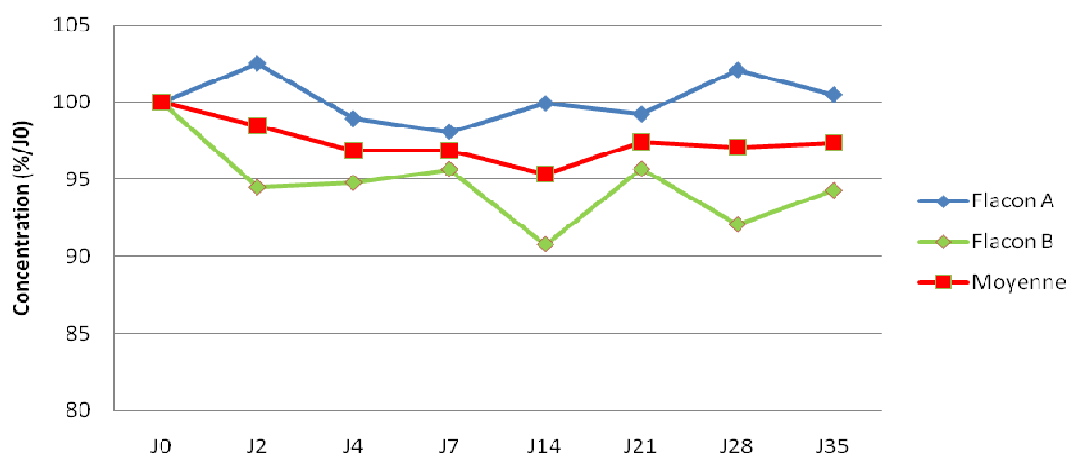


Figure 23. Pourcentage de bortézomib par rapport à la concentration initiale après conservation au réfrigérateur

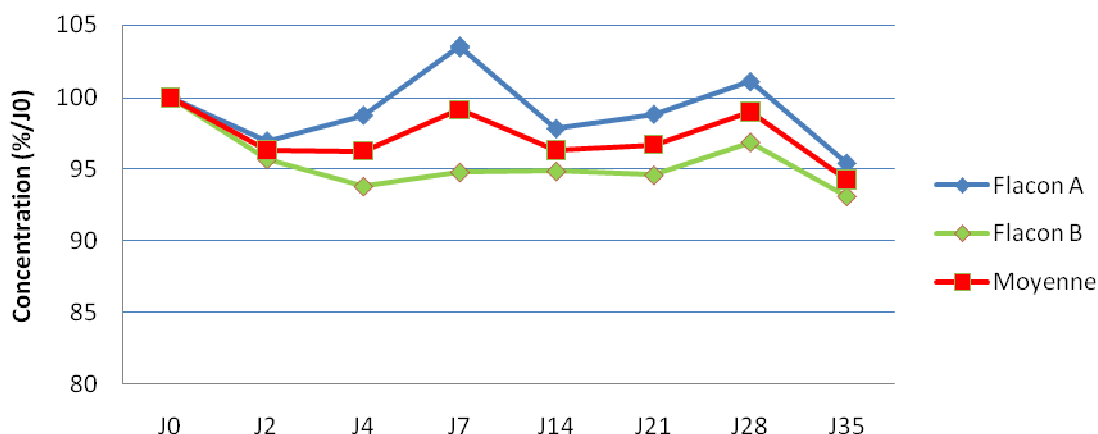


Figure 24. Pourcentage de bortézomib par rapport à la concentration initiale après conservation à température ambiante

Toutes les valeurs moyennes recueillies sauf une sont comprises dans l'intervalle défini de stabilité, quelque soit le mode de conservation.

La solution de bortézomib à 1 mg/mL, conditionnée en seringue de polypropylène conserve plus de 95% de sa concentration initiale durant 35 jours lorsqu'elle est conservée au réfrigérateur et durant 28 jours lorsqu'elle est conservée à température ambiante.

V.3.2.2. Etude des produits de dégradation

Les chromatogrammes obtenus à J35 pour la conservation à température ambiante et au réfrigérateur sont présentés dans les figures 25 et 26.

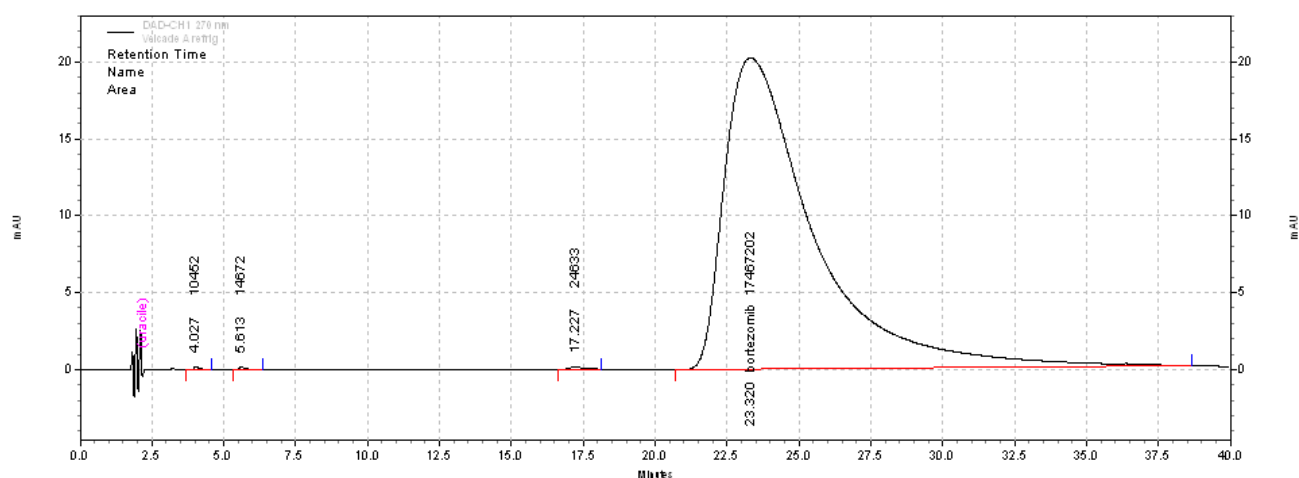


Figure 25. Chromatogramme obtenu après injection de 50 μ L de bortézomib à J35 d'une préparation à 1 mg/mL conservée au réfrigérateur

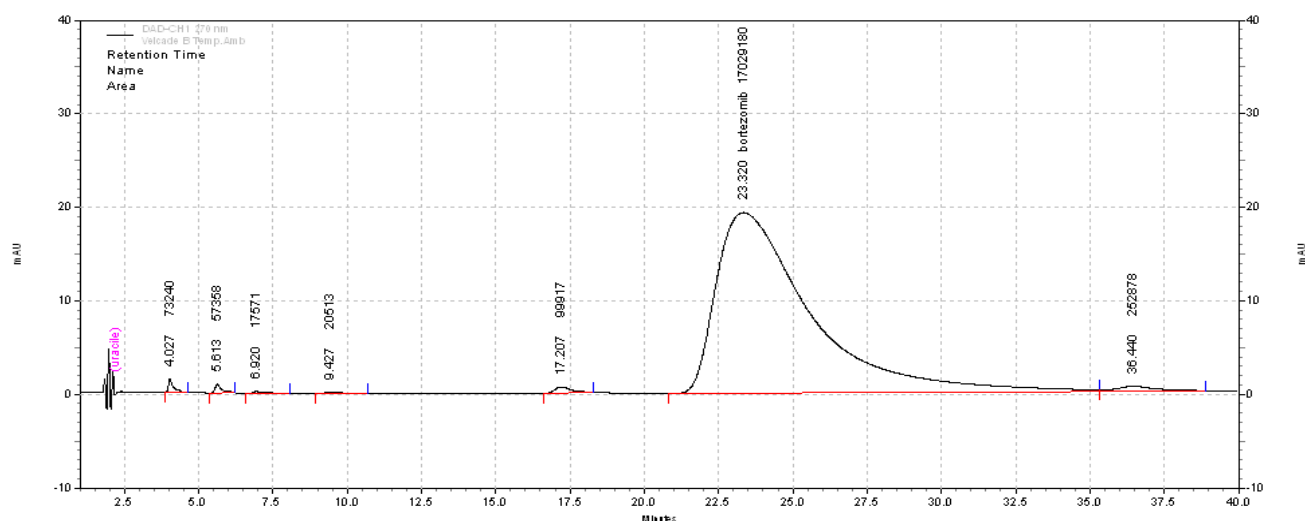


Figure 26. Chromatogramme obtenu après injection de 50 μ L de bortézomib à J35 d'une préparation à 1 mg/mL conservée à température ambiante

En analysant le chromatogramme obtenu à chaque mesure, nous avons vu apparaître des produits de dégradation et retrouvé 6 pics dont la rétention relative se rapproche de certains produits identifiés lors des phases de dégradation forcée. Les rétentions relatives de ces produits notés PD1, PD2, PD3, PD4, PD5 et PD6 sont respectivement de 0,10 ; 0,17 ; 0,24 ; 0,35 ; 0,76 ; 1,68. Le produit PD3 semble être celui identifié dans l'étude de Bolognese et al [26] puisque la rétention relative est proche de 0,26.

Nous avons calculé le pourcentage de chaque produit par rapport à la surface totale des pics ainsi que le pourcentage total que représentent les produits de dégradation à chaque jour de manipulation.

Pour la conservation au réfrigérateur, seuls 3 produits de dégradation sont apparus dans la solution alors que six sont apparus lors de la conservation à température ambiante.

Les figures 27 et 28 représentent le pourcentage de la surface des pics des produits de dégradation par rapport à la somme de la surface de tous les pics apparus au cours des 35 jours de conservation au réfrigérateur.

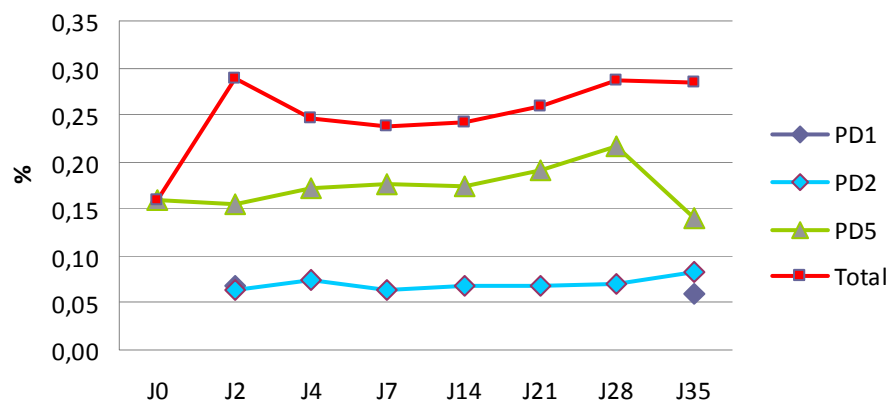


Figure 27. Pourcentage de produits de dégradation obtenus par rapport à la surface totale des pics après conservation au réfrigérateur de la seringue A

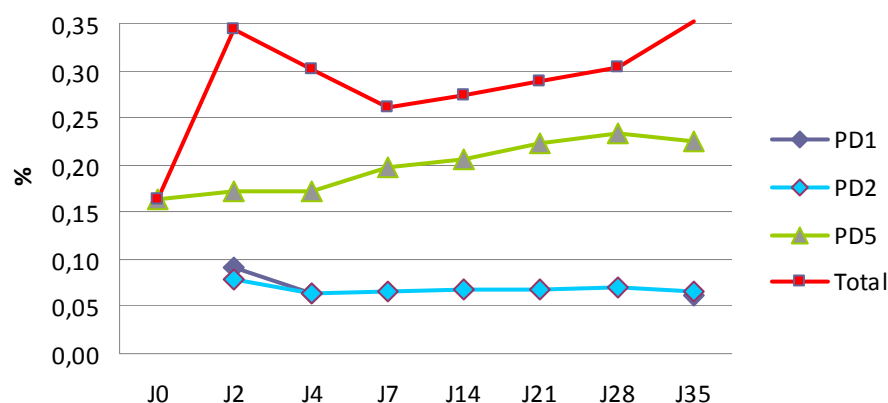


Figure 28. Pourcentage de produits de dégradation obtenus par rapport à la surface totale des pics après conservation au réfrigérateur de la seringue B

Lors de la conservation au réfrigérateur, nous retrouvons un pourcentage de produits de dégradation détecté inférieur à 0,4% de la quantité de produit initiale au bout de 35 jours.

Les figures 29 et 30 indiquent l'évolution du pourcentage de produits de dégradation par rapport à la somme des surfaces de tous les pics au cours des 35 jours de conservation à température ambiante.

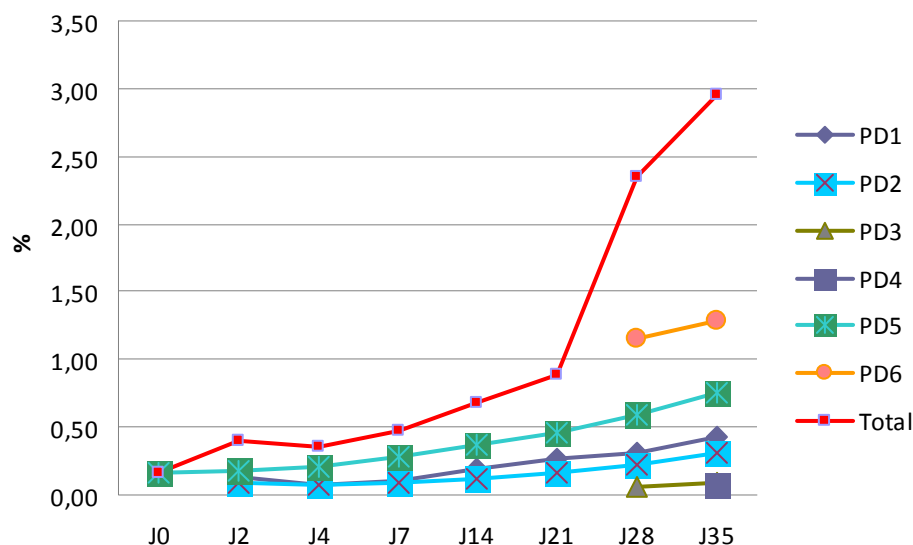


Figure 29. Pourcentage de produits de dégradation obtenus par rapport à la surface totale des pics après conservation à température ambiante de la seringue A

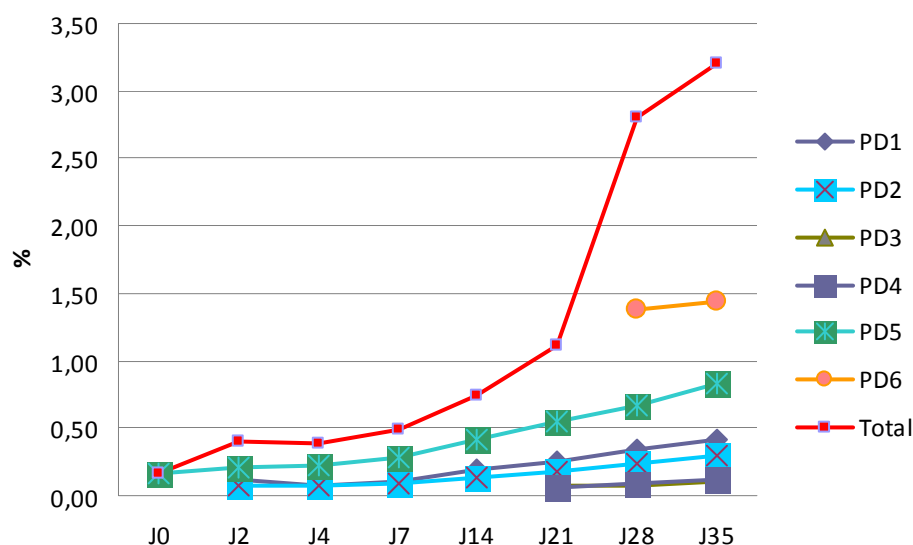


Figure 30. Pourcentage de produits de dégradation obtenus par rapport à la surface totale des pics après conservation à température ambiante de la seringue B

Il apparaît une quantité plus importante de produits de dégradation lors de la conservation à température ambiante. Le seuil de 1% est franchi entre J14 et J21, pour atteindre plus de 3% à J35.

Le bortézomib n'ayant pas de monographie à la Pharmacopée Européenne, nous n'avons pas de données sur le taux maximal acceptable de produits de dégradation et nous avons fixé cette limite à 1%.

Nos conditions pour affirmer la stabilité de la solution sont une perte de principe actif inférieure à 5% et une apparition de produits de dégradation dans la limite de 1% :

La solution de bortézomib à 1 mg/mL conditionnée en seringue de polypropylène est, selon ces critères, stable 35 jours conservée entre 2 et 8°C, et 14 jours à température ambiante.

VI. Discussion

VI.1. Validation de la méthode de dosage

L'usage d'une colonne thermostatée permet de pallier les problèmes de variations des conditions chromatographiques habituellement rencontrés, mais nous avons cependant établi une gamme d'étalonnage à chaque journée de manipulation. Du point de vue des grandeurs chromatographiques, nous avons vu que l'efficacité et la symétrie sont faibles mais suffisantes pour la qualification et la quantification du principe actif, ainsi que la mise en évidence de produits de dégradation. La recherche d'interactions entre les excipients et les solvants utilisés ne montre pas d'interférence avec le produit à étudier.

Notre étude statistique, notamment les tests de Grubbs, Cochran et Fisher nous ont permis de valider notre étalonnage de façon mathématique en ne mettant aucune valeur aberrante en évidence.

L'analyse de 18 échantillons comme indiqué dans les ICH nous a permis de démontrer la répétabilité et la fidélité intermédiaire de notre méthode.

VI.2. Produits de dégradation

La mise en place de la dégradation accélérée a été plus agressive que prévue sur notre colonne, qui au fil des premières manipulations, a semblé s'être dégradée. Nous avons donc utilisé une nouvelle colonne pour la mise en place de notre étude de stabilité sur les 35 jours. Les produits de dégradation retrouvés ne présentent pas d'interaction avec le bortézomib. Nous avons utilisé une même solution mère que nous avons

congelée lors de nos gammes, estimant que la congélation à -70°C ne provoquait pas de dégradation.

VI.3. Etude de stabilité

La stabilité physique de la solution de bortézomib à 1 mg/mL a été vérifiée à chaque jour de manipulation par un examen à la loupe où aucun changement de couleur ni formation de précipité n'ont été notés.

Les deux solutions A et B de bortézomib ont démontré une stabilité chimique de 35 jours après conservation au réfrigérateur, et 14 jours à température ambiante. Le calcul des valeurs moyennes obtenues sur nos 2 flacons permet de pallier les problèmes de précision qui ont pu être rencontrés lors des étapes de manipulation. Les temps d'analyse étant longs, il n'a pas été possible d'effectuer une répétition pour chaque mesure, ce qui aurait permis de faire une moyenne des résultats obtenus pour chaque flacon séparément.

Trois produits de dégradation ont été observés lors de la conservation au réfrigérateur, avec un pourcentage total par rapport à la somme de tous les pics inférieur à 0,4% à J35. Six produits, atteignant un taux de 3% à J35 sont apparus lors de la conservation à température ambiante. Lors de notre phase de dégradation forcée, nous avons identifié 13 pics de dégradation.

Plusieurs contraintes se sont présentées dans cette étude : la durée d'analyse, qui représentait au total, avec le rinçage de la colonne, l'équilibrage des phases et l'analyse des échantillons près de 8h. Nous avons à chaque journée de manipulation procédé de la même manière, en répartissant notre travail de façon à ce que les échantillons subissent les mêmes conditions de préparation, d'attente et de dosage. Une seconde contrainte fut la limitation du nombre de flacons de Velcade® à utiliser puisqu'un flacon dosé à 3,5 mg coûte près de 1200 euros. Nous avons donc fait des solutions mères pour les étalonnages, congelées à -70°C, et utilisé le nombre minimum de flacons nécessaires pour garantir la qualité de notre étude.

VI.4. Applications

Les résultats de cette étude peuvent être appliqués dans toute unité de préparation de cytotoxiques à condition de respecter les modalités de reconstitution du Velcade® et de conservation que nous avons validés.

La stabilité de la solution de bortézomib à 1 mg/mL établie sur 35 jours avec conservation au réfrigérateur permet la fabrication par anticipation des seringues en n'assurant aucune perte de produit en cas de report ou d'annulation de cure. Cela peut se faire selon deux modes :

En dose banding : c'est-à-dire en dose standardisée non nominative

En préparation nominative standardisée : les seringues sont préparées, avant la validation de la cure par le médecin.

Au CHU de Nancy à l'hôpital de Brabois, nous travaillons maintenant en préparation nominative standardisée fabriquée à l'avance pour les seringues de Velcade®. La standardisation des doses se fait par paliers de 0,2 mg pour une gamme allant de 1,6 à 2,6 mg de bortézomib, ce qui comprend la majorité des patients. (Annexe 5). Les paliers ont été calculés en fonction du biais estimé sur la quantité de produit réellement préparée lors de la manipulation et la quantité prescrite. Une centaine de seringues ont été fabriquées ainsi entre juin et septembre 2011. L'anticipation des préparations peut se faire car économiquement, si l'injection est reportée ou annulée, la seringue étant stable 35 jours, elle peut être conservée et réattribuée à un autre patient selon une procédure sécurisée. Six seringues ont ainsi été recyclées, ce qui évite, pour une moyenne de coût d'une seringue (pour un patient avec une surface corporelle à 1,8 m²) de 800 euros, une perte d'environ 4 800 euros.

CONCLUSION

L'objectif de cette étude était d'étudier la stabilité d'une solution de bortézomib à une concentration de 1 mg/mL, conditionnée en seringue de polypropylène, sur une durée de 35 jours. Nous avons étudié deux situations : la température ambiante et le réfrigérateur, la stabilité ayant été définie par une perte de principe actif inférieure à 5% et une apparition de produits de dégradation inférieure à 1%.

Nos résultats montrent :

- Une stabilité de 35 jours de la solution de bortézomib à 1 mg/mL conservée au réfrigérateur entre 2 et 8 °C
- Une stabilité de 14 jours de la solution de bortézomib à 1 mg/mL conservée à température ambiante.

Les résultats obtenus ont permis la réorganisation des préparations de bortézomib à l'unité centralisée des préparations de cytotoxiques de Brabois. Les cures de Velcade® sont prévues habituellement les lundis et jeudis, et cela représente de nombreux patients, jusqu'à parfois plus d'une vingtaine dans la journée. Dorénavant, les seringues sont préparées d'avance nominativement, avec des doses standardisées, sont ensuite conservées en chambre froide afin de garantir la stabilité, et sont délivrées le jour de l'injection au service lorsque la cure a été validée par appel téléphonique. Si la cure est décalée ou annulée, la seringue est conservée au réfrigérateur puis réattribuée à un autre patient. Les patients n'attendent plus que la seringue soit préparée et reçoivent l'injection rapidement. La standardisation des doses et la procédure de réattribution permettent également d'éviter la perte économique liée à la destruction d'une seringue dont l'injection aurait été annulée.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure du bortézomib	16
Figure 2. Répartition des types de myélomes traités par bortézomib	26
Figure 3. Chromatogramme obtenu lors de la qualification de la colonne 1	46
Figure 4. Chromatogramme obtenu lors de la qualification de la colonne 2	47
Figure 5. Chromatogramme obtenu après injection de 50 µL d'uracile à 20 mg/L avec la colonne 1	48
Figure 6. Chromatogramme obtenu après injection de 50 µL d'uracile à 20 mg/L avec la colonne 2	48
Figure 7. Chromatogramme obtenu après injection de 50 µL de bortézomib à 0,1mg/mL	49
Figure 8. Spectre du bortézomib	50
Figure 9. Représentation des grandeurs retrouvées en fonction des grandeurs théoriques	51
Figure 10. Répartition des biais en pourcentage en fonction des niveaux de concentrations par rapport à l'EMA fixé à 5%	52
Figure 11. Représentation graphique des résultats pour la concentration de 63 µg/mL...	56
Figure 12. Représentation graphique des résultats pour la concentration de 105 µg/mL	57
Figure 13. Représentation graphique des résultats pour la concentration de 147 µg/mL	58
Figure 14. Chromatogramme obtenu après injection de 50 µL de mannitol 100 mg/L.....	59
Figure 15. Chromatogramme obtenu après injection de 50 µL d'eau ultrapure	60
Figure 16. Chromatogramme obtenu après injection de 50 µL de NaCl 0,9% Macoperf®	60
Figure 17. Chromatogramme obtenu après injection de 50 µL de NaCl 0,9% unidose Aguettant®	61
Figure 18. Superposition des deux chromatogrammes obtenus après dégradation du bortézomib par l'HCl 1N après 16h et 24h	62
Figure 19. Superposition des chromatogrammes obtenus après dégradation basique du bortézomib par du NaOH 5N et 1N en 30 minutes	63
Figure 20. Chromatogramme obtenu après dégradation du bortézomib par la chaleur à 60°C pendant 24 heures	63
Figure 21. Superposition des chromatogrammes obtenus après oxydation du bortézomib avec du HClO à 0,00096%, 0,0096% et 0,096%	64

Figure 22. Superposition des chromatogrammes obtenus après chaque type de dégradation du bortézomib	65
Figure 23. Pourcentage de bortézomib par rapport à la concentration initiale après conservation au réfrigérateur	67
Figure 24. Pourcentage de bortézomib par rapport à la concentration initiale après conservation à température ambiante	68
Figure 25. Chromatogramme obtenu après injection de 50 µL de bortézomib à J35 d'une préparation à 1 mg/mL conservée au réfrigérateur	68
Figure 26. Chromatogramme obtenu après injection de 50 µL de bortézomib à J35 d'une préparation à 1 mg/mL conservée à température ambiante	69
Figure 27. Pourcentage de produits de dégradation obtenus par rapport à la surface totale des pics après conservation au réfrigérateur de la seringue A.....	70
Figure 28. Pourcentage de produits de dégradation obtenus par rapport à la surface totale des pics après conservation au réfrigérateur de la seringue B.....	70
Figure 29. Pourcentage de produits de dégradation obtenus par rapport à la surface totale des pics après conservation à température ambiante de la seringue A	71
Figure 30. Pourcentage de produits de dégradation obtenus par rapport à la surface totale des pics après conservation à température ambiante de la seringue B	71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Consommation et coût du Velcade® de 2006 à 2010	24
Tableau II. Grille de recueil	25
Tableau III. Répartition des âges des patients en 2010	26
Tableau IV. Répartition des effectifs et âge moyen.....	26
Tableau V. Préparation de la gamme d'étalonnage du bortézomib	39
Tableau VI. Récapitulatif des grandeurs chromatographiques obtenues avec la colonne 1	46
Tableau VII. Récapitulatif des grandeurs chromatographiques obtenues avec la colonne 2	47
Tableau VIII. Récapitulatif des grandeurs expérimentales obtenues avec les colonnes 1 et 2.....	49
Tableau IX. Aires des pics de bortézomib enregistrées lors des gammes d'étalonnage .	50
Tableau X. Equations, coefficients de détermination et de corrélation retrouvés lors des gammes d'étalonnage.....	51
Tableau XI. Biais relatifs calculés	52
Tableau XII. Biais absolus calculés.....	53
Tableau XIII. Récapitulatif des valeurs permettant de calculer F	53
Tableau XIV. Récapitulatif des valeurs retrouvées lors du jour 1 de la répétabilité.....	54
Tableau XV. Valeurs retrouvées lors de l'essai de fidélité intermédiaire pour les échantillons de bortezomib à 63 µg/mL	56
Tableau XVI. Valeurs retrouvées lors de l'essai de fidélité intermédiaire pour les échantillons de bortézomib à 105 µg/mL	57
Tableau XVII. Valeurs retrouvées lors de l'essai de fidélité intermédiaire pour les échantillons de bortézomib à 147 µg/mL	58
Tableau XVIII. Récapitulatif des valeurs de fidélité intermédiaire	59
Tableau XIX. Bilan massique, temps de rétention et rétention relative des produits de dégradation	65
Tableau XX. Concentrations de bortézomib retrouvées aux jours d'analyse	66
Tableau XXI. Pourcentage de bortézomib restant par rapport à la concentration initiale aux jours d'analyse	67

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] PALUMBO A, ANDERSON K

Multiple Myeloma

The New England Journal of Medicine 2011:1046-60

[2] INTERGROUPE FRANÇAIS DU MYELOME

www.myelome.fr

Site consulté le 15/07/2011

[3] Myélome multiple des os (Maladie de Kahler)

<http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/.../Myelome166.doc>

Site consulté le 15/07/2011

[4] VARET B

Le livre de l'interne, Hématologie

Médecine-Sciences Flammarion 2007 Paris, 2ème édition, 607p

[5] SOCIETE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE

Référentiel d'hématologie consulté

http://sfh.hematologie.net/hematolo/UserFiles/File/REFERENTIEL_SFH_2008_2009.pdf

2009 : 99-105

[6] ONCOCENTRE

Référentiel Onco-hématologie

http://www.oncocentre.org/referentiels/ref_hemato_2010.pdf

2010 : 35-41

[7] QUACH H, PRINCE M, SPENCER A

Managing multiple myeloma in the elderly: are we making progress?

Expert Review of Hematology, 2011 4(3): 301-15

[8] SPANO J-P, BAY J-O, BLAY J-Y, RIXE O

L'inhibition du protéasome : une nouvelle approche thérapeutique en onco-hématologie
Bull cancer 2005; 92 (11):945-52

[9] SAN MIGUEL J, SCHLAG R, KHUAGEVA N, DIMOPOULOS M, SHIPILBERG, KROPFF M et al.

Bortezomib plus Melphalan and Prednisone for Initial Treatment of Multiple Myeloma
The New England Journal of Medicine 2008; 359:906-17.

[10] MATEOS M-V, ORIOL A, MARTINEZ-LOPEZ J, GUTIERREZ N, TERUEL A, GARCIA-LARANA J et al

Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma: a randomised trial

Lancet Oncology 2010; 11: 934–41

[11] HAROUSSEAU JL, PALUMBO A, RICHARDSON P, SCHLAG R, DIMOPOULOS M, SHPILBERG O et al

Superior outcomes associated with complete response in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with nonintensive therapy: analysis of the phase 3 VISTA study of bortezomib plus melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone

Blood 2010 116(19): 3685-86

[12] DISPENZIERI A, JACOBUS S, VESOLE D, CALLANDAR N, FONSECA R, GREIPP P et al

Primary therapy with single agent bortezomib as induction, maintenance and re-induction in patients with high risk myeloma: results of the ECOG E2A02 trial

Leukemia, 2010; 24(8): 1406-11

[13] LIONAL S

Relapsed Multiple Myeloma

Hematology 2010: 303-09

- [14] HRUSOVSKY I, EMMERICH B, VON ROHR B, VOEGELI J, TAVERNA C et al
Bortezomib Retreatment in relapsed multiple myeloma- Results from a retrospective multicentre survey in Germany and Switzerland
Oncology 2010; 79: 247-54
- [15] DURIE BG, HAROUSSEAU JL, MIGUEL JS, BLADE
International uniform response criteria for multiple myeloma.
Leukemia. 2006; 20(12): 2220
- [16] RICHARDSON P, HIDEHIMA T, ANDERSON K,
Bortezomib (PS-341): A Novel, First-in-Class Proteasome Inhibitor for the Treatment of Multiple Myeloma and Other Cancers
Cancer Control 2003, 10(5):361
- [17] DICTIONNAIRE VIDAL
Résumé des Caractéristiques du Produit Velcade®
87e éd. Paris, 2011 , p.2374
- [18] SWEETMAN SC et al
"Bortezomib"
Martindale: The complete drug reference, 34th edition, Pharmaceutical Press, Suffolk, 2005 p.532
- [19] THERIAQUE Fiche produit
www.theriaque.org site consulté le 15/07/2011
- [20] HAUTE AUTORITE DE SANTE,
Commission de transparence, avis du 10 juin 2009
- [21] AFSSAPS EMEA
Rapport européen public d'évaluation du comité des spécialités pharmaceutiques Velcade® bortézomib
2004

[22] ANDRE P, CISTERNINO S, CHIADMI F, TOLEDANO A, SCHLATTER J et al
Stability of bortezomib 1 mg/ml solution in plastic syringe and glass vial.
The Annals of Pharmacotherapy 2005; 39:1462-66.

[23] The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
Guideline on stability testing: stability testing of existing active substances and related
finished products
CPMP/QWP/122/02, rev1; 2003

[24] FRIES D, NGYUEN HC, LIPP HP
HPLC- stabilitätuntersuchungen zu rekonstituierten Bortezomib-Lösungen.
Krankenhauspharmazie 2005; 26, 6:206-10.

[25] WALKER SE, MILLIKEN D, LAW S.
Stability of Bortezomib reconstituted with 0.9% Sodium chloride at 4°C and room
temperature (23°C)
Canadian Journal of Hospital Pharmacy 2008; 61, 1:14-20.

[26] BOLOGNESE A, ESPOSITO A, MANFRA M, CATALANO L, PETRUZZIELLO F et al
An NMR study of the bortezomib degradation under clinical use conditions
Advance in Haematology 2009, Article ID 704928, 5 p

[27] VANDERLOO J, POMPLUN M, VERMEULEN L, KOLESAR J
Stability of unused reconstituted bortezomib in original manufacturer vials
Journal of Oncology Pharmacy Practice, 2010

[28] HAGAN R
High-performance liquid chromatography for small-scale studies of drug stability
American Journal of Hospital Pharmacy 1994; 51 : 2162-75

[29] International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1), Current Step 4 version, 2005

[30] FEINBERG M

Labostat Guide de validation des méthodes d'analyse

Paris, 2009, Lavoisier, 361p.

[31] International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use.

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2), Current Step 4 version, 2003

Annexe 1

IMWG diagnostic criteria

In 2003, the International Myeloma Working Group[1] agreed on diagnostic criteria for symptomatic myeloma, asymptomatic myeloma and MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance):

Symptomatic myeloma

1. Clonal plasma cells >10% on bone marrow biopsy or (in any quantity) in a biopsy from other tissues (plasmacytoma)
2. A monoclonal protein (paraprotein) in either serum or urine
3. Evidence of end-organ damage (related organ or tissue impairment, ROTI):
 - ☐ Hypercalcemia (corrected calcium >2.75 mmol/L)
 - ☐ Renal insufficiency attributable to myeloma
 - ☐ Anemia (hemoglobin <10 g/dL)
 - ☐ Bone lesions (lytic lesions or osteoporosis with compression fractures)
 - ☐ Frequent severe infections (>2 a year)
 - ☐ Amyloidosis of other organs
 - ☐ Hyperviscosity syndrome

Asymptomatic myeloma:

4. Serum paraprotein >30 g/L AND/OR
5. Clonal plasma cells >10% on bone marrow biopsy AND
6. NO myeloma-related organ or tissue impairment

Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS):

7. Serum paraprotein <30 g/L AND
8. Clonal plasma cells <10% on bone marrow biopsy AND
9. NO myeloma-related organ or tissue impairment

Related conditions include solitary plasmacytoma (a single tumor of plasma cells, typically treated with irradiation), plasma cell dyscrasia (where only the antibodies produce symptoms, e.g. AL amyloidosis), and POEMS syndrome (peripheral neuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal plasma cell disorder, skin changes).

Annexe 2

Tableau 1 : Classification du myélome multiple selon Durie et Salmon	
	Critères
Stade I	Myélome de faible masse tumorale Présence de tous les critères suivants : Hémoglobine > 10 g/dl Calcémie < ou = 3 mmol/l Os normal ou un seul plasmocytome osseux Faible taux d'immunoglobuline monoclonale : IgG sérique < 50 g/l IgA sérique < 30 g/l Protéïnurie monoclonale < 4 g/24 h
Stade II	Myélome de masse tumorale intermédiaire Regroupe les myélomes multiples ne répondant ni aux critères de stade I, ni aux critères de stade III
Stade III	Myélome de forte masse tumorale Présence d' un ou plusieurs des critères suivants : Hémoglobine < 8,5 g/dl Calcémie > 3 mmol/l Atteinte ostéolytique multiple Taux élevé d'immunoglobuline monoclonale : IgG sérique > 70 g/l IgA sérique > 50 g/l protéïnurie monoclonale > 12 g/24 h
	Sous-classification selon la fonction rénale
Stade A	Créatinine < 20 mg/l
Stade B	Créatinine > ou = 20 mg/l

Annexe 3

Système international de classification du myélome multiple (2005).		
Stade	Critères	Survie (médiane)
I	Bêta2-m < 3,5 mg/l + albuminémie > ou = 35 g/l	62 mois
II	Ni stade I, ni stade III	44 mois
III	Bêta2-m > ou = 5,5 mg/l	29 mois
Bêta2-m : bêta2-microglobulinémie sérique		

Annexe 4

Exemples de Protocoles de première ligne

MP-THAL

(Thalidomide Melphalan Prednisone): J1=J28 à J42.

MELPHALAN 0,25 mg/kg/j J1 à J4 po.

☐ Sujets âgés >75 ans 0,2 à 0,18 mg/kg/j J1 à J4 po.

CORTANCYL 2 mg/kg/j J1 à J4 po.

THALIDOMIDE 100 mg/j po en continu.

VMP

(Velcade Melphalan Prednisone) : J1=J35.

VELCADE 1,3 mg/m²/j J1, J8 J15, J22 IV.

MELPHALAN 0,25 mg/kg/j J1 à J4 po.

☐ Sujets âgés >75 ans 0,2 à 0,18 mg/kg/j J1 à J4 po.

CORTANCYL 2 mg/kg/j J1 à J4 po.

VTD

(Velcade Thalidomide Dexaméthasone) : induction J1=J21.

VELCADE 1 mg/m² J1 J4 J8 J11 IV.

DECTANCYL 40 mg/j J1 à J4 po.

THALIDOMIDE 100 mg/j po en continu.

VTD (Velcade Thalidomide Dexaméthasone) : consolidation J1=J28.

VELCADE 1 mg/m² J1 J4 J8 J11 IV.

DECTANCYL 40 mg/j 1/sem.

THALIDOMIDE 100 mg/j po en continu.

MEL200 (autogreffe) :

MELPHALAN 200 mg/m² J-2 IV sous hyperhydratation.

Ré injection des CSP J0 IV.

1 ou 2 intensifications thérapeutiques.

VCD

(Velcade Endoxan Dexaméthasone) : J1=J35.

VELCADE 1,3 mg/m² J1 J8 J15 J22 IV.

ENDOXAN 300 mg/m² (500 mg max) J1 J8 +/-J15 IV.

DECTANCYL 40 mg/semaine.

M-Dex (Melphalan Dexaméthasone) amylose : J1=J28.

MELPHALAN 11 mg/m² J1 à J4 po.

DECTANCYL 40 mg/m² J1 à J4 po.

PAD (Velcade Adriamycine Dexaméthasone) : J1=J22.

VELCADE 1,3 mg/m² J1 J4 J8 J11 IV.

ADRIBLASTINE 36 mg/m² J1 IV.

DECTANCYL 40 mg J1 J4 J8 J11 po.

Exemples de Protocoles de rechute

VRD (Velcade Revlimid Dexamethasone): J1=J21.

VELCADE 1 mg/m² IV - J1 J4 J8 J11.

REVLIMID. 25 mg/j po 3 semaines sur 4

DECTANCYL 40 mg/j po J1 J4 J8 J11.

VMD (Velcade Melphalan Dexaméthasone): J1=J28.

VELCADE 1,3 mg/m²/j J1 J4 J8 J11 IV.

DECTANCYL 40 mg/j J1 à J4 po

MELPHALAN 0,25 mg/kg J1 à J4 po.

REV-DEX : J1=J28

REVLIMID 25 mg/j po 21 jours par mois.

☐ Dose adaptable : REV 15 mg/j po 21J/mois.

DECTANCYL 40 mg/j J1 J8 J15 J22 po.

☐ Dose adaptable : DEX 20 mg po par semaine.

CTD

(Endoxan Thalidomide Dexaméthasone): J1=J28

ENDOXAN 300 mg/m² IV J1 J8 J15

ou 100 mg po J1 à J15.

THALIDOMIDE 100 mg/j po en continu.

DECTANCYL 40 mg po J1 J8 J15 J21.

VAD classique (IVC): J1=J28.

ONCOVIN 0,4 mg/j J1 à J4 IVC.

ADRIPLASTINE 9 mg/m²/j J1 à J4 IVC.

DECTANCYL 40 mg/j J1 à J4 po.

VD (Velcade Dexaméthasone): J1=J21

VELCADE 1,3 mg/m²/j J1 J4 J8 J11 IVD.

Adaptation de doses: 1 mg/m² ou 0,7 mg/m² suivant les effets secondaires.

ATTENTION à la NEUROPATHIE.

DECTANCYL 40 mg/j J1 à J4 po.

Adaptation de doses: DEX 40 ou 20 mg po par semaine.

DCEP : J1=J28.

ENDOXAN 400 mg/m²/j J1 à J4 IVC.

CISPLATINE 15 mg/m²/j J1 à J4 IVC.

ETOPOSIDE 40 mg/m²/j J1 à J4 IVC.

DECTANCYL 40 mg/j J1 à J4 po.

VMCP : J1=J21

ONCOVIN 1 mg/m² J1 IV.

MELPHALAN 5 mg/m²/j J1 à J4 po.

ENDOXAN 100 mg/m²/j J1 à J4 po.

CORTANCYL 60 mg/m²/j J1 à J4 po.

BVAP: J1=J21

ONCOVIN 1 mg/m² J1 IV.

BICNU 25 mg/m² J1 IV.

ADRIBLASTINE 25 mg/m² J1 IV.

CORTANCYL 60 mg/m² J1 à J4 po.

VTD-PACE : J1=J28

VELCADE 1 mg/m² J1 J4 J8 J11 IV.

THALIDOMIDE 200 mg J1 à J4 po.

DEXAMETHASONE 40 mg J4 à J7 po.

CISPLATINE 10 mg/m² J1 à J4 IV.

ADRIAMYCINE 10 mg/m² J4 à J7 IV.

ENDOXAN 400 mg/m² J1 à J4 IV.

ETOPOSIDE 40 mg/m² J1 à J4 IV.

BP: J1=J28

BENDAMUSTINE 120 mg/m² J1 J2 IV.

PREDNISONE 60 mg/m² J1 à J4 IV ou po.

BTP : J1=J28

BENDAMUSTINE 60 mg/m² J1, J8, J15 IV

THALIDOMIDE 50 mg/j J1 à J28 po.

PREDNISONE 100 mg J1, J8, J15, J22 po.

VBD ou VBP : J1=J28

VELCADE 1,3 mg/m² J1 J8 J15 J22 IV.

BENDAMUSTINE 70 mg/m² J1, J8 IV.

DECTANCYL 20 ou 40 mg J1 J4 J8 J11 po.

Annexe 5

Standardisation bortézomib

Si on accepte un écart tolérable de 6,6% entre la dose prescrite et la dose préparée

Dose à 1,6 mg pour prescription entre 1,5 et 1,7 mg (écart max = 6,6%)

Dose à 1,8 mg pour prescription entre 1,7 et 1,9 mg (écart max = 5,8%)

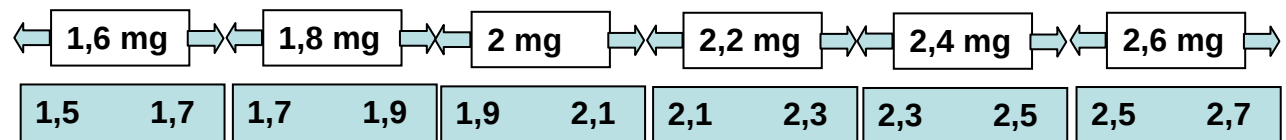
Dose à 2 mg pour prescription entre 1,9 et 2,1 mg (écart max = 5,2%)

Dose à 2,2 mg pour prescription entre 2,1 et 2,3 mg (écart max = 4,7 %)

Dose à 2,4 mg pour prescription entre 2,3 et 2,5 mg (écart max = 4,3 %)

Dose à 2,6 mg pour prescription entre 2,5 et 2,7 mg (écart max = 4 %)

Standardisation bortézomib



DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 17/10/2011

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par Mathilde Perissutti

Sujet : Etude de la stabilité d'une solution de bortézomib à
1mg/mL conditionnée en seringue de polypropylène –
Application à la production quotidienne d'une unité centralisée
de préparation de cytotoxiques pour le service d'hospitalisation
de jour d'Hématologie

Jury :

Président : M. Jean-Louis Merlin
Directeur : M. Jean Vigneron

Juges : M. Dominique Decolin
M. Philippe Fagnoni
M. Cyrille Hulin

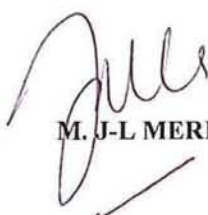
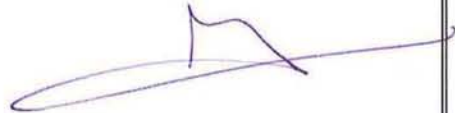
Vu,

Nancy, le 14/09/2011

Nancy, le 14/09/2011

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse


M. J-L MERLIN
M. J. VIGNERON

Vu et approuvé,

Nancy, le 19.09.11

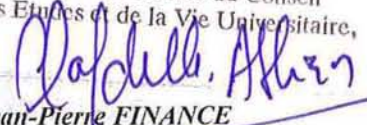
Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,


Francine PAULUS
FACULTE de PHARMACIE

Vu,

Nancy, le 26.9.2011

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

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

Jean-Pierre FINANCE
C. CAPDEVILLE-ATKINSON

N° d'enregistrement : 3771.

N° d'identification :

TITRE :

Etude de stabilité d'une solution de bortézomib à 1 mg/mL conservée en seringue de polypropylène au réfrigérateur et à température ambiante - Application à la production quotidienne d'une unité centralisée de préparations de cytotoxiques pour le service d'hospitalisation de jour d'Hématologie

Thèse soutenue le 17 octobre 2011

Par Melle Mathilde Perissutti

RESUME :

Le bortézomib, premier inhibiteur du protéasome, est en France actuellement le traitement de référence du myélome multiple. C'est un produit coûteux dont la stabilité de la solution reconstituée et conditionnée en seringue n'est que de 8h à 25°C selon le laboratoire, et de 5 jours à 5°C selon la publication d'André et al, Ann Pharmacotherapy 2005;39:1462-66. Il est difficile de préparer les seringues à l'avance ou de conserver, selon une procédure sécurisée, une seringue dont l'administration serait reportée au-delà de cette limite. L'étude de la stabilité d'une solution de bortézomib à 1 mg/mL conditionnée en seringue de polypropylène, avec comme critères de validation une perte de principe actif inférieure à 5% et une apparition de produit de dégradation inférieure à 1%, nous a montré que la solution de bortézomib à 1mg/mL est stable 35 jours après conservation entre 2 et 8°C, et 14 jours à température ambiante. Trois produits de dégradation sont apparus au réfrigérateur et six à température ambiante.

Ces résultats permettent l'organisation :

- en dose banding : dose standardisée non nominative ou
- en préparation standardisée nominative

La préparation de seringues à l'avance et la mise à disposition immédiate permet de limiter le temps de passage du patient en hôpital de jour. La réattribution des seringues non utilisées, selon une procédure de ré-étiquetage sécurisée, permet de n'avoir aucune perte financière en cas de préparation à l'avance et d'une annulation de cure.

La stabilité sur 35 jours à conservation entre 2 et 8°C a permis la réorganisation du circuit du Velcade® dans l'unité de préparation des cytotoxiques de l'hôpital de Brabois. Nous travaillons désormais en préparation standardisée nominative anticipée.

MOTS CLES : Bortézomib, stabilité, seringue, CLHP, dose-banding

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
M. Jean VIGNERON	Pharmacie Brabois Adultes CHU Nancy	Expérimentale