



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

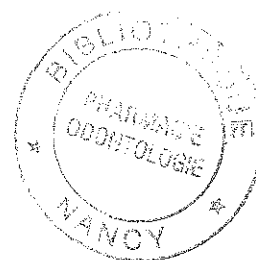
<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY 1

2006

ECOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT »

THESE



Présentée et soutenue publiquement
Le 10 Novembre 2006

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ – NANCY 1

Par Valérie BONNET – BERTHOLLE

Née le 3 Novembre 1974 à Nancy

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

ETUDE DE LA VARIABILITE PHARMACOCINETIQUE DU BUSULFAN ET EVALUATION CLINIQUE DE L'ADAPTATION BAYESIENNE DES POSOLOGIES DANS LE CONDITIONNEMENT DE GREFFE DE MOELLE OSSEUSE EN PEDIATRIE

MEMBRES DU JURY :

Madame le Professeur Saux (rapporteur)
Madame le Docteur Bleyzac
Monsieur le Professeur Aulagner
Monsieur le Professeur Sassard (rapporteur)
Monsieur le Professeur Vigneron

Madame le Professeur SAUX

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance.

Madame le Docteur BLEYZAC

Ce travail n'aurait jamais pu voir le jour sans votre très grande compétence, votre encadrement et votre disponibilité. Aucun remerciement ne sera jamais suffisant pour vous exprimer toute notre reconnaissance et notre respect.

Monsieur le Professeur AULAGNER

Nous vous remercions de nous avoir accueillis au sein de votre unité et de nous avoir permis de réaliser ce travail. Recevez ici l'expression de notre profonde reconnaissance

Monsieur le Professeur SASSARD

Vous avez accepté de lire et juger ce travail. Recevez ici l'expression de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur VIGNERON

Nous vous adressons tous nos remerciements pour votre présence parmi les membres de ce jury.

Monsieur le Professeur JELLIFFE

Votre collaboration et vos conseils ont été précieux pour la réalisation de ce travail. Nous avons été profondément marqués par le désir que vous avez de partager vos connaissances et votre savoir, avec beaucoup de pédagogie. Recevez ici l'expression de notre reconnaissance et nos sincères remerciements.



A toute ma famille,

A tous mes amis,

Et plus particulièrement à Brice, pour tes compétences incontournables en biostatistiques, ta gentillesse et ton immense participation à ce travail,

A Nath, il faudrait des caisses entières de merci pour l'implication dont tu as fait preuve dans ce travail et cela risquerait d'être encore insuffisant. Outre tes compétences professionnelles et ton implication personnelle, ton soutien aura été primordial tout au long de ce labeur. Je ne l'oublierai jamais.

Merci à vous tous

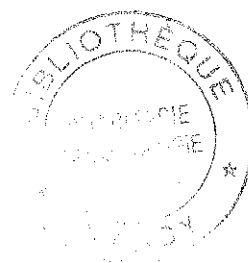
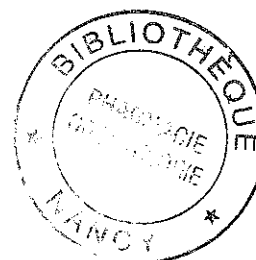


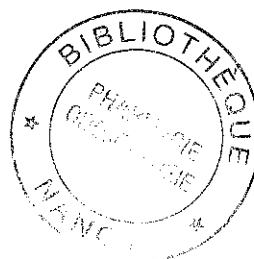
TABLE DES MATIERES



LISTE DES TABLEAUX.....	5
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	10
PREMIERE PARTIE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	11
1. LA GREFFE DE MOELLE OSSEUSE	12
1.1. <i>Historique</i>	12
1.2. <i>Les différents types de greffes de moelle osseuse allogéniques.....</i>	13
1.3. <i>Indications de la greffe de moelle osseuse</i>	14
1.3.1. Hémopathies malignes	15
1.3.2. Hémoglobinopathies	15
1.3.3. Maladies métaboliques.....	16
1.3.4. Déficits immunitaires	16
1.3.5. Aplasies médullaires	17
1.4. <i>Conditionnement pré-greffe</i>	17
1.5. <i>Complications de la greffe de moelle osseuse.....</i>	19
1.5.1. Complications précoces.....	19
1.5.1.1. Maladie du greffon contre l'hôte (GVH)	19
a/ GVH aiguë.....	20
b/ GVH chronique.....	21
1.5.1.2. Complications infectieuses	22
1.5.1.3. Maladie veno-occlusive du foie.....	23
a/ Pathogénèse	23
b/ Diagnostic.....	24
c/ Facteurs de risque	25
d/ Traitement préventif.....	25
e/ Traitement « curatif ».....	26
1.5.1.4. Complications gastro-intestinales	27
1.5.1.5. Autres complications	28
a/ Complications pulmonaires.....	28
b/ Complications urinaires	28
c/ Insuffisance médullaire.....	28
d/ Rejet de greffe.....	28
1.5.2. Complications tardives.....	29
1.5.2.1. Complications endocriniennes.....	29

1.5.2.2.	Complications oculaires.....	29
1.5.2.3.	Complications orthopédiques	30
1.5.2.4.	Complications pulmonaires	30
1.5.2.5.	Complications tumorales	30
2.	LE BUSULFAN	31
2.1.	<i>Caractéristiques Physico-Chimiques.....</i>	<i>31</i>
2.2.	<i>Mécanisme d'Action.....</i>	<i>31</i>
2.3.	<i>Effets Indésirables et Toxicité.....</i>	<i>31</i>
2.3.1.	Toxicité digestive.....	32
2.3.2.	Toxicité hépatique.....	32
2.3.3.	Toxicité neurologique.....	32
2.3.4.	Toxicité pulmonaire	33
2.3.5.	Toxicité vésicale.....	33
2.4.	<i>Utilisation Clinique du Busulfan.....</i>	<i>34</i>
2.5.	<i>Pharmacocinétique du Busulfan</i>	<i>35</i>
2.5.1.	Absorption digestive	37
2.5.2.	Distribution	37
2.5.3.	Métabolisme.....	37
2.5.4.	Élimination.....	39
2.6.	<i>Variabilité pharmacocinétique inter-individuelle du busulfan</i>	<i>39</i>
2.6.1.	Age.....	39
2.6.2.	Pathologie	41
2.6.3.	Biodisponibilité du busulfan	42
2.6.4.	Rythme circadien (chronobiologie).....	42
3.	LA PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION	44
3.1.	<i>Définition.....</i>	<i>44</i>
3.1.1.	Méthodes de régression.....	44
3.1.2.	Pharmacocinétique de population.....	45
3.1.2.1.	Méthode du Pool de données (« Naive Pooled data »).....	45
3.1.2.2.	Méthodes en deux étapes (two stage)	45
3.1.2.3.	Méthodes en une étape.....	46
a/	Méthodologie NONMEM = méthode à effets mélangés.....	46
b/	Méthodes non paramétriques (NPEM, NPAG, NPML)	47
3.2.	<i>Adaptation bayésienne de posologie.....</i>	<i>48</i>
4.	INTERET DU SUIVI THERAPEUTIQUE.....	51
	DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL	54
1.	OBJECTIFS.....	55
2.	MATERIEL ET METHODE.....	58

2.1. Patients.....	58
2.1.1. Etude de pharmacocinétique de population.....	58
2.1.2. Etude chez les nourrissons de moins de 9 kg	60
2.1.3. Etude EVODI.....	62
2.2. Méthode analytique.....	64
2.3. Recueil et traitement des données.....	64
2.4. Etude de pharmacocinétique de population.....	66
2.4.1. Recherche du modèle d'erreur	67
2.4.2. Etude des paramètres pharmacocinétiques et de l'influence de la pathologie	68
2.4.3. Etude de la variabilité intra-individuelle (AUC)	69
2.5. Etude chez le nourrisson.....	69
2.6. Etude EVODI.....	70
2.6.1. Etude des MVO.....	70
2.6.2. Ajustement	70
2.6.3. Procédure d'analyse des sommes cumulées avec ajustement en fonction du risque (RA-CUSUM).....	70
2.6.4. Interprétation.....	72
3. RESULTATS	73
3.1. Etude de pharmacocinétique de population.....	73
3.1.1. Choix du modèle d'erreur	73
3.1.2. Estimation des paramètres pharmacocinétiques en fonction de la pathologie.....	76
3.1.3. Etude la variabilité intra-individuelle : comparaison des AUC obtenues pour chaque jour de traitement	88
3.2. Etude chez le nourrisson	93
3.3. Etude EVODI.....	98
3.3.1. Score de risque.....	98
3.3.2. Incidence des MVO.....	99
3.3.3. Procédure d'analyse des sommes cumulées avec ajustement en fonction du risque (RA-CUSUM)	100
4. DISCUSSION	103
4.1. Etude de Pharmacocinétique de population	103
4.1.1. Choix du modèle d'erreur	103
4.1.2. Etude de l'influence de la pathologie sur la pharmacocinétique du busulfan.....	104
4.1.3. Etude de la variabilité intra-individuelle : comparaison des AUC obtenues pour chaque jour de traitement	108
4.2. Etude chez le nourrisson.....	109
4.3. Etude EVODI.....	111
CONCLUSION	116
ANNEXES	118

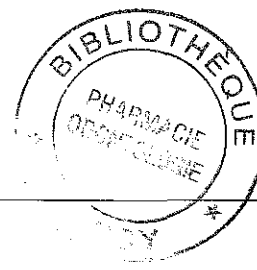


LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau I : Principaux protocoles de conditionnement pré-greffe de moelle osseuse réalisés à l'hôpital Debrousse.....</i>	<i>18</i>
<i>Tableau II : Stades et grades de GVH d'après la classification de Glucksberg.....</i>	<i>20</i>
<i>Tableau III : Paramètres pharmacocinétiques du busulfan (moyenne $\pm$ écart-type, valeurs extrêmes).....</i>	<i>36</i>
<i>Tableau IV : Caractéristiques des 100 patients de l'étude.....</i>	<i>58</i>
<i>Tableau V : Classes des pathologies étudiées.....</i>	<i>59</i>
<i>Tableau VI : Caractéristiques des nourrissons.....</i>	<i>61</i>
<i>Tableau VII : Caractéristiques des patients de l'étude EVODI.....</i>	<i>63</i>
<i>Tableau VIII : Critères de comparaison de l'estimation des paramètres K_a, V_s et K_{el} obtenus dans les six modèles d'erreur analytique</i>	<i>74</i>
<i>Tableau IX : Bornes des paramètres pharmacocinétiques étudiés</i>	<i>76</i>
<i>Tableau X : Estimation des paramètres pharmacocinétiques dans la population totale et par classe de pathologie.....</i>	<i>77</i>
<i>Tableau XI: Coefficient de détermination (R^2), biais (ME) et précision (MSE) obtenus a posteriori dans la population globale et par classe de pathologie (résultats obtenus avec les paramètres pharmacocinétiques estimés médians)</i>	<i>85</i>
<i>TableauXII : AUC moyenne par dose pour chaque jour du conditionnement et pourcentage de variation des AUC par rapport à l'AUC calculée à J1</i>	<i>90</i>
<i>Tableau VII : AUC moyenne par milligramme de busulfan pour chaque jour du conditionnement et pourcentage de variation des AUC par rapport à l'AUC calculée à J1</i>	<i>92</i>

<i>Tableau XIV : Evaluation clinique après individualisation des posologies de busulfan chez les nourrissons.....</i>	<i>94</i>
<i>Tableau XV : Etude des facteurs « Age » et « Poids ».....</i>	<i>96</i>
<i>Tableau XVI : Caractéristiques des onze patients ayant développé une MVO.....</i>	<i>100</i>

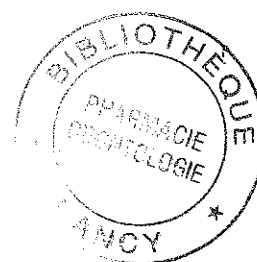




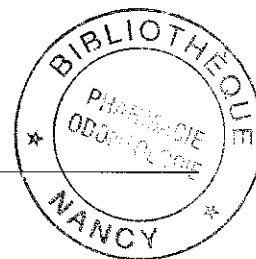
LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Métabolisme du busulfan selon Hassan et al. (89)	38
Figure 2 : Total SD	75
(Courbe d'erreur analytique multipliée par le coefficient gamma)	75
Figure 3 : Densité de probabilité marginale de la constante d'absorption pour la population globale.....	79
Figure 4 : Densité de probabilité marginale de la constante d'absorption pour la population « Maladies métaboliques »	79
Figure 5 : Densité de probabilité marginale de la constante d'absorption pour la population « Hémoglobinopathies »	80
Figure 6 : Densité de probabilité marginale de la constante d'absorption pour la population « Maladies hématologiques malignes »	80
Figure 7 : Densité de probabilité marginale de la constante d'absorption pour la population « Déficits immunitaires »	81
Figure 8 : Densités de probabilité jointives des paramétrisations Cl et Vs de la population totale.....	82
Figure 9 : Densités de probabilité jointives des paramétrisations Cl et Vs de la population "Maladies métaboliques"	82
Figure 10 : Densités de probabilité jointives des paramétrisations Cl et Vs de la population "Maladies hématologiques non malignes"	83
Figure 11 : Densités de probabilité jointives des paramétrisations Cl et Vs de la population "Maladies hématologiques malignes"	83
Figure 12 : Densités de probabilité jointives des paramétrisations Cl et Vs de la population "Déficits immunitaires"	84
Figure 13 : Résidus pondérés en fonction de la concentration de busulfan pour la population globale.....	86
Figure 14 : Résidus pondérés en fonction de la concentration de busulfan pour la population « Maladies métaboliques »	86
Figure 15 : Résidus pondérés en fonction de la concentration de busulfan pour la population « Hémoglobinopathies »	87

<i>Figure 16 : Résidus pondérés en fonction de la concentration de busulfan pour la population « Maladies hématologiques malignes »</i>	87
<i>Figure 17 : Résidus pondérés en fonction de la concentration de busulfan pour la population « Déficits immunitaires »</i>	88
<i>Figure 20 : AUC moyenne par milligramme de busulfan obtenue pour chaque jour de conditionnement</i>	93
<i>Figure 21 : Etude de la corrélation entre dose de busulfan et AUC moyenne</i>	95
<i>Figure 22 : Corrélation entre la dose totale de busulfan reçue et (a) l'âge ; (b) le poids corporel</i>	97
<i>Figure 23: Corrélation entre le poids et la dose estimée pour obtenir une AUC = 4 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}.\text{h}$; (b) la clairance totale du busulfan</i>	97
<i>Figure 24 : Distribution du score de risque estimé de MVO avant transplantation</i>	99
<i>Figure 25 : Sommes cumulées avec ajustement en fonction du risque (RA CUSUM)...</i>	101



LISTE DES ABREVIATIONS



AUC : Area Under the Curve (aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps)

BU : Busulfan

C_{max} : Concentration plasmatique maximale

C_{ss} : Concentration plasmatique à l'équilibre (Steady State)

Cl : clairance

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : CytoMegalovirus

CY : Cyclophosphamide

DICS : Déficit Immunitaire Combiné Sévère

EBV : Epstein-Barr Virus

FA : Fraction d'Absorption

GMO : Greffe de Moelle Osseuse

GVH : Graft Versus Host disease (maladie du greffon contre l'hôte)

HLA : Human Leucocyte Antigen

ICT : Irradiation Corporelle Totale

IT2B : Iterative 2 stage Bayesian

K_a : constante d'absorption

K_{el} : constante d'élimination

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aiguë Myéloblastique

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

ME : Mean Error

MSE : Mean Squared Error

NONMEM : Non linear Mixed Effect Model

NPAG : Non parametric Adaptative Grid

NPEM : Non Parametric Expectation Maximisation

RC : Rémission Complète

SMD : Syndrome Myélodysplasique

V_d : volume de distribution

V_s : volume de distribution rapporté au poids corporel

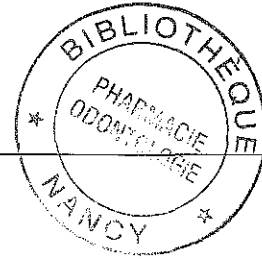
INTRODUCTION

La greffe de moelle osseuse allogénique a permis d'améliorer le pronostic de nombreuses pathologies affectant l'hématopoïèse en substituant la moelle pathologique par la moelle saine du donneur. Les principales indications de la transplantation de moelle osseuse sont les maladies hématologiques malignes (leucémies aiguës myéloïdes et lymphoïdes, syndromes myélodysplasiques), les maladies hématologiques non malignes dont les hémoglobinopathies (drépanocytose, thalassémie), les maladies métaboliques et les déficits immunitaires. En fonction de l'indication de la greffe, un conditionnement pré-greffe incluant du busulfan est préconisé. L'exposition systémique au busulfan doit être suffisante afin de permettre la prise de greffe. Cependant, la toxicité importante de cette molécule, et notamment le risque de développement d'une maladie veno-occlusive hépatique potentiellement fatale, impose l'utilisation d'une dose minimale efficace.

Plusieurs études ont mis en évidence la grande variabilité inter-individuelle et intra-individuelle de la pharmacocinétique du busulfan en pédiatrie. En collaboration avec le service d'hématologie, la pharmacie réalise une adaptation bayésienne des posologies de busulfan lors des conditionnements pré-greffe afin d'ajuster au mieux la dose administrée au patient en fonction de ses propres paramètres pharmacocinétiques. L'objectif de notre étude a été d'obtenir des données de pharmacocinétique de population spécifiques à notre population pédiatrique ainsi que d'étudier l'influence de la pathologie sur la pharmacocinétique du busulfan. Nous avons également étudié le cas plus particulier des nourrissons de moins de 9 kg (toutes pathologies confondues) . Enfin, nous avons validé l'intérêt clinique de notre procédure d'adaptation quotidienne des posologies de busulfan par une méthode statistique (méthode d'analyse des sommes cumulées avec ajustement en fonction du risque).

PREMIERE PARTIE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1. LA GREFFE DE MOELLE OSSEUSE



1.1. HISTORIQUE

La transplantation médullaire est une thérapeutique destinée à rétablir le fonctionnement de la moelle osseuse en apportant chez le receveur des cellules souches hématopoïétiques fonctionnelles. Elle est envisagée chez des patients pour lesquels il n'existe pas d'autres alternatives thérapeutiques et dont la pathologie engage le pronostic vital à plus ou moins long terme.

Historiquement, les premières tentatives de greffe de moelle osseuse sont rapportées à la fin du XIX^{ème} siècle par Brown-Séquard après administration de moelle par voie orale (1). Plus d'un demi siècle plus tard, après la description du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par Dausset, les premières tentatives d'injection de moelle osseuse chez l'homme sont rapportées par Thomas et al. en 1957 (2) puis par Mathé et al. en 1959 (3). D'autres équipes s'engagent dans la voie de la transplantation médullaire. Malgré l'observation de la prise de greffe, ces premiers patients ont une survie limitée du fait de rechute précoce, de la survenue d'une maladie du greffon contre l'hôte ou d'infections. Dans les années 70, le développement des connaissances relatives au système du CMH (encore appelé système HLA pour Human Leucocytes Antigen) et la réalisation de greffes HLA identiques ainsi que la meilleure prise en charge des infections survenant au décours de la greffe permettent d'améliorer la survie des patients transplantés. Le méthotrexate est la première molécule à démontrer son efficacité dans la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte (4). La ciclosporine est ensuite le premier immunosuppresseur non cytotoxique utilisé pour la prophylaxie et le traitement de la maladie du greffon contre l'hôte. Storb et al. (5) démontrent l'efficacité de l'association du méthotrexate et de la ciclosporine dans la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte.

Parallèlement, les traitements utilisés pour les conditionnements pré-greffe se diversifient. Cette étape permet d'obtenir d'une part une myélosuppression permettant au greffon de prendre la place de la moelle à remplacer et une immunosuppression d'autre

part afin d'éviter que l'organisme receveur ne rejette le greffon. Les premiers conditionnements associaient une chimiothérapie (cyclophosphamide) à une irradiation corporelle totale. Santos et al. rapportent en 1983 l'utilisation du busulfan (8 à 20 mg/kg) en association au cyclophosphamide (200 mg/kg) sans radiothérapie dans le cadre de leucémies aiguës myéloïdes (6). Cette même association est également relatée par Blazar en 1985 chez quatre enfants atteints de pathologies non malignes (7) puis par Antin et al. (avec en plus procarbazine et sérum antilymphocytaire) avant une greffe chez un enfant présentant une hémoglobinurie paroxystique nocturne (8). L'emploi du busulfan lors des conditionnements pré-greffe s'est rapidement élargi à d'autres indications : leucémies aiguës de l'enfant (9), beta-thalassémie majeure (10), leucémies aiguës et chroniques de l'adulte (11) ...

1.2. LES DIFFERENTS TYPES DE GREFFES DE MOELLE OSSEUSE ALLOGENIQUES

Lorsque le donneur et le receveur sont deux personnes distinctes, il est indispensable de prendre en compte l'aspect immunologique de la greffe. Chaque individu possède normalement des cellules immunocompétentes capables de distinguer les cellules du soi et du non-soi via la présentation d'antigènes de surface. Si ces antigènes de surface sont reconnus différents du « soi » par les cellules immunocompétentes, celles-ci vont déclencher une réaction immunitaire destinée à détruire les cellules reconnues comme étrangères. Les antigènes de surface qui seront reconnus par les cellules immunocompétentes sont les antigènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), encore appelé système HLA (Human Leucocyte Antigen). Deux groupes principaux d'antigènes d'histocompatibilité ont été identifiés :

- les antigènes de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), présents à la surface de la très grande majorité des cellules nucléées de l'organisme
- les antigènes de classe II (principalement HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ), présents uniquement au niveau des lymphocytes T activés et B, des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques.

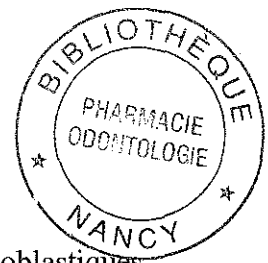
D'autres antigènes d'histocompatibilité, appelés antigènes mineurs d'histocompatibilité, interviennent également dans les réactions immunitaires survenant au décours des transplantations. Ces antigènes, encore mal identifiés, possèdent tout comme les antigènes du CMH, une forte immunogénicité malgré leur dénomination.

En tenant compte des différentes possibilités d'histocompatibilité, on distingue trois types de greffe de moelle allogénique :

- Greffe géno-identique familiale : le donneur est un frère ou une sœur du receveur, le donneur et le receveur possédant les mêmes antigènes HLA. Des différences existent néanmoins au niveau d'autres antigènes que ceux du CMH et sont impliqués dans les réactions du greffon contre l'hôte.
- Greffe phéno-identique : le donneur n'est généralement pas apparenté au receveur (donneur volontaire inscrit sur un fichier). On recherchera une compatibilité pour les antigènes HLA-DR, HLA-DQ, HLA-A, HLA-B.
- Greffe incompatible ou « mismatch » : la compatibilité HLA entre donneur et receveur n'est retrouvée que pour un haplotype, le second haplotype présentant une incompatibilité au niveau d'un ou plusieurs antigènes du CMH.

1.3. INDICATIONS DE LA GREFFE DE MOELLE OSSEUSE

La greffe de moelle osseuse est une thérapeutique non dénuée de risque et qui ne doit être envisagée qu'en l'absence d'alternative. Les pathologies pour lesquelles une transplantation médullaire est préconisée chez l'enfant comprennent notamment les hémopathies malignes, les hémoglobinopathies, certaines maladies métaboliques, les déficits immunitaires ou les aplasies médullaires.



1.3.1. Hémopathies malignes

La greffe de moelle osseuse sera envisagée lors des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) dès l'obtention de la première rémission complète dans le cas des LAL à très haut risque (LAL VHR, very high risk) lorsqu'une possibilité de greffe géno-identique existe. Pour les LAL non VHR, une greffe est indiquée en cas de rechute et après obtention d'une seconde rémission. Elle est réalisée avec un donneur géno (préférentiellement) ou phéno-identique.

Les enfants atteints de leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) sont greffés en première rémission s'il existe un donneur géno-identique ou en seconde rémission en l'absence de donneur familial géno-identique.

Dans le cas des syndromes myélodysplasiques, la greffe est le seul traitement permettant d'espérer une guérison. Parmi les syndromes myélodysplasiques, la classification franco-americano-britannique (classification FAB) distingue les anémies réfractaires, les anémies sidéroblastiques, les anémies réfractaires avec excès de blastes (AREB) et les anémies réfractaires avec excès de blastes en transformation (AREB-t). Les leucémies myélomonocytaires juvéniles chroniques ont récemment été reclassées dans les syndromes myéloprolifératifs.

1.3.2. Hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies sont des anomalies qualitatives ou quantitatives de l'hémoglobine. Les thalassémies sont caractérisées par un défaut de synthèse d'une ou plusieurs chaînes de l'hémoglobine (β , α ou γ). Les thalassémies majeures, formes retrouvées chez les sujets homozygotes sont une indication de greffe de moelle osseuse. Les premières transplantations ont été réalisées par l'équipe de Lucarelli (12).

La drépanocytose, ou anémie falciforme, est une anomalie qualitative de l'hémoglobine touchant les chaînes β et ayant pour origine le remplacement d'un acide aminé, le glutamate, par une valine en position 6 de cette chaîne β . Dans les formes graves de la maladie, la sévérité des complications thrombotiques (infarctus de localisation variée,

accidents vasculaires cérébraux...) font de la greffe de moelle osseuse une thérapeutique désormais envisagée (13).

1.3.3. Maladies métaboliques

Cet ensemble regroupe des pathologies caractérisées par un déficit enzymatique, aboutissant à une accumulation tissulaire de substrats non dégradés. L'enzyme déficiente peut dans certains cas être apportée par des cellules souches hématopoïétiques. Parmi ces différentes maladies, on peut notamment citer :

- la mucopolysaccharidose de type I ou maladie de Hurler (déficit en alpha L-iduronidase avec accumulation de mucopolysaccharides)
- la mucopolysaccharidose de type II ou maladie de Hunter (déficit en iduronate-sulfatase avec accumulation de mucopolysaccharides)
- la maladie de Niemann-Pick (trouble du métabolisme des graisses dû à un déficit en sphingomyélinase, d'où accumulation de sphingomyéline)
- la maladie de Günther ou porphyrie (déficit en enzyme du métabolisme des porphyrines)
- l'ostéopétrose ou maladie d'Albers-Schönberg, due à un dérèglement de la résorption des ostéoclastes

1.3.4. Déficits immunitaires

La gravité des déficits immunitaires repose sur l'incapacité de l'organisme à se défendre contre les infections. La greffe de moelle osseuse doit donc être envisagée le plus rapidement possible afin d'éviter les complications liées aux infections diverses. Les déficits immunitaires combinés sévères (DICS) s'expriment par des manifestations infectieuses dès les premiers mois de la vie (14) (Stephan et al., 1993). D'autres déficits immunitaires tel que le syndrome de Wiskott-Aldrich (dysgammaglobulinémie avec augmentation des Ig A et diminution des Ig M, perturbation de l'hypersensibilité retardée et thrombocytopénie) ont une révélation généralement plus tardive.

1.3.5. Aplasies médullaires

L'aplasie médullaire est définie par une atteinte du tissu myéloïde se traduisant biologiquement par une pancytopenie. Dans près de 85% des cas, aucune cause n'est retrouvée et l'on parle d'aplasie médullaire idiopathique. Dans les autres cas, outre des origines infectieuses ou toxiques, les aplasies constitutionnelles constituent 30% des aplasies diagnostiquées chez l'enfant. La maladie de Fanconi est la forme d'aplasie médullaire constitutionnelle la plus fréquemment retrouvée : on retrouve en plus des anomalies de l'hémogramme une fragilité chromosomique caractéristique et des malformations notamment au niveau des mains ainsi qu'un faciès typique.

Dans les formes sévères d'aplasie médullaire, les polynucléaires neutrophiles sont inférieurs à 0,5 G/l et les plaquettes inférieures à 20 G/l (15) (Camitta et al., 1982). La greffe de moelle osseuse est le meilleur traitement des formes sévères.

1.4. CONDITIONNEMENT PRE-GREFFE

La phase de conditionnement pré-greffe est une étape préliminaire à la transplantation médullaire que l'on retrouve dans la très grande majorité des indications nécessitant une greffe de moelle. Seuls quelques cas de déficits immunitaires combinés sévères ne nécessitent pas de conditionnement, la prise du système lymphoïde du donneur se faisant avec conservation de l'hématopoïèse du receveur.

Le conditionnement consiste d'une part à provoquer une myéloablation afin de fournir la place nécessaire au greffon. Il permet d'autre part d'obtenir une immunosuppression indispensable à la prise de greffe. Cette destruction du tissu hématopoïétique vise également dans le cas des hémopathies malignes à détruire les cellules leucémiques ayant résisté aux traitements antérieurs.

Les protocoles utilisés lors des conditionnements diffèrent notamment en fonction de l'indication de la greffe, du type de greffe (géo ou phéno-identique), de l'âge de l'enfant et du centre. Ils combinent irradiation corporelle totale (ICT) et chimiothérapie dans le

cas des LAL chez l'enfant de plus de quatre ans. Les conditionnements purement chimiothérapiques prévalent dans les autres indications. Les principaux protocoles de conditionnement pratiqués à l'hôpital Debrousse sont résumés dans le tableau I.

Tableau I : Principaux protocoles de conditionnement pré-greffe de moelle osseuse réalisés à l'hôpital Debrousse

Diagnostic	Protocole (dose totale de chimiothérapie)
LAL, > 4 ans (1 ^{ère} ligne)	CY (120 mg/kg) + ICT
LAL, < 4 ans et > 1 an (1 ^{ère} ligne)	BU (16 mg/kg) + CY (120 mg/kg)
LAL, >1 an 1 ^{ère} ligne (protocole Interfant)	BU (20 mg/kg) + CY (120 mg/kg) + VP16 (40 mg/kg)
LAL (rechute)	TAM 12
LAM (1 ^{ère} ligne)	BU (16 mg/kg) + CY (200 mg/kg)
LAM (rechute)	CY + ICT
SMD	BU (20 mg/kg) + CY (120 mg/kg) + Melphalan (140 mg/kg)
Thalassémie, drépanocytose	BU (16 mg/kg) + CY (120 mg/kg) - SAL systématique
Hurler, Hunter	BU (600 mg/m ²) + CY (200 ou 260 mg/kg) - SAL systématique
DICS, > 6 ans	BU (20 mg/kg) + CY (200 mg/kg)
DICS, < 6 ans	BU (16 mg/kg) + CY (200 mg/kg)
Aplasie médullaire	BU (16 mg/kg) + CY (200 mg/kg) - SAL systématique Pas de busulfan si greffe géno-identique

CY : cyclophosphamide, ICT : irradiation corporelle totale, BU : busulfan, VP 16 : étoposide, TAM : ICT(12Gy)+Aracytine+Melphalan, SAL : sérum antilymphocytaire.

Du sérum antilymphocytaire (THYMOGLOBUINE®) est ajouté pour toute greffe non géno-identique (10 à 20 mg/kg).

1.5. COMPLICATIONS DE LA GREFFE DE MOELLE OSSEUSE

Malgré les progrès réalisés depuis vingt ans, les complications liées à la transplantation médullaire restent un problème majeur dans l'évolution de la greffe de moelle. Elles résultent de la toxicité du traitement administré lors du conditionnement (chimiothérapie et/ou irradiation corporelle totale), de la réaction du greffon contre l'hôte et de problèmes liés à la pathologie initiale (16) (Tabbara et al., 2002). Ces complications peuvent survenir précocement au décours de la greffe ou plus tardivement et se chroniciser. La toxicité inhérente à la greffe est cependant généralement moins sévère chez l'enfant que chez l'adulte.

1.5.1. Complications précoces

1.5.1.1. Maladie du greffon contre l'hôte (GVH)

La maladie du greffon contre l'hôte (ou GVH : Graft Versus Host disease) est une complication fréquente et grave de la greffe de moelle osseuse qui affecte 10 à 50% des patients recevant une greffe d'un donneur géno-identique et jusqu'à plus de 75% des patients transplantés avec un donneur phéno-identique selon les différentes études. Il s'agit d'une réaction immunitaire faisant intervenir les lymphocytes T du greffon qui vont réagir contre les antigènes tissulaires du receveur non présents chez le donneur. Les antigènes tissulaires les plus immunogènes sont ceux du CMH. Les antigènes mineurs d'histocompatibilité sont également mis en cause dans les GVH puisque de telles réactions surviennent au décours de greffes géno-identiques. Le conditionnement pré-greffe provoque une immunosuppression qui rend le receveur incapable de rejeter les lymphocytes T du greffon.

On distingue deux types de GVH (17) : les GVH aiguës, survenant généralement dans les deux premiers mois suivants la greffe de moelle (le plus souvent au cours des deux premières semaines) et les GVH chroniques (Ferrara et al., 1991). Les GVH chroniques peuvent faire suite à une GVH aiguë ou survenir isolément dans un délai plus ou moins long après la greffe.

a/ GVH aiguë

Au cours d'une GVH aiguë, les principaux organes touchés sont la peau, le foie et le système digestif, plus précisément les intestins. On peut également observer une majoration du déficit immunitaire associée histologiquement à une atrophie et une dysplasie du thymus (18) (Lum et al., 1987). La classification de Glucksberg-Seattle (19), modifiée par Thomas (20), distingue quatre stades (côtés de 1 à 4) et quatre grades (notés de I à IV) de gravité. Le tableau II résume cette classification (21) (Sullivan et al., 1986).

Tableau II : Stades et grades de GVH d'après la classification de Glucksberg

	Peau	Foie	Intestin	Altération de l'état général
Stade 1	Rash maculopapuleux < 25% surface corporelle	Bb : 20 à 30 mg/l (33 à 50 µg/ml)	Diarrhée : 10-15 ml/kg/j	
Stade 2	Rash maculopapuleux 25% à 50% de la surface corporelle	Bb : 31 à 60 mg/l (50 à 100 µg/ml)	Diarrhée : 16-20 ml/kg/j	
Stade 3	Erythrodermie généralisée	Bb: 61 à 150 mg/l (100 à 255 µg/ml)	Diarrhée : 21-25 ml/kg/j	
Stade 4	Desquamation, épidermolyse bulleuse	Bb : >150 mg/l (255 µg /ml)	Diarrhée : >25 ml/kg/j	
Grade I	+ à +++	0	0	0
Grade II	+ à +++	+	+	+
Grade III	++ à +++	++ à +++	++ à +++	++
Grade IV	++ à ++++	++ à ++++	++ à ++++	+++

Bb : bilirubine

Le grade I signe une GVH mineure, on parle de GVH modérée pour le grade II, les GVH sont sévères pour les grades III et IV, engageant le pronostic vital. Très largement utilisée, cette classification a été réévaluée lors d'une conférence de consensus suggérant notamment la réalisation de nouvelles études afin d'évaluer le devenir des patients atteints de GVH aiguës de différents grades à plus ou moins long terme (22) (Przepiorka et al., 1995). Un autre index de sévérité des GVH a été développé par Rowlings et al. (23). Il permet de pallier le manque de prédictivité concernant la mortalité et le risque de rejet de greffe associés au grade de GVH et a été comparé à la classification de Glucksberg (24) (Martino et al., 1999).

Le traitement prophylactique de la GVH aiguë comprend de la ciclosporine, associée ou non au méthotrexate. Du sérum antilymphocytaire est également utilisé en cas de greffe phéno-identique ainsi que dans les thalassémies. Martin et al. ont corrélé la sévérité des GVH aiguës et les concentrations sanguines résiduelles de ciclosporine mesurés au cours des deux premières semaines après la greffe (25). Cette étude a ainsi permis de définir des cibles thérapeutiques lors du suivi des ciclosporinémies. Ces cibles dépendent de la pathologie initiale et sont fonction du souhait d'obtention d'une GVH de grade I-II ou non. Plusieurs études relatent également l'utilisation du tacrolimus en remplacement de la ciclosporine, seul ou en association au méthotrexate (26) (Ratanatharathorn et al., 1998), (27) (Nash et al., 2000) en traitement prophylactique de la GVH.

Le traitement de la GVH aiguë fait appel à la corticothérapie, associée à un renforcement du traitement par ciclosporine. En cas d'échec, du sérum antilymphocytaire ou des anticorps monoclonaux anti-récepteurs à l'IL2 (LEUCOTAC®, XENAPAX®) peuvent être utilisés (28) (Zecca et al., 2000).

b/ GVH chronique

Deux formes cliniques sont décrites en fonction de l'extension de la maladie. Les atteintes limitées associent une atteinte cutanée localisée à type de lichen plan primitif et/ou une atteinte hépatique. Ces formes sont de bon pronostic. Les atteintes extensives ont par contre un pronostic plus réservé. L'atteinte cutanée est alors généralisée et

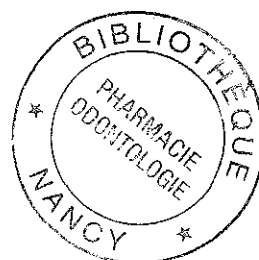
ressemble à la sclérodermie. Elle s'accompagne d'une atteinte hépatique cholestatique, associant parfois des signes de cytolyse. Un syndrome sec ressemblant au syndrome de Sjögren est fréquent. L'atteinte du système oculaire est possible. Le système hématopoïétique est également touché dans les formes sévères, une thrombocyémie sévère étant un signe de gravité (29) (Sullivan et al., 1988). La présence d'une GVH chronique accentue le déficit immunitaire et retarde la reconstitution de l'immunité.

Le traitement des formes cliniques est basé sur une majoration de l'immunosuppression (avec les risques que cela comporte) : corticothérapie, ciclosporine, azathioprine (IMUREL®), mycophénolate (CELLCEPT®). En cas d'échec, d'autres traitements ont été proposés : thalidomide, psoralène, puvathérapie, TNF (tumor Necrosis Factor), anticorps monoclonaux anti-CD 20 (30) (Ratanatharathorn et al., 2001).

1.5.1.2. Complications infectieuses

Du fait de l'immunosuppression, les infections sont une cause majeure de morbidité et de mortalité après une greffe de moelle osseuse. Durant la période d'aplasie, les infections bactériennes et fongiques sont les plus fréquentes, avec des atteintes le plus souvent de type septicémique, pulmonaire ou cutané. La mortalité de ces infections est estimée entre 3 et 5% (16) (Tabarra et al., 2002). Les infections fongiques posent des problèmes diagnostiques et thérapeutiques plus complexes que les infections bactériennes. Les champignons les plus fréquemment incriminés sont les *Candida* et les *Aspergillus* (*A. flavus* et *A. fumigatus* principalement).

Le déficit en lymphocytes T expose également au risque d'infection virale. Les infections herpétiques sont très fréquentes, avec une localisation le plus souvent labiale, buccale ou oesophagienne. Varicelle et zona sont des maladies graves chez l'immunodéprimé, avec risque de dissémination. Les atteintes à cytomégalovirus (CMV) ont généralement une localisation pulmonaire (pneumopathie interstitielle) ou cérébrale dans les formes les plus redoutables rencontrées après une greffe de moelle osseuse. Chez les patients porteurs du virus EBV, des syndromes lymphoprolifératifs EBV-induits sont possibles, notamment en cas de greffe phéno-identique (31) (Chiang et al., 2000).



La prévention de ces infections se fait par la mise en place de mesures d'isolement lourdes : le patient est placé dans une chambre stérile, alimentée en air stérile par un flux laminaire en pression positive, tous les objets introduits dans cette pièce sont stérilisés et les personnes en contact avec l'enfant suivent un protocole strict d'hygiène et d'habillement. Les patients reçoivent par voie orale une antibiothérapie non absorbable afin d'obtenir une décontamination digestive et tous leurs aliments sont stérilisés.

1.5.1.3. Maladie veno-occlusive du foie

La maladie veno-occlusive (MVO) du foie est l'une des complications majeures après une greffe de moelle osseuse. Son incidence varie selon les études, en fonction notamment de la population étudiée, de l'indication de la greffe, du type de greffe ou du type de conditionnement réalisé. Elle est estimée chez l'enfant entre 1 et 28% (32 à 39) (Brugières et al., 1988 – Ozkaynak et al., 1991 – Meresse et al., 1992 – Bisogno et al., 1997 – Locasciulli et al., 1997 – Ortega et al., 1997 – Hasegawa et al., 1998 – Frisk et al., 1998) pour des greffes effectuées pour des indications variées (hémopathies malignes, tumeurs de Wilms, tumeurs solides, rhabdomyosarcome...). Cette incidence atteint 50 à 60% dans certaines séries. La maladie veno-occlusive est la troisième cause de mortalité après la GVH et les complications infectieuses durant la période post-greffe (40) (Remberger et al., 1995). Le taux de mortalité varie de 2 à 50%.

a/ Pathogénèse

La pathogénèse de la MVO n'est pas encore clairement établie. Histologiquement, on observe un rétrécissement concentrique et progressif des sinusoides hépatiques de la zone centrolobulaire (zone 3), dû à un œdème sous-endothélial ou à une oblitération non thrombotique. Ceci entraîne une nécrose des hépatocytes au niveau centrolobulaire puis une hypertension portale et une défaillance hépatique (41) Shulman et al., 1987). Parallèlement se développe un état d'hypercoagulation avec déficit en protéine C et en antithrombine III ainsi qu'un état inflammatoire (42) (Faioni et al., 1997). Les cytokines produites au cours de l'inflammation entretiennent cet état d'hypercoagulabilité et ont une toxicité hépatique. Les formes sévères peuvent se compliquer d'une défaillance multiviscérale pouvant entraîner le décès du patient.

b/ Diagnostic

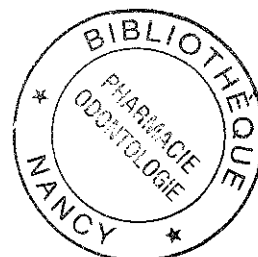
La biopsie hépatique, bien qu'utile pour le diagnostic précoce de MVO, n'est en fait que peu souvent réalisée dans la période post-greffe du fait de l'hypercoagulabilité liée à cette pathologie, de la thrombocytopénie (43) (Scharma et al., 1980) et de l'immunosuppression. Le diagnostic de MVO se fait principalement sur la base de signes cliniques. Deux classifications sont classiquement utilisées pour poser ce diagnostic : les critères décrits par l'équipe de McDonald et al. sont connus sous le terme de critères de Seattle (44) et ceux décrits par Jones et al. sont regroupés sous le terme de critères de Baltimore (45). Ces deux classifications sont basées sur les symptômes suivants : ascite, prise de poids, hépatomégalie et hyperbilirubinémie. Selon l'équipe de Seattle, la MVO est définie cliniquement lorsqu'au moins deux des trois critères suivants sont présents :

- hépatomégalie et/ou douleur de l'hypocondre droit
- hyperbilirubinémie > 2 mg/dl (ou 34 μ mol/l)
- ascite et/ou prise de poids inexpliquée > 2,5% du poids de référence

L'équipe de Baltimore définit la MVO comme un dysfonctionnement hépatique caractérisé par une hyperbilirubinémie supérieure ou égale à 2 mg/dl avant le 21^{ème} jour post-greffe et associée à au moins deux des trois critères suivants :

- hépatomégalie généralement douloureuse
- ascite
- prise de poids supérieure ou égale à 5% du poids de référence

Ces critères présentent l'avantage d'être facilement observés ou mesurés mais ces symptômes ne deviennent cependant évidents qu'à un stade avancé de la MVO. Carreras et al. (46) ont comparé la sensibilité et la spécificité de ces deux classifications sur une cohorte de 17 patients dont la MVO avait été diagnostiquée histologiquement. La concordance entre les critères de Seattle et le diagnostic histologique était de 42% (atteignant 91% quand trois critères cliniques étaient retrouvés), avec une sensibilité de 56% seulement. La concordance entre les critères de Baltimore et le diagnostic histologique était de 91%, avec là encore une sensibilité de 56%. Afin d'améliorer ces résultats, d'autres méthodes diagnostiques ont été proposées : techniques d'imagerie (Doppler couleur échographique (47) (Yoshimoto et al., 2001), IRM (48) (Yoshimoto et



al., 2003)), mesures de facteurs de l'hémostase (protéine C, facteur VII, inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I, antithrombine, acide hyaluronique) (40).

c/ Facteurs de risque

Les facteurs de risque associés à la MVO les plus fréquemment retrouvés sont le type de greffe (risque augmenté en cas de donneur non géno-identique), la chimiothérapie avec busulfan seul ou en association au cyclophosphamide, les antécédents d'atteinte hépatique, les pancréatites et plus récemment une sérologie positive au CMV chez le receveur ainsi que des antécédents de nutrition parentérale dans le mois précédent la greffe (à mettre en relation avec l'état général du patient) (49) (Barker et al., 2003).

d/ Traitement préventif

Du fait de l'absence de traitement curatif de la MVO et de la gravité potentielle de cette pathologie, les mesures préventives sont d'importance. De nombreuses études relatent l'utilisation de différents traitements préventifs mais les résultats souvent contradictoires ne permettent pas de mettre clairement en évidence la supériorité de l'une ou l'autre de ces thérapeutiques. Les traitements préventifs les plus utilisés sont :

- l'héparine à faible dose (héparine standard (50 à 52) (Bearman et al., 1990 – Marsa-Vila et al., 1991 – Cahn et al., 1992) ou héparine de bas poids moléculaire HBPM (53, 54) (Or et al., 1996 – Forrest et al., 2003)) : l'héparine agirait en limitant l'oblitération endothéliale. Le risque hémorragique lié à l'héparinothérapie semblerait diminué avec les HBPM.
- L'ursodiol (URSOLVAN®) : ce sel biliaire possède un effet cytoprotecteur vis-à-vis des cellules endothéliales et des hépatocytes en bloquant l'expression de certains médiateurs de l'inflammation (55, 56) (Essel et al., 1998 – Ohashi et al., 2000). Aucune toxicité relative à ce traitement n'a été rapportée.
- La prostaglandine E1 (PGE1) (PROSTINE VR®) : cette prostaglandine possède des propriétés vasodilatatrices, anti-agrégantes plaquettaires et d'activation de la fibrinolyse. Quelques études font état de son efficacité (57) (Gluckman et al.,

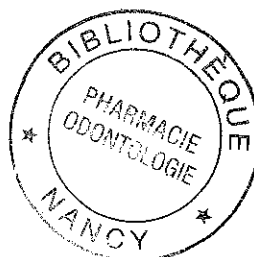
1990) mais la toxicité de cette prostaglandine impose la prudence quant à son utilisation (58) (Bearman et al., 1993).

- La glutamine, administrée sous forme de solution buvable ou avec l'alimentation parentérale, permettrait de prévenir les dommages hépatocellulaires. Cet acide aminé est l'un des trois composants du glutathion, impliqué dans la métabolisation de plusieurs chimiothérapies dont le busulfan et le cyclophosphamide. L'apport de glutamine permet de prévenir la déplétion en glutathion observée après chimiothérapie (59) (Brown et al., 1998).
- La N acétylcystéine est également un précurseur du glutathion et pourrait être envisagée en prévention de la survenue d'une MVO (60) (Hassan et al., 2002). L'administration de N acétylcystéine n'a pas montré d'interférence sur l'effet myéloablatif du busulfan. Des études sont néanmoins encore nécessaires pour confirmer l'efficacité de ces deux derniers traitements.

e/ Traitement « curatif »

Aucun traitement ne s'est révélé curatif vis à vis de la MVO. Les thérapeutiques utilisées visent à maintenir le volume intravasculaire (restriction hydrique et sodée, utilisation de diurétiques du type furosémide), le débit de perfusion rénale et à limiter le risque de thrombose en agissant à différentes étapes de la coagulation.

- L'Alteplase, ou activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rtPA) est un fibrinolytique dont les résultats dans le traitement d'une MVO restent controversés. Le risque hémorragique important doit être pris en compte dans la balance bénéfice/risque de ce traitement.
- Le taux d'antithrombine III, anticoagulant physiologique, tend à diminuer au cours de la survenue d'une MVO, favorisant l'état d'hypercoagulabilité. Son utilisation à visée thérapeutique semble donc intéressante mais sa réelle efficacité reste à prouver.



- le defibrotide (PROCICLIDE®) est un polydesoxyribonucléotide présentant des effets antihrombotiques. Il augmente la concentration de prostaglandines endogènes, ce qui stimule la production de plaquettes et la fibrinolyse (61) (Pegram et al., 2001). Ce traitement a démontré son efficacité dans certains cas (62, 63) (Richardson et al., 2002 – Richardson et al., 1998). Le defibrotide n'a cependant pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France et les démarches nécessaires à son obtention (demande d'autorisation temporaire d'utilisation (ATU), importation du médicament) le rendent difficilement accessible.
- L'utilisation de N acétylcystéine (64) (Ringden et al., 2000) chez des patients atteints de MVO a donné des résultats encourageants.

1.5.1.4. Complications gastro-intestinales

Les complications gastro-intestinales sont très fréquentes et sont en partie dues au conditionnement pré-greffe (chimiothérapique et/ou radiothérapique). Les mucites peuvent être très importantes, nécessitant des antalgiques puissants. On observe également fréquemment nausées, vomissements, douleurs abdominales et diarrhées. Ces manifestations intestinales peuvent cependant avoir pour origine une autre cause que la toxicité liée au conditionnement : GVH aiguë ou infection virale (CMV, ADV) notamment.

Du fait de ces complications, une alimentation parentérale est généralement instaurée pendant la période post-greffe.

1.5.1.5. Autres complications

D'autres types de complications peuvent survenir au décours d'une greffe de moelle osseuse, avec une fréquence cependant généralement moindre que les complications mentionnées ci-dessus.

a/ Complications pulmonaires

Les étiologies et les manifestations des complications pulmonaires sont variées : on retrouve des causes infectieuses (généralement bactériennes lorsqu'elles surviennent précocement, puis fongiques ou virales) ainsi que des toxicités liées au conditionnement ou à l'évolution d'une GVH chronique.

b/ Complications urinaires

La survenue d'une cystite hémorragique quelques jours après une greffe est généralement à mettre en relation avec la toxicité vésicale de l'acroléine, produit issu du métabolisme du cyclophosphamide (65) (Brugier et al., 1989). Cette toxicité est majorée lorsque le cyclophosphamide est associé au busulfan. En cas d'apparition plus tardive d'une cystite hémorragique, on recherchera préférentiellement une origine infectieuse (CMV, adénovirus, tuberculose).

c/ Insuffisance médullaire

Au cours des greffes géno ou phéno-identiques, la sortie d'aplasie survient généralement deux à trois semaines après la greffe. Une insuffisance médullaire peut néanmoins survenir après cette sortie d'aplasie et être qualitative ou quantitative. Elle peut être secondaire à une infection (CMV), à l'administration de certains médicaments présentant une toxicité médullaire tel que le ganciclovir ou compliquer l'évolution d'une GVH chronique.

d/ Rejet de greffe

Enfin le rejet de greffe peut se manifester par une non prise de greffe ou de façon plus tardive soit par une rechute de la maladie soit par la prédominance de cellules hématopoïétiques du receveur et disparition progressive des cellules du donneur. Son

incidence reste cependant faible chez les patients transplantés pour hémopathie maligne en situation HLA-identique (< 2%) (16) (Tabbara et al., 2002), elle est plus élevée chez les patients greffés pour aplasie médullaire. Dans certains cas, une seconde greffe pourra être envisagée.

1.5.2. Complications tardives

Le risque de survenue de complications tardives, avec un délai pouvant atteindre plusieurs années voire plusieurs dizaines d'années, impose une surveillance étroite et de longue durée des patients greffés, ce d'autant plus que l'espérance de vie de ces patients s'accroît.

1.5.2.1. Complications endocriniennes

Les atteintes endocriniennes sont essentiellement consécutives à une irradiation corporelle. Après irradiation corporelle totale, les hypothyroïdies et les déficits en hormone de croissance sont fréquents. La radiothérapie est également impliquée dans les retards de survenue de puberté et l'infertilité, surtout si la dose administrée n'a pas été fractionnée. De tels troubles endocriniens sont également retrouvés chez des patients n'ayant reçu aucune irradiation préalablement à la greffe. Ainsi dans une cohorte de 40 patients greffés dont le conditionnement comprenait busulfan et cyclophosphamide (mais pas de radiothérapie), 47,5% d'entre eux ont présenté des troubles thyroïdiens (thyroïdite, hypo ou hyperthyroïdie), 95% des patientes ont présenté une insuffisance ovarienne et 47% des hommes présentaient un défaut de spermatogénèse (66) (Tauchmanova et al., 2002).

1.5.2.2. Complications oculaires

85% des patients ayant reçu une irradiation corporelle totale non fractionnée développent une cataracte (67) (Benyunes et al., 1995) contre 19% des patients ayant reçu un conditionnement purement chimiothérapique. L'utilisation des corticoïdes, notamment dans le traitement des GVH, augmente le risque de survenue de cette complication.

1.5.2.3. Complications orthopédiques

Des cas de nécrose aseptique de la hanche ont été rapportés après irradiation corporelle ainsi qu'après une corticothérapie au long cours.

1.5.2.4. Complications pulmonaires

La bronchiolite oblitérante est une complication observée chez 10% des patients atteints de GVH chronique plus de deux ans après la greffe.

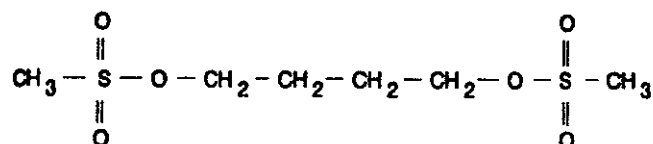
1.5.2.5. Complications tumorales

Enfin le risque de cancer secondaire est majoré chez les patients greffés. Une étude portant sur 3182 enfants greffés pour leucémie aiguë entre 1964 et 1992 (68) a montré un risque accru de tumeurs solides (principalement cancers de la thyroïde et tumeurs cérébrales) et de syndromes lymphoprolifératifs en comparaison à une population de classe d'âge et de sexe similaire (Socie et al., 2000). Les facteurs de risque corrélés au risque de tumeurs solides sont l'irradiation corporelle totale et un âge inférieur à cinq ans au moment de la transplantation. Concernant les syndromes lymphoprolifératifs, la survenue d'une GVH chronique, une greffe non géno-identique, une moelle transfusée déplétée en cellules T ainsi qu'un traitement par sérum antilymphocytaire sont les facteurs de risque mis en évidence par cette étude.

2. LE BUSULFAN

2.1. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

Le Busulfan est le diméthyl sulfonyl 1,4 diméthane :



Sa masse moléculaire est de 246,31 g/mol. Le busulfan est très peu soluble dans l'eau mais présente un caractère lipophile.

2.2. MECANISME D'ACTION

Du fait de ces deux groupements méthylsulfonyls nucléophiles, le busulfan est un bis-alkylant. Il réagit avec les acides nucléiques (nucléophiles) pour former des ponts interbrins et des pontages ADN-protéines. Ces lésions induisent la mort cellulaire. De part son caractère lipophile, le busulfan est très myélotoxique et passe au niveau du liquide céphalo-rachidien à forte dose. A faible dose, il agit plus spécifiquement sur les cellules de la lignée granulocytaire alors qu'à forte dose son action se répercute sur l'ensemble des lignées hématopoïétiques.

2.3. EFFETS INDESIRABLES ET TOXICITE

Comme pour toute chimiothérapie anticancéreuse, les effets indésirables liés au busulfan sont nombreux (69) (Dossiers du CNHIM, 2001). A forte dose, le busulfan provoque une aplasie médullaire, cet effet myéloablatif est recherché lors de son utilisation dans les conditionnements pré-greffe.

2.3.1. Toxicité digestive

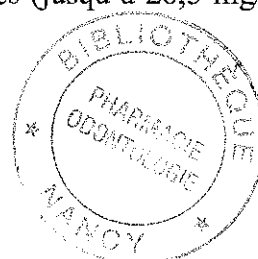
Les troubles digestifs (nausées, vomissements) sont nombreux. Les mucites peuvent être extrêmement douloureuses et invalidantes, nécessitant antalgiques puissants et nutrition parentérale.

2.3.2. Toxicité hépatique

La survenue d'une maladie veino-occlusive (MVO) est une complication grave dont la pathogénèse, l'incidence et les possibles prises en charge ont été détaillées dans la première partie de cet exposé. L'incidence de la MVO a été corrélée à l'exposition systémique au busulfan, estimée notamment par l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps. Grochow et al. ont été les premiers à mettre en évidence un risque augmenté de MVO en cas d'aire sous la courbe (AUC : Area Under the Curve) supérieure à 2012 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{l}$, soit 8,26 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ lors d'une première étude (70). Cette cible a ensuite été abaissée à 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{l}$ (6,18 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$) dans une seconde étude (71) (Grochow et al., 1993). En reprenant cette cible de 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{l}$, Dix et al. (72) aboutissent à la même conclusion et soulignent l'intérêt d'une diminution de la posologie de busulfan lorsque l'AUC estimée est élevée. Ils n'ont cependant pas pu mettre en évidence de diminution significative de l'incidence de MVO, probablement lié au fait que cette réduction de posologie intervenait tardivement après estimation de l'AUC du fait notamment des délais nécessaires aux dosages de busulfan. Dans cette étude, la concentration plasmatique maximale (Cmax) en busulfan n'a pas montré d'influence sur le risque de survenue de MVO.

2.3.3. Toxicité neurologique

Les crises convulsives représentent une complication caractéristique pouvant survenir au décours du traitement par busulfan. Il s'agit le plus souvent de crises tonico-cloniques, généralement de courte durée et habituellement sans séquelles. Dans une étude portant sur 123 enfants ayant reçu du busulfan à la dose de 16 mg/kg ou de 600 mg/m², Vassal et al. (73) suggèrent que cette neurotoxicité soit dose-dépendante : les concentrations plasmatiques ainsi que les concentrations retrouvées au niveau du liquide céphalo-rachidien (LCR) des enfants ayant reçu les plus fortes doses (jusqu'à 26,5 mg/kg, dose



totale) sont significativement plus élevées qu'avec une posologie de 16 mg/kg. L'incidence des crises convulsives est par ailleurs significativement plus élevée dans le groupe recevant la posologie de 600 mg/m². La prophylaxie par clonazepam semble efficace : aucun des enfants de cette étude ayant reçu ce traitement n'a présenté de convulsion. Ce traitement préventif est préféré à la phénytoïne ou au phenobarbital : contrairement aux autres antiépileptiques, les benzodiazépines présentent moins d'interaction avec le métabolisme hépatique du busulfan.

2.3.4. Toxicité pulmonaire

Le busulfan est impliqué dans la survenue d'une toxicité pulmonaire, le plus généralement de façon tardive (plus de 100 jours après la greffe). En cas d'atteinte précoce, cette toxicité peut compliquer l'évolution d'une MVO, avec notamment un risque d'hémorragie pulmonaire. De survenue généralement plus tardive, l'atteinte la plus fréquente est une fibrose interstitielle diffuse : l'incidence moyenne est de l'ordre de 10%, toutes origines confondues (exposition au busulfan, au cyclophosphamide, à d'autres chimiothérapies ou après irradiation corporelle totale notamment en l'absence de cache pulmonaire). Ce diagnostic est souvent difficile à poser et se fait généralement après élimination d'autres causes potentielles. Des cas de bronchiolite oblitérante ont été décrits. Alors que l'étude de Paz et al. (74) suggère que le type de conditionnement pré-greffe (chimiothérapie uniquement ou en association avec une irradiation corporelle totale) ne soit pas le facteur de risque dans la survenue d'une bronchiolite oblitérante mais que cette complication soit fortement liée au développement d'une maladie du greffon contre l'hôte, Ringden et al. (75) concluent à un risque accru de bronchiolite oblitérante après utilisation du busulfan versus irradiation corporelle totale.

2.3.5. Toxicité vésicale

Les cystites hémorragiques peuvent compliquer une greffe de moelle osseuse chez 5 à 10% des patients (76, 77) (Seber et al., 1999 – Kondo et al., 1998) (et jusqu'à 18% des patients dans une toute récente étude (78) (Tsuboi et al., 2003)). Dans ces trois études, le busulfan est retrouvé comme étant un facteur de risque important dans la survenue de cette complication, ce d'autant plus qu'il est associé au cyclophosphamide. L'âge du

receveur est également un facteur de risque reconnu : les enfants en bas âge sont globalement moins exposés à ce risque.

2.4. UTILISATION CLINIQUE DU BUSULFAN

Le mécanisme d'action et l'utilisation du busulfan comme cytotoxique dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques ont été décrits dès 1953 par Haddow (79) et Galton (80). Mais son utilisation comme agent du conditionnement pré-greffe est plus tardive : Santos et al. (6) rapportent en 1983 l'utilisation du busulfan (8 à 20 mg/kg) en association au cyclophosphamide (200 mg/kg) sans radiothérapie dans le cadre de leucémies aiguës myéloïdes dans un groupe de 51 patients (dont 7 enfants de moins de 15 ans).

Dans le cadre des conditionnements pré-greffe, le busulfan est généralement utilisé en association avec le cyclophosphamide (ENDOXAN®). Le busulfan est utilisé pour son effet myéloablatif, le cyclophosphamide complète ensuite son action en s'attaquant aux lymphocytes matures provoquant ainsi chez le receveur une immunosuppression susceptible de prévenir le rejet de la greffe. Suivant l'indication de la greffe, d'autres agents cytotoxiques peuvent être associés au busulfan. Les principaux protocoles utilisés dans les conditionnements pré-greffe à l'hôpital Debrousse ont été présentés précédemment dans le tableau I.

L'intérêt de l'utilisation du busulfan en remplacement de la radiothérapie dans les conditionnements pré-greffe a fait l'objet de nombreuses études dont les résultats sont parfois contradictoires. Ces différents essais ont inclus des patients d'âge variable (enfants et/ou adultes) présentant des pathologies variées ainsi que des stades d'avancement de la maladies hétérogènes, ce qui complique l'interprétation globale des résultats. Plusieurs essais comparatifs rapportent un effet antileucémique majoré et une moindre incidence de certaines complications avec l'association cyclophosphamide-irradiation corporelle totale (CY-TBI). Ringden (81, 82) et Litzow (83) rapportent une incidence significativement plus élevée de maladie veno-occlusive du foie chez les patients traités par l'association busulfan-cyclophosphamide (BU-CY). Ringden rapporte

également dans une étude ultérieure portant sur un suivi à long terme (75) plus de GVH chronique, d'alopécie et de bronchiolite oblitérante chez ces patients. L'étude de Blaise (84) relate un taux de rechute et une mortalité liée à la toxicité du traitement plus importants chez des patients ayant reçu un conditionnement BU-CY. La méta analyse réalisée par Hartmann (85) confirme l'incidence plus élevée de maladie veno-occlusive avec BU-CY mais ne retrouve aucune autre différence significative pour les autres effets toxiques (GVH aiguë ou chronique, pneumopathie interstitielle). Dans la majorité des études, la survie sans maladie ainsi que la survie globale ne sont pas significativement différentes entre les deux conditionnements. Le busulfan est préféré chez les jeunes enfants du fait du retentissement de l'irradiation corporelle totale sur la croissance. Le type de radiothérapie (fractionnée ou dose unique) ainsi que la dose totale semble avoir une importance : Sanders et al (86) ont corrélié le type de radiothérapie et le déficit en hormone de croissance. Le conditionnement BU-CY présenterait l'avantage d'être plus facilement réalisable, provoquerait moins de mucites et moins de GVH de grade II-IV (87) (Clift et al., 1994). Curtis et al. (88) suggèrent également que les cancers secondaires seraient plus fréquents après irradiation corporelle totale.

2.5. PHARMACOCINETIQUE DU BUSULFAN

Le busulfan se caractérise par une variabilité pharmacocinétique inter-individuelle très marquée. Les paramètres pharmacocinétiques de cette molécule ont été décrits dans de nombreuses études dont certains résultats sont rapportés dans le tableau III.

Tableau III : Paramètres pharmacocinétiques du busulfan (moyenne $\pm$ écart-type, valeurs extrêmes)

Référence (posologie)	Age des patients (années)	AUC (ng.h/ml)	Cmax (ng/ml)	Cl (ml/min/kg)	Vd (l/kg)
Schiltmeyer et al. 2003 (13 à 20 mg/kg ou 600 mg/m ² . 16 doses)	9,9 (0,4 à 18,1)	7761 (2292 à 11894)	ND	2,42 (1,42 à 5,46)	0,73 (0,38 à 1,62)
Bostrom et al. 2003 (1,21 $\pm$ 0,41mg/kg. 16 doses)	10 (0,17 à 59)	3982 $\pm$ 3859 (164 à 28736)	640 $\pm$ 419 (74 à 3448)	8,7 $\pm$ 10 (0,2 à 93)	1,4 $\pm$ 1,5 (0,03 à 15)
Jacobson et al. 2001 (40 mg/m ² . 8 doses)	2 (0,8 à 21,8)	5305 (1882 à 10683)	950 (314 à 1780)	5,2 (2,1 à 11,4)	ND
Sandstrom et al. 2001 (1 mg/kg. 16 doses)	A=1,2 à 12 B=14 à 59	A=4000 (1900 à 8500) B=6590 (4100 à 13000)	ND	A = 4,98 $\pm$ 2,1 B = 2,69 $\pm$ 0,64	A = 0,96 $\pm$ 0,35 B = 0,64 $\pm$ 0,16
Baker et al. 2000 (1 mg/kg. 16 doses ou 2 mg/kg. 8 doses)	A=<10 B= $\geq$ 10à<18 C $\geq$ 18	A=2735 (426 à 36250) B=4104 (1143 à 38250) C=5699 (4596 à 20717)	A=541 (172 à 1033) B=590 (246 à 3592) C= 886 (861 à 1919)	A = 7 (0 à 37) B = 4 (0 à 13) C = 3 (1 à 4)	A = 1,23 (0,36 à 3,33) B = 0,86 (0,2 à 1,94) C= 0,49 (0,03 à 0,88)
Poonkuzhali et al. 1999 (A : 1mg/kg - B:37,5 mg/m ²) 16 doses	7,3 (2,5 à 13)	A = 3167 $\pm$ 878 B = 6287 $\pm$ 1194	A = 949 $\pm$ 278 B = 1579 $\pm$ 400	A = 5,7 $\pm$ 1,7 B = 4,2 $\pm$ 1,1	A = 0,94 $\pm$ 0,3 B = 0,79 $\pm$ 0,2
Hassan et al. 1994 (1 mg/kg. 16 doses)	A=1,5 à 6 B=13 à 60	ND	ND	A = 5,2 $\pm$ 2,1 B = 3,6 $\pm$ 1,3	A = 1,15 $\pm$ 0,52 B = 0,64 $\pm$ 0,12
Regazzi et al. 1993 (1 mg/kg. 16 doses)	5,7 $\pm$ 6,5 (0,5 à 19)	2154 $\pm$ 813	610 $\pm$ 225	9,08 $\pm$ 3,77	ND
Vassal et al. 1992 600 mg/m ² (17,8 à 29,2 mg/kg) en 16 doses	5,4 (1,9 à 13,8)	6404 $\pm$ 2378	1258 $\pm$ 378	4,5 $\pm$ 1,40	1,04 $\pm$ 0,38
Grochow et al. 1990 (1 ou 2 mg/kg. 16 doses)	0,17 à 5	ND	ND	8,44 $\pm$ 4,3	1,42 $\pm$ 0,86

AUC : Aire sous la courbe, Cmax : concentration maximale, Vd : volume de distribution, Cl : clairance

ND : donnée non disponible

2.5.1. Absorption digestive

La biodisponibilité de cette molécule est très variable d'un patient à l'autre, cette variabilité étant encore plus marquée chez les enfants que chez les adultes (89) (Hassan et al., 1996). La biodisponibilité est estimée entre 0,22 et 1,2 chez les enfants de 1,5 à 6 ans alors qu'elle varie de 0,47 à 1,03 chez les sujets de 13 à 60 ans (90) (Hassan et al., 1994). Les causes de cette variabilité sont notamment la forme galénique administrée (comprimés, comprimés écrasés, éventuellement mis en suspension, ou gélules) ainsi que l'heure d'administration par rapport au repas. Le modèle d'absorption décrit dans la littérature est généralement un modèle d'ordre 0 (91) (Vassal et al., 1989), parfois d'ordre 1 (92) (Tran et al., 2000).

2.5.2. Distribution

Mc Cune et al. (93) ainsi que Hassan et al. (89) décrivent une faible liaison aux protéines plasmatiques. La distribution est monocompartimentale (91, 93). Hassan et al (90) ont montré que le volume de distribution du busulfan après administration intra-veineuse correspond au compartiment aqueux de l'organisme et ce, malgré la lipophilie de cette molécule. La variabilité interindividuelle est très marquée pour l'exposition systémique.

Concernant le passage du busulfan au niveau du LCR, Vassal et al. (91) retrouvent un ratio entre les concentrations moyennes cérébrale et systémique de 0,95 (variation de 0,5 à 1,4). Le passage d'environ 20% de la dose de busulfan au niveau du LCR pourrait expliquer la toxicité de la molécule vis à vis du système nerveux central (89).

2.5.3. Métabolisme

Le busulfan est éliminé par conjugaison au glutathion sans aucune autre transformation au préalable. Cette réaction est catalysée par les glutathion-S-transférases hépatiques (figure 1).

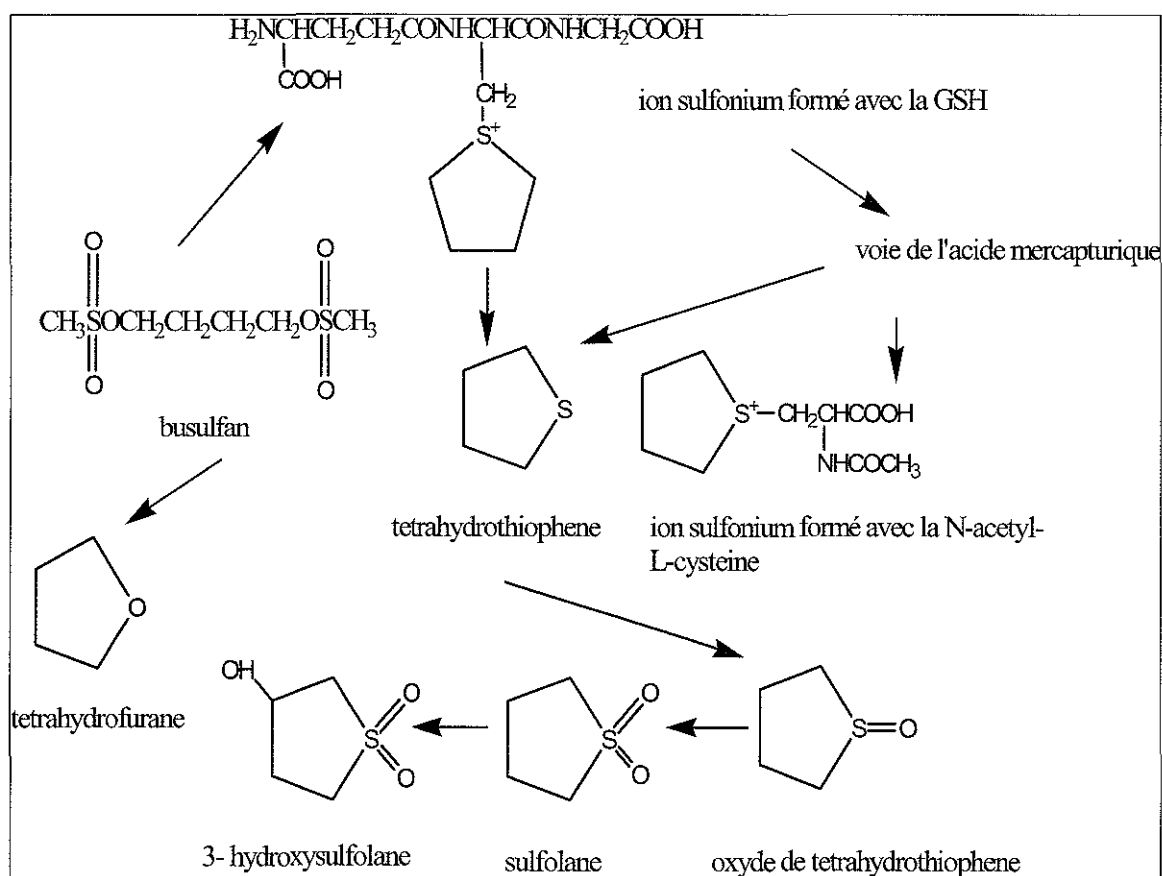


Figure 1 : Métabolisme du busulfan selon Hassan et al. (89)

Les métabolites formés ne sont pas cytotoxiques, à l'exception de l'ion sulfonium (métabolite formé après réaction avec le glutathion réduit ou avec la N-acétyl-cystéine) qui possède une action pharmacologique en tant qu'alkylant (89) (Hassan et al., 1996). Czerwinski et al. (94) ont mis en évidence le rôle prépondérant de l'isoforme GST A1-1 dans le métabolisme du busulfan, les isoformes pi et mu auraient quant à elles un rôle important dans la protection des cellules. A notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur le rôle de l'isoforme theta dans la conjugaison du busulfan. Huit polymorphismes (SNPs : single nucleotides polymorphisms) ont été identifiés au niveau de la GST A1 mais aucune relation n'a été retrouvée (95) entre ces différents polymorphismes et le niveau d'expression de la GST A1 ou la capacité de conjugaison au busulfan de cette enzyme (Bredschneider et al., 2002).

D'après l'étude de Gibbs et al. (96), il semblerait que les glutathion-S-transférases des entérocytes puissent constituer une première étape de métabolisation du busulfan avant que la molécule n'atteigne le foie.

2.5.4. Élimination

Les métabolites sont excrétés par voie urinaire, la molécule mère est éliminée par voie biliaire. Vassal et al. (91) estiment la demi-vie à 2,3 h et la clairance à 119 ml/m² chez des enfants de 4 à 14 ans ayant reçu 16 mg/kg de busulfan. Les auteurs ne trouvent cependant pas de différence dans les paramètres pharmacocinétiques entre la première et la dernière dose. Dans une autre étude comparant un groupe d'enfants de 1,5 à 5 ans à un groupe de patients âgés de 13 à 60 ans, la clairance rapportée au poids corporel est significativement différente entre les deux groupes (3,62 ml/min/kg versus 2,49 ml/min/kg) alors que cette différence n'est pas significative lorsque la clairance est rapportée à la surface corporelle (89). Jacobson et al. (97) observent une plus faible exposition systémique chez les enfants de moins de trois ans (diminution de l'AUC et de la concentration plasmatique en busulfan). L'importante variabilité de la clairance en fonction de l'âge sera abordée plus en détail au cours de cet exposé.

2.6. VARIABILITE PHARMACOCINETIQUE INTER-INDIVIDUELLE DU BUSULFAN

Plusieurs études ont rapporté la très grande variabilité inter-individuelle observée au cours des traitements par busulfan à haute dose. Les facteurs pouvant expliquer en partie cette variabilité sont l'âge, la pathologie, les modifications de la fonction hépatique, la biodisponibilité du busulfan ou le rythme circadien.

2.6.1. Age

Malgré l'administration de posologies identiques entre adultes et enfants (doses rapportées au poids corporel), de nombreuses études ont conclu à une exposition systémique moindre chez les enfants comparativement aux adultes. Grochow et al. (98) ont montré que les enfants de moins de cinq ans ont une clairance (rapportée à la

surface corporelle) multipliée par 2,2 et un volume de distribution multiplié par 2,4 par rapport aux adultes (études sur 21 enfants âgés de 2 mois à 5 ans). Hassan et al. (99) ont étudié la pharmacocinétique du busulfan parmi trois classes d'âge : enfants de moins de 5 ans, de 5 à 16 ans et patients de 16 à 50 ans. Ils rapportent une élimination plus rapide, des concentrations plasmatiques minimales, des concentrations plasmatiques à l'équilibre et des AUC plus faibles chez les enfants en bas âge, alors que la clairance est augmentée. D'autres études, portant sur des classes d'âge variables concluent au même type de résultats :

- Regazzi et al. (100) : augmentation significative de la clairance chez les enfants de 6 mois à 13 ans par rapport aux enfants de 7 à 19 ans
- Hassan et al. (90) : clairance et volume de distribution plus élevés chez les enfants de 1,5 à 6 ans que chez les patients de 13 à 60 ans
- Baker et al. (101) : étude parmi 3 classes d'âge : moins de 10 ans, de 10 à 17 ans et plus de 18 ans. Les concentrations plasmatiques minimales, maximales et l'AUC sont plus basses, la clairance et le volume de distribution sont plus élevés chez les patients les plus jeunes. Les différences sont significatives pour les trois classes d'âge.
- Jacobson et al. (97) : clairance plus élevée chez les enfants de moins de trois ans, AUC et concentration à l'équilibre plus faibles.
- Sandstrom et al. (102) : clairance et volume de distribution plus élevés chez les enfants de 1,25 à 12 ans par rapport à des patients de 14 à 59 ans

La différence entre les valeurs de clairance entre jeunes enfants et adultes tend à devenir moins significative (voire parfois non significative) lorsque la clairance est exprimée en fonction de la surface corporelle et non plus par rapport au poids. Gibbs

et al. (96) suggèrent que l'augmentation de clairance observée chez l'enfant soit la conséquence d'une plus grande capacité de conjugaison du busulfan au glutathion via une augmentation de l'expression de la glutathion-S-transférase chez les enfants.

De façon contradictoire, Pawlowska et al. (103) ne concluent pas à une influence de l'âge sur le métabolisme du busulfan mais leur étude ne porte que sur des patients thalassémiques. De même, Bostrom et al. (104) n'ont pas retrouvé de relation significative entre l'âge et l'AUC chez des patients thalassémiques, atteints de déficits immunitaires ou de maladies métaboliques alors que cette relation existe dans le cas de patients leucémiques.

2.6.2. Pathologie

Une étude réalisée chez des enfants greffés atteints de leucémie ou de maladies congénitales (105) (Hassan et al., 1996) montre que la pharmacocinétique du busulfan peut être influencée par la pathologie sous-jacente. Ainsi l'élimination du busulfan est significativement moins rapide chez les patients leucémiques (demi-vie d'élimination augmentée et clairance diminuée). Aucune comparaison n'est cependant faite par rapport à des témoins.

Chez des patients atteints de β thalassémie majeure, la glutathion-S-transférase alpha plasmatique (impliquée dans la métabolisation du busulfan) augmente d'un facteur 5 à 10 par rapport aux témoins. Cette augmentation (106) est le reflet de l'atteinte hépatique et/ou de l'augmentation de l'expression de l'enzyme liée à la pathologie (Poonkuzhali et al., 2001). L'activité de cette enzyme est corrélée positivement avec la clairance du busulfan et négativement avec les concentrations maximales et minimales ainsi qu'avec les aires sous la courbe obtenues. La modification de l'activité de la GST hépatique est donc en partie responsable de la variabilité inter-individuelle observée dans la cinétique du busulfan.

2.6.3. Biodisponibilité du busulfan

Le busulfan se présente sous forme de comprimés (seule spécialité commercialisée en France par les laboratoires Glaxo SmithKline : MYLERAN®, comprimés dosés à 2 mg) administrés entiers, écrasés ou après mise en suspension dans l'eau. Il existe également sous forme de gélules qui peuvent être avalées telles quelles ou alors ouvertes et mélangées à de la compote. Dans certains cas, le busulfan est administré par sonde nasogastrique après mise en suspension dans une solution aqueuse. Il convient alors de rincer de façon extrêmement rigoureuse la sonde du fait de l'insolubilité du busulfan dans l'eau. La prise concomitante d'aliments diminuerait l'absorption (89), d'où la recommandation de prendre le médicament à distance des repas soit une heure avant ou deux heures après.

Une forme injectable du busulfan (BUSILVEX®, laboratoire Pierre Fabre Médicament) est également disponible en France.

2.6.4. Rythme circadien (chronobiologie)

Vassal et al. (107) ont étudié la variation des concentrations plasmatiques de busulfan au cours du nyctémère pour un schéma d'administration classique au rythme d'une dose per os toutes les six heures pendant quatre jours. Ils ont pu mettre en évidence l'existence d'un rythme circadien stable de J2 à J4 pour les concentrations plasmatiques de busulfan avec une augmentation des concentrations durant la nuit. La même observation avait déjà été faite par Hassan et al., ce rythme étant plus marqué chez des enfants de moins de 5 ans que chez les enfants plus âgés, aucune différence de concentrations entre le jour et la nuit n'étant retrouvée chez les adultes (99).

Ces différents éléments montrent l'importance de la variabilité inter-individuelle dans la cinétique du busulfan à laquelle se surajoute une variabilité intra-individuelle non négligeable. Sandström et al. (102) estiment la variabilité intra-individuelle de la clairance à 9,4%.

3. LA PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION

Différentes approches peuvent être utilisées pour déterminer les paramètres pharmacocinétiques d'un individu. Les approches traditionnelles regroupent les méthodes de régression et sont des méthodes relativement anciennes. La pharmacocinétique de population, développée depuis les années 1970 par Sheiner et de plus en plus utilisée, fait appel à des méthodes en deux étapes ou en une étape (méthodes paramétrique ou non paramétrique).

3.1. DEFINITION

3.1.1. Méthodes de régression

La régression linéaire découle de l'utilisation de la méthode des moindres carrés pour tracer la droite du logarithme népérien de la concentration sanguine en fonction du temps ($\text{Log}(C) = f(t)$). Les paramètres de cette droite permettent d'estimer la demi-vie d'élimination (et donc la constante d'élimination) et la concentration à l'origine extrapolée (et donc le volume de distribution).

Cette méthode présente plusieurs inconvénients. L'introduction d'une linéarisation par transformation logarithmique introduit une source d'erreur. De plus cette méthode donne la même importance aux faibles et fortes concentrations lors de l'ajustement bien que l'erreur soit très souvent majorée pour les faibles concentrations et que ces concentrations interviennent fortement dans l'estimation de la pente et donc de la demi-vie. Enfin, cette méthode nécessite d'atteindre l'état d'équilibre pour réaliser les prélèvements sanguins.

La régression non linéaire pondérée prend en compte les résultats des mesures réalisées lors de différentes administrations. A la différence d'une régression linéaire, chaque résultat peut être pondéré par la variance de l'erreur qui lui est associée. Elle prend en compte toutes les mesures réalisées chez un patient depuis le début du traitement mais contrairement aux méthodes bayésiennes, elle n'incorpore pas l'expérience des

traitements antérieurs chez des patients a priori similaires. L'estimation des paramètres pharmacocinétiques du patient est obtenue par la minimisation d'une fonction des moindres carrés pondérés par l'erreur analytique.

3.1.2. Pharmacocinétique de population

La pharmacocinétique de population a pour but de déterminer des paramètres pharmacocinétiques ainsi que leur relation statistique avec des covariables au sein d'un groupe d'individus appelé population. Au sens pharmacocinétique, une population regroupe un ensemble de sujets qui présentent certaines similitudes telles que l'âge, la pathologie ou d'autres facteurs pouvant intervenir dans la modification des paramètres pharmacocinétiques.

Parmi les différentes méthodes développées en pharmacocinétique de population, citons la méthode du pool de données, la méthode en deux étapes et les méthodes en une étape avec notamment NONMEM et NPEM.

3.1.2.1. Méthode du Pool de données (« Naive Pooled data »)

Le principe de cette méthode est de regrouper toutes les mesures de concentrations d'un médicament de tous les sujets et d'analyser ce pool de mesures comme si elles provenaient du même sujet afin d'obtenir une estimation des paramètres de la population. Une courbe du type $\text{Concentration} = f(\text{temps})$ est obtenue par régression. Cette méthode présente l'avantage d'être simple et de ne pas nécessiter beaucoup de données par patient. Néanmoins, elle ne permet pas de mettre en évidence les variabilités inter et intra-individuelles ni de les différencier, ce qui peut conduire à la construction de modèles erronés. La distribution des paramètres ne peut être caractérisée (108) (Minto et al., 1998).

3.1.2.2. Méthodes en deux étapes (two stage)

La première étape est une étude de cinétique individuelle : les paramètres pharmacocinétiques de chaque sujet de la population sont déterminés à partir des mesures de concentration réalisées chez chaque sujet par une méthode de régression non linéaire.

Lors de la deuxième étape, la moyenne et l'écart-type des paramètres sont calculés afin d'estimer les paramètres de la population. Cette méthode, relativement simple, permet d'obtenir une bonne estimation des paramètres de population (109) (Jelliffe et al., 1998). De plus, l'étude de la distribution des paramètres est possible.

La méthode IT2B (Iterative two-stage Bayesian) permet ainsi d'obtenir une estimation initiale raisonnable des valeurs moyennes des paramètres de la population ainsi que leurs écarts-types. Ces valeurs initiales sont ensuite utilisées pour examiner les valeurs individuelles de chaque patient et obtenir les valeurs des paramètres de chaque patient présentant la probabilité maximale en utilisant la procédure du MAP (Maximum a posteriori probability) Bayésien. Les valeurs moyennes et les écarts-types de la population sont ensuite recalculés et le processus recommence et se poursuit de façon itérative jusqu'à ce qu'un critère de convergence soit atteint. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir fonctionner avec peu de points, au minimum un par patient .

3.1.2.3.Méthodes en une étape

Ces méthodes regroupent des méthodes paramétriques telles que NONMEM (on suppose que les paramètres présentent une distribution normale ou log normale) et des méthodes non paramétriques telles que NPEM (aucune hypothèse n'est faite sur le type de distribution). Dans les deux cas, les données de tous les patients sont analysées simultanément afin de décrire la distribution de la probabilité des paramètres pharmacocinétiques dans cette population.

a/ Méthodologie NONMEM = méthode à effets mélangés

Ce programme a été nommé ainsi car l'estimation des paramètres pharmacocinétiques et de leur variabilité sont issus d'un modèle statistique qui prend en compte des effets dits fixes et des effets dits aléatoires.

Les effets fixes correspondent aux caractéristiques générales de la population regroupant les valeurs moyennes des paramètres pharmacocinétiques, les caractéristiques propres aux patients (sexe, âge, poids, taille ...), les pathologies associées, les facteurs génétiques... Les effets aléatoires reflètent la variabilité de la pharmacocinétique qui ne

peut être expliquée par les effets fixes. Ils sont représentés par la variabilité interindividuelle et la variabilité résiduelle. La variabilité résiduelle regroupe la variabilité intra-individuelle et une variabilité liée aux erreurs expérimentales (erreur analytique et erreurs lors du recueil des données telles que les incertitudes sur l'heure exacte de l'administration du médicament ou du prélèvement ...).

Il s'agit d'une méthode paramétrique qui estime en une seule étape les paramètres pharmacocinétiques moyens et la variabilité qui leur est associée (matrice de variance et covariance) (108, 109). Le programme NONMEM développé par Beal et Sheiner (110) repose sur l'utilisation d'un algorithme qui dans un premier temps estime la valeur moyenne du paramètre à partir des valeurs moyenne ou médiane obtenues dans la population. Dans un deuxième temps, l'utilisation des informations provenant de l'individu (concentrations sériques mesurées, covariables éventuelles) permet d'estimer la valeur la plus probable du paramètre du patient étudié. Chaque paramètre pharmacocinétique peut être relié à une ou plusieurs covariables.

Ce programme permet d'obtenir une valeur de la fonction objective. Cette fonction objective reflète la qualité du modèle utilisé.

b/ Méthodes non paramétriques (NPEM, NPAG, NPML)

De nombreux paramètres pharmacocinétiques ne possèdent pas une distribution normale ou log normale au sein d'une population. De plus, certaines populations sont en fait constituées de sous-populations (par exemple acétyleurs lents et rapides) qu'il est impossible de décrire avec une distribution gaussienne. Une approche non paramétrique peut alors être utilisée. Les principales méthodes non paramétriques sont NPEM (Non Parametric Expectation Maximisation) développé par Schumitzky (111) et NPML (NonParametric Maximum Likelihood) mise au point par Mallet (112). Ces deux méthodologies reposent sur le même principe. Une première étape consiste à estimer les densités de probabilité des différents paramètres pharmacocinétiques dont le produit va permettre le calcul de la fonction de vraisemblance. Il s'agit de sélectionner parmi toutes les densités de probabilité possibles celle pour laquelle les données disponibles ont la plus grande probabilité de se réaliser (113) (Mallet et al., 1990). Une fonction de

vraisemblance est définie comme étant le produit des probabilités de chaque paramètre. Dans un deuxième temps, on utilise un algorithme d'optimisation du calcul (Méthode du Simplexe dans le cas de NPEM) qui permet par un processus itératif de maximiser cette fonction de vraisemblance (approche par maximum de vraisemblance).

Ces méthodes permettent de mettre en évidence d'éventuelles sous-populations sans avoir recours à l'utilisation de covariables ou à l'estimation bayésienne des paramètres individuels a posteriori.

La principale différence entre NPEM et NPML réside dans le fait que NPEM fournit des résultats sous forme de densités de probabilité continues alors que l'on obtient des densités de probabilité discrètes avec NPML (109).

Récemment, Leary et al (114) ont démontré que la vraisemblance (probabilité) (likelihood) des résultats obtenus avec NPEM était corrélée étroitement avec la précision du maillage (grid points) utilisé pour effectuer l'analyse : plus le nombre de grid points augmente et meilleure est la qualité des résultats mais en nécessitant une puissance de calcul considérable et un allongement des temps de calcul. Leary et al. ont de ce fait développé la méthodologie NPAG (Non Parametric Adaptive Grid) : le processus démarre avec un maillage (grid) plus petit que dans NPEM. Lorsque la première analyse est résolue, le maillage initial est redéfini en ajoutant de nouveaux grid points proches des points trouvés initialement puis l'analyse est refaite avec ce nouveau maillage. Ce procédé se poursuit de façon itérative jusqu'à ce qu'un critère de convergence soit atteint. On obtient ainsi beaucoup plus rapidement des résultats dont la qualité est améliorée, tout en diminuant les temps de calcul.

3.2. ADAPTATION BAYESIENNE DE POSOLOGIE

La pharmacocinétique de population permet d'obtenir les valeurs moyennes des paramètres pharmacocinétiques ainsi que leur dispersion chez un groupe d'individus. La méthode bayésienne permet d'estimer les paramètres pharmacocinétiques d'un sujet, ainsi que la variabilité qui leur est associée en combinant des informations relatives à cet

individu à l'information provenant de la population dont est issu le sujet (113) (Mallet et al., 1990). L'approche bayésienne utilisée pour le suivi thérapeutique repose sur le théorème développé par Thomas Bayes au 18^{ème} siècle. Cette formule, à la base des probabilités conditionnelles, permet de calculer la probabilité qu'un fait soit vérifié sachant qu'un autre fait est vrai (114) (Leeman TD., 1990). Appliqué à la pharmacocinétique, il permet d'établir une relation quantitative entre l'estimation d'une probabilité d'un événement avant toute information relative à cet événement (valeur a priori), l'obtention d'informations (telles que des concentrations plasmatiques) concernant cet événement et une nouvelle estimation de la probabilité de cet événement en tenant compte de l'information acquise (valeur a posteriori).

Pour estimer cette probabilité, la méthode bayésienne utilise un estimateur "MAP" (Maximum A posteriori Probability) qui prend en compte la différence entre la concentration mesurée et celle prédite par le modèle ainsi que la différence entre les paramètres de l'individu et ceux de la population. Ces valeurs sont respectivement pondérées par l'incertitude sur la mesure (variance de l'erreur analytique) et par la distribution du paramètre au sein de la population (108) (Minto et al., 1998). Cet estimateur est encore appelé fonction objective (FO) :

$$FO = \Sigma (C_{mes} - C_{est})^2 / SD^2 + \Sigma (P_{pop} - P_{est})^2 / SD_{pop}^2$$

avec C_{mes} = concentrations mesurées

C_{est} = concentrations estimées

SD^2 = variance de l'erreur analytique

P_{pop} = valeur du paramètre de la population a priori

P_{est} = valeur du paramètre estimé pour un individu

SD_{pop}^2 = variance du paramètre de la population

L'approche bayésienne a pour objectif de déterminer les valeurs des paramètres pharmacocinétiques les plus probables chez un individu et pour lesquels on obtient la valeur la plus faible possible de l'estimateur bayésien. Les valeurs des paramètres pharmacocinétiques permettent ensuite de prédire les concentrations plasmatiques futures

chez un patient donné ou d'autres valeurs cibles si besoin comme une aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps dans le cas du suivi thérapeutique du busulfan.

4. INTERET DU SUIVI THERAPEUTIQUE

Le busulfan utilisé à haute dose lors des conditionnements de greffes de moelle osseuse en pédiatrie présente différentes caractéristiques qui rendent l'adaptation de posologie nécessaire lors de tels traitements (116) (Bertholle V, et al. 2004).

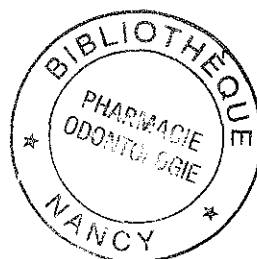
Cette molécule présente tout d'abord un index thérapeutique étroit qui dépend notamment du type de greffe envisagée (greffe géno ou phéno-identique, greffe autologue) et de la pathologie sous-jacente. L'index thérapeutique du busulfan a été relié à l'exposition moyenne au busulfan exprimée par l'aire sous la courbe (AUC) obtenue pour les concentrations plasmatiques en fonction du temps ou par la concentration moyenne à l'équilibre (C_{ss}) (cette concentration moyenne étant obtenue en divisant l'aire sous la courbe par l'intervalle de temps entre deux doses successives, soit 6 heures en général). Une trop faible exposition au busulfan expose à un risque de rejet de greffe. Différentes concentrations moyennes « cibles » ont été publiées en fonction du type de greffon et de la pathologie sous-jacente : ainsi dans le cas d'une greffe géno-identique, une concentration moyenne à l'équilibre de 200 ng/ml (soit une AUC de 1,2 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}$) minimum a été mise en évidence par l'étude de Slattery et al. (117) pour permettre une prise de greffe. Cette valeur seuil (très faible) reste discutable : Bolinger et al. ne retrouvent pas de différence de seuil entre greffe géno et phéno-identique (118). En cas de donneur non HLA-identique, la C_{ss} cible est de 600 ng/ml (soit une AUC de 3,6 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}$) (117) (Slattery et al., 1995), voire 900 ng/ml (AUC de 5,4 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}$) dans le cas à haut risque de rejet (donneur non apparenté avec mismatches, enfants atteints de maladie de Hurler...) (119) (Bolinger et al., 2001). Inversement une sur-exposition au busulfan est corrélée avec un risque accru de toxicité, la toxicité la plus fréquente étant les mucites mais la plus grave restant la survenue d'une maladie veino-occlusive du foie (MVO). Au regard des différentes études publiées, un consensus assez général permet de déterminer un seuil de toxicité pour une aire sous la courbe supérieure à des valeurs de l'ordre de 5,5 à 7 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}$ (117, 120, 121) (Slattery et al., 1995 – Dix et al., 1996 – Slattery et al., 1998).

De plus, la cinétique du busulfan présente une importante variabilité inter-individuelle mais également intra-individuelle comme cela a été exposé précédemment.

L'individualisation des posologies est à envisager lorsque la molécule utilisée présente une variabilité interindividuelle marquée au niveau de ses paramètres pharmacocinétiques et possède un index thérapeutique étroit. Le busulfan remplit donc pleinement ces critères, ce d'autant plus que le traitement ne dure que quatre jours lors des conditionnements pré-greffe et que l'intervalle entre deux doses est généralement de six heures (la posologie standard est de 1 mg/kg/dose, 16 doses au total administrées par os toutes les 6 heures). Il convient donc d'employer des méthodes analytiques rapides et précises permettant d'obtenir des résultats de dosages dans les heures suivant les prélèvements. Les méthodes classiquement employées sont la chromatographie gazeuse (couplée à un spectromètre de masse ou avec capture d'électrons) et la chromatographie liquide haute performance avec détection dans l'ultra-violet.

Le suivi thérapeutique de l'exposition systémique des patients au busulfan associé à un ajustement des doses a permis une augmentation du taux de prise de greffe et une diminution de la toxicité en lien avec le traitement, à condition que l'adaptation des posologies soit réalisé suffisamment rapidement au cours du traitement (117-118-119) (Slattery et al., 1995 – Bolinger et al., 2000 – Bolinger et al., 2001). Il doit s'appliquer à tous les patients, aucun facteur ne permettant de prédire quel patient aura besoin d'un ajustement de doses. Dans l'étude de Bolinger et al. (119), 74% des patients ont eu besoin d'une dose différente de la dose standard préconisée par les différents protocoles pour atteindre la cible thérapeutique prédéfinie. Mais l'utilisation du busulfan en pédiatrie impose en plus un nombre de prélèvements limité. Dans ce contexte, l'utilisation d'une méthode bayésienne pour estimer les paramètres pharmacocinétiques d'un patient à partir de quelques prélèvements sanguins permettant la réalisation d'une adaptation des posologies s'avère très utile.

Bleyzac et al. (122) ont mis en évidence l'intérêt de la réalisation d'une dose-test pour prédire la valeur de l'AUC au cours du conditionnement par du busulfan en pédiatrie. Les paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés par méthode bayésienne



(utilisation du logiciel USC*Pack). Cette étude a montré l'existence d'une bonne corrélation entre les AUC prédites et observées mais également une moindre incidence de la maladie veno-occlusive, une plus grande proportion de prise de greffe à trois mois ainsi qu'un taux de survie sans maladie veno-occlusive significativement plus important dans le groupe des enfants ayant bénéficié d'une dose-test et d'adaptation de posologie durant les quatre jours du conditionnement par rapport au groupe ayant reçu une dose standard de busulfan.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL

1. OBJECTIFS

Ce travail a eu pour objectif de mettre à disposition des données de pharmacocinétique de population spécifiques afin d'optimiser la réalisation des adaptations de posologie de busulfan lors des conditionnements pré-greffe en pédiatrie. Nous avons étudié l'influence de la pathologie sur la pharmacocinétique du busulfan en utilisant une approche de pharmacocinétique de population. Cette hypothèse s'appuie sur des résultats allant dans ce sens obtenus dans différentes études (97,103,105) (Jacobson et al., 2001 – Pawlowska et al., 1997 – Hassan et al., 1996).

Dans une deuxième partie, nous avons étudié plus spécifiquement la pharmacocinétique du busulfan chez les enfants de moins de 9 kg. En effet, bien que l'introduction du busulfan par voie intra veineuse ait permis de réduire la variabilité pharmacocinétique due à la phase d'absorption digestive avec une variabilité intra-individuelle moindre qu'avec la forme per os (123) (Nguyen et al. 2004), la variabilité inter-individuelle reste importante (124) (Zwaveling et al. 2005) et peut atteindre 30% même lorsque l'âge et le poids sont pris en compte. L'utilisation de la forme IV a permis d'augmenter le nombre de patients ayant une exposition systémique au busulfan efficace et sûre (inférieure au seuil toxique) puisque 75% d'entre eux ont eu des AUC comprises dans l'intervalle 900 – 1200 $\mu\text{mol/l.h}$ sans contrôle pharmacologique des taux de busulfan. Mais chez les très jeunes enfants, ce taux est inférieur à 54% (123) (Nguyen 2004).

Des travaux rapportent un taux de MVO de 26% chez des enfants traités par busulfan IV, ce qui est comparable au taux obtenu avec la forme per os (124) (Zwaveling et al. 2005). Ceci pourrait être dû à une mauvaise définition de la posologie chez les très jeunes enfants, l'étude ayant abouti à cette posologie n'ayant inclus que 24 patients dans cette population (123) (Nguyen et al. 2004). Ces résultats sont confirmés par l'étude de Kletzel et al. (125) (Kletzel et al. 2006) où 86% des patients n'ayant pas atteint la fenêtre thérapeutique optimale en terme d'AUC avec du busulfan IV étaient âgés de moins de deux ans. Le laboratoire commercialisant la forme IV du busulfan recommande une posologie de 1 mg/kg toutes les 6 heures pour les enfants de moins de 9 kg. Avec cette

posologie utilisée chez des nourrissons de moins de 10 kg, Dalle et al. ont rapporté une variabilité pharmacocinétique inter-individuelle substantielle, suggérant ainsi que le contrôle pharmacologique des taux de busulfan serait utile chez ces patients (126) (Dalle et al 2003). Les AUC rapportées étaient comprises entre 982 et 1986 $\mu\text{mol/l.min}$, montrant ainsi que si la posologie de 1mg/kg/6h convient pour certains patients, une partie d'entre eux a néanmoins présenté un surdosage. Nous avons observé le même type de résultats dans notre pratique clinique et un cas de MVO fatale est survenu chez un enfant greffé pour déficit immunitaire et ayant reçu un conditionnement par busulfan IV à la posologie de 1 mg/kg/6h. Du fait de données encore peu abondantes à ce sujet, nous rapportons notre expérience clinique sur une cohorte de patients de moins de 9 kg. Puisque la posologie recommandée pour la forme IV du busulfan est la même que pour la forme per os (1 mg/kg/6h), il nous a semblé intéressant d'inclure également notre expérience avec la forme orale chez les enfants de moins de 9 kg. Contrairement à l'étude de Dalle et al. qui décrivait quelles AUC étaient atteintes avec une posologie de 1 mg/kg/6h, notre étude a eu pour objectif d'étudier quelles doses de busulfan ont dû être administrées pour atteindre les AUC cibles. De plus, aucun inducteur enzymatique tel que la phénytoïne (utilisée en prévention des toxicités neurologiques) n'a été administré aux patients de notre cohorte, ce qui n'a pas été le cas dans l'étude de Dalle et al. où une réduction de dose a été nécessaire chez 83% des patients traités par benzodiazépine (126).

Enfin, dans une dernière partie, nous avons analysé l'intérêt de l'individualisation bayésienne quotidienne des posologies du busulfan sur l'incidence de survenue de la maladie veno-occlusive (MVO), l'une des principales complications de la greffe de moelle osseuse (étude EVODI). Suite à l'étude de Bleyzac et al. (122) démontrant l'intérêt de ce suivi thérapeutique, l'individualisation bayésienne des posologies de busulfan a été systématiquement mise en place pour tout conditionnement à l'hôpital Debrousse. Bien que ce protocole permette de contrôler l'exposition systémique des patients au busulfan, tout surdosage par rapport aux cibles prévues peut entraîner la survenue d'une MVO. La MVO est donc une mesure importante de la performance de l'adaptation bayésienne des posologies de busulfan. Le suivi d'une procédure est nécessaire afin de détecter la survenue de modifications, le process doit alors être ré-

examiné pour renforcer les pratiques bénéfiques et a contrario éliminer les facteurs susceptibles de dégrader les performances de la procédure mise en place. L'analyse des sommes cumulées (CUSUM) est une méthode de maîtrise statistique des processus dérivée de l'industrie qui permet de contrôler les tendances d'événements séquentiels dans le temps. Cet outil statistique fournit un résumé graphique des changements de performance dans le temps et permet de détecter rapidement de petites déviations significatives (127) (Montgomery D). Récemment, Steiner et al. (128-129) ont développé une méthode avec ajustement en fonction du risque (RA-CUSUM, risk-adjust cumulative sum) permettant l'utilisation de l'analyse des sommes cumulées dans le domaine de la santé avec des cohortes de patients hétérogènes d'un point de vue physiopathologique. Concernant la MVO, différents facteurs de risque ont été identifiés (130) (Carreras et al. 2000) et les patients présentent une grande hétérogénéité face au risque de développement de MVO. Ainsi la technique RA-CUSUM a pu être appliquée pour tester les performances de l'adaptation bayésienne des posologies sur l'incidence de survenue de MVO chez les patients recevant un conditionnement pré-greffe incluant du busulfan.

2. MATERIEL ET METHODE

2.1. PATIENTS

2.1.1. Etude de pharmacocinétique de population

Notre étude pharmacocinétique a inclus cent patients. Ces patients ont tous reçu un traitement par busulfan oral en vue d'une transplantation de moelle osseuse entre mars 1998 et février 2006. Les caractéristiques des sujets sont présentées dans le tableau IV.

Tableau IV : Caractéristiques des 100 patients de l'étude

Caractéristiques	Moyenne $\pm$ SD
Sexe ratio (filles/garçons)	0,39
Age (années) au premier jour du conditionnement	5,3 $\pm$ 4,8
Poids (kg) au premier jour du conditionnement	19,5 $\pm$ 13,4

Les différentes indications nécessitant une greffe de moelle osseuse chez ces enfants ont été réparties en quatre classes de pathologies. Ces pathologies sont détaillées dans le tableau V.

Tableau V : Classes des pathologies étudiées

Classe	Pathologie	Nombre de sujets
Maladies hématologiques malignes	Leucémie aiguë myéloïde	27
	Leucémie aiguë lymphoïde	8
	Syndrome myélodysplasique	12
	Leucémie myélomonocytaire juvénile chronique	3
	Total	50
Maladies hématologiques non malignes	Drépanocytose	6
	Thalassémie	6
	Drépano-thalassémie	1
	Total	13
Maladies métaboliques	Hurler	11
	Hunter	2
	Nieman-Pick	1
	Porphyrie	2
	Ostéopétrose	2
	Hémoglobinurie paroxystique nocturne	1
	Déficit en ADA	1
	Déficit en aspartine glutaminidase	1
	Fucosidose	1
	Maladie de Schimke	1
	Mucopolysaccharidose	1
	Total	24
Déficits immunitaires	Déficits immunitaires combinés sévères	12
	Wiskott Aldrich	1
	Total	13

Le conditionnement pré-greffe par busulfan se fait sur quatre jours : seize doses sont administrées au total, soit une dose toutes les six heures. Les gélules, préparées par la pharmacie, sont généralement administrées à 8h30, 14h30, 20h30 et 2h30, à distance des repas. Lors de ces quatre jours de conditionnement, des dosages plasmatiques sont réalisés quotidiennement après la prise du matin, ceci afin de s'affranchir de la variabilité liée au rythme circadien de la cinétique du busulfan. Le premier jour, trois prélèvements sont effectués : le premier une heure après la prise pendant la phase d'absorption, le second deux heures trente après la prise soit proche de la concentration plasmatique maximale et le troisième au cours de la phase d'élimination cinq heures après la prise. Ces horaires correspondent à des temps de prélèvements optimaux (131,132) (D'Argenio DZ. 1981 – Tod et al., 1998), moments de prélèvement pour lesquels l'erreur sur l'estimation des paramètres pharmacocinétiques est la plus faible. Les trois jours suivants, seuls deux prélèvements sont réalisés 1h30 et 5h après la prise du matin afin de réduire le nombre de prélèvements chez les enfants. Les posologies sont adaptées quotidiennement en fonction des résultats des dosages.

2.1.2. Etude chez les nourrissons de moins de 9 kg

Cette étude rétrospective a inclus tous les patients recevant un conditionnement pré-greffe incluant du busulfan (per os ou IV) et pesant moins de 9 kg. Dix neuf patients, âgés de 3 à 17 mois (âge moyen $\pm$ SD = 7.3 $\pm$ 3.8 mois) et pesant entre 3,9 et 8,5 kg ont bénéficié d'une greffe de moelle osseuse dans notre centre entre Juin 2000 et Août 2006, après un conditionnement par busulfan et sans irradiation. Les patients ont été greffés pour les indications suivantes : maladies métaboliques (n = 5), déficit immunitaire (n = 7) et maladies malignes (LAL : n= 2, LAM : n = 3, LMMJ : n = 1, SMD : n = 1). Les protocoles de conditionnement ont été busulfan-cyclophosphamide (200 mg/kg) chez 15 patients, busulfan-cyclophosphamide (200 mg/kg)-etoposide (60 mg/kg) chez 2 patients et busulfan-cyclophosphamide (200 mg/kg)-melphalan (140 mg/m²) chez 2 patients. Le tableau VI résume les caractéristiques de ces patients.

Tableau VI : Caractéristiques des nourrissons

Patient (sexe)	Indication	Age (mois)	Poids (Kg)	Donneur	Conditionnement
1 (M)	DI	9	6.50	phenoMM	Bu Cy
2 (M)	DI	6	6.60	phenoMM	Bu Cy
3 (M)	DI	3	5.17	pheno	Bu Cy
4 (F)	DI	9	6.20	phenoMM	Bu Cy
5 (M)	DI	8	7.70	phenoMM	Bu Cy
6 (M)	DI	3	4.30	phenoMM	Bu Cy
7 (M)	DI	6	7.16	phenoMM	Bu Cy
8 (F)	LAL	12	7.07	phenoMM	Bu Cy VP16
9 (M)	LAL	12	8.00	geno	Bu Cy VP16
10 (F)	LAM	6	8.32	geno	Bu Cy
11 (M)	LAM	6	7.76	pheno	Bu Cy
12 (F)	LAM	6	7.41	phenoMM	Bu Cy
13 (M)	LMMJ	5	6.18	pheno	Bu Cy Mel
14 (M)	SMD	7	8.50	pheno	Bu Cy Mel
15 (F)	Maladie métabolique	12	7.38	phenoMM	Bu Cy
16 (F)	Maladie métabolique	17	5.10	phenoMM	Bu Cy
17 (M)	Maladie métabolique	5	5.70	geno	Bu Cy
18 (F)	Maladie métabolique	3	3.90	phenoMM	Bu Cy
19 (M)	Maladie métabolique	3	4.60	phenoMM	Bu Cy

Bu : busulfan, Cy : cyclophosphamide, VP 16 : etoposide, Mel : melphalan
Géno : geno-identique, Pheno : pheno-identique, phenoMM : pheno-identique mismatch

Du clonazepam (0,1 mg/kg) a été administré afin de prévenir les crises convulsives pouvant survenir au décours d'un traitement par busulfan et une prophylaxie par Ursodiol (URSOLVAN®) a été réalisée afin de lutter contre la MVO.

La posologie a été la même que celle décrite pour la précédente étude. Le busulfan a été administré toutes les 6 heures pendant 4 jours, avec une adaptation individualisée des posologies. Les temps de prélèvement ont été les mêmes que précédemment pour la forme orale. En ce qui concerne la forme IV, deux échantillons sanguins ont été prélevés 30 minutes et 5 heures après la fin de la première et de la 5^{ème} administration et n'ont été répétés que si une variabilité pharmacocinétique intra-individuelle était observée entre les deux premiers jours du conditionnement. Pour la forme orale, les gélules préparées par la pharmacie ont été administrées, la spécialité commercialisée par les laboratoires Pierre Fabre (BUSILVEX®) a été utilisée pour les administrations intra-veineuses.

2.1.3. Etude EVODI

Entre Juin 2000 et Février 2006, 128 enfants ont reçu un conditionnement pré-greffe de moelle osseuse mais seuls les patients recevant du busulfan oral ont été inclus dans cette analyse soit 66 patients. Les patients ayant reçu la forme injectable de busulfan n'ont pas été retenus pour cette étude, Kashyap et al. (133) ayant démontré que cette forme injectable réduisait le risque de MVO. L'âge médian des enfants inclus est de 3,9 ans (1,2 mois à 15,7 ans). Les caractéristiques des patients sont résumées dans le tableau VII.

Tableau VII : Caractéristiques des patients de l'étude EVODI

Nombre de patients	N = 66
Age (années) médian	3,9 [0,1 – 15,7]
Sexe ratio (filles/garçons)	0,36
Diagnostic	
Maladies malignes	
Leucémie aiguë myéloïde	5
Leucémie aiguë lymphoïde	19
Syndrome myélodysplasique	6
Leucémie myélomonocytaire juvénile chronique	2
Maladies non malignes	
Aplasie médullaire	2
Anémie de Fanconi	1
Thalassémie	2
Drépanocytose	7
Maladie métabolique	14
Déficit immunitaire	8
Type de greffon	
Géno identique	25
Phéno identique	18
Phéno mismatch	23
Statut CMV du receveur (positif)	
AUC (µg/ml.h) de busulfan (moyenne ± SD)	3,99 ± 0,5
Nutrition parentérale avant greffe (oui)	11
Risque estimé de MVO avant le conditionnement (médiane [valeurs extrêmes])	0,34 [0,23 - 0,84]

2.2. METHODE ANALYTIQUE

Le busulfan est dosé dans le plasma par chromatographie en phase liquide. Les détails de cette méthode de dosage sont décrits par Bleyzac et al. (134). La limite de détection est de 25 ng/ml et la méthode est linéaire jusqu'à 25 000 ng/ml. Deux cents microlitres seulement de plasma sont nécessaires pour réaliser cette analyse. Cette technique présente l'avantage d'être relativement rapide, permettant ainsi l'exploitation des résultats en vue d'une adaptation de posologie le jour même des prélèvements. Le busulfan est dégradé extrêmement rapidement à température ambiante et s'adsorbe sur le verre. De ce fait, les prélèvements (réalisés sur tubes héparinés en verre) sont placés immédiatement dans la glace, transmis au laboratoire très rapidement et centrifugés à 4°C. Le plasma est recueilli dans des tubes en polypropylène et conservé à -20°C.

2.3. RECUEIL ET TRAITEMENT DES DONNEES

Les résultats des dosages ainsi que toutes les informations relatives au patient (nom, âge, poids, taille, mais aussi les doses reçues, les horaires d'administration, les horaires des prélèvements) sont enregistrés dans un fichier informatique grâce au programme PASTRX contenu dans le logiciel USC*Pack Clinical PC programs (109) (Jelliffe et al., 1998). L'ensemble de ces dossiers-patients est ensuite utilisable par le logiciel de pharmacocinétique de population NPAG (114) (Leary et al.). Ce logiciel comporte dans une première partie un programme itératif bayésien en deux étapes (IT2B) (135) (Jelliffe et al., 1997) permettant notamment d'obtenir une évaluation des bornes des paramètres pharmacocinétiques étudiés, c'est-à-dire leur étendue possible. Ces bornes sont ensuite utilisées dans le programme NPAG proprement dit. IT2B permet aussi de déterminer les coefficients de la courbe d'erreur analytique (à partir de données initiales ou non) ainsi que de calculer un coefficient gamma. Gamma est un coefficient multiplicateur que l'on applique aux différents coefficients de la courbe d'erreur analytique afin de prendre en compte d'autres sources de variabilité que l'erreur analytique (incertitudes sur la dose exactement administrée, sur l'heure d'administration, sur l'heure de prélèvement...). C'est

une mesure globale des autres sources de variabilité intra-individuelle. Ainsi, gamma est généralement supérieur à 1.

Le logiciel NPAG est un programme de calcul itératif qui cherche à obtenir les combinaisons des paramètres pharmacocinétiques les plus probables en maximisant une fonction de vraisemblance. Le programme s'arrête lorsqu'un critère de convergence est atteint c'est à dire lorsque la différence entre les valeurs de la fonction de vraisemblance obtenues après deux cycles itératifs successifs est inférieure à une valeur déterminée (généralement 0.001%). Si ce critère n'est pas atteint, le programme s'interrompt après un nombre déterminé de cycles mais dans ce cas, cela signifie que le modèle pharmacocinétique n'est pas satisfaisant et que l'analyse ne peut aboutir à des résultats. Au terme de chaque analyse, NPAG fournit différents résultats parmi lesquels :

- La valeur du logarithme de la fonction de vraisemblance, qui doit être la plus élevée possible
- La moyenne, la médiane et les coefficients de variation des paramètres pharmacocinétiques étudiés
- Des graphes représentant les densités de probabilité marginales de chaque paramètre et les densités de probabilité jointives d'un couple de paramètres
- L'étude de la corrélation entre les concentrations plasmatiques prédites et les concentrations observées, ce qui reflète les capacités du modèle à prédire les concentrations plasmatiques des sujets. Pour chaque corrélation sont donnés le coefficient de détermination (R^2), la précision (MSE : Mean Squared Error) et le biais (ME : Mean Error), liés à la dispersion des concentrations autour de la droite identité $y = x$.

Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SPSS pour Windows (version 11.5, SPSS, Chicago, IL, USA).

2.4. ETUDE DE PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION

Au vu des résultats de la littérature, le modèle pharmacocinétique utilisé est un modèle à un compartiment, avec une absorption et une élimination d'ordre 1. Nous avons tenu compte des éventuels retards d'absorption observés pour certains patients. Le volume de distribution est représenté par V_s , le poids des patients étant pris en compte en exprimant le volume de distribution rapporté au poids corporel.

L'élimination du busulfan à partir du compartiment central s'effectue majoritairement par voie non rénale (métabolisme hépatique). Du fait de la métabolisation quasi exclusivement hépatique du busulfan, la clairance de la créatinine n'a pas été retenue comme une covariable d'élimination et la valeur de la clairance de la créatinine (ClCr) a été fixée arbitrairement à 100 $\mu\text{mol/l/min}$ pour tous les patients lors de la saisie des fichiers-patients dans USC Pack.

Ainsi la quantité de busulfan dans le compartiment central est résumée par l'équation différentielle :

$$XP(2) = K_a * X(1) - Cl / (V_s * BW) * X(2)$$

Avec $X(1)$: quantité dans le compartiment d'absorption

$X(2)$: quantité dans le compartiment central

K_a : constante d'absorption

Cl : clairance du busulfan

V_s : volume de distribution rapporté au poids corporel

BW : poids corporel

2.4.1. Recherche du modèle d'erreur

Dans une première étape, différents modèles ont été étudiés à partir d'une population constituée de 55 patients afin de déterminer le modèle d'erreur le mieux adapté. Ces modèles diffèrent par la courbe d'erreur qui leur est associée, cette courbe d'erreur étant représentée par un polynôme du 3^{ème} degré du type :

$$SD = C_0 + C_1x + C_2x^2 + C_3x^3$$

SD représente l'écart-type de l'erreur analytique, C_0 , C_1 , C_2 , C_3 sont les coefficients du polynôme et x représente la concentration mesurée (en $\mu\text{g/ml}$). Il s'agit d'un modèle d'erreur hétéroscédastique

La comparaison se base sur la qualité de l'ajustement entre les concentrations prédites par ces différents modèles et les concentrations observées : étude du biais et de la précision. Six modèles ont été testés :

- a. Les coefficients du polynôme sont ceux qui ont été déterminés pour la courbe d'erreur analytique lors d'une précédente étude par P. Magron (136).

$$C_0 = 0,0003 \quad C_1 = 0,1493 \quad C_2 = -0,077 \quad C_3 = 0,0135$$

- b. Les coefficients ci-dessus ont été multipliés par un coefficient gamma déterminé par IT2B : $\gamma = 2.88863$.

$$C_0 = 0,001 \quad C_1 = 0,43127 \quad C_2 = -0,22243 \quad C_3 = 0,03900$$

- c. Les coefficients ont été entièrement estimés par IT2B :

$$C_0 = 0,15241 \quad C_1 = -0,42198 \quad C_2 = 0,61321 \quad C_3 = -0,10343$$

- d. Les coefficients ci-dessus ont été multipliés par $\gamma = 1.05644$ (γ a été déterminé par IT2B) :

$$C_0 = 0,16101 \quad C_1 = -0,44580 \quad C_2 = 0,64782 \quad C_3 = -0,10927$$

- e. Les coefficients ont été estimés par IT2B à partir des coefficients déterminés par l'étude de P. Magron (136) :

$$C_0 = 0 \quad C_1 = 0,40348 \quad C_2 = -0,48205 \quad C_3 = 0,28673$$

- f. Les coefficients ci-dessus ont été multipliés par $\gamma = 1.06034$ (γ a été déterminé par IT2B) :

$$C_0 = 0 \quad C_1 = 0,42782 \quad C_2 = -0,51113 \quad C_3 = 0,30403$$

2.4.2. Etude des paramètres pharmacocinétiques et de l'influence de la pathologie

A partir du modèle d'erreur sélectionné ci-dessus, nous avons étudié les paramètres pharmacocinétiques de la population globale ($n = 100$ patients) et des quatre groupes de patients répartis en fonction de leur pathologie à l'aide du logiciel NPAG. Les quatre classes de pathologie regroupent les maladies hématologiques malignes (leucémies, syndromes myélodysplasiques), les hémoglobinopathies (drépanocytoses, thalassémies), les maladies métaboliques congénitales (maladie de Hurler...) et les déficits immunitaires. La répartition des 100 patients étudiés au sein de ces différentes classes de pathologies a été donnée dans le tableau V. Les paramètres étudiés sont la constante d'absorption (K_a), le volume de distribution rapporté au poids corporel (V_s) et la clairance (Cl). Les bornes de ces différents paramètres ont été définies par IT2B. De plus, les aires sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps (AUC) ont été estimées à l'aide du logiciel USC Pack.

Afin d'estimer la qualité des différents modèles de population testés, les critères suivants sont pris en compte :

- étude de la variabilité inter-individuelle : une diminution de cette variabilité se traduit notamment par une diminution du nombre de pics des densités de probabilité dans la distribution des paramètres ainsi que par une réduction de l'écart-type associé à l'estimation des paramètres.
- étude de la qualité de l'ajustement entre les concentrations plasmatiques prédites par le modèle et les concentrations observées. Une amélioration du modèle se traduit par une diminution du biais, une amélioration de la précision et une augmentation du coefficient de corrélation.

2.4.3. Etude de la variabilité intra-individuelle (AUC)

Plusieurs études ont rapporté une variabilité intra-individuelle plus ou moins importante. Nous avons donc tenté de quantifier cette variabilité au sein de notre population en étudiant les variations d'AUC et en comparant les AUC obtenues aux 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} jour de traitement (soit après les doses 5, 9 et 13) à l'AUC obtenue le 1^{er} jour de traitement (après la 1^{ère} dose). Cette étude a été réalisée sur notre population globale ainsi que pour chaque groupe de pathologie précédemment défini.

2.5. ETUDE CHEZ LE NOURRISSON

L'évaluation clinique s'est basée sur l'étude de la survenue de MVO et sur l'étude de la prise de greffe (chimérisme). Nous avons évalué l'incidence et la sévérité des MVO et recherché une corrélation avec les doses de busulfan administrée et les AUC observées. Le diagnostic de MVO a été fait suivant les critères cliniques de Seattle (44) (Mc Donald et al. 1984). Deux au moins des trois critères suivants devaient être présents :

- hyperbilirubinémie : bilirubinémie > 2 mg/dl ou 34.2 μ mol/l
- hépatomégalie ou douleur de l'hypocondre droit d'origine hépatique
- ascite et/ou prise de poids soudaine (> 2,5% du poids de référence)

La MVO était classée comme légère, modérée ou sévère, tel que décrit par McDonald et al. (44).

La prise de greffe a également été étudiée selon les critères suivants : incidence de rejet de greffe (défini par l'absence de cellules du donneur), existence d'un chimérisme mixte (présence de cellules du donneur et du receveur) ou prise de greffe complète (définie par la présence de > 95% de cellules du donneur). Ces résultats ont été corrélés aux AUC obtenues au cours du conditionnement.

2.6. ETUDE EVODI

2.6.1. Etude des MVO

L'étude de l'incidence des MVO a été faite selon les mêmes modalités que celles décrites pour l'étude chez les nourrissons (paragraphe 2.5.)

2.6.2. Ajustement

Pour tester les performances d'une technique médicale, un ajustement en fonction du risque est nécessaire. Afin d'assigner un score de risque de MVO à chaque patient, nous avons utilisé des estimations à partir de la littérature. Peu de données sont disponibles à ce sujet : nous avons repris une estimation de Barker et al. (49) où une méthode de régression logistique a permis d'estimer la probabilité de développer une MVO à partir des critères suivants : type de greffon, statut du receveur par rapport au cytomégalovirus, conditionnement incluant du busulfan et administration d'une nutrition parentérale avant la transplantation.

2.6.3. Procédure d'analyse des sommes cumulées avec ajustement en fonction du risque (RA-CUSUM)

La technique d'analyse des sommes cumulées avec ajustement en fonction du risque a été décrite en détail par Steiner et al. (128 – 129). La statistique suivie est une somme d'écarts cumulés entre la moyenne de l'échantillon et une valeur cible. Afin de construire la carte de contrôle RA-CUSUM avec des limites de contrôles permettant de détecter le moment où la performance du processus devient inacceptable (ou acceptable), quatre paramètres ont été spécifiés :

- le taux de MVO considéré comme acceptable (p_0),

- le taux de MVO considéré comme inacceptable en suivant notre procédure d'adaptation des posologies de busulfan (p_1),
- le risque α ou risque de première espèce : probabilité de conclure que le taux de MVO est « hors contrôle » alors qu'il ne l'est pas. Ce risque est également appelé risque de fausse alarme,
- le risque β ou risque de deuxième espèce : probabilité de conclure que le taux de MVO est « sous contrôle » alors qu'il ne l'est pas.

Afin de détecter une augmentation des odds de MVO avec notre procédure d'adaptation bayésienne quotidienne des posologies de busulfan, une carte de contrôle RA-CUSUM a été établie en étudiant le CUSUM (X_t) par rapport au score de risque pondéré de chaque patient (W_t). Ce score de risque est pondéré en fonction du risque estimé pour chaque patient de développer une MVO en regard des critères de risque pré-transplantation cités précédemment (type de greffon, statut du receveur par rapport au cytomégalo virus, conditionnement incluant du busulfan et administration d'une nutrition parentérale avant la transplantation) :

$$X_t = \max(0, X_{t-1} + W_t) \quad (1)$$

De même, pour détecter une diminution des odds de MVO, la fonction suivante a été utilisée :

$$X_t = \min(0, X_{t-1} - W_t) \quad (2)$$

Le score W_t attribué à chaque patient dépend du risque estimé de développer une MVO, du devenir y_t du patient vis à vis de la MVO ($y_t = 0$ pour les patients sans MVO, $y_t = 1$ pour les patients déclarant une MVO) et de l'odds ratio (OR_A) définissant le niveau alternatif de performance à détecter.

Dans cette étude, le risque p_t de chaque patient de développer une MVO dérive du modèle décrit par Barker et al. (49). Puisque le risque de chaque patient varie, OR_A a été défini comme l'odds ratio permettant de détecter un doublement ($OR_A = 2$) ou une diminution de moitié ($OR_A = 0,5$) de l'odds de MVO. Le score (W_t) de chaque patient dérive de l'utilisation d'un ratio des logarithmes de vraisemblance (log likelihood). Celui-ci est défini par le logarithme du ratio de la probabilité du devenir observé versus la probabilité attendue avec le risque estimé p_t .

Si la patient t développe une MVO, le score attribué à ce patient est :

$$W_t = \log_e (OR_A / 1 - pt + OR_{Apt}) \quad (3)$$

Si le patient n'a pas de MVO, le score est :

$$W_t = \log_e (1 / 1 - pt + OR_A X_{pt}) \quad (4)$$

2.6.4. Interprétation

La valeur du RA-CUSUM (équations 1 et 2) accumule les informations de tous les patients ayant reçu un conditionnement pré-greffe et prend donc en compte l'historique du processus. La valeur de cette fonction augmente si les performances de la procédure d'adaptation des posologies de busulfan se détériorent et tend à fluctuer autour de zéro si aucun changement ne se produit. Ainsi l'interprétation des valeurs du RA-CUSUM vient de la position relative de ces valeurs par rapport aux limites de contrôle prédéfinies. Tant que les valeurs restent entre ces limites de contrôle, aucune décision ne peut être prise et la procédure de monitoring doit être maintenue. Si la valeur du RA-CUSUM dépasse la limite de contrôle supérieure, cela marque une dégradation des performances de la procédure. Inversement, lorsque la limite inférieure est franchie, on peut confirmer la qualité du processus.

Le risque de base de MVO a été fixé à 3,4%, ce qui correspond au taux de MVO rapporté pour notre centre dans une étude précédente (122) (Bleyzac et al. 2001). La carte de contrôle a été mise en place afin de détecter un doublement ou une diminution de moitié du risque de l'odds de MVO, ce qui correspond à détecter une augmentation du risque de MVO à 6,7% ou une diminution à 1,7%. Les risques α et β ont été fixés à 5% et 20% respectivement. Avec ces paramètres, la valeur de la limite de contrôle supérieure h_1 a été fixée à +2,25 et la valeur de la limite inférieure h_0 fixée à -4.

L'ensemble des analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R2.20 (137).

Les détails de cette méthode d'analyse sont donnés en annexe 2.

3. RESULTATS

3.1. ETUDE DE PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION

3.1.1. Choix du modèle d'erreur

Le choix entre les six modèles testés a été réalisé à partir de la comparaison de la qualité de l'estimation des paramètres pharmacocinétiques (fonction de vraisemblance et entropie) et de la qualité de prédiction des concentrations plasmatiques (coefficients de corrélation, précision et biais). Les paramètres du modèle pharmacocinétique sont la constante d'absorption K_a , le volume de distribution rapporté au poids V_s et la constante d'élimination K_{el} . Les valeurs des critères de comparaison entre les différents modèles sont reportées dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Critères de comparaison de l'estimation des paramètres Ka, Vs et Kel obtenus dans les six modèles d'erreur analytique

		Modèle a	Modèle b	Modèle c	Modèle d	Modèle e	Modèle f
Coefficient γ		1	2.889	1	1.056	1	1.060
log de la fonction de vraisemblance		-1080.4	33.1	112.3	115.9	79.4	83
Entropie		3.79	2.89	3.00	2.96	2.81	2.77
ME	moy	-0.057	-0.090	-0.131	-0.135	-0.119	-0.129
	r (moy)	0.8868	0.8729	0.8005	0.7994	0.7903	0.7901
	med	-0.049	-0.058	-0.112	-0.112	-0.106	-0.105
	r (med)	0.8855	0.8721	0.7972	0.7915	0.7900	0.7908
MWE	moy	-0.519	-0.377	-0.489	-0.481	-0.400	-0.451
	med	-0.373	-0.151	-0.264	-0.238	-0.280	-0.254
MSE	moy	0.043	0.052	0.087	0.088	0.085	0.087
	med	0.042	0.047	0.086	0.087	0.083	0.082
MWSE	moy	7.573	1.122	1.383	1.233	1.199	1.151
	med	7.522	1.019	1.121	1.018	1.111	0.982

 meilleur résultat
 2^{ème} meilleur résultat

ME, MWE : Mean Error, Mean Weighted Error

MSE, MWSE : Mean Squared Error, Mean Weighted Squared Error

moy : calculs réalisés avec la moyenne des paramètres estimés

r (moy) : coefficient de corrélation obtenu lorsque les calculs sont réalisés avec la moyenne des paramètres estimés

med : calculs réalisés avec la médiane des paramètres estimés

r (med) : coefficient de corrélation obtenu lorsque les calculs sont réalisés avec la médiane des paramètres estimés

D'après ces résultats, le modèle b a été sélectionné : l'équation de la courbe d'erreur, avec gamma fixé à 2,888 est donc :

$$\text{Total SD} = 0,001 + 0,43127C - 0,22243C^2 + 0,039C^3 \quad (\text{figure 2})$$

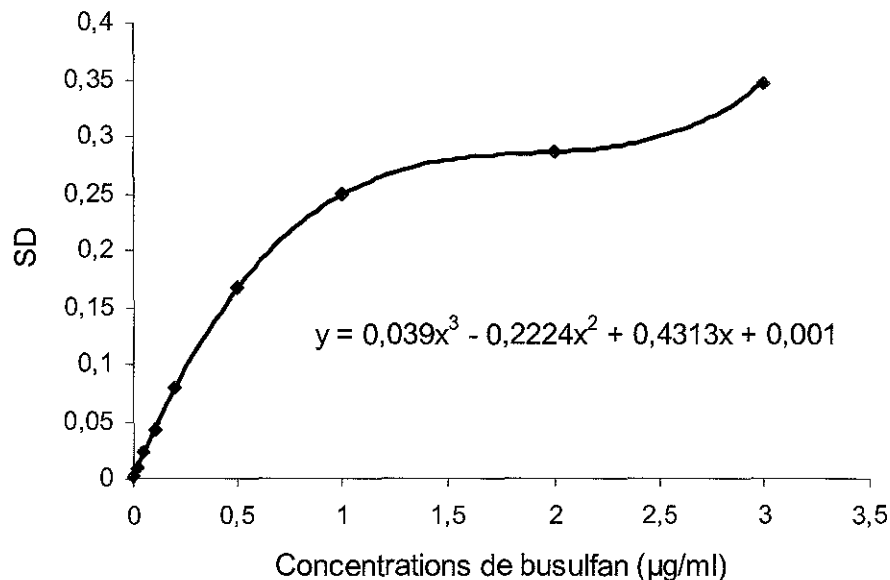


Figure 2 : Total SD

(Courbe d'erreur analytique multipliée par le coefficient gamma)

Le logarithme de la fonction de vraisemblance et l'entropie ne sont pas les meilleurs obtenus parmi les différents modèles, cependant, on obtient une meilleure capacité de prédiction des concentrations plasmatiques. Les résultats obtenus à partir de la médiane des paramètres pharmacocinétiques sont plus précis et moins biaisés que ceux obtenus avec la moyenne.

3.1.2. Estimation des paramètres pharmacocinétiques en fonction de la pathologie

En utilisant la courbe d'erreur correspondant au modèle b ci-dessus, nous avons estimé les paramètres pharmacocinétiques du busulfan au sein de la population globale (100 patients) ainsi que dans chacune des quatre populations correspondant à une classe de pathologie. Les bornes des paramètres étudiés, déterminées par IT2B, ont été les suivantes:

- K_a est compris entre 0 et 10 h^{-1}
- V_s est compris entre 0 et 2 l.kg^{-1}
- Cl est compris entre 0 et 12 l.h^{-1}

Nous avons dans certains cas étendu ces bornes afin d'améliorer la distribution des densités de probabilité des paramètres : au final les bornes utilisées dans les différents groupes de patients sont résumées dans le tableau IX. Les résultats des estimations des paramètres pharmacocinétiques figurent dans le tableau X.

Tableau IX : Bornes des paramètres pharmacocinétiques étudiés

	Population globale	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV.
$K_a (\text{h}^{-1})$	0 – 13	0 – 12	0 – 10	0 – 13	0 – 12
$Cl (\text{l.h}^{-1})$	0 – 16	0 – 16	0 – 12	0 – 15	0 – 12
$V_s (\text{l.kg}^{-1})$	0 - 4	0 - 2	0 - 2	0 - 3	0 - 4

Groupe 1 : population regroupant les patients atteints de maladies métaboliques

Groupe 2 : population regroupant les patients atteints de maladies hématologiques non malignes

Groupe 3 : population regroupant les patients atteints de maladies hématologiques malignes

Groupe 4 : population regroupant les patients souffrant de déficits immunitaires

Tableau X : Estimation des paramètres pharmacocinétiques dans la population totale et par classe de pathologie

Population		Population globale n = 100	Groupe I n = 24	Groupe II n = 13	Groupe III n = 50	Groupe IV. n = 13
Log Likelihood		68.4	32.6	45.7	14.5	35.1
Ka (h ⁻¹)	moy	2.32	3.41	3.93	3.59	3.38
	med	1.59	2.15	1.47	1.91	0.75
	CV (%)	102	93	110	107	136
Vs (l.kg ⁻¹)	moy	0.70	0.58	0.79	0.81	0.72
	med	0.75	0.66	0.78	0.80	0.39
	CV (%)	65	48	21	42	125
Cl/F (l. h ⁻¹)	moy	4.84	4.25	7.78	4.63	3.59
	med	4.14	3.70	7.36	3.80	2.24
	CV (%)	59	59	42	54	77
AUC (µg.ml ⁻¹ .h)	mean	4,29	4,43	3,71	4,49	3,84
	med	4,12	4,16	3,59	4,30	3,69
	CV (%)	22	29	18	18	11
AUC/mg * (µg.ml ⁻¹ .h)	mean	0,328	0,379	0,158	0,298	0,517
	med	0,250	0,249	0,148	0,269	0,501
	CV (%)	74	79	45	56	65

Groupe 1 : population regroupant les patients atteints de maladies métaboliques

Groupe 2 : population regroupant les patients atteints de maladies hématologiques non malignes

Groupe 3 : population regroupant les patients atteints de maladies hématologiques malignes

Groupe 4 : population regroupant les patients souffrant de déficits immunitaires

Moy, med : moyenne, médiane ; CV : coefficient de variation

* AUC/mg : AUC normalisée par la dose totale de busulfan administré

Nous avons comparé les résultats obtenus dans les quatre différents sous-groupe en utilisant le test de Kruskal Wallis (test non paramétrique puisque aucune supposition n'a été faite quant au type de distribution (gaussienne ou non) des paramètres). Les valeurs de la constante d'absorption et du volume de distribution ne diffèrent pas significativement. La clairance apparente est significativement plus élevée chez les patients atteints d'hémoglobinopathies ($p = 0,003$) avec une valeur moyenne atteignant $7,78 \text{ l. h}^{-1}$ alors que les patients avec un déficit immunitaire se caractérisent par la clairance apparente la plus faible ($2,24 \text{ l. h}^{-1}$). Les AUC, par dose ou normalisées par la dose totale de busulfan administré, sont significativement différentes entre les quatre sous groupes ($p < 0,001$ et $p = 0,001$ respectivement). Les AUC sont plus élevées chez les patients atteints de pathologies malignes (AUC moyenne = $4.49 \pm 0.83 \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$) et chez les patients atteints de maladies métaboliques (AUC moyenne = $4.43 \pm 1.28 \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$) que dans les deux autres sous-groupes. Lorsque les AUC sont normalisées, les patients avec un déficit immunitaire présentent des AUC très nettement supérieures au reste de la population.

Par ailleurs, les valeurs moyennes et médianes de la plupart des paramètres pharmacocinétiques sont éloignées (avec par exemple une valeur moyenne à $3,38 \text{ h}^{-1}$ et une valeur médiane à $0,75 \text{ h}^{-1}$ pour la constante d'absorption estimée chez les patients atteints de déficit immunitaire), traduisant ainsi l'hétérogénéité et l'asymétrie de la distribution de ces paramètres. Ces résultats s'observent également pour la population globale, montrant ainsi que la distribution des paramètres pharmacocinétiques du busulfan ne semble pas gaussienne, ni dans une population pédiatrique générale, ni dans des sous groupes tenant compte de la pathologie. De plus, les valeurs moyennes de la constante d'absorption K_a sont pour chaque sous population supérieure à la valeur obtenue dans la population globale et traduisent ainsi probablement la distribution non gaussienne de ce paramètre. Les figures 3, 4, 5, 6 et 7 présentent les densités de probabilité marginales de la constante d'absorption dans la population globale et dans chaque sous population.

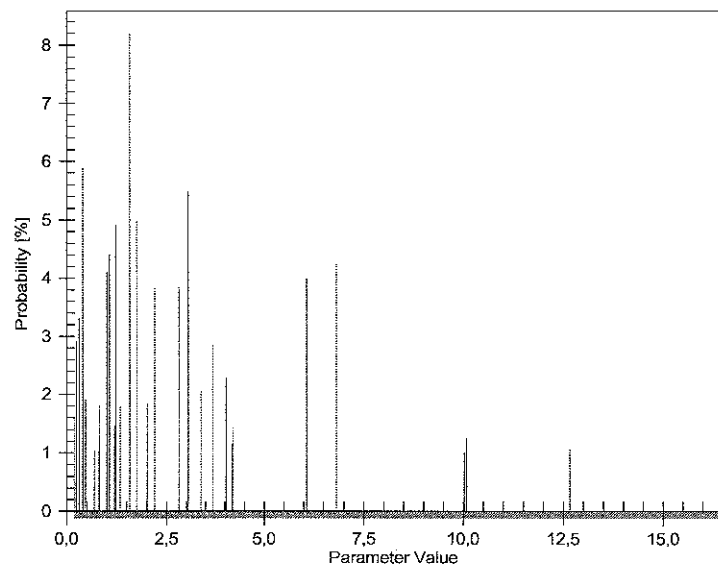


Figure 3 : Densité de probabilité marginale de la constante d'absorption pour la population globale

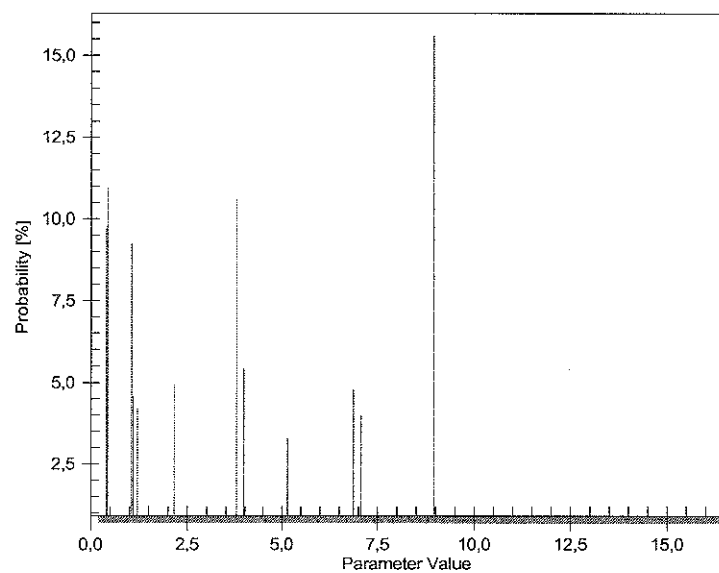


Figure 4 : Densité de probabilité marginale de la constante d'absorption pour la population « Maladies métaboliques »

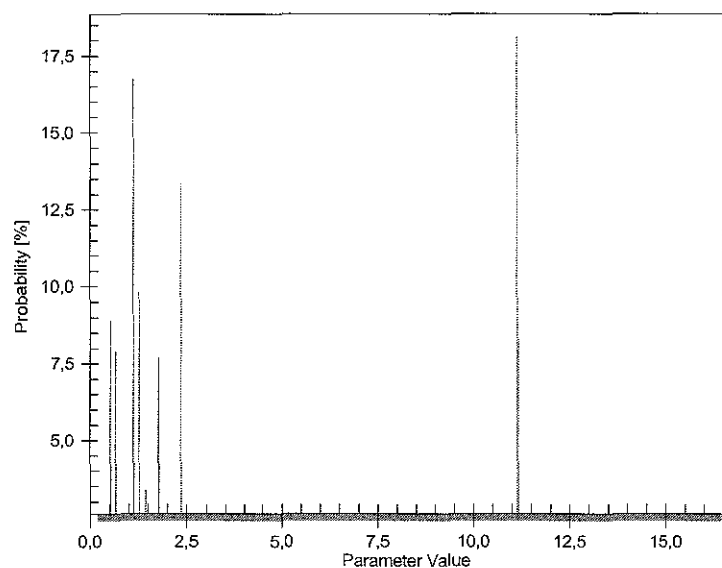


Figure 5 : Densité de probabilité marginale de la constante d'absorption pour la population « Hémoglobinopathies »

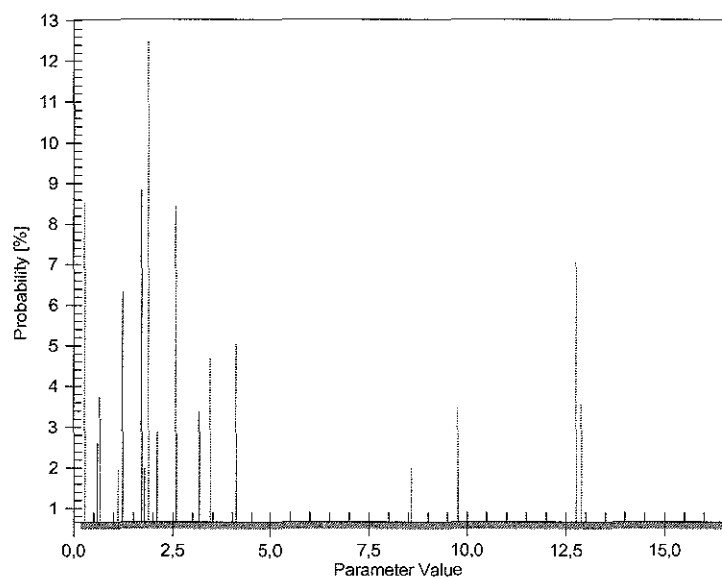


Figure 6 : Densité de probabilité marginale de la constante d'absorption pour la population « Maladies hématologiques malignes »

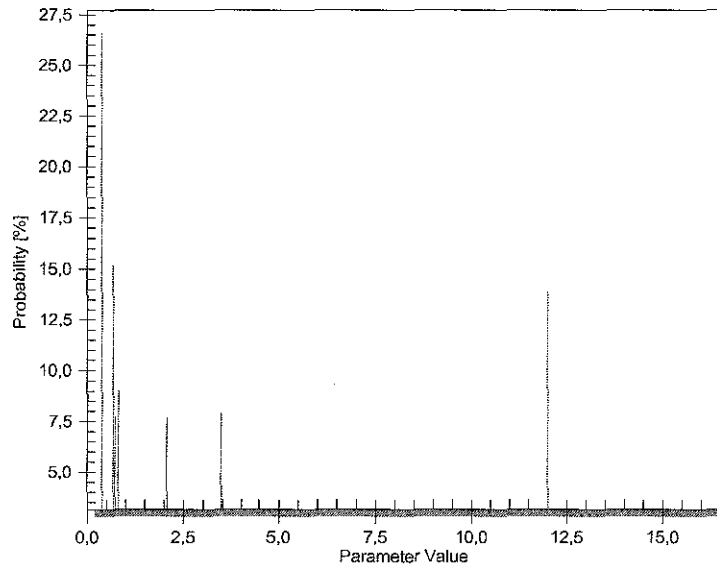


Figure 7 : Densité de probabilité marginale de la constante d'absorption pour la population « Déficits immunitaires »

La variabilité inter-individuelle peut être visualisée sur les représentations en deux dimensions des densités de probabilité jointives des paramètres Cl et V_s (figures 8, 9, 10, 11 et 12 respectivement pour la population globale, puis pour les populations des maladies métaboliques, des maladies hématologiques non malignes, des maladies hématologiques malignes et des déficits immunitaires). Chaque point représente un profil possible d'un couple de paramètres (Cl et V_s) et peut laisser supposer de possibles sous-groupes de patients avec des comportements pharmacocinétiques différents. La dispersion des points est la conséquence de l'importante variabilité pharmacocinétique inter-individuelle.

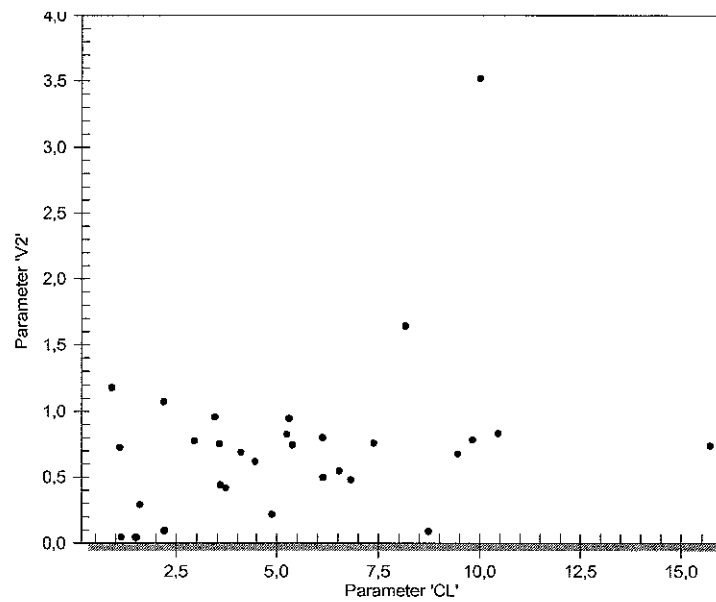


Figure 8 : Densités de probabilité jointives des paramétrisations CL et Vs de la population totale

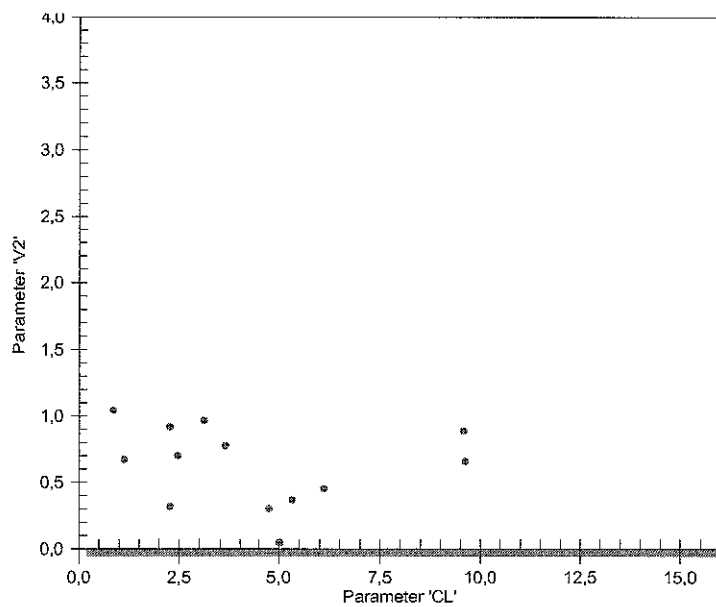


Figure 9 : Densités de probabilité jointives des paramétrisations CL et Vs de la population "Maladies métaboliques"

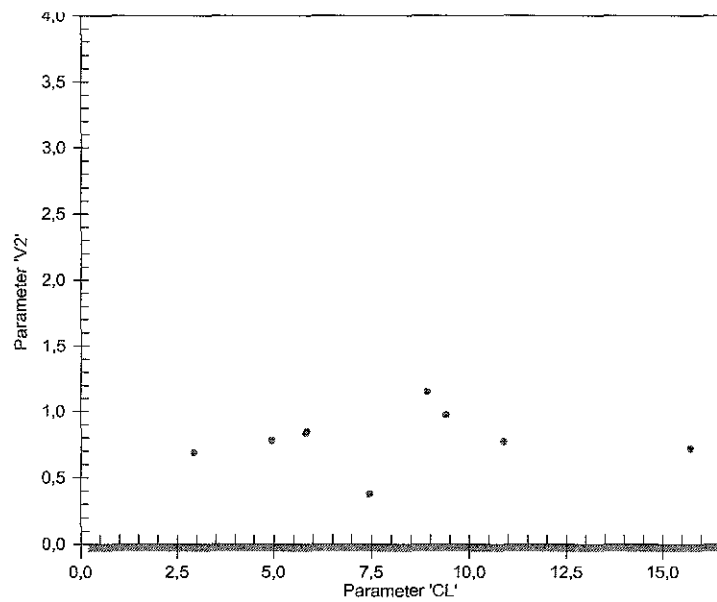


Figure 10 : Densités de probabilité jointives des paramétrisations CL et Vs de la population "Maladies hématologiques non malignes"

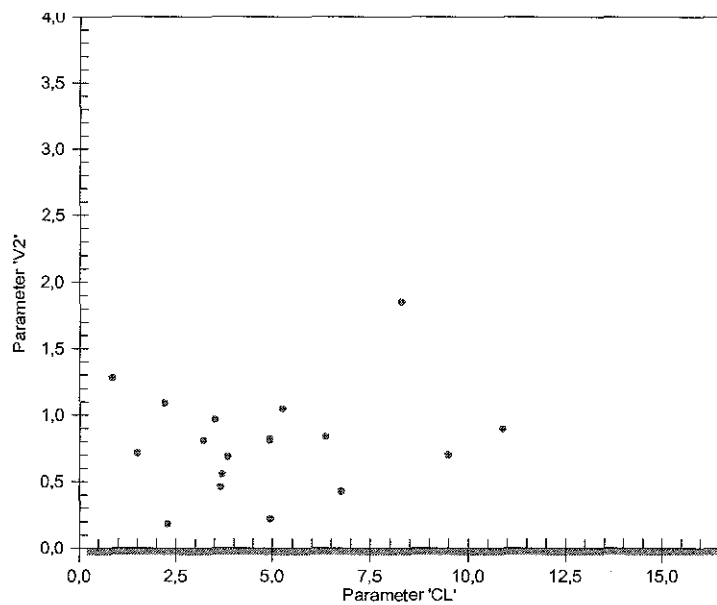


Figure 11 : Densités de probabilité jointives des paramétrisations CL et Vs de la population "Maladies hématologiques malignes"

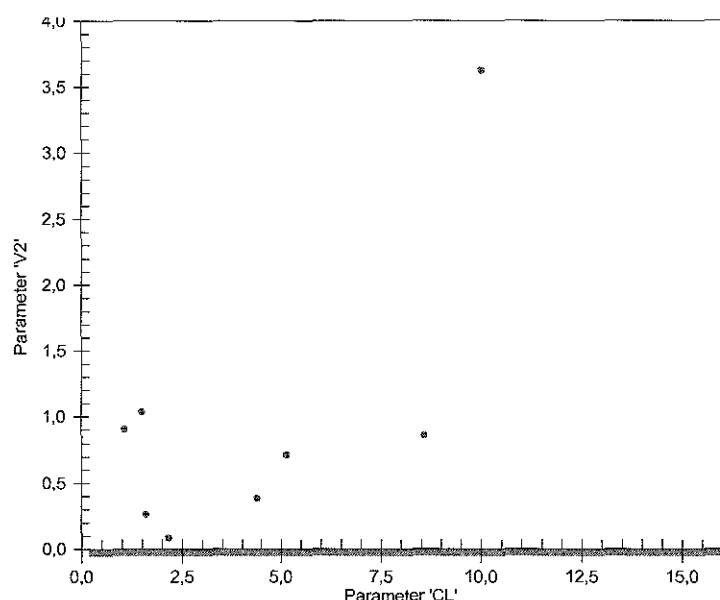


Figure 12 : Densités de probabilité jointives des paramétrisations CL et Vs de la population "Déficits immunitaires"

La population globale et les quatre sous-groupes de patients présentent une variabilité inter-individuelle importante, associée à des coefficients de variations élevés pour chaque paramètre (tableau X) mais suggérant néanmoins une diminution de la variabilité de Vs dans les sous groupes « Maladies métaboliques », « Hémoglobinopathies », « Maladies malignes » et une diminution de la variabilité de la clairance pour les patients du groupe « Hémoglobinopathies ».

La qualité de l'ajustement entre concentrations prédites (valeurs individuelles estimées a posteriori) et observées des différents modèles, représentée par le biais (ME), la précision (MSE) et le coefficient de détermination (r^2) est donnée dans le tableau XI pour la population globale et pour chacun des quatre sous-groupe de population.

Tableau XI: Coefficient de détermination (R^2), biais (ME) et précision (MSE) obtenus a posteriori dans la population globale et par classe de pathologie (résultats obtenus avec les paramètres pharmacocinétiques estimés médians)

	Population globale	Group I	Group II	Group III	Group IV
R^2	0.78	0.85	0.79	0.76	0.75
ME	- 0.041	-0.041	-0.028	-0.047	-0.045
MSE	0.039	0.035	0.027	0.043	0.038

R^2 : coefficient de détermination entre les concentrations de busulfan mesurées et estimées par le modèle, ME: mean error, MSE: mean squared error

Groupe 1 : maladies métaboliques, Groupe 2 : hémoglobinopathies, Groupe 3 : maladies hématologiques malignes, Groupe 4 : déficits immunitaires

L'adéquation est bonne avec globalement un biais peu important et une bonne précision. Nous avons comparé le biais et la précision de chaque sous-groupe à ceux de la population globale (test T de Student ou test de Mann-Whitney lorsque le nombre de patients est inférieur à 30). La précision est significativement meilleure ($p = 0,002$) pour le sous-groupe « Hémoglobinopathies ». Aucune différence significative n'a été retrouvée pour le biais bien que celui-ci tende à être meilleur pour le sous-groupe « Hémoglobinopathies ».

Les figures 13 à 17 représentent la distribution des résidus pondérés par rapport aux concentrations plasmatiques de busulfan. La pondération est obtenue en utilisant l'inverse de la variance des concentrations mesurées, permettant ainsi d'obtenir une approximation de l'hypothèse hétéroscédastique. En comparaison avec les résultats obtenus pour la population globale, les résidus pondérés des différents sous-groupes sont plus faibles et peuvent être inclus dans des bornes acceptables $[-3, + 3]$, à l'exception du groupe des maladies malignes.

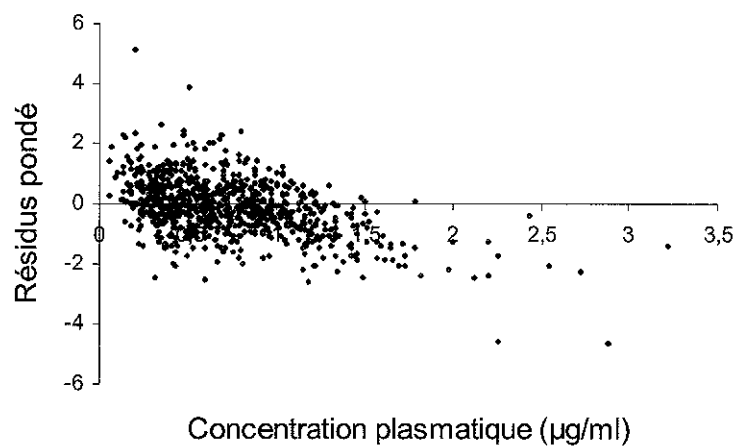


Figure 13 : Résidus pondérés en fonction de la concentration de busulfan pour la population globale

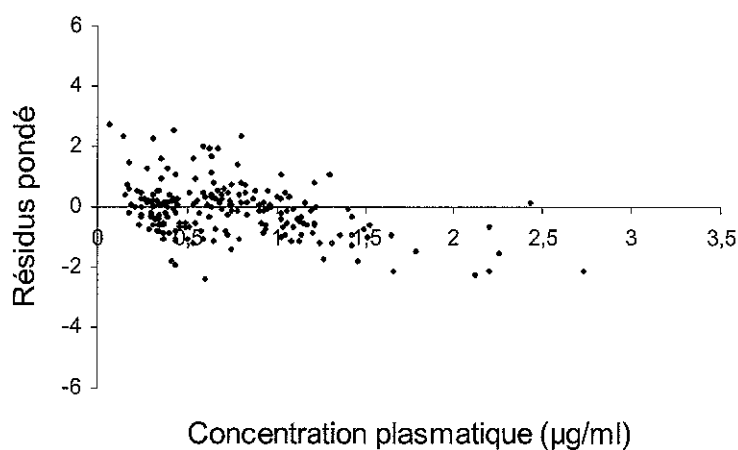


Figure 14 : Résidus pondérés en fonction de la concentration de busulfan pour la population « Maladies métaboliques »

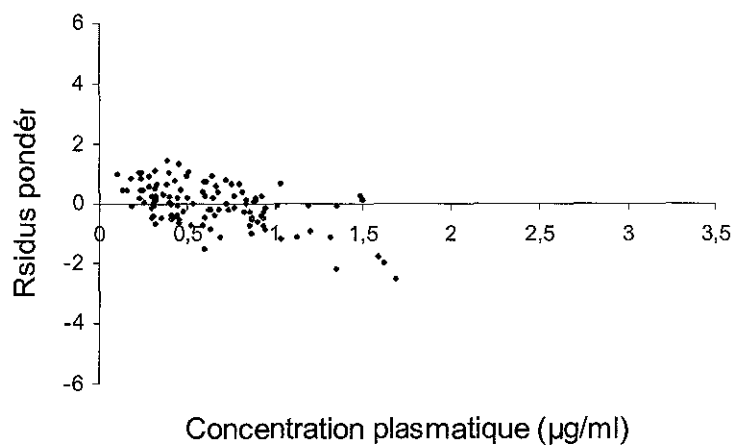


Figure 15 : Résidus pondérés en fonction de la concentration de busulfan pour la population « Hémoglobinopathies »

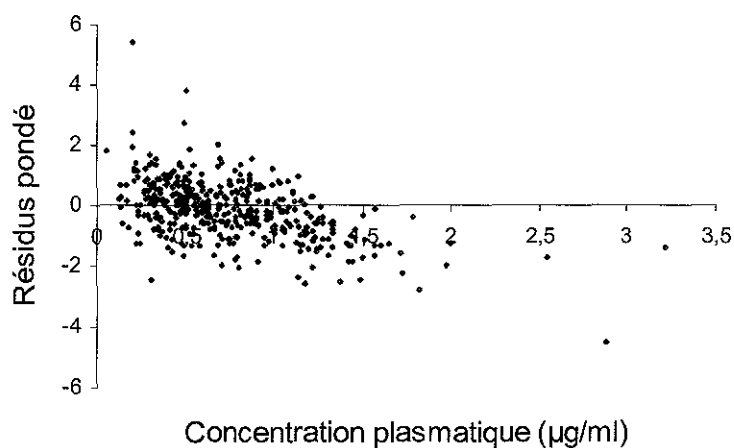
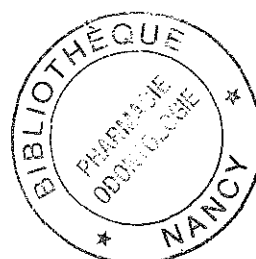


Figure 16 : Résidus pondérés en fonction de la concentration de busulfan pour la population « Maladies hématologiques malignes »



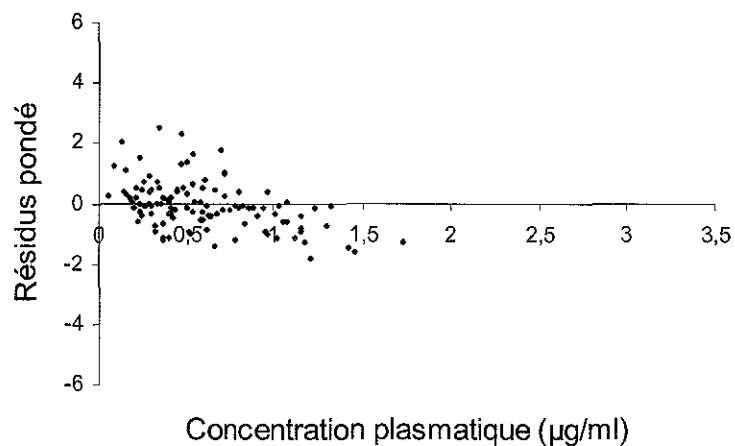


Figure 17 : Résidus pondérés en fonction de la concentration de busulfan pour la population « Déficits immunitaires »

3.1.3. Etude la variabilité intra-individuelle : comparaison des AUC obtenues pour chaque jour de traitement

L'aire sous la courbe (calculée pour une dose puis normalisée par la dose de busulfan administrée en milligrammes) a été calculée pour chaque jour du conditionnement et pour chaque patient. L'ensemble de ces résultats sont donnés en annexe I. La figure 18 illustre la répartition des AUC obtenues chaque jour du conditionnement pour l'ensemble des patients.

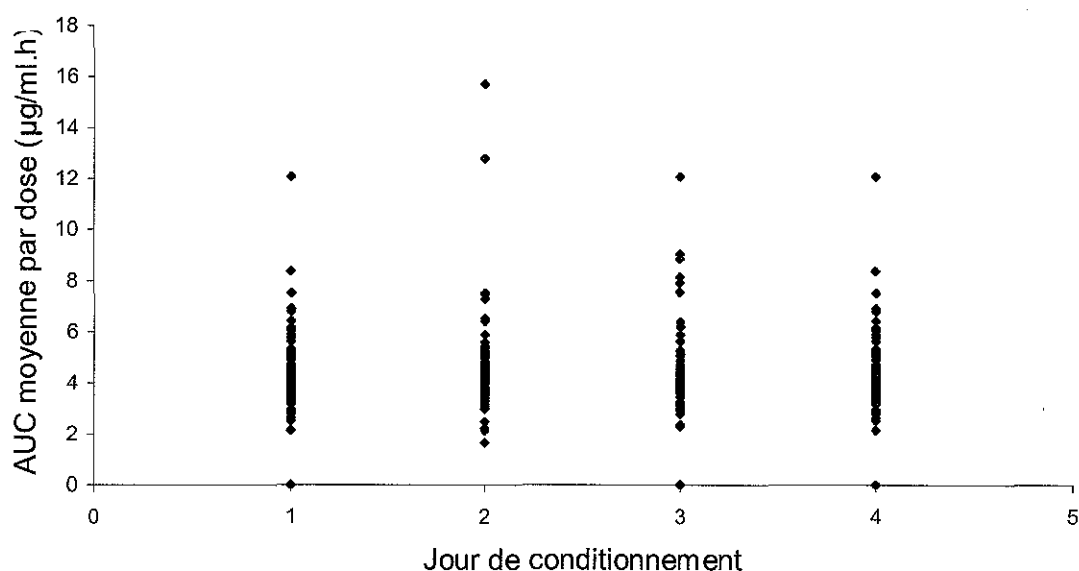


Figure 18 : Répartition des AUC des 100 patients lors des quatre jours de conditionnement

Les moyennes des AUC calculées par dose ainsi que les variations d'AUC (en pourcentage) par rapport à l'AUC calculée à J1 sont données dans le tableau XII. Cette étude a été faite en supprimant de l'effectif le patient 71. En observant les paramètres individuels (annexe 1), on constate que ce patient, un nourrisson atteint d'un déficit immunitaire et âgé de un mois au moment du conditionnement, a présenté des AUC extrêmement faibles à J1 et J2 en regard des doses administrées. Il s'est avéré que les premières doses de busulfan avaient été administrées après ouverture des gélules dans du lait, aboutissant à une absorption très faible (très faible solubilité, dépôt du contenu de la gélule sur les parois de la seringue, absence de rinçage...). Le busulfan a été administré avec une petite quantité de compote à partir de la 7^{ème} dose et les AUC mesurées ont été beaucoup plus conformes aux résultats attendus.

TableauXII : AUC moyenne par dose pour chaque jour du conditionnement et pourcentage de variation des AUC par rapport à l'AUC calculée à J1

	J1	J2		J3		J4	
	AUC / Dose (µg/ml.h)	AUC / Dose (µg/ml.h)	% / J1	AUC / Dose (µg/ml.h)	% / J1	AUC / Dose (µg/ml.h)	% / J1
BuTot	4,10	4,39	9%	4,49	15,7%	4,33	12,1%
BuMet	4,34	4,55	3,3%	4,62	6,1%	4,45	2,0%
BuNeo	4,14	4,61	14,3%	4,76	26,1%	4,69	23,1%
BuHem	3,57	4,01	14,7%	3,88	10,2%	3,52	- 1,3%
BuDic	4,08	3,53	- 8,9%	3,79	- 2,2%	3,90	2 ,3%
p	0,088	0,017	ND	< 0,001	ND	0,001	ND

Remarque : chaque valeur figurant dans les colonnes %/J1 n'est pas calculée à partir des valeurs moyennes d'AUC mais est la moyenne des variations d'AUC observée pour chaque patient par rapport à J1 (calculée à partir des valeurs présentées en annexe I)

La population des patients leucémiques présente les plus fortes variations d'AUC par rapport à l'AUC obtenue à J1, et ceci malgré une adaptation quotidienne des posologies. On constate que les différents sous-groupes présentent les mêmes profils d'augmentation progressive des AUC puis de décroissance, excepté pour les déficits immunitaires (décrochement à J2) sans qu'une raison particulière ait pu être identifiée. L'AUC moyenne maximale est obtenue au troisième jour de traitement, à l'exception des hémoglobinopathies où l'AUC maximale est atteinte à J2. La figure 19 illustre ces résultats.

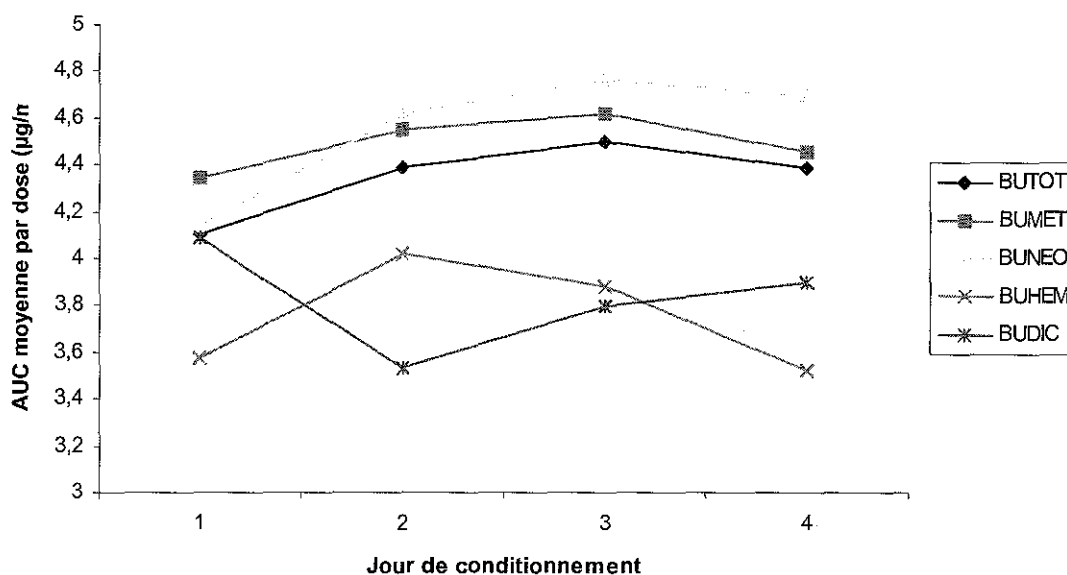


Figure 19 : AUC moyenne obtenue pour chaque jour de conditionnement

Hormis le premier jour du conditionnement, les différents sous-groupes présentent des AUC moyennes significativement différentes (test de Kruskal Wallis). Les patients atteints de déficits immunitaires et d'hémoglobinopathies présentent les AUC les plus basses au cours du conditionnement. Ceci est en accord avec le choix d'AUC cibles plus basses pour ces catégories de patients.

Cette même étude a été refaite en normalisant les AUC : pour ce faire, nous avons rapporté les AUC calculées à la quantité de busulfan (en milligramme) administrée par dose.

Tableau VII : AUC moyenne par milligramme de busulfan pour chaque jour du conditionnement et pourcentage de variation des AUC par rapport à l'AUC calculée à J1

	J1	J2		J3		J4	
	AUC / mg ($\mu\text{g/ml.h}$)	AUC / mg ($\mu\text{g/ml.h}$)	% / J1	AUC / mg ($\mu\text{g/ml.h}$)	% / J1	AUC / mg ($\mu\text{g/ml.h}$)	% / J1
BuTot	0,295	0,321	9,4%	0,341	20,1%	0,331	14,9%
BuMet	0,336	0,378	6,4%	0,384	10,4%	0,378	6,4%
BuNeo	0,271	0,292	13,5%	0,327	31,9%	0,301	26,3%
BuHem	0,148	0,159	13,3%	0,164	13,2%	0,152	2,7%
BuDic	0,486	0,466	- 6,7%	0,504	-1,9%	0,553	-1,5%
p	0,003	0,003	ND	0,002	ND	0,001	ND

Remarque : chaque valeur figurant dans les colonnes %/J1 n'est pas calculée à partir des valeurs moyennes d'AUC mais est la moyenne des variations d'AUC observée pour chaque patient par rapport à J1 (calculée à partir des valeurs présentées en annexe I)

De même que lorsque les AUC sont exprimées par dose, la population des patients leucémiques se caractérise par les plus fortes augmentations d'AUC/mg observées au cours du conditionnement. En normalisant ainsi les AUC, les différents sous-groupes présentent des profils similaires (augmentation jusqu'à J3 puis diminution), toujours à l'exception des patients avec déficit immunitaire (diminution à J2 puis augmentation jusqu'à J4) (figure 20).

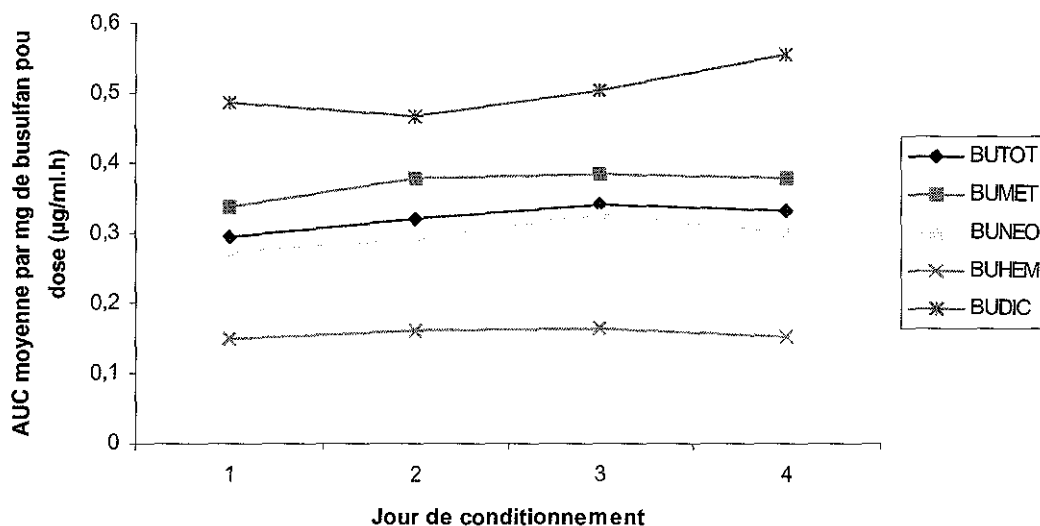


Figure 20 : AUC moyenne par milligramme de busulfan obtenue pour chaque jour de conditionnement

En normalisant les AUC, les quatre sous-groupes présentent des valeurs moyennes d'AUC significativement différentes pour chaque jour du conditionnement (test de Kruskal Wallis). Contrairement aux résultats obtenus avec les AUC moyennes par dose, les AUC moyennes normalisées les plus élevées sont obtenues chez les patients atteints de déficit immunitaire, suivi des patients atteints de maladies métaboliques, puis des patients leucémiques. La population des patients atteints de thalassémie ou de drépanocytose se caractérise par une très grande stabilité des AUC sur l'ensemble du conditionnement ainsi que par les valeurs normalisées les plus faibles.

3.2. ETUDE CHEZ LE NOURRISSON

Les doses de busulfan administrées après adaptation des posologies ainsi que les AUC obtenues chez les 19 patients de moins de 9 kg sont présentés dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Evaluation clinique après individualisation des posologies de busulfan chez les nourrissons

Patients	Indication	Voie	Dose totale individualisée de busulfan (mg/kg)	AUC ($\mu\text{g.h.ml}^{-1}$ $^1/\mu\text{M.min}$)	MVO	Prise de greffe (% donneur)
1	DI	PO	18.0	3.63 / 888	Non	84
2	DI	PO	8.7	3.69 / 902	Non	54
3	DI	PO	15.1	3.70 / 905	Non	86
4	DI	PO	13.4	4.95 / 1211	Non	100
5	DI	PO	15.7	3.97 / 971	Oui (sévère)	12
6	DI	IV	10.2	4.76 / 1164	Oui (sévère)	88
7	DI	IV	11.5	4.38 / 1071	Non	65
8	LAL	IV	18.5	4.53 / 1108	Non	100
9	LAL	PO	24.5	4.58 / 1120	Oui (modérée)	96
10	LAM	PO	18.5	4.45 / 1088	Non	100
11	LAM	PO	17.5	4.54 / 1110	Non	100
12	LAM	IV	14.3	4.16 / 1017	Non	100
13	LMMJ	PO	19.9	4.39 / 1074	Oui (modérée)	96
14	SMD	PO	11.9	4.13 / 1010	Oui (modérée)	100
15	Fucosidose	PO	20.3	4.54 / 1110	Non	96
16	Micolipidose	PO	16.1	4.21 / 1030	Non	67
17	Nieman-Pick	PO	12.2	3.82 / 934	Non	100
18	Osteopetrose	PO	12.1	3.60 / 880	Non	85
19	Osteopetrose	PO	12.3	3.65 / 893	Non	96

La dose totale moyenne de busulfan a été de 15,3 mg/kg mais avec un écart type et des valeurs extrêmes très larges (SD : 4,0 mg/kg, valeurs extrêmes : 8,7 à 24,5 mg/kg). Seuls deux patients ont finalement reçu une dose totale proche de 16 mg/kg (dose théorique). 37% des patients ont reçu une dose supérieure à 16 mg/kg alors que 53% ont reçu une dose inférieure. Les valeurs des AUC pour un intervalle de 6h ont été dans les cibles pré-définies. Les patients atteints d'ostéopétrose avaient des AUC cibles basses du fait du risque élevé rapporté de toxicité liée au busulfan chez ces patients (138) (Steward et al. 2004). Nous n'avons retrouvé qu'une corrélation extrêmement faible entre les doses totales de busulfan administrées et les AUC moyennes obtenues (figure 21)

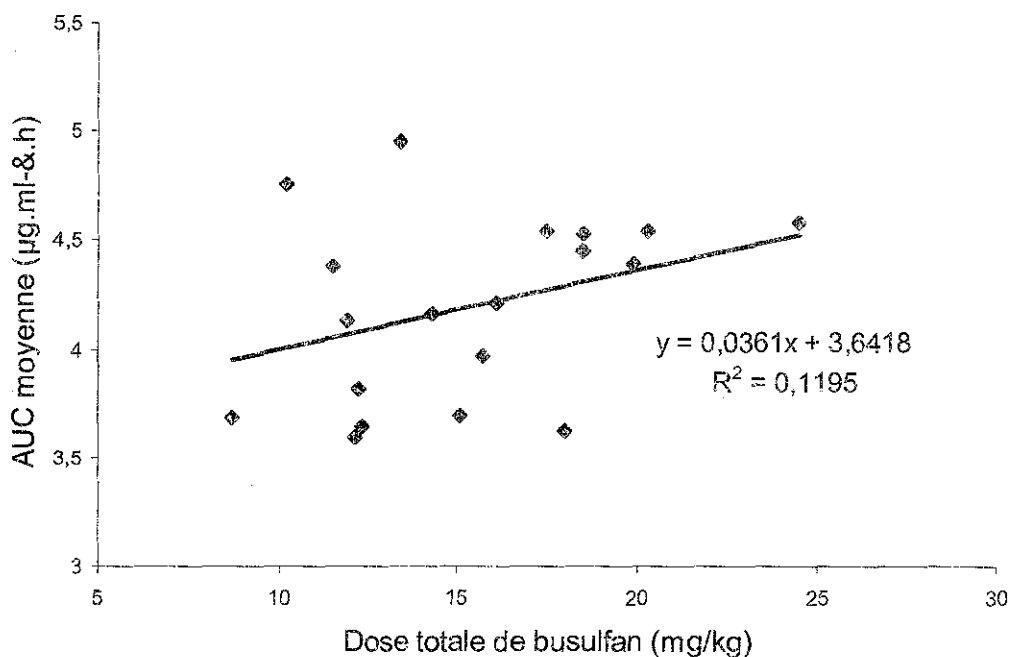


Figure 21 : Etude de la corrélation entre dose de busulfan et AUC moyenne

L'incidence des MVO a été de 26,3% ; deux patients ont présenté des MVO sévères, les trois autres patients ont présenté des formes modérées. Ces patients ont reçu des doses de busulfan variant de 10,2 à 24,5 mg/kg : deux patients ont reçu des doses inférieures à 12 mg/kg, un patient a été proche de la dose théorique (15,7 mg/kg) et deux patients ont eu des doses supérieures à 19 mg/kg. Ces patients ont tous eu des AUC correspondant aux

cibles qui avaient été fixées (971 à 1164 $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}$ soit 3,97 à 4,76 $\mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$). L'un des patients est décédé suite à une MVO : il avait reçu une dose totale de busulfan IV de 10,2 mg/kg mais le traitement avait été initié à la dose recommandée par l'AMM de 1 mg/kg. Malheureusement, ce patient n'a pu bénéficier d'un contrôle pharmacologique des taux plasmatiques de busulfan et d'une individualisation des posologie qu'à partir du deuxième jour de conditionnement du fait de difficultés majeures lors des prélèvements sanguins. Les doses de busulfan n'ont pu être diminuées qu'à partir de la 7^{ème} dose à des valeurs de 0,38 mg/kg/dose, ceci afin d'obtenir une AUC moyenne de 4,76 $\mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$ (1164 $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}$) sur l'ensemble du conditionnement mais avec une variabilité très importante durant les 4 jours de conditionnement. L'AUC estimée pour les premières doses administrées à 1mg/kg/dose a été de 7,6 $\mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$ (1859 $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}$) soit très largement au-dessus des valeurs cibles. Le second patient ayant développé une MVO sévère a reçu une dose totale de busulfan de 15,7 mg/kg et a présenté l'AUC la plus faible parmi les patients ayant développé une MVO (3,97 $\mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$ soit 971 $\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}$). Aucune relation n'a pu être mise en évidence entre l'incidence de MVO et les AUC (test de Mann Whitney, $p > 0,05$).

Nous avons étudié si l'âge et le poids pouvaient être corrélés avec différents facteurs. Les résultats de cette étude par régression linéaire sont présentés dans le tableau XV.

Tableau XV : Etude des facteurs « Age » et « Poids »

Facteurs étudiés	Age	Poids
Dose totale de busulfan (mg/kg)	0,032	< 0,001
Dose normalisée par AUC	NS	NS
Dose pour obtenir une AUC à 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$	NS	< 0,001
Clairance totale (l.h^{-1})	NS	< 0,001
NS : non significatif ($p > 0,05$)		

Les figures 22 et 23 illustrent les corrélations obtenues pour les résultats significatifs.

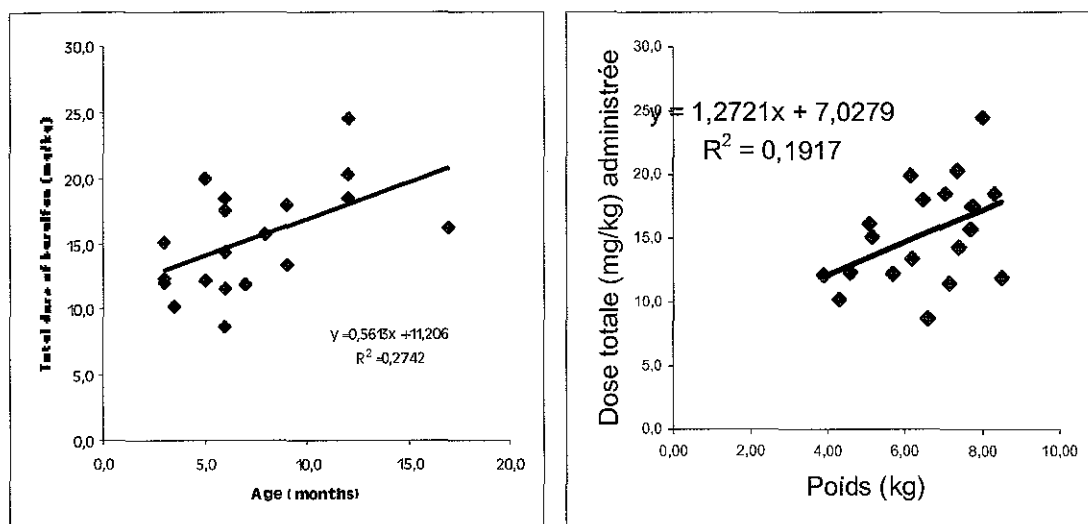


Figure 22 : Corrélation entre la dose totale de busulfan reçue et (a) l'âge ; (b) le poids corporel

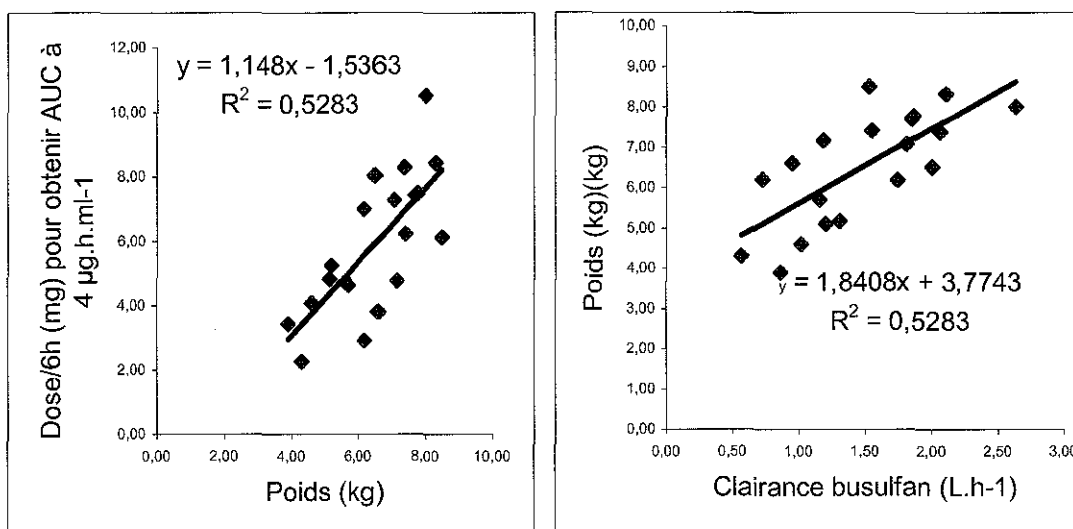


Figure 23: Corrélation entre le poids et la dose estimée pour obtenir une AUC = $4 \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$; (b) la clairance totale du busulfan

En tenant compte de la relation linéaire entre la dose à administrer toutes les 6 heures afin d'obtenir une AUC de $4 \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$ et le poids corporel (Dose AUC 4 = $1,148 \times \text{Poids} - 1,5363$), la dose optimale de busulfan à administrer toutes les 6 heures serait :

- 0,8 mg/kg chez les enfants dont le poids est compris entre 4 et 6 kg
- 0,9 mg/kg chez les enfants dont le poids est compris entre 6 et 8 kg
- 1 mg/kg chez les enfants dont le poids est proche de 9 kg

Les résultats concernant la prise de greffe sont présentés dans le tableau XIV. L'incidence d'un chimérisme mixte à un mois post-greffe (< 95% de cellules du donneur) est élevée (42%) bien que les AUC aient atteint les valeurs cibles. Les AUC moyennes obtenues chez les patients avec une prise de greffe complète ($4,40 \pm 0,69 \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$) n'ont pas présenté de différence significative par rapport aux AUC obtenues chez les patients ayant développé un chimérisme mixte ($4,10 \pm 0,45 \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$) (test de Mann Whitney, $p = 0,216$).

3.3. ETUDE EVODI

3.3.1. Score de risque

La figure 24 illustre la distribution du score estimé de risque de MVO avant transplantation (estimé suivant le modèle proposé par Barker et al (49)). Le score de risque médian est de 0,34 (valeurs extrêmes : 0,23 à 0,84).

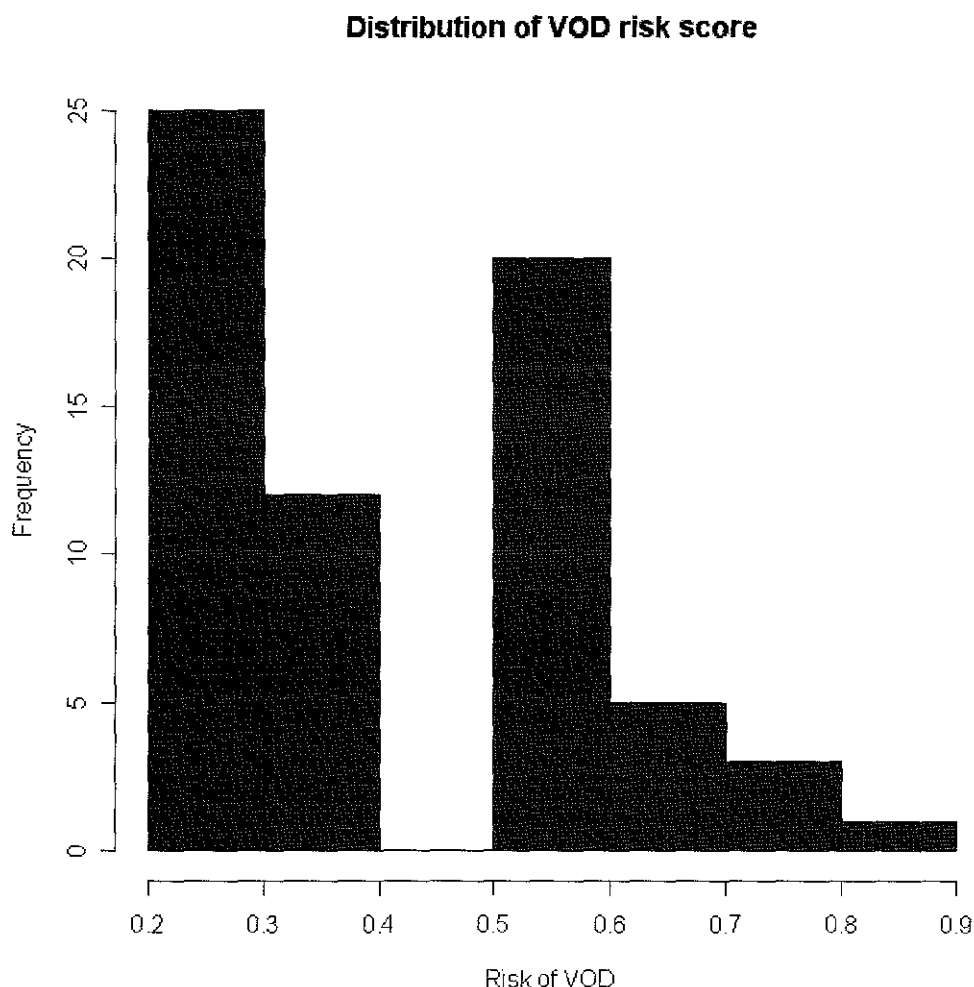


Figure 24 : Distribution du score de risque estimé de MVO avant transplantation

3.3.2. Incidence des MVO

Onze épisodes de MVO sont survenus pendant la période d'étude soit une incidence de 16,7%, ce qui représente 17 épisodes (60,7%) de moins que le nombre attendu suite à l'estimation du score de risque. Les MVO ont été classées comme modérées chez 8 patients et sévères pour 3 patients. Deux des 11 patients sont décédés : l'un de complications infectieuses et le second de défaillance multiviscérale en lien avec la MVO. Le tableau XVI présente les principales caractéristiques cliniques et biologiques des patients ayant développé une MVO.

Tableau XVI : Caractéristiques des onze patients ayant développé une MVO

Age médian (années)	4 [0,42 – 8,2]
Sexe ratio (filles/garçons)	4/7 (36,3%)
Score de risque médian	0,34 (0,29 – 0,78)
AUC busulfan médiane ($\mu\text{g/ml.h}$)	4,1 [3,9 – 5,1]
Sévérité de la MVO	
Modérée	8
Sévère	3
Décès (toute cause)	2

3.3.3. Procédure d'analyse des sommes cumulées avec ajustement en fonction du risque (RA-CUSUM)

La figure 25 est une représentation graphique de l'analyse des sommes cumulées avec ajustement en fonction du risque : les données de chaque patient sont rassemblées et structurées dans le même ordre chronologique que celui où elles ont été mesurées.

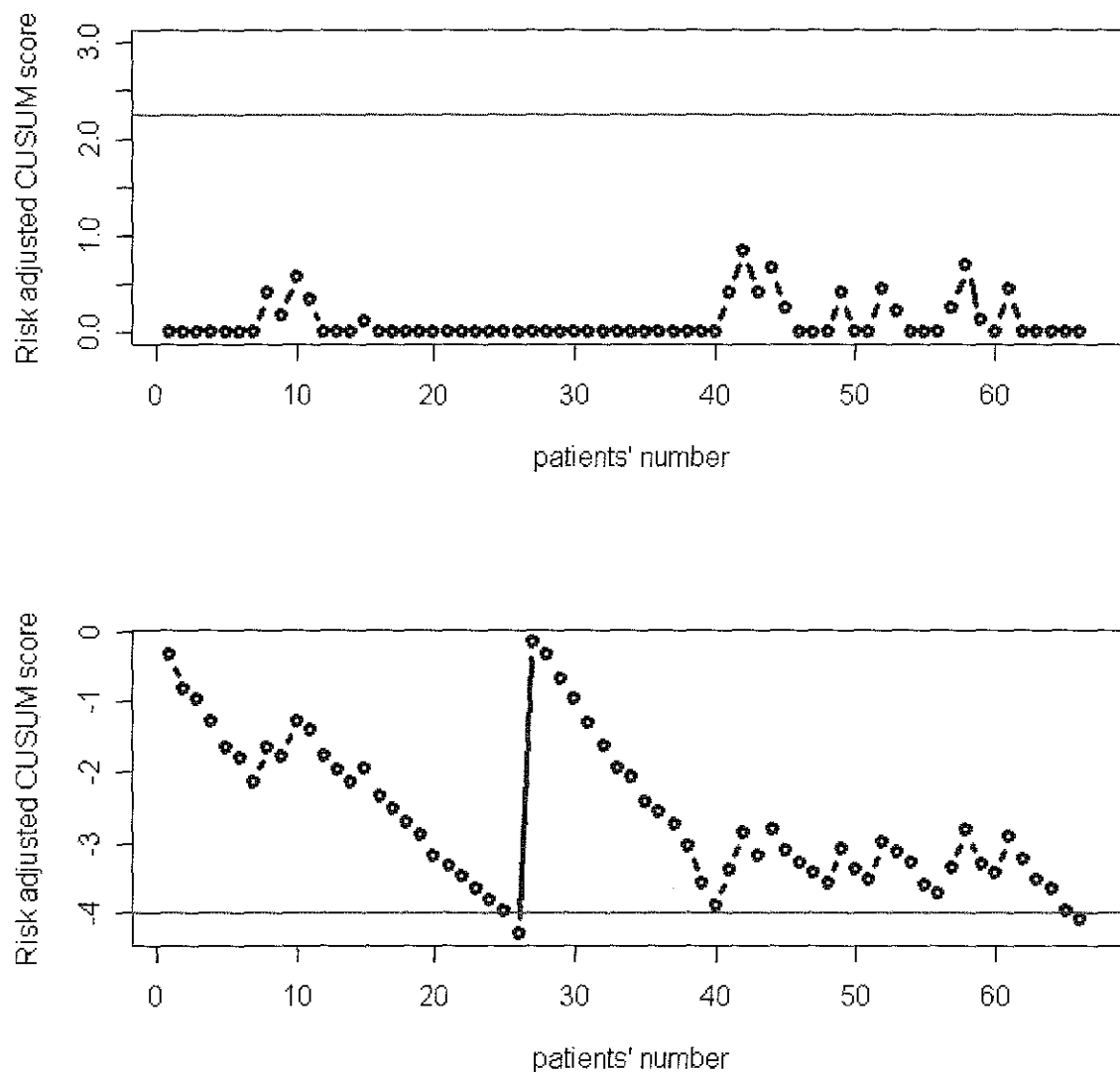


Figure 25 : Sommes cumulées avec ajustement en fonction du risque (RA CUSUM)

Le graphe supérieur de la figure 25 montre que le RA-CUSUM se maintient strictement entre les limites de contrôle ($h1 = 2,25$), ce qui ne suggère aucune augmentation de l'odds de MVO par rapport à celui prédit par le score de risque. Ce graphe montre que la performance de la procédure d'adaptation de posologies est restée stable jusqu'au patient 40. Il semble ensuite que la procédure se dégrade (augmentation du RA-CUSUM) sans que la limite de contrôle ne soit atteinte néanmoins. La plus grande séquence de points consécutifs croissants est de 2 (survenue de 2 MVO pour 2 patients consécutifs) : ceci est

apparu deux fois, pour les patients n° 41-42 et n° 57-58. Sur le graphe inférieur de la figure 25, celui-ci amorce rapidement une pente négative jusqu'au patient n°27 où le RA-CUSUM franchit la limite de contrôle inférieure ($h_0 = -4$), ce qui signifie une diminution de moitié de l'odds de MVO. Après ce premier signal, les valeurs du RA-CUSUM ont été remises à zéro. Un nouveau franchissement de la limite de contrôle inférieure est apparu après le patient n°66.

4. DISCUSSION

4.1. ÉTUDE DE PHARMACOCINETIQUE DE POPULATION

4.1.1. Choix du modèle d'erreur

Le rôle de la modélisation en pharmacocinétique de population est de décrire et de conserver l'expérience acquise avec le comportement d'un médicament dans une population de patients. L'une des applications consiste en l'analyse de données en situation de données pauvres comme cela est souvent le cas en pédiatrie. Afin d'individualiser un régime posologique pour un patient donné, il est nécessaire d'explorer la variabilité pharmacocinétique inter-individuelle du médicament à étudier. Cependant, une part de cette variabilité inter-individuelle est souvent due au degré de précision de la méthode analytique utilisées, c'est pourquoi la courbe d'erreur analytique doit être soigneusement définie car elle va conditionner la variabilité attribuée aux paramètres pharmacocinétiques estimés par le modèle (139) (Jelliffe et al. 1994). NPAG permet de prendre en compte cette variabilité analytique, aboutissant ainsi à une estimation plus précise des paramètres pharmacocinétiques. Mais si seule l'erreur analytique correspondant à la réalité est prise en compte, certaines valeurs de paramètres deviennent improbables alors que ces valeurs sont retrouvées chez certains patients. En effet, on ne prend alors pas en compte les autres types d'erreurs pouvant influencer la qualité des estimations des paramètres, à savoir les erreurs sur les horaires d'administration des prises et de prélèvements ou les quantités administrées réellement par le personnel soignant... On risque notamment d'obtenir de mauvaises prédictions des concentrations plasmatiques. Le fait de multiplier les coefficients du polynôme décrivant l'erreur analytique par un coefficient gamma (déterminé par IT2B) permet de prendre en compte une partie de la variabilité résiduelle. Le modèle d'erreur ainsi défini permet d'obtenir une répartition plus réaliste de la distribution des probabilités des paramètres pharmacocinétiques étudiés. Ceci est particulièrement intéressant pour les études menées sur des échantillons de faible effectif comme cela peut être le cas en pédiatrie. De plus, la

précision de l'estimation des paramètres pharmacocinétiques est renforcée dans notre étude grâce à la sélection de temps de prélèvements optimaux et par la mesure quotidienne de taux plasmatiques de busulfan durant les quatre jours de conditionnement.

4.1.2. Etude de l'influence de la pathologie sur la pharmacocinétique du busulfan

Les résultats des analyses NPAG d'estimation des paramètres pharmacocinétiques du busulfan confirment la variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique observée chez l'enfant. Les paramètres pharmacocinétiques estimés présentent parfois des différences importantes entre les résultats moyens et médians. C'est le cas notamment pour la constante d'absorption K_a et le volume de distribution V_s chez les patients atteints de déficit immunitaire. Ces résultats traduisent la répartition non gaussienne de la distribution des paramètres et confirment l'intérêt de l'utilisation d'une méthode non paramétrique. Avec NPAG ou d'autres algorithmes non paramétriques, aucune hypothèse n'est faite quant au type de distribution du (des) paramètre(s) étudié(s), la vraisemblance est calculée exactement et les valeurs des paramètres sont estimées avec une grande précision : ces outils permettent la détection d'une plus grande diversité dans les valeurs des paramètres de la population étudiée (114) (Leary et al. 2002). Les valeurs élevées obtenues pour les coefficients de variation (le coefficient de variation de la constante d'absorption atteint 136% dans la population des déficits immunitaires) reflètent une variabilité interindividuelle très marquée. On observe également une forte dispersion des densités de probabilité des paramètres pharmacocinétiques dans la population globale. Néanmoins, le fait de subdiviser notre population initiale de 100 patients en fonction de quatre grandes classes de pathologies a permis de réduire modérément cette dispersion, à l'exception des patients atteints de maladies hématologiques malignes.

La variabilité inter-individuelle est restée marquée pour le groupe des maladies malignes. Ce résultat pourrait être en lien avec les chimiothérapies anticancéreuses administrées antérieurement et connues pour altérer le métabolisme hépatique et provoquer des atteintes au niveau des muqueuses modifiant l'absorption intestinale (140) (Wiela-Hojenska et al. 2001). La susceptibilité de chaque patient vis à vis des différentes chimiothérapies et de l'intensité des doses administrée pourrait également jouer un rôle.

De plus, cette population est celle qui a l'effectif le plus important ($n = 50$) d'où l'importance de son influence dans les résultats obtenus pour la population globale ($n = 100$). Ces hypothèses pourraient expliquer le manque d'amélioration de performances prédictives de ce modèle comparativement au modèle construit avec la population globale.

A notre connaissance, notre étude de pharmacocinétique de population est la première rapportant un nombre aussi important de cas pédiatriques ($n = 100$) avec des pathologies aussi variées. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature montrant l'influence de la pathologie sur les paramètres pharmacocinétiques du busulfan. C'est le cas notamment de l'étude réalisée par Hassan et al. (105) montrant que les patients leucémiques ($n = 9$) ont une demi-vie d'élimination et une demi-vie d'absorption significativement augmentées par rapport à des patients présentant des maladies métaboliques ($n = 9$) telles qu'un syndrome de Wiskott Aldrich, un déficit immunitaire combiné ou une ostéopétrose. Dans notre étude, la clairance apparente des 50 patients atteints d'une pathologie maligne est plus élevée que celle des autres sous-groupes de pathologie, à l'exception des patients atteints d'hémoglobinopathie. Un seul cas de thalassémie a été rapporté par Hassan et al. (105), ne montrant pas d'augmentation de Cl/F mais la comparaison avec un cas unique ne permet pas de conclure pour ce type de patients.

Vassal et al (141) rapportent chez les enfants de moins de trois ans atteints de maladies métaboliques de surcharge ($n = 6$) une augmentation du volume de distribution et de la clairance apparente comparativement à des patients atteints de déficit immunitaire ($n = 27$). Nos résultats sont contradictoires mais l'effectif limité de l'étude de Vassal et al. ($n = 6$ patients versus $n = 24$ dans la présente étude) pourrait expliquer cette différence de résultat. L'âge des patients doit également être discuté : les 24 patients de notre cohorte ne sont pas tous âgés de moins de trois ans (âge médian : 2,1 ans, valeurs extrêmes [0,3 – 16,3 ans]) alors qu'il a été montré que l'âge est un facteur de variabilité non négligeable (97 à 102). De plus, le traitement des échantillons sanguins prélevés doit être rigoureux et rapide du fait d'un risque de dégradation très rapide du busulfan et pouvant aboutir à une sous-estimation des concentrations plasmatiques. Cette problématique concerne principalement les études multicentriques où les modalités de traitement des échantillons

ne sont pas toujours identiques et peuvent alors aboutir à des résultats de mesures des taux plasmatiques de busulfan difficilement comparables.

La sous-population regroupant les patients atteints d'un déficit immunitaire présente une variabilité très importante des estimations des paramètres pharmacocinétiques. Ces résultats pourraient être expliqués d'une part par le petit nombre de patients de ce sous-groupe ($n = 13$). Les grandes différences d'âge observées dans cette population (âge médian = 9 mois, valeurs extrêmes [0,1 – 18 ans], trois patients étaient âgés de plus de 10 ans) pourraient également être une hypothèse.

L'amélioration des capacités de prédiction du modèle relatif à la sous-population des maladies hématologiques non malignes est la meilleure obtenue. Ce résultat est à mettre en relation avec la relative homogénéité des pathologies de cette classe : tous les patients présente une hémoglobinopathie (drépanocytose ou thalassémie) et une atteinte des mêmes organes (hépatite chronique active ou persistante, fibrose, sidérose). Il faut souligner les valeurs élevées obtenues pour la clairance apparente (valeur médiane = $7,36 \text{ l.h}^{-1}$, valeurs extrêmes [2,94 – 15,73]) en comparaison aux autres sous-groupes de notre étude. Les paramètres pharmacocinétiques estimés sont similaires à ceux de Pawlowska (103) dans une étude rapportant 64 cas de thalassémies chez des enfants et de jeunes adultes. Les auteurs n'ont pas mis en évidence de corrélation entre les paramètres pharmacocinétiques du busulfan et le bilan hépatique pré-transplantation ni l'âge.

Les AUC rapportées dans cette étude résultent d'un monitoring quotidien associé à une adaptation journalière des posologies. Des expositions systémiques élevées ont été obtenues chez les patients atteints de maladies métaboliques (AUC moyenne $\pm$ SD = $4,43 \pm 1,28 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$) et chez les patients atteints de pathologies malignes (AUC moyenne $\pm$ SD = $4,49 \pm 0,83 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$), ce qui correspond aux valeurs cibles fixées pour ce type de pathologie. Les enfants atteints de maladies métaboliques possèdent généralement une moelle riche qui nécessite une exposition systémique au busulfan suffisamment importante afin d'obtenir une myéloablation complète avant la transplantation, à l'exception des patients atteints d'ostéopétrose du fait du risque de complications post greffe en lien avec cette pathologie (138) (Steward et al. 2004). Concernant les patients atteints de maladies malignes, le conditionnement vise à obtenir cette myéloablation mais également à éradiquer d'éventuels clones leucémiques ayant résisté aux traitements

chimiothérapiques antérieurs. Inversement, les patients atteints d'hémoglobinopathies présentent un risque important de complications post-greffe, notamment en ce qui concerne le risque de MVO, et requièrent de ce fait des AUC plus basses (AUC moyenne $\pm$ SD = $3,94 \pm 0,87 \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$).

La variabilité pharmacocinétique inter-individuelle du busulfan n'est qu'en partie expliquée par la pathologie sous-jacente. Nous n'avons par ailleurs pas pu établir de relation entre l'âge et la clairance du busulfan (travail préliminaire présenté dans le cadre d'un mémoire de DEA) (142). Le busulfan est majoritairement métabolisé au niveau hépatique et conjugué au glutathion, cette réaction étant catalysée par la glutathion-S-transférase A1. Lors de cette précédente étude, l'âge a été inclus comme covariable de la métabolisation hépatique mais n'a pas permis d'améliorer le modèle ainsi obtenu et nous n'avons pas observé de diminution de la variabilité inter-individuelle. Il n'existe cependant actuellement à notre connaissance aucun marqueur pertinent de la capacité métabolique hépatique qui pourrait être pris en compte lors du conditionnement, même si Poonkuzhali et al. (106) suggèrent que le taux plasmatique de glutathion-S-transférase alpha puisse être l'un des déterminants du métabolisme du busulfan chez les patients thalassémiques. Ce résultat corrobore les conclusions d'autres travaux : la variabilité inter-individuelle ne s'explique pas uniquement par une différence de maturation hépatique liée à l'âge. La pathologie sous-jacente est un critère à prendre en compte car pouvant interférer avec les capacités métaboliques ou modifier la pharmacocinétique de la molécule à d'autres étapes (92) (Tran et al., 2000), (103) (Pawlowska et al., 1997), (126) (Vassal et al., 1993), (127) (Poonkuzhali et al., 1999), (140) (Wiela Hojenska et al., 2001). Malgré cette prise en compte, la variabilité inter-individuelle persiste, principalement chez les patients atteints de pathologies malignes. Récemment, Bullock et al. ont développé un modèle pharmacocinétique à un compartiment avec un modèle mixte pour l'absorption orale (1 à 3 phases possibles pour l'absorption) et qui a permis d'obtenir de bons résultats chez des patients adultes (143). L'étude de la complexité de l'absorption doit également être menée en pédiatrie. Devant l'ensemble de ces constats, l'individualisation des posologies de busulfan apparaît comme essentielle et un contrôle pharmacologique devrait être systématiquement proposé.

4.1.3. Etude de la variabilité intra-individuelle : comparaison des AUC obtenues pour chaque jour de traitement

Notre analyse de la littérature montre que les études sur la variabilité intra-individuelle de la pharmacocinétique du busulfan sont contradictoires. Dans une étude portant sur des patients thalassémiques, Poonkuzhali et al. (144) retrouvent, entre la première et la treizième dose, une augmentation de la clairance ($p=0,06$) associée à une diminution de l'AUC ($p=0,037$) et de la concentration plasmatique à l'équilibre ($p=0,05$) chez les patients ayant reçu une dose totale de 600 mg/m^2 . L'auteur suggère que le busulfan induit son propre métabolisme via l'activation des glutathion-S-transférases. Dans cette même étude, les différences entre les paramètres pharmacocinétiques entre la première et la treizième dose sont par contre non significatives chez les patients ayant reçu 16 mg/kg de busulfan. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Pawlowska (103) chez des patients thalassémiques ayant reçu une dose de busulfan de 14 à 16 mg/kg . Les résultats de notre étude vont également dans ce sens en ce qui concerne les patients greffés pour une hémoglobinopathie (augmentation de l'AUC entre J1 et J2 puis décroissance à J3 et J4). Les AUC restent remarquablement stables au cours du conditionnement lorsqu'elles sont exprimées par milligramme de busulfan administré. On peut également remarquer que les valeurs d'AUC que nous avons obtenues sont parmi les plus faibles. En effet, ces patients présentent une altération des fonctions hépatiques plus ou moins marquée du fait de la pathologie (fibrose, cirrhose, hépatite) d'où un risque majoré de MVO a priori et une AUC cible fixée à une valeur relativement faible (inférieure à $4 \text{ } \mu\text{g/ml.h}$).

Hassan et al. rapportent une diminution significative de l'AUC entre la première et la treizième dose de busulfan chez des patients atteints de leucémies ou de maladies métaboliques congénitales (105). Cependant, contrairement à notre étude, les AUC ne sont estimées qu'après deux doses à 72 heures d'intervalle et non de façon quotidienne. Nos résultats sont contradictoires puisque les AUC obtenues après les 5^{ème}, 9^{ème} et 13^{ème} doses restent constamment plus élevées que l'AUC obtenue le premier jour du conditionnement, chez les patients atteints de pathologie maligne ou dans la population des patients leucémiques. Une diminution de l'AUC entre les doses 4 et 8 est également rapportée par Jacobson et al. (97) chez des patients atteints de maladie de Hurler, contrairement à nos résultats.

4.2. ETUDE CHEZ LE NOURRISSON

Cette étude n'apporte pas de réponse précise sur le problème de la posologie optimale chez les enfants de petit poids mais fournit néanmoins quelques éléments. Tout particulièrement, les posologies devraient être diminuées chez les enfants de moins de 9 kg. En effet si la clairance du busulfan chez les enfants âgés de 1 à 4 ans est plus élevée que chez les plus grands enfants et les adultes (96), il est possible que la clairance diminue avant 1 an. Le busulfan est métabolisé par conjugaison hépatique au glutathion et il a été montré que la maturation de ces systèmes de conjugaison augmentait progressivement au cours des premiers mois de vie (154, 155). L'incidence des MVO observées chez les 19 nourrissons de notre cohorte (26%) s'est révélée bien plus élevée que celle constatée dans notre population générale pédiatrique (16,7% au cours de notre étude EVODI, où l'âge médian était de 3,9 ans - 3,4% au cours d'une précédente étude (122) (Bleyzac et al. 2001), malgré la mise en place d'une individualisation quotidienne des posologies dans tous les cas (nourrissons ou enfants plus âgés). Plusieurs équipes ont étudié les facteurs de risque de MVO et les résultats diffèrent souvent, l'âge n'apparaissant pas systématiquement comme l'un des facteurs de risque. Néanmoins, la spécificité de notre étude réside dans le fait que notre cohorte n'est composée que de nourrissons, dont le plus âgé a 17 mois. Nous n'avons pas retrouvé de données sur cette catégorie d'âge. Cesaro et al. (145) ont démontré au cours d'une analyse multivariée que, outre un conditionnement à base de busulfan, l'âge inférieur à 6,7 ans (âge médian de la cohorte) était un des facteurs de risque de MVO. Il semblerait donc que les plus jeunes enfants présentent un risque majoré de MVO par rapport aux enfants plus âgés.

Parmi les cinq nourrissons ayant développé une MVO, nous n'avons pu mettre en évidence de relation entre les AUC obtenues et la survenue d'une MVO. Hasegawa et al. avaient également conclu à l'absence de relation entre l'utilisation de busulfan, les doses de busulfan et la survenue de MVO chez des enfants atteints de pathologies hématologiques malignes(38). Il faut cependant se garder d'associer AUC et doses de busulfan comme un même critère : nous avons effectivement montré que pour obtenir des AUC comprises globalement entre 3,5 et 4,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}$, les doses de busulfan administrées présentent des variations considérables (valeurs extrêmes : 8,7 - 24,5 mg/kg). La dose moyenne administrée (15,7 mg/kg) est proche de la dose théorique de 16

mg/kg proposée par l'AMM mais ne reflète absolument pas l'étendue des doses qui ont été administrées en pratique. Nous avons montré que l'on ne pouvait mettre en évidence une corrélation entre dose administrée et AUC moyenne obtenue (figure 21). De plus, seuls 2 patients sur 19 (10,5 % des patients) ont reçu une dose proche de la dose théorique (15, 1 et 15,7 mg/kg), 53% ont reçu une dose supérieure, 37% une dose inférieure. Parmi les quatre patients ayant reçu du busulfan par voie intra-veineuse, tous ont bénéficié d'une modification de dose : 3 dans le sens d'une diminution, 1 avec une posologie plus élevée. Ces résultats confirment ceux mentionnés dans l'étude de Dalle et al. effectuée chez des nourrissons (âge médian = 4,7 mois) ayant reçu du busulfan IV (126) et dont 50% ont bénéficié d'une réduction de dose. Bolinger et al (119) avait précédemment conclu qu'aucun facteur ne permettait de prédire quel patient aurait besoin d'un ajustement de dose suite à une étude montrant que 74% des patients avaient reçu une dose différente de la posologie standard afin d'atteindre la cible thérapeutique pré-définie. Le contrôle pharmacologique des taux plasmatiques de busulfan et l'individualisation des posologies apparaissent donc indispensables pour cette catégorie de patients, que le busulfan soit administré per os ou par voie intra-veineuse.

Les données obtenues sur le chimérisme montre un taux de chimérisme mixte relativement important (42%) chez les nourrissons comparativement aux résultats que nous obtenons dans notre pratique clinique. Une étude réalisée dans notre centre sur une cohorte de 60 patients (âge moyen : 6 ± 5 ans) a montré un taux de chimérisme mixte de 27%, 26,9%, 25% et 29% respectivement à 1, 3, 6 et 12 mois post-greffe (146) (Sahakian P). L'âge des patients semble ici être l'un des facteurs les plus probables pouvant expliquer cette différence, l'étude ayant été effectuée dans le même centre (même procédure analytique de traitement des échantillons, même procédure d'individualisation des posologies, mêmes types de pathologies prises en charge), sans pour autant mettre en évidence une cause précise. Sur ce petit effectif de patient ($n = 19$), nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les valeurs d'AUC chez les patients présentant un chimérisme mixte et ceux présentant un chimérisme complet. Des résultats similaires avaient déjà été obtenus dans notre centre (122) et par Copelan et al. (147). A contrario, plusieurs auteurs ont pourtant conclu à une corrélation positive entre les valeurs d'AUC et l'obtention d'un chimérisme complet (117) (Slattery et al. 1995),

(119) (Bolinger et al. 2000), (120) (Bolinger et al. 2001). Il apparaît donc nécessaire de poursuivre les recherches sur une possible relation entre exposition systémique et prise de greffe.

4.3. ETUDE EVODI

Cette étude a été mise en place afin de détecter un doublement ou une diminution de moitié de l'odds de l'incidence de MVO pour les patients recevant un conditionnement pré-greffe contenant du busulfan per os et bénéficiant d'une adaptation bayésienne quotidienne des posologies. Durant les cinq ans de la période d'étude, nous n'avons pu mettre en évidence une augmentation de l'odds de MVO. Inversement, la mise en évidence des bonnes performances de notre procédure de monitoring a été atteinte après 27 procédures et s'est maintenue jusqu'à la fin de la période d'étude. Le taux de survenue de MVO a été de 16,7% dans cette étude. L'incidence de survenue de MVO rapportée dans la littérature est très variable (32 à 39), allant de 1 à plus de 50%. Ces taux sont difficilement comparables du fait notamment des différences de critères retenus pour le diagnostic de MVO ou des facteurs de risque pré-existants chez les patients.

La figure 25 n'a pas montré de détérioration de notre procédure d'adaptation de posologies quant au risque de survenue de MVO. Cependant, ce graphe signale une augmentation du taux de MVO après le patient 40. Dans la mesure où la limite supérieure de contrôle n'est pas franchie ($h_1 = 2,25$), l'interprétation statistique formelle de cette augmentation signifie que celle-ci ne correspond qu'à des variations aléatoires du taux (constant) de MVO ; la procédure de monitoring doit être poursuivie. Néanmoins, dans le cadre d'un suivi clinique des patients, la moindre modification du processus doit être étudiée et nous avons envisagé plusieurs explications possibles. La population de patients a pu avoir changé au cours de l'étude, entraînant une mauvaise adéquation du modèle d'ajustement de risque défini. Néanmoins la distribution du score de risque est restée sensiblement la même au cours de l'étude, avec des valeurs médianes de 0,34 [0,26 – 0,84] et 0,31 [0,23 – 0,79] respectivement avant et après le patient n°40. Il est également possible qu'avec l'expérience acquise, la procédure d'adaptation des posologies ne soit pas toujours strictement suivie, notamment en terme d'AUC cible par exemple. Ainsi, l'AUC cible initiale basse d'une pathologie donnée a pu être augmentée par le clinicien

suite à un échec de prise de greffe lors de la greffe suivante. Cette instabilité peut également faire suite à un changement de pratique. La recherche de cette possibilité a montré que le seul changement intervenu durant cette période est l'introduction dans notre laboratoire d'une nouvelle chaîne de chromatographie liquide pour la mesure des concentrations plasmatiques de busulfan. La relation entre cette modification et le taux de survenue de MVO n'est cependant pas claire.

Le graphe inférieur de la figure 25 adopte rapidement une tendance négative, franchissant la limite de contrôle inférieure ($h_0 = -4$) au niveau des patients 28 et 66. Ce franchissement indique une diminution de moitié de l'odds de MVO. Cette apparente diminution du taux de MVO peut être la résultante soit d'une réelle diminution du taux actuel de MVO soit d'une estimation initiale du risque de MVO trop élevée. Nous avons vérifié que les patients à haut risque de MVO étaient répartis équitablement au cours de la période d'étude (figure 24). Une autre possibilité est que ce franchissement constitue une fausse alarme : on trouve une cause particulière alors qu'elle n'existe pas. Bien que la limite de contrôle ait été fixée de façon à minimiser cette possibilité ($h = -4$) avec un risque α fixé à 5%, il est difficile d'attribuer une cause vraisemblable à une telle fausse alarme. Après ce premier signal, le CUSUM a été ré-initialisé et le monitoring a été poursuivi. La même pente négative a de nouveau été observée et la limite de contrôle inférieure a été franchie une seconde fois après le patient 66. Ce franchissement indique une amélioration de la performance du contrôle bayésien des posologies de busulfan durant cet intervalle patient (n° 28 à 66). Ainsi, l'explication plausible en lien avec la diminution du taux de MVO observé est que les performances de l'individualisation bayésienne des posologies de busulfan sont bonnes. Ce résultat confirme les bonnes performances de ce monitoring et son intérêt clinique ainsi que cela a été suggéré par de précédentes études (122) (Bleyzac et al. 2001), (102) (Sandström et al. 2001), (92) (Tran et al. 2000), (143) (Bullock et al. 2006,). Plusieurs travaux se sont intéressés au contrôle de l'exposition systémique au busulfan (92) (Tran et al. 2000), (117 à 119) (Slattery et al. 1995, Bolinger et al. 2000, Bolinger et al. 2001), (122) (Bleyzac et al. 2001) : ce contrôle permet de maintenir l'aire sous la courbe du busulfan à l'intérieur de cibles pré-définies selon les patients. L'exposition systémique au busulfan, exprimée sous forme d'AUC ou de C_{ss}, est dans le cadre des greffes de moelle osseuse un indicateur dont le contrôle

permet d'améliorer le devenir des patients en diminuant la toxicité liée au traitement. La méthodologie appliquée dans cette étude a permis d'établir de façon argumentée une relation entre les performances de l'individualisation bayésienne quotidienne des posologies de busulfan et la survenue d'une MVO, complication importante pouvant compromettre le résultat de la greffe.

Nous avons utilisé une procédure d'analyse des sommes cumulées avec ajustement en fonction du risque (RA-CUSUM) telle que proposée par Steiner et al. (128-129) pour contrôler les performances de notre procédure d'adaptation bayésienne des posologies de busulfan lors des conditionnements pré-greffe. Cette procédure RA-CUSUM est bien adaptée à ce type de contrôle pour plusieurs raisons :

- la procédure RA-CUSUM prend en compte de l'impact du temps en tant que variable. Ainsi la survenue de plusieurs MVO durant une courte période est plus à même de déclencher un signal d'alarme que le même nombre de MVO survenant aléatoirement au cours d'une période plus étendue (148) (Altman et al. 1988).
- La carte de contrôle RA-CUSUM permet de détecter de petites modifications d'un processus qui perdurent dans le temps (127) (Montgomery) car basée sur le dérèglement de la moyenne de l'indicateur. Elle est ainsi plus efficace que d'autres processus de contrôle statistiques (149) (Grigg et al. 2003).
- La procédure RA-CUSUM est bien adaptée aux événements peu fréquents qui dans d'autres types d'études nécessiteraient des tailles d'échantillons très importantes afin d'obtenir la sensibilité et la puissance statistiques nécessaires.
- Du fait de la représentation graphique du RA-CUSUM, tout changement observé au niveau de la pente de la courbe indique rapidement qu'un événement s'est produit, c'est à dire une modification dans la performance du processus étudié, avant même qu'un signal n'apparaisse.

A notre connaissance, cette étude est la première appliquant la procédure RA-CUSUM pour suivre le risque de MVO après greffe de moelle osseuse allogénique. Cette procédure a été utilisée dans d'autres domaines médicaux, notamment en chirurgie cardiaque afin d'évaluer une nouvelle technique par rapport à une autre (150) (Novick RJ et al. 2003). Dans le domaine de la transplantation, Rogers et al. (151) ont appliqué cette méthodologie pour suivre la mortalité à trente jours après transplantation cardiaque ou

pulmonaire. Axelrod et al. (152) ont démontré l'utilité du RA-CUSUM lors de l'analyse multicentrique du devenir de patients ayant reçu une transplantation hépatique ou rénale.

Comme dans toute étude observationnelle, notre travail présente des faiblesses. Notre modèle d'ajustement en fonction du risque dérive d'un échantillon de patients hétérogènes, il est de ce fait probablement imparfait car n'incluant pas certains facteurs de risques de MVO décrits par ailleurs (153) (Reiss et al. 2002), (130) (Carreras A 2000). La performance de notre procédure d'adaptation bayésienne des posologies de busulfan pourrait résulter de l'absence de mesure de certains facteurs affectant l'ajustement. Le perfectionnement du modèle nécessitera le recueil de données plus détaillées.

Du fait de la nature rétrospective de notre analyse, nous n'avons pu étudier tous les facteurs potentiels pouvant expliquer l'instabilité de notre procédure après le patient 40. Ceci suggère que la procédure RA-CUSUM devrait être utilisée de façon prospective en routine afin de contrôler la performance de notre procédure d'adaptation de posologies de busulfan et ce afin de pouvoir réagir rapidement devant toute modification de performance (analyse des causes éventuelles, solutions à envisager).

La supposition implicite à la base de cette analyse est que la survenue d'une MVO suite à un conditionnement pré-greffe comportant du busulfan était entièrement attribuable au busulfan et donc à la qualité de l'ajustement des posologies de busulfan réalisé. Il faut néanmoins garder à l'esprit que la survenue d'une MVO est influencée par de nombreux autres facteurs dont les facteurs de risque propres à chaque patient ou les autres traitements (38) (Hasegawa et al. 1998), (130) (Carreras A 2000).

Notre étude a plusieurs conséquences. Nous avons tout d'abord confirmé l'intérêt de l'adaptation bayésienne des posologies de busulfan. Une étude précédente (122) (Bleyzac et al. 2001) a montré que ce monitoring permettait d'augmenter la survie à 90 jours post-greffe. Ces résultats soulignent l'intérêt de l'individualisation des posologies de busulfan pour les greffes de moelle osseuse. La méthode RA-CUSUM pourrait être utilisée en routine dans le cadre des greffes de moelle afin de contrôler l'évolution des patients

greffés sur d'autres critères que la MVO (GVH, prise de greffe ...). De plus, cette approche par RA-CUSUM est intéressante car elle fournit un moyen d'accumuler des preuves sur une série de patients tout en réalisant un ajustement sur les caractéristiques des patients qui affectent directement le risque de survenue de l'effet étudié, ici la MVO (129) (Steiner et al. 2001). L'ajustement permet également de pouvoir comparer l'évolution de patients dans différents centres présentant éventuellement des procédures différentes.

CONCLUSION

Le busulfan est une molécule communément employée lors des conditionnements pré-greffe de moelle osseuse en pédiatrie pour son action myéloablatrice. Il est indiqué lors des greffes effectuées pour des pathologies malignes (leucémies, syndromes myélodysplasiques) et non malignes (hémoglobinopathies, maladies métaboliques, déficits immunitaires, ...). L'utilisation du busulfan à haute dose en association au cyclophosphamide est particulièrement intéressante chez l'enfant en remplacement de l'irradiation corporelle totale du fait de la morbidité et de la mortalité liée à la radiothérapie affectant notamment le système endocrinien et la croissance. Le busulfan présente cependant un index thérapeutique très étroit, avec un risque de non prise de greffe en cas d'exposition insuffisante et une toxicité très importante avec survenue de maladie veno-occlusive en cas de surdosage. De plus, de nombreuses études ont rapporté la très grande variabilité inter-individuelle et intra-individuelle des paramètres pharmacocinétiques de cette molécule chez l'enfant. Dans ce contexte, l'individualisation des posologies a montré son intérêt. Le service pharmaceutique de l'hôpital Debrousse réalise lors de chaque conditionnement pré-greffe de moelle osseuse une adaptation quotidienne des posologies de busulfan à l'aide d'une méthode bayésienne permettant d'estimer les paramètres pharmacocinétiques d'un patient à partir de quelques prélèvements sanguins.

Ce travail a eu pour objectif de mettre à disposition des données de pharmacocinétique de population spécifiques afin d'optimiser la réalisation des adaptations de posologie de busulfan lors des conditionnements pré-greffe en pédiatrie. Nous avons étudié l'influence de la pathologie sur la pharmacocinétique du busulfan en utilisant une approche de pharmacocinétique de population. Les analyses effectuées à l'aide du logiciel NPAG ont confirmé la grande variabilité inter-individuelle de la pharmacocinétique du busulfan chez l'enfant. Le regroupement des patients en fonction de leur pathologie nous a fourni des données de pharmacocinétique qui ont permis l'élaboration de modèles de population spécifiques. L'étude de l'exposition systémique au cours des quatre jours du

conditionnement a mis en évidence la variabilité intra-individuelle et les différences d'exposition systémique en fonction du groupe de pathologie. La problématique de la variabilité intra-individuelle, et tout particulièrement la variabilité liée à l'absorption pour les formes orales de busulfan reste cependant d'importance et nécessite des investigations complémentaires, notamment en terme de modélisation.

Une étude plus spécifique a été réalisée chez les nourrissons de moins de neuf kg, recevant du busulfan per os ou par voie intra-veineuse. L'évaluation de l'incidence des MVO et de la prise de greffe montre que les posologies standard et uniformes recommandées ne sont pas adaptées à ces patients et qu'une individualisation des posologies s'avère indispensable afin d'obtenir une exposition systémique conforme à l'index thérapeutique du busulfan.

Enfin, l'application de la méthodologie RA-CUSUM au suivi de l'incidence des MVO nous a permis de mettre en évidence la diminution du risque de MVO au cours du temps par rapport au risque attendu et en ajustant cette méthode au risque estimé individuel de MVO avant la greffe. Cet outil, grâce à ses possibilités d'ajustement, s'avère ainsi tout à fait adapté à la détection précoce de modification de l'incidence des MVO et a confirmé l'importance et la qualité de notre procédure d'individualisation bayésienne des posologies de busulfan au regard de cette complication.

ANNEXES

ANNEXE 1

AUC ($\mu\text{g/ml.h}$) obtenues pour chaque patient et pour chaque jour du conditionnement.

Groupes de pathologies :

- groupe I : maladies métaboliques
- groupe II : hémoglobinopathies
- groupe III : maladies hématologiques malignes
- groupe IV : déficits immunitaires

Patient	Population	Patho	AUC J1		
			AUC/dose	dose totale en	AUC/mg
1	I	Hurler	7,5	44	0,341
11	I	Hurler	5,28	40	0,264
12	I	Hurler	ND	ND	ND
13	I	Hurler	4,73	40	0,237
17	I	Hunter	4,52	110	0,082
18	I	Hurler	5,1	40	0,255
24	I	Hurler	4,66	36	0,259
25	I	Hurler	3,73	36	0,207
28	I	Hurler	3,34	36	0,186
29	I	Nieman-Pick	4,89	9	1,087
33	I	Hunter	5,39	40	0,270
35	I	porphyrie	3,78	32	0,236
39	I	Hurler	3,94	24	0,328
41	I	Hurler	4,63	36	0,257
47	I	Ostéopétrose	ND	7	ND
56	I	Hurler	3,82	44	0,174
58	I	Porphyrie	3,37	43	0,157
59	I	HPN	4,05	84	0,096
73	I	Deficit en ADA	2,69	24	0,224
77	I	Schimcke	3,19	18	0,354
79	I	Mucopolidose	4,21	12	0,702
86	I	Osteopetrose	4,41	9	0,980
93	I	Fucosidose	5,33	18	0,592
99	I	deficit asp glutaminidase	2,95	60	0,098
10	II	thalassémie	5,51	34	0,324
20	II	thalassémie	3,38	64	0,106
26	II	Drépano-thalassémie	4,16	70	0,119
27	II	drépanocytose	2,96	88	0,067
36	II	drépanocytose	3,14	48	0,131
42	II	thalassémie	4,04	52	0,155
60	II	drepanocytose	3,37	30	0,225
62	II	drepanocytose	2,83	42	0,135
67	II	Thalassemie	3,73	32	0,233
81	II	drepanocytose	3,45	60	0,115
91	II	drepanocytose	3,66	50	0,146
94	II	thalassémie	3,46	74	0,094
97	II	thalassémie	2,72	70	0,078
2	III	SMD (AREB)	10,85	84	0,258
3	III	LAL RC2	3,6	28	0,257
4	III	SMD - 2ème greffe	2,1	60	0,070
5	III	LAL1 VHR - 2ème greffe	4,28	26	0,329
6	III	LAM2 - RC1	5,82	60	0,194
7	III	LAM4 - RC2	3,8	80	0,095
8	III	LAM2 - RC1	3,55	114	0,062
14	III	LAM1 - RC1	4,82	110	0,088
16	III	LAM (SMD anémie réfr.)	3,63	36	0,202
21	III	SMD (AREB T)	3,56	48	0,148
22	III	LAM0 - RC1	2,77	100	0,055
23	III	SMD	4,61	24	0,384
30	III	LAM2 (SMD acutisé)	3,42	32	0,214
31	III	LAM6 - RC1	3,14	28	0,224
32	III	LAM4 - RC1	4,31	36	0,239

Patient	Population	Patho	AUC J1		
			AUC/dose	dose totale	AUC/mg
34	III	SMD	3,04	100	0,061
38	III	LAL1 - RC1	3,19	18	0,354
40	III	LAM	5,61	52	0,216
43	III	LAM1 - RC1	4,8	52	0,185
44	III	LAM3	4,2	70	0,120
46	III	LAM5 - RC2	3,61	30	0,241
48	III	LAM	3,59	18	0,399
50	III	LAM	4,01	72	0,111
51	III	LAM	3,1	28	0,221
52	III	LAL	3,51	13	0,540
53	III	LAM	2,61	16	0,326
55	III	LAL	3,3	26	0,254
61	III	SMD	4,28	38	0,225
63	III	SMD	3,59	64	0,112
65	III	LAM 6	3,44	50	0,138
66	III	LAM	4,44	28	0,317
68	III	LAM	4,11	30	0,274
69	III	LMMJ	4,35	26	0,335
70	III	LAM / SMD	3,34	19	0,352
72	III	LMMJ	4,99	13	0,768
78	III	SMD	3,79	36	0,211
80	III	SMD Monosomie7	ND	48	ND
82	III	rechute LAL	4,84	15	0,645
83	III	SMD	4,17	36	0,232
84	III	LAM RC1	4,1	18	0,456
85	III	LAM RC1	5,82	70	0,166
87	III	LMMJ	4,55	22	0,414
88	III	LAM 6-7	4,54	17	0,534
89	III	LAL VHR	4,58	18	0,509
90	III	SMD Monosomie7	3,8	32	0,238
92	III	LAM5	3,91	26	0,301
95	III	LAM1 RC1	ND	30	ND
96	III	SMD Monosomie7	4,85	26	0,373
98	III	LAM	ND	22	ND
100	III	LAL	4,3	30	0,287
9	IV	DI- 2ème greffe	4,75	68	0,140
15	IV	DI	5,3	88	0,120
19	IV	DI	4,84	44	0,220
37	IV	Wiskott-Aldrich	4,35	36	0,242
45	IV	DI	3,28	14	0,469
49	IV	DI	3,33	7,4	0,900
54	IV	DI	Pb absorption	ND	ND
57	IV	DICS	3,53	10	0,706
64	IV	DICS	3,6	8,5	0,847
71	IV	DICS	1,7	10	0,340
74	IV	DICS- 2ème greffe	5,5	12	0,917
75	IV	DICS	2,72	26	0,209
76	IV	DICS	3,73	13	0,574

Patient	Population	AUC J2				
		AUC/dose	/ AUC J1	dose totale en	AUC/mg	%/J1
1	I	12,8	0,707	132	0,582	0,707
11	I	4,66	-0,117	120	0,233	-0,117
12	I	7,5	ND	80	0,563	ND
13	I	5,86	0,239	128	0,275	0,161
17	I	4,47	-0,011	310	0,087	0,053
18	I	3,28	-0,357	120	0,164	-0,357
24	I	4,71	0,011	100	0,283	0,092
25	I	1,65	-0,558	69	0,143	-0,308
28	I	4,83	0,446	124	0,234	0,260
29	I	3,23	-0,339	25	0,775	-0,287
33	I	4,08	-0,243	120	0,204	-0,243
35	I	4,11	0,087	112	0,220	-0,068
39	I	3,6	-0,086	88	0,245	-0,252
41	I	3,7	-0,201	88	0,252	-0,019
47	I	3,79	ND	20	1,137	ND
56	I	5,08	0,330	112	0,272	0,567
58	I	4,24	0,258	103	0,247	0,576
59	I	3,99	-0,015	228	0,105	0,089
73	I	4,34	0,613	80	0,326	0,452
77	I	4,4	0,379	61	0,433	0,221
79	I	4,21	0,000	32	0,789	0,125
86	I	3,62	-0,179	23,8	0,913	-0,069
93	I	4,01	-0,248	50	0,481	-0,187
99	I	3	0,017	180	0,100	0,017
10	II	4,98	-0,096	102	0,293	-0,096
20	II	3,78	0,118	192	0,118	0,118
26	II	4,82	0,159	274	0,106	-0,112
27	II	2,48	-0,162	216	0,069	0,024
36	II	4,36	0,389	144	0,182	0,389
42	II	3,84	-0,050	164	0,140	-0,096
60	II	3,09	-0,083	98	0,189	-0,158
62	II	3,34	0,180	138	0,145	0,078
67	II	3,54	-0,051	100	0,212	-0,089
81	II	4,08	0,183	168	0,146	0,267
91	II	5,43	0,484	142	0,229	0,567
94	II	3,39	-0,020	222	0,092	-0,020
97	II	5,05	0,857	210	0,144	0,857
2	III	15,7	0,447	252	0,374	0,447
3	III	7,44	1,067	89	0,502	0,951
4	III	3,66	0,743	170	0,129	0,845
5	III	6,4	0,495	78	0,492	0,495
6	III	5,59	-0,040	180	0,186	-0,040
7	III	4,45	0,171	250	0,107	0,124
8	III	5,12	0,442	366	0,084	0,348
14	III	5,17	0,073	330	0,094	0,073
16	III	4,18	0,152	108	0,232	0,152
21	III	3,33	-0,065	144	0,139	-0,065
22	III	6,53	1,357	313	0,125	1,259
23	III	2,48	-0,462	72	0,207	-0,462
30	III	3,13	-0,085	96	0,196	-0,085
31	III	3,17	0,010	88	0,216	-0,036
32	III	4,3	-0,002	100	0,258	0,077

Patient	Population	AUC J2				
		AUC/dose	/ AUC J1	dose totale en	AUC/mg	%/J1
34	III	4,43	0,457	328	0,081	0,333
38	III	2,98	-0,066	58	0,308	-0,130
40	III	3,62	-0,355	132	0,165	-0,237
43	III	4,39	-0,085	156	0,169	-0,085
44	III	3,42	-0,186	190	0,108	-0,100
46	III	4,02	0,114	86	0,280	0,165
48	III	3,59	0,000	54	0,399	0,000
50	III	5,22	0,302	208	0,151	0,352
51	III	4,66	0,503	84	0,333	0,503
52	III	4,36	0,242	39	0,671	0,242
53	III	3,24	0,241	48	0,405	0,241
55	III	5,025	0,523	90	0,335	0,320
61	III	3,98	-0,070	110	0,217	-0,036
63	III	4,52	0,259	176	0,154	0,374
65	III	4,33	0,259	170	0,153	0,111
66	III	3,73	-0,160	92	0,243	-0,233
68	III	4,09	-0,005	90	0,273	-0,005
69	III	3,02	-0,306	90	0,201	-0,398
70	III	4,53	0,356	51	0,533	0,516
72	III	4,68	-0,062	39	0,720	-0,062
78	III	3,97	0,047	100	0,238	0,131
80	III	4,28	ND	144	0,178	ND
82	III	4,29	-0,114	45	0,572	-0,114
83	III	4,73	0,134	102	0,278	0,201
84	III	4,38	0,068	54	0,487	0,068
85	III	4,03	-0,308	162	0,149	-0,102
87	III	3,27	-0,281	66	0,297	-0,281
88	III	4,54	0,000	51	0,534	0,000
89	III	4,58	0,000	66	0,416	-0,182
90	III	7,26	0,911	100	0,436	0,834
92	III	4,5	0,151	86	0,314	0,044
95	III	4,54	ND	90	0,303	ND
96	III	4,33	-0,107	90	0,289	-0,226
98	III	5,33	ND	58	0,551	ND
100	III	4,13	-0,040	84	0,295	0,029
9	IV	3,13	-0,341	204	0,092	-0,341
15	IV	3,94	-0,257	176	0,134	0,115
19	IV	4,04	-0,165	96	0,253	0,148
37	IV	3,39	-0,221	100	0,203	-0,158
45	IV	4,21	0,284	42	0,601	0,284
49	IV	3,27	-0,018	22,2	0,884	-0,018
54	IV	3,59	ND	16	0,898	ND
57	IV	4,19	0,187	30	0,838	0,187
64	IV	3,5	-0,028	44,5	0,472	-0,443
71	IV	2,15	0,265	38	0,339	-0,002
74	IV	2,21	-0,598	30	0,442	-0,518
75	IV	3,27	0,202	91	0,216	0,030
76	IV	3,65	-0,021	39	0,562	-0,021

Patient	Population	AUC J3				
		AUC/dose	/ AUC J1	dose totale en	AUC/mg	%/J1
1	I	12,1	0,613	220	0,550	0,613
11	I	5,89	0,116	200	0,295	0,116
12	I	6,16	ND	148	0,416	ND
13	I	5,03	0,063	216	0,233	-0,015
17	I	5,14	0,137	510	0,101	0,226
18	I	5,61	0,100	208	0,270	0,058
24	I	3,73	-0,200	160	0,233	-0,100
25	I	3,84	0,029	165	0,233	0,123
28	I	4,69	0,404	204	0,230	0,239
29	I	3,98	-0,186	43	0,926	-0,148
33	I	3,56	-0,340	200	0,178	-0,340
35	I	4,46	0,180	192	0,232	-0,017
39	I	4,63	0,175	176	0,263	-0,199
41	I	4,01	-0,134	140	0,286	0,114
47	I	3,84	ND	32	1,200	ND
56	I	2,9	-0,241	168	0,173	-0,006
58	I	3,91	0,160	151	0,259	0,652
59	I	4,46	0,101	372	0,120	0,243
73	I	4,28	0,591	111	0,386	0,720
77	I	3,44	0,078	97	0,355	0,001
79	I	4,21	0,000	52	0,810	0,154
86	I	3,1	-0,297	35,8	0,866	-0,116
93	I	4,46	-0,163	90	0,496	-0,163
99	I	3,41	0,156	308	0,111	0,126
10	II	5,86	0,064	170	0,345	0,064
20	II	3,23	-0,044	320	0,101	-0,044
26	II	3,41	-0,180	466	0,073	-0,384
27	II	3,63	0,226	344	0,106	0,569
36	II	3,44	0,096	216	0,159	0,217
42	II	4,07	0,007	276	0,147	-0,051
60	II	5,08	0,507	178	0,285	0,270
62	II	4,15	0,466	234	0,177	0,316
67	II	4,09	0,097	172	0,238	0,020
81	II	4,72	0,368	276	0,171	0,487
91	II	2,3	-0,372	200	0,115	-0,214
94	II	3,69	0,066	382	0,097	0,033
97	II	2,78	0,022	249	0,112	0,437
2	III	ND	ND		ND	ND
3	III	7,54	1,094	145	0,520	1,022
4	III	7,9	2,762	270	0,293	3,180
5	III	5,05	0,180	137	0,369	0,120
6	III	8,15	0,400	300	0,272	0,400
7	III	4,51	0,187	410	0,110	0,158
8	III	9,03	1,544	626	0,144	1,316
14	III	4,39	-0,089	550	0,080	-0,089
16	III	4,59	0,264	196	0,234	0,161
21	III	5,05	0,419	240	0,210	0,419
22	III	5,23	0,888	505	0,104	0,869
23	III	4,89	0,061	132	0,370	-0,036
30	III	4,71	0,377	160	0,294	0,377
31	III	3,82	0,217	156	0,245	0,092
32	III	4,34	0,007	164	0,265	0,105

Patient	Population	AUC J3				
		AUC/dose	/ AUC J1	dose totale en	AUC/mg	%/J1
34	III	5,22	0,717	556	0,094	0,544
38	III	2,98	-0,066	106	0,281	-0,207
40	III	2,39	-0,574	228	0,105	-0,514
43	III	4,15	-0,135	260	0,160	-0,135
44	III	5,88	0,400	316	0,186	0,551
46	III	3,46	-0,042	138	0,251	0,042
48	III	4,54	0,265	90	0,504	0,265
50	III	3,92	-0,022	308	0,127	0,143
51	III	3,97	0,281	124	0,320	0,446
52	III	6,35	0,809	57	1,114	1,063
53	III	5,11	0,958	80	0,639	0,958
55	III	3,45	0,045	44	0,784	2,089
61	III	4,26	-0,005	198	0,215	-0,045
63	III	4,33	0,206	256	0,169	0,508
65	III	4,51	0,311	264	0,171	0,242
66	III	4,29	-0,034	172	0,249	-0,214
68	III	4,37	0,063	150	0,291	0,063
69	III	4,58	0,053	162	0,283	-0,155
70	III	4,57	0,368	75	0,609	0,733
72	III	4,48	-0,102	67	0,669	-0,129
78	III	4,48	0,182	164	0,273	0,297
80	III	4,3	ND	260	0,165	ND
82	III	3,9	-0,194	77	0,506	-0,215
83	III	4,15	-0,005	162	0,256	0,106
84	III	4,42	0,078	94	0,470	0,032
85	III	4,23	-0,273	254	0,167	0,002
87	III	5,09	0,119	114	0,446	0,079
88	III	4,54	0,000	85	0,534	0,000
89	III	4,58	0,000	118	0,388	-0,237
90	III	4,52	0,189	136	0,332	0,399
92	III	4,87	0,246	150	0,325	0,079
95	III	5,29	ND	150	0,353	ND
96	III	4,29	-0,115	158	0,272	-0,272
98	III	4,59	ND	94	0,488	ND
100	III	4,2	-0,023	140	0,300	0,047
9	IV	3,82	-0,196	364	0,105	-0,249
15	IV	4,05	-0,236	334	0,121	0,007
19	IV	4,29	-0,114	148	0,290	0,318
37	IV	3,66	-0,159	172	0,213	-0,119
45	IV	3,65	0,113	68	0,537	0,146
49	IV	4,14	0,243	37	1,119	0,243
54	IV	3,61	ND	36	1,003	ND
57	IV	3,84	0,088	48	0,800	0,133
64	IV	3,13	-0,131	80,5	0,389	-0,541
71	IV	8,84	4,200	67	1,319	2,881
74	IV	3,75	-0,318	51	0,735	-0,198
75	IV	4,37	0,607	171	0,256	0,221
76	IV	3,2	-0,142	67	0,478	-0,168

Patient	Population	AUC J4				
		AUC/dose	/ AUC J1	dose totale en	AUC/mg	%/J1
1	I	12,1	0,613	308	0,550	0,613
11	I	3,66	-0,307	280	0,183	-0,307
12	I	6,76	ND	216	0,438	ND
13	I	5,03	0,063	304	0,232	-0,021
17	I	4,36	-0,035	686	0,089	0,083
18	I	2,93	-0,425	290	0,141	-0,445
24	I	3,41	-0,268	220	0,217	-0,162
25	I	4,35	0,166	261	0,233	0,126
28	I	4,69	0,404	276	0,238	0,282
29	I	3,18	-0,350	61	0,730	-0,328
33	I	4,72	-0,124	320	0,207	-0,234
35	I	3,61	-0,045	280	0,181	-0,236
39	I	5,6	0,421	264	0,297	-0,096
41	I	2,65	-0,428	192	0,193	-0,249
47	I	2,95	ND	41	1,007	ND
56	I	3,97	0,039	236	0,236	0,356
58	I	4,21	0,249	199	0,296	0,890
59	I	3,45	-0,148	500	0,097	0,002
73	I	4,17	0,550	139	0,420	0,874
77	I	4,61	0,445	145	0,445	0,256
79	I	4,21	0,000	72	0,819	0,167
86	I	3,43	-0,222	49,8	0,964	-0,016
93	I	4,37	-0,180	130	0,471	-0,205
99	I	ND	ND	428	ND	ND
10	II	6,12	0,111	238	0,360	0,111
20	II	4	0,183	480	0,117	0,105
26	II	3,26	-0,216	694	0,066	-0,447
27	II	2,89	-0,024	464	0,087	0,296
36	II	3,45	0,099	294	0,164	0,256
42	II	3,46	-0,144	388	0,125	-0,197
60	II	3,61	0,071	238	0,212	-0,055
62	II	2,79	-0,014	314	0,124	-0,077
67	II	3,71	-0,005	232	0,224	-0,040
81	II	non fait	ND	364	ND	ND
91	II	2,64	-0,279	272	0,136	-0,072
94	II	3,48	0,006	534	0,091	-0,024
97	II	2,86	0,051	351	0,114	0,468
2	III	3,49	-0,678	478	0,102	-0,604
3	III	8,36	1,322	201	0,582	1,264
4	III	5,78	1,752	370	0,219	2,124
5	III	7,5	0,752	196	0,536	0,627
6	III	5,26	-0,096	420	0,175	-0,096
7	III	5,6	0,474	600	0,131	0,375
8	III	6,09	0,715	826	0,103	0,657
14	III	6,88	0,427	770	0,125	0,427
16	III	2,14	-0,410	276	0,109	-0,462
21	III	3,71	0,042	336	0,155	0,042
22	III	5,31	0,917	697	0,107	0,925
23	III	5,06	0,098	192	0,369	-0,040
30	III	4,06	0,187	200	0,284	0,330
31	III	3,83	0,220	224	0,239	0,067
32	III	4,33	0,005	228	0,266	0,110

Patient	Population	AUC J4				
		AUC/dose	/ AUC J1	dose totale en	AUC/mg	%/J1
34	III	5,04	0,658	748	0,094	0,552
38	III	6,06	0,900	154	0,551	0,554
40	III	4,16	-0,258	332	0,175	-0,187
43	III	3,8	-0,208	372	0,143	-0,225
44	III	3,24	-0,229	396	0,115	-0,045
46	III	3,25	-0,100	190	0,239	-0,005
48	III	3,68	0,025	117	0,440	0,104
50	III	4,48	0,117	396	0,158	0,422
51	III	4,56	0,471	172	0,371	0,676
52	III	ND	ND	71	ND	ND
53	III	4,56	0,747	104	0,614	0,882
55	III	4,18	0,267	190	0,308	0,213
61	III	6,02	0,407	278	0,303	0,346
63	III	3,88	0,081	348	0,156	0,391
65	III	5,86	0,703	364	0,225	0,638
66	III	3,98	-0,104	252	0,221	-0,303
68	III	4,13	0,005	210	0,275	0,005
69	III	ND	ND	226	ND	ND
70	III	4,06	0,216	91	0,625	0,777
72	III	3,41	-0,317	99	0,482	-0,372
78	III	4,14	0,092	220	0,263	0,251
80	III	3,99	ND	376	0,149	ND
82	III	5,1	0,054	113	0,632	-0,021
83	III	4,15	-0,005	222	0,262	0,130
84	III	4,94	0,205	134	0,516	0,133
85	III	4,04	-0,306	346	0,163	-0,017
87	III	6,42	0,411	186	0,483	0,168
88	III	4,54	0,000	119	0,534	0,000
89	III	4,58	0,000	170	0,377	-0,259
90	III	5,1	0,342	176	0,406	0,708
92	III	ND	ND	210	ND	ND
95	III	3,79	ND	210	0,253	ND
96	III	ND	ND	234	ND	ND
98	III	4,9	ND	142	0,483	ND
100	III	4,35	0,012	200	0,305	0,062
9	IV	ND	ND	524	ND	ND
15	IV	3,44	-0,351	474	0,102	-0,157
19	IV	2,53	-0,477	200	0,177	-0,195
37	IV	5,08	0,168	244	0,291	0,206
45	IV	3,38	0,030	96	0,493	0,052
49	IV	4,01	0,204	51	1,101	0,223
54	IV	3,84	ND	52	1,034	ND
57	IV	3,22	-0,088	66	0,683	-0,033
64	IV	3,84	0,067	104,5	0,514	-0,393
71	IV	5,16	2,035	78	0,926	1,724
74	IV	4,17	-0,242	79	0,739	-0,194
75	IV	4,07	0,496	251	0,227	0,085
76	IV	5,3	0,421	103	0,720	0,255

ANNEXE 2 : Carte de contrôle RA-CUSUM

La construction d'une carte de contrôle RA CUSUM avec limites de contrôle nécessite la spécification de 4 paramètres : p_0 , le taux acceptable de MVO, p_1 , le taux inacceptable de MVO que l'on cherche à détecter, α le risque de première espèce et β le risque de 2ème espèce.

Suivant les recommandations de Steiner et al., le CUSUM (X_t) est calculé comme une somme continue de W_t , score pondéré qui dépend du risque estimé (pt) de MVO de chaque patient avant transplantation (Baker et al.)

En cas de survenue d'une MVO, W_t devient :

$$W_t = \log_e (OR_A / 1 - pt + OR_{Apt})$$

En l'absence de survenue de MVO, W_t devient :

$$W_t = \log_e (1 / 1 - pt + OR_{Apt})$$

pt est le risque ajusté du patient t de développer une MVO

$\log_e$: logarithme népérien

$OR_A = 2$ pour détecter un doublement de l'odds

$OR_A = 0,5$ pour détecter une diminution de moitié de l'odds

Afin de détecter une augmentation de l'odds, le RA CUSUM est construit à partir du CUSUM (X_t) pour chaque patient t :

$$X_t = \max (0, X_{t-1} + W_t) \text{ et } t = 1, 2, 3 \dots ; \quad X_0 = 0$$

Inversement, pour détecter une diminution de l'odds, on a :

$$X_t = \min (0, X_{t-1} - W_t)$$

Afin de compléter la carte de contrôle, les limites de contrôles ont été calculées ainsi :

- pour détecter une augmentation du risque de MVO de p_0 à p_1 , la limite de contrôle supérieure h_1 est :

$$h_1 = \log_e [(1 - \alpha)/\beta] / \log_e (OR)$$

- la limite de contrôle inférieure (qui permet de détecter une diminution du risque de MVO par rapport à notre risque initial) h_0 est :

$$h_0 = \log_e [(1 - \beta)/\alpha] / \log_e (OR)$$

OR est l'odds ratio correspondant à une augmentation (ou diminution) du risque de MVO de p_0 à p_1

BIBLIOGRAPHIE

1- Quine WE.

The remedial application of bone marrow. JAMA 1896 ; 26 : 1012-3.

2- Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu W, Ferrebee JW.

Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiations and chemotherapy. N Engl J Med 1957 ; 257 : 491-8.

3- Mathé G, Jammet H, Pendic B, et al.

Transfusion et greffes de moelle osseuse homologues chez des humains irradiés accidentellement. Rev Fr Etud Clin Biol 1959 ; 4 : 226-38.

4- Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, et al.

One hundred patients with acute leukaemia treated by chemotherapy, total body irradiation and allogenic bone marrow transplantation. Blood 1977 ; 49 : 511-3.

5- Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, et al.

Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation for leukaemia. N Engl J Med 1986 ; 314 : 729-35.

6- Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, et al.

Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. N Engl J Med 1983; 309 :1347-53.

7- Blazar BR, Ramsay NK, Kerssey JH, et al.

Pretransplant conditioning with busulfan (Myleran) and cyclophosphamide for non malignant disease. Assessment of engraftment following histocompatible allogenic bone marrow transplantation. Transplantation 1985; 39: 597-603.

8- Antin JH, Ginsburg D, Smith BR, et al.

Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : eradication of the PNH clone and documentation of complet lymphohematopoietic engraftment. Blood 1985; 66 : 1247-50.

9- Michel G, Maraninchi D, Perrimond H, et al.

Transplantation de moelle osseuse allogénique dans le traitement des leucémies aiguës de l'enfant : étude de 26 patients. Arch Fr Pediatr 1986 ; 43 : 769-74.

10- Frappaz D, Freycon F, Richard O, et al.

Beta-thalassémie majeure et allogreffe médullaire. Deux observations et une étude de la littérature. Pédiatrie 1987; 42 : 637-44.

11- Tutschka PJ, Copelan EA, Klein JP.

Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. Blood 1987; 70 : 1382-8.

12- Lucarelli G, Polchi P, Galimberti M, et al.

Marrow transplantation for thalassemia following busulfan and cyclophosphamide. Lancet. 1985; 1: 1355-7.

13- Vermynen C, Fernandez Robles E, et al.

Bone marrow transplantation in five children with sickle cell anaemia. Lancet. 1988;1 :1427-8.

14- Stephan JL, Vlekova V, Le Deist F, et al.

A retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients with severe combined immunodeficiency. Immunodeficiency. 1993 ; 4 : 87-8.

15- Camitta BM, Storb R, Thomas ED.

Aplastic anemia. Pathogenesis, diagnosis, treatment, and prognosis. N Engl J Med. 1982 ; 306 : 645-52, 712-8.

- 16- Tabbara IA, Zimmerman K, Morgan C, et al.
Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Complications and results. Arch Intern Med. 2002 ; 162 : 1558-66.
- 17- Ferrara JL, Deeg HJ.
Graft versus host disease. N Engl J Med. 1991 ; 324 : 667-74.
- 18- Lum LG.
The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. Blood. 1987; 6: 369-80
- 19- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al.
Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. Transplantation. 1974; 18: 295-304.
- 20- Thomas ED, Storb R, Clift RA, et al.
Bone marrow transplantation (second of two parts). N Engl J Med. 1975; 292 : 895-902.
- 21- Sullivan KM.
Acute and chronic GVHD in man. Int J Cell Cloning. 1986 ; 4(suppl 1) : 42-93.
- 22- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al.
1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone Marrow Transplant. 1995 ; 15 : 825-8.
- 23- Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, et al.
IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. Br J Haematol. 1997; 97 : 855-64.

24- Martino R, Romero P, Subira M, et al.

Comparison of the classic Glucksberg criteria and the IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease following HLA-identical sibling stem cell transplantation. International Bone Marrow Transplant Registry. Bone Marrow Transplant. 1999; 24 : 283-7.

25- Martin P, Bleyzac N, Souillet G, et al.

Relationship between CsA trough blood concentration and severity of acute graft versus host disease after paediatric stem cell transplantation from matched-sibling or unrelated donor. Bone marrow Transplant. 2003; 32 : 777-84.

26- Ratanatharathorn V, Nash R, Przepiorka D, et al.

Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (FK 506) with methotrexate and cyclosporine for graft versus host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. Blood. 1998 ; 92 : 2303-14.

27- Nash RA, Antin JH, Karanes C, et al.

Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and CsA for prophylaxis of acute GVHD after bone marrow transplantation from unrelated donor. Blood. 2000; 96 : 2062-8.

28- Zecca M, Locatelli F.

Management of graft versus host disease in paediatric bone marrow transplant recipients. Paediatr Drugs 2000; 2 : 29-55.

29- Sullivan KM, Witherspoon RP, Storb R, et al.

Prednisone and azathioprine compared with prednisone alone and placebo for the treatment of chronic graft-v-host disease: prognostic influence of prolonged thrombocytopenia after allogeneic marrow transplantation. Blood. 1988 ; 72 : 546-54.

30- Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus HM, et al.

Chronic graft-versus-host disease : clinical manifestation and therapy. Bone Marrow Transplant. 2001 ; 28 : 121-9.

31- Chiang KY, Halett LJ, Godder KT, et al.

Epstein Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorder following mismatched related T cell-depleted bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 2000; 28 : 1117-23.

32- Brugieres L, Hartmann O, Benhamou E, et al.

Veno-occlusive disease of the liver following high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation in children with solid tumors : incidence, clinical course and outcome. Bone Marrow Transplant. 1988; 3 : 53-8.

33- Ozkaynak MF, Weinberg K, Kohn D, et al.

Hepatic veno-occlusive disease in post-bone marrow transplantation, in children conditioned with busulfan and cyclophosphamide : incidence, risk factors and clinical outcome. Bone Marrow Transplant. 1991 ; 7 : 467-74.

34- Meresse V, Hartmann O, Vassal G, et al.

Risk factors for hepatic veno-occlusive disease after high-dose busulfan-containing regimens followed by autologous bone marrow transplantation : a study in 136 children. Bone Marrow Transplant. 1992; 10 : 135-41.

35- Bisogno G, de Kraker J, Weirich A, et al.

Veno-occlusive of the liver in children treated for Wilm's tumor. Med Pediatr Oncol. 1997; 29 : 245-51.

36- Locasciulli A, Testa M, Valsecchi MG, et al.

Morbidity and mortality due to liver disease in children undergoing allogeneic bone marrow transplantation : a 10-year prospective study. Blood. 1997; 90 : 3799-805.

37- Ortega JA, Donaldson SS, Ivy SP, et al.

Venoocclusive disease of the liver after chemotherapy with vincristine, actinomycin D and cyclophosphamide for the treatment of rhabdomyosarcoma. *Cancer*. 1997; 79 : 2435-9.

38- Hasegawa S, Horibe K, Kawabe T, et al.

Veno-occlusive disease of the liver after allogeneic bone marrow transplantation in children with hematologic malignancies : incidence, onset time and risk factors. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 22 : 1191-7.

39- Frisk P, Lonnerholm G, Oberg G.

Disease of the liver following bone marrow transplantation in children : incidence, clinical course and outcome in a long term perspective. *Acta Paediatr*. 1998 ; 87 : 579-83.

40- Remberger M, Ringden O.

Cytokines in veno-occlusive disease of the liver after bone marrow transplantation. *Transplant Proc*. 1995 ; 27 : 3533-4.

41- Shulman HM, Gown AM and Nugent DJ.

Hepatic veno-occlusive disease after bone marrow transplantation. *Am J Pathol*. 1987 ; 127 : 549-56.

42- Faioni EM and Mannucci PM.

Venoocclusive disease of the liver after bone marrow transplantation : the role of hemostasis. *Leuk Lymphoma*. 1997 ; 25 : 233-45.

43- Scharma P, McDonald GB and Banajii M.

The risk of bleeding after liver biopsy : relation to platelet count. (abstract) *Gastroenterology*. 1980 ; 78, 1320.

- 44- Mc Donald GB, Sharma P, Matthews DE and Shulman HM.
Veno-occlusive disease of the liver after bone marrow transplantation : diagnosis, incidence and factors. *Hepatology*. 1984 ; 4 : 112-6.
- 45- Jones RJ, Lee KSK, Beschorner WE, et al.
Venoocclusive disease of the liver following bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1987 ; 44 : 778-83.
- 46- Carreras E, Granena A, Navasa M, et al .
On the reliability of clinical criteria for the diagnosis of hepatic veno-occlusive disease. *Ann hematol*. 1993 ; 66 : 77-80.
- 47- Yoshimoto K, Yakushiji K, Ijuin J, et al.
Color-Doppler ultrasonography of segmental branch of portal vein is useful for early diagnosis and monitoring the therapeutic course of veno-occlusive disease after allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2001 ; 115 : 945-8.
- 48- Yoshimoto K, Ono N, Okamura T, et al.
Recent progress in the diagnosis and therapy for veno-occlusive disease of the liver. *Leuk Lymphoma*. 2003 ; 44 : 229-34.
- 49- Barker CC, Butzner JD, Anderson RA, et al.
Post transplant complications. Incidence, survival and risk factors for the development of veno-occlusive disease in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2003 ; 32 : 79-87.
- 50- Bearman SI, Hinds MS, Wolford JL, et al.
A pilot study of continuous infusion heparin for prevention of hepatic veno-occlusive disease after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1990 ; 5 : 407-11.

51- Marsa-Vila L, Gorin NC, Laporte JP, et al.

Prophylactic heparin does not prevent liver veno-occlusive disease following autologous bone marrow transplantation. *Eur J Haematol.* 1991 ; 47 : 346-54.

52- Cahn JY, Flesh M, Brion A, et al.

Prevention of veno-occlusive disease of the liver after bone marrow transplantation : heparin or no heparin ? *Blood.* 1992 ; 80 : 2149-50.

53- Or R, Nagler A, Shpilberg O, et al.

Low molecular weight heparin for the prevention of veno-occlusive disease of the liver in bone marrow transplantation patients. *Transplant.* 1996 ; 61 : 1067-71.

54- Forrest DL, Thompson K, Dorcas VG, et al.

Low molecular weight heparin for the prevention of veno-occlusive disease (VOD) after hematopoietic stem cell transplantation : a prospective phase II study. *Bone Marrow Transplant.* 2003 ; 31 : 1143-9.

55- Essel JH, Schroeder MT, Harman GS, et al.

Ursodiol prophylaxis against hepatic complications of allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Intern Med.* 1998 ; 128 : 975-81.

56- Ohashi K, Tanabe J, Watanabe J, et al.

The japanese multicenter open randomized trial of ursodesoxycholic acid prophylaxis for hepatic veno-occlusive disease after stem cell transplantation. *Am J Hematol.* 2000 ; 64 : 32-8.

57- Gluckman E, Jolivet I, Scrobohaci ML, et al.

Use of prostaglandin E1 for prevention of liver veno-occlusive disease in leukemic patients treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 1990 ; 74 : 277-81.

58- Bearman SI, Shen DD, Hinds MS, et al.

A phase I/II study of prostaglandin E1 for prevention of hepatic veno-occlusive disease after bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 1993 ; 84 : 724-30.

59- Brown SA, Goringe A, Fegan C, et al.

Parenteral glutamine protects hepatic function during bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998 ; 22: 281-4.

60- Hassan Z, Hellstrom-Lindberg E, Alsadi S, et al.

The effect of modulation of glutathione cellular content on busulphan-induced cytotoxicity on hematopoietic cells in vitro and in vivo. *Bone Marrow Transplant.* 2002 ; 30 :141-7.

61- Pegram AA, Kennedy LD.

Prevention and treatment of veno-occlusive disease. *Ann Pharmacother.* 2001 ; 35 : 935-42.

62- Richardson PG, Murakami C, Jin Z, et al.

Multi-institutional use of defibrotide in 88 patients after stem cell transplantation with severe veno-occlusive disease and multisystem organ failure: response without significant toxicity in a high-risk population and factors predictive of outcome. *Blood.* 2002 ; 100 : 4337-43.

63- Richardson PG, Elias AD, Krishnan A, et al.

Treatment of severe veno-occlusive disease with defibrotide : compassionate use results in response without significant toxicity in a high risk population. *Blood.* 1998 ; 92 : 737-44.

64- Ringden O, Remberger M, Lehman S, et al.

N-acetylcysteine for hepatic veno-occlusive disease after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000 ; 25 : 993-6.

- 65- Brugieres L, Hartmann O, Travagli JP, et al.
Hemorrhagic cystitis following high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation in children with malignancies: incidence, clinical course, and outcome. *J Clin Oncol.* 1989 ; 7 : 194-9.
- 66- Tauchmanova L, Selleri C, Rosa GD, et al.
High prevalence of endocrine dysfunction in long-term survivors after allogeneic bone marrow transplantation for hematologic diseases. *Cancer.* 2002 ; 95 :1076-84.
- 67- Benyunes MC, Sullivan KM, Deeg HJ, et al.
Cataracts after bone marrow transplantation: long-term follow-up of adults treated with fractionated total body irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995; 32 : 661-70.
- 68- Socie G, Curtis RE, Deeg HJ, et al.
New malignant diseases after allogeneic marrow transplantation for childhood acute leukemia. *J Clin Oncol.* 2000;18 : 348-57.
- 69- Dossiers du Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament :
Médicaments utilisés en cancérologie (4ème édition). 2001 ; XXII, 1-2.
- 70- Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, et al.
Pharmacokinetics of busulfan : correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989 ; 25 : 55-61.
- 71- Grochow LB.
Busulfan disposition : the role of therapeutic monitoring in bone marrow transplantation induction regimens. *Semin Oncol.* 1993 ; 20 : 18-25.
- 72- Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, et al.
Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17: 225-30.

73- Vassal G, Deroussent A, Hartmann O, et al.

Dose-dependent neurotoxicity of high-dose busulfan in children: a clinical and pharmacological study. *Cancer Res.* 1990 ; 50 : 6203-7.

74- Paz HL, Crilley P, Topolsky DL, et al.

Bronchiolitis obliterans after bone marrow transplantation : the effect of preconditioning. *Respiration.* 1993 ; 60 : 109-14.

75- Ringden O, Remberger M, Ruutu T, et al.

Increased risk of chronic graft-versus-host disease, obstructive bronchiolitis and alopecia with busulfan versus total body irradiation : long term results of a randomized trial in allogeneic marrow recipients with leukemia. *Blood.* 1999 ; 93 : 2196-201.

76- Seber A, Shu XO, Defor T, et al.

Risk factors for severe hemorrhagic cystitis following BMT. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23 : 35-40.

77- Kondo M, Kojima S, Kato K, et al.

Late-onset hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Bone Marrow Transplant.* 1998 ; 22 : 995-8.

78- Tsuboi K, Kishi K, Ohmachi K, et al.

Multivariate analysis of risk factors for hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003 ; 32 : 903-7.

79- Haddow A, Timmis GH.

Myleran in chronic myeloïd leukemia; chemical constitution and biological action. *Lancet* 1953 ; 264 : 207-8.

80- Galton DA.

Myleran in chronic myeloïd leukemia; results of treatment. *Lancet.* 1953 ; 264 : 207-8.

81- Ringden O, Ruutu T, Remberger M, et al.

A randomized trial comparing busulfan with total body irradiation as conditioning in allogeneic marrow transplant recipients with leukemia : a report from the nordic Bone Marrow Transplantation Group. *Blood* 1994 ; 83 :2723-30.

82- Ringden O, Labopin M, Tura S, et al.

A comparison of busulfan versus total body irradiation combined with cyclophosphamide as conditioning for autograft or allograft bone marrow transplantation in patients with acute leukemia. Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol.* 1996 ; 93 : 2196-201.

83- Litzow MR, Prez WS, Klein JP, et al.

Comparison of outcome following bone marrow transplantation with cyclophosphamide-total body irradiation versus busulfan-cyclophosphamide conditioning regimens for acute myelogenous leukemias in first remission. *Br J Haematol.* 2002 ; 119 : 1115-24.

84- Blaise D, Maraninchi D, Archimbaud E, et al.

Ten year follow up of a national randomized trial comparing CYTBI vs BUSCY as conditioning regimen for patients administered HLA-identical marrow grafts for CR1 AML. *Blood.* 2000 ; 96 : 480-8.

85- Hartmann AR, Williams SF, Dillon JJ.

Survival, disease-free survival and adverse effects of conditioning allogeneic bone marrow transplantation with busulfan/cyclophosphamide vs total body irradiation : a meta analysis. *Bone Marrow Transplant.* 1998 ; 22 : 439-43.

86- Sanders JE, Pritchard S, Mahoney P, et al.

Growth and development following marrow transplantation for leukemia. *Blood.* 1986; 68 : 1129-35.

- 87- Clift RA, Buckner CD, Thomas ED, et al.
Marrow transplantation for chronic myeloïd leukemia : a randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide .
Blood 1994 ; 84 : 2036-43.
- 88- Curtis RE, Rowlings PA, Deeg HJet al.
Solid cancers after bone marrow transplantation. N Engl J Med. 1997 ; 336 : 897-904.
- 89- Hassan M, Ehrsson H, Ljungman P.
Aspects concerning busulfan pharmacokinetics and bioavailability. Leuk Lymphoma.
1996; 22 : 395-407.
- 90- Hassan M, Ljungman P, Bolme P, et al.
Busulfan bioavailability. Blood. 1994; 84 : 2144-50.
- 91- Vassal G, Gouyette A, Hartmann O, et al.
Pharmacokinetics of high dose busulfan in children. Cancer Chemother Pharmacol. 1989;
24 : 386-90.
- 92- Tran HT, Madden T, Petropoulos D, et al.
Individualizing high dose oral busulfan : prospective dose adjustment in a pediatric population undergoing allogeneic stem cell transplantation for advanced hematologic malignancies. Bone Marrow Transplant. 2000; 26 : 463-70.
- 93- Mc Cune JS, Gibbs JP, Slaterry JT.
Plasma concentration monitoring of busulfan : does it improve clinical outcome? Clin Pharmacokinet. 2000; 39 : 155-65.
- 94- Czerwinski M, Gibbs JP, Slaterry JT.
Busulfan conjugation by glutathione-S-transferase alpha, mu and pi. Drug Metab Dispos. 1996; 24 : 1015-9.

- 95- Bredschneider, M, Klein K, Murdter TE, et al.
Genetic polymorphism of glutathione S transferase A1, the major glutathione S transferase in human liver: consequences for enzyme expression and busulfan conjugation. Clin Pharmacol Ther. 2002 ; 71 : 479-87.
- 96- Gibbs JP, Murray G, Risler L, et al.
Age-dependant tetrahydrothiophenium ion formation in young children and adults receiving high-dose busulfan. Cancer Research. 1997; 57: 5509-16.
- 97- Jacobson P, Park JJ, DeFor TE, et al.
Oral busulfan pharmacokinetics and engraftment in children with Hurler syndrome and other inherited metabolic storage diseases undergoing hematopoietic cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2001; 27: 855-61.
- 98- Grochow LB, Krivit W, Whitley CB, Blazar B.
Busulfan disposition in children. Blood. 1990; 75: 1723-7.
- 99- Hassan M, Oberg G, Bekassy AN, et al.
Pharmacokinetics of high-dose busulphan in relation to age and chronopharmacology. Cancer Chemother Pharmacol. 1991; 28: 130-4.
- 100- Regazzi MB, Locatelli F, Buggia I, et al.
Disposition of high dose busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. Clin Pharmacol Ther. 1993 ; 53 : 45-52.
- 101- Baker BS, Bostrom B, DeFor T, et al.
Busulfan pharmacokinetics do not predict relapse in acute myeloid leukemia. Bone Marrow Transplant. 2000; 26: 607-14.
- 102- Sandström M, Karlsson MO, Ljungman P, et al.
Population pharmacokinetic analysis resulting in a tool for dose individualization of busulfan in bone marrow transplant recipients. Bone Marrow Transplant. 2001; 28 : 657-64.

- 103- Pawlowska AB, Blazar BR, Angelucci E, et al.
Relationship of plasma pharmacokinetics of high-dose oral busulfan to the outcome of allogeneic bone marrow transplantation in children with thalassemia. Bone Marrow Transplant. 1997; 20: 915-20.
- 104- Bostrom B, Enockson K, Johnson A, et al.
Plasma pharmacokinetics of high-dose oral busulfan in children and adults undergoing bone marrow transplantation. Pediatr Transplantation. 2003; 7 : 12-8.
- 105- Hassan M, Fasth A, Gerritsen B, et al.
Busulfan kinetics and limited sampling model in children with leukaemia or inherited disorders. Bone Marrow Transplant. 1996; 15: 843-50.
- 106- Poonkuzhali B, Srivastava A, Quernin MH, et al.
Glutathione-S-transferase activity influences busulfan pharmacokinetics in patient with beta thalassemia major undergoing bone marrow transplantation. Drug Metab Disp. 2001; 29: 264-7.
- 107- Vassal G, Challine D, Koscielny S, et al.
Chronopharmacology of high-dose busulfan in children. Cancer Res. 1993; 53 : 1534-7.
- 108- Minto C, Schnider T.
Expanding clinical applications of population pharmacodynamic modelling. Br J Clin Pharmacol. 1998; 46 : 321-33.
- 109- Jelliffe RW, Schumitzky A, Bayard D, et al.
Model-based, goal oriented, individualized drug therapy. Clin Pharmacokinet. 1998; 34 : 57-77.
- 110- Beal S, Sheiner L.
NONMEM user's guide – Part 1. User's basic guide. Technical report of the Division of Clinical Pharmacology, University of California, San Francisco, 1980.

111- Schumitzky A.

Nonparametric EM algorithms for estimating prior distributions. Appl Math Computation. 1991; 45 : 143-57.

112- Mallet A.

Maximum likelihood estimation method for random coefficient regression models. Biometrika. 1986; 73 : 645-56.

113- Mallet A, Trouvin JH.

Notions de pharmacocinétique de population. In Pharmacocinétique. G Houin. Ed Marketing, Paris, 1990 ; 127-44.

114- Leary R, Jelliffe R, Schumitzky A, et al.

A unified parametric/nonparametric approach to population PK/PD modelling. Annual meeting of the Population Approach Group in Europe; 2002 June 6-7; Paris

115- Leeman TD.

Incertitude et raisonnement bayésien en pharmacologie clinique. Med et Hyg. 1990 ; 48 : 1254-8.

116- Bertholle V, Martin P, Bleyzac N, et al. Intérêt clinique de l'adaptation des posologies de busulfan et de la ciclosporine chez des enfants greffés de moelle. Ann Pharm Fr. 2004; 62(3) : 165-76.

117- Slattery JT, Sanders JE, Buckner CD, et al.

Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics [erratum publié dans Bone Marrow Transplant 1996 ; 18 : 829]. Bone Marrow Transplant. 1995; 16 : 31-42.

118- Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT et al.

An evaluation of engraftment, toxicity and busulfan concentration in children receiving bone marrow transplantation for leukemia or genetic disease. *Bone Marrow Transplant.* 2000 ; 25 : 925-30.

119- Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, et al.

Target dose adjustment of busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001 ; 28 : 1013-8.

120- Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, et al.

Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17 : 225-30.

121- Slattery JT, Risler LJ.

Therapeutic monitoring of busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit.* 1998; 20: 543-9.

122- Bleyzac N, Souillet G, Magron P, et al.

Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipient using a test-dose and bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 28: 743-51.

123- Nguyen L, Fuller D, Lennon S, et al.

IV busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant* 2004 ; 33 :979-87

124- Zwaveling J, Bredius RGM, Cremers SCLM, et al.

Intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation: study of pharmacokinetics in association with early clinical outcome and toxicity. *Bone Marrow Transplant* 2005 , 35:17-23.

125- Kletzel M, Jacobshn D, Duerst R.

Pharmacokinetics of a test dose of intravenous busulfan guide dose modifications to achieve an optimal area under the curve of a single daily dose of intravenous busulfan in children undergoing a reduced-intensity conditioning regimen with hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2006, 12: 472-9.

126- Dalle JH, Wall D, Theoret Y, et al.

Intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in infants: clinical and pharmacokinetic results. *Bone Marrow Transplant*, 2003, 32: 647-51.

127- Montgomery D.

Introduction to statistical quality control. 2nd edition. NewYork: Wiley; 1991.

128- Steiner SH, Cook RJ, Farewell VT, et al.

Monitoring surgical performance using risk-adjusted cumulative sum charts. *Biostatistics*. 2000 Dec;1(4):441-52.

129- Steiner SH, Cook RJ, Farewell VT.

Risk-adjusted monitoring of binary surgical outcomes. *Med Decis Making*. 2001 May-Jun;21(3):163-9.

130- Carreras E.

Veno-occlusive disease of the liver after hemopoietic cell transplantation. *Eur J Haematol*. 2000 May;64(5):281-91.

131- D'Argenio DZ.

Optimal sampling times for pharmacokinetic experiment. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1981 ; 9 : 739-56.

132- Tod M, Mentre F, Merle Y , et al.

Robust optimal design for the estimation of hyperparameters in population pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1998; 26 : 689-716.

133- Kashyap A, Wingard J, Cagnoni P, et al.

Intravenous versus oral busulfan as part of a busulfan/cyclophosphamide preparative regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: decreased incidence of hepatic venoocclusive disease (HVOD), HVOD-related mortality, and overall 100-day mortality. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(9):493-500.

134- Bleyzac N, Barou P, Aulagner G.

Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2000 ; 742 : 427-32.

135- Jelliffe RW, Gomis P, Tahani B, et al.

A population pharmacokinetic model of trimethoprim in patients with pneumocystis pneumonia, made with parametric and nonparametric methods. *Ther Drug Monit*. 1997; 19 : 450-9.

136- Magron P.

Pharmacocinétique de population et adaptation des posologies de busulfan dans le conditionnement de la greffe de moelle osseuse en pédiatrie. *Th D Pharm*, Lyon 1 ; 1999.

137- R [computer program]. Version 2.1.0.

<http://cran.r-projet.org;2005>

138- Steward CG, Pellier I, Mahajan A, et al.

The Working Party on Inborn Errors of the European Blood and Marrow Transplantation Group. Severe pulmonary hypertension: a frequent complication of stem cell transplantation for malignant infantile osteopetrosis. *Br J Haematol*, 2004, 124: 63-71.

139- Jelliffe RW, Tahani B.

Effect of assumptions concerning assay error patterns upon pharmacokinetic parameter values and model behavior. *J Vet Pharmacol Ther*; 1994; 17:105-9.

- 140- Wiela-Hojenska A, Gorczynska E, Orzechowska-Juzwenko K et al.
Metabolic functions of the liver during chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Clin Pharm Ther* 2001; 39:246-50
- 141- Vassal G, Fisher A, Challine D, Boland I, Ledheist F, Lemerle S, et al.
Busulfan disposition below the age of three : alteration in children with lysosomal storage disease. *Blood*. 1993 ; 82 : 1030-4.
- 142- Bonnet-Bertholle V.
Etude de la variabilité pharmacocinétique du busulfan dans le conditionnement de greffe de moelle osseuse en pédiatrie. Diplôme d'Etudes Approfondies, Nancy 1, 2002.
- 143- Bullock JM, Smith PF, Booker BM, et al.
Development of a pharmacokinetic and Bayesian optimal sampling model for individualization of oral busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit*. 2006 Feb;28(1):62-6.
- 144-- Poonkuzhali B, Srivastava A, Quernin MH, et al.
Pharmacokinetics of oral busulphan in children with beta thalassemia major undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 24 : 5-11.
- 145- Cesaro S, Pillon M, Talenti E, et al.
A prospective survey on incidence, risk factors and therapy of hepatic veno-occlusive disease in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2005 Oct;90(10):1396-404.
- 146- Sahakian P. Evaluation de l'incidence de la maladie veino-occlusive du foie et du chimérisme après individualisation des posologies de busulfan en transplantation de moelle osseuse pédiatrique. Thèse D Pharm, Lyon 1, 2003.

147- Copelan EA, Bechtel TP, Avalos BR, et al.

Busulfan levels are influenced by prior treatment and are associated with veno-occlusive disease and early mortality but not with delayed complications following marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 27: 1121-4.

148- Altman D, Royston JP.

The hidden effect of time. *Stat Med*. 1988 Jun;7(6):629-37.

149- Grigg OA, Farewell VT, Spiegelhalter DJ.

Use of risk-adjusted CUSUM and RSPRT charts for monitoring in medical contexts. *Stat Methods Med Res*. 2003 Mar;12(2):147-70.

150- Novick RJ, Fox SA, Stitt LW, et al.

Effect of off-pump coronary artery bypass grafting on risk-adjusted and cumulative sum failure outcomes after coronary artery surgery. *J Card Surg*. 2002 Nov-Dec;17(6):520-8.

151- Rogers CA, Ganesh JS, Banner NR, et al.

Cumulative risk adjusted monitoring of 30-day mortality after cardiothoracic transplantation: UK experience. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005 Jun;27(6):1022-9.

152- Axelrod DA, Guidinger MK, Metzger RA, et al.

Transplant center quality assessment using a continuously updatable, risk-adjusted technique (CUSUM). *Am J Transplant*. 2006 Feb;6(2):313-23.

153- Reiss U, Cowan M, McMillan A, et al.

Hepatic venoocclusive disease in blood and bone marrow transplantation in children and young adults: incidence, risk factors, and outcome in a cohort of 241 patients. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002 Dec;24(9):746-50.

154- Baars AJ, Amoldussen S, Rauth DC, et al.

Developmental aspects of hepatic glutathione S-transferase activities in male rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1980;5(3):153-9.

155- Holt DE, Hurley R, Harvey D.

Metabolism of chloramphenicol by glutathione S-transferase in human fetal and neonatal liver. *Biol Neonate*. 1995;67(4):230-9.

PUBLICATIONS

TITLE:

INFLUENCE OF UNDERLYING DISEASE ON BUSULFAN DISPOSITION IN BONE MARROW TRANSPLANT CHILDREN: A NON PARAMETRIC POPULATION PHARMACOKINETIC STUDY

AUTHORS :

V. BERTHOLLE-BONNET ¹, N. BLEYZAC ^{1,3}, C. GALAMBRUN ², V. MIALOU ², Y. BERTRAND ², G. SOUILLET ², G. AULAGNER ^{1,3}

1- Pharmacy department, Debrousse Hospital, 29 Rue Sœur Bouvier, 69005 Lyon, France

2- Pediatric Hematology Department, Debrousse Hospital, 29 Rue Sœur Bouvier, 69005 Lyon, France

3- Henry Poincaré University, rue Lebrun, 54000 Nancy, France.

Correspondence and reprint requests should be sent to:

Dr. Nathalie Bleyzac

Pharmacy Department - Debrousse Hospital

29 rue Sœur Bouvier

69005 Lyon, France

Tel: (33) 4 72 38 57 76 / Fax: (33) 4 72 38 55 15

Email: nathalie.bleyzac@chu-lyon.fr

KEY WORDS: busulfan – pediatric – population pharmacokinetics

SUMMARY

Busulfan is an alkylating agent used in conditioning regimen prior to bone marrow transplantation. Busulfan shows a narrow therapeutic index with a major liver toxicity (veno-occlusive disease), and a wide inter and intra-patient pharmacokinetic variability. This report presents the results of a population pharmacokinetic analysis leading to models based on underlying diseases justifying bone marrow transplantation. A hundred children received oral busulfan-based conditioning regimen between March 1998 and February 2006. Busulfan pharmacokinetic parameter estimates (K_a , Cl/F and V_s) were estimated by using NPAG algorithm in patients divided into four groups according to initial diagnosis: metabolic diseases, hemoglobinopathies, hematological malignancies and immune deficiencies. K_a and V_s did not significantly differ in the four subgroups. Cl/F and AUCs were significantly different in the four groups. Cl/F was significantly higher in the “hemoglobinopathies” group ($p = 0.002$) with a mean value at 7.78 l.h^{-1} whereas the “immune deficiencies” group was characterised by the lowest Cl/F (3.59 l.h^{-1}). Interindividual variability was marked with high interindividual parameter percent coefficients of variation (CV%), with nevertheless less diversity in the population parameter distributions for V_s in the three subgroups “metabolic diseases”, “hemoglobinopathies”, “malignant diseases” and Cl/F for patients with hemoglobinopathies. Fit was good for busulfan concentrations predictions based on Bayesian individual posterior values, with little bias and good precision. In comparison with the overall population, the only model of subgroup presenting a greater precision was patients with hemoglobinopathies ($p = 0.002$). The advantage of these more specific models of a given disease could result in a more accurate individualisation of busulfan dosage regimens, especially in very sparse blood sampling situation.

INTRODUCTION

Busulfan is a part of myeloablative therapy substituting total body irradiation prior to bone marrow transplantation (BMT). It is currently used in hematological malignancies (leukemia, myelodysplastic syndromes) and non malignant disorders (β thalassemia major, sickle cell anemia, metabolic diseases and immune deficiencies). Busulfan systemic exposure must be sufficient to avoid graft rejection but an excessive exposure, measured by area under the plasma concentration curve versus time (AUC), has been related to severe toxicity, particularly veno-occlusive disease (1,2). Because of its narrow therapeutic index and its wide inter-patient and intra-patient pharmacokinetic variability, individual therapeutic drug monitoring of busulfan plasma concentrations is necessary to optimise systemic exposure, especially in children (1-6). However, in clinical practice, busulfan plasma concentrations are rarely measured daily and used for dosage regimen individualization based on the estimation of individual pharmacokinetic parameter values by using Bayesian methods. These methods allow one to choose the best dosage regimen for a given patient by combining pharmacokinetic data from a reference population and relevant information from the patient such as 1 to 3 plasma concentration levels (7). Bleyzac et al. showed Bayesian control of busulfan dosage regimens, daily adapted to individual pharmacokinetic parameter values, could improve clinical outcome of bone marrow transplant children (8). It was also suggested that busulfan pharmacokinetic parameter values could vary according to the underlying disease (9-13). However, even with intravenous preparation and whereas variability due to absorption is decreased considerably, systemic drug exposure might be inappropriate. Furthermore, the intravenous form is much more expensive than oral preparation. To explore this variability and because oral busulfan is still widely used, studies upon oral formulation are still necessary. This report presents the results of a population pharmacokinetic analysis of oral busulfan aimed at evaluating several population pharmacokinetic models based on underlying diseases justifying BMT. These models will be used for further kinetic studies and busulfan regimens Bayesian adaptative control.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Data were prospectively collected in the Pediatric Hematology Unit of Debrousse hospital (Hospices Civils de Lyon) during routine therapeutic drug monitoring. All children requiring a busulfan-based conditioning regimen prior to BMT were included between March 1998 and February 2006, namely 100 patients (age 5.3 ± 4.8 years, range 0.1-18.1 years, sex ratio F/M 0.39, weight 19.5 ± 13.4 kg). Patients received busulfan for the following indications: malignant diseases (acute myeloid leukemia: $n = 28$, acute lymphoid leukemia: $n = 7$, myelodysplastic syndrome: $n = 12$, JMML: $n = 3$), hemoglobinopathies (sickle cell anemia: $n = 6$, β thalassemia major: $n = 7$), inborn errors of metabolism of various types ($n = 24$) and immunodeficiencies ($n = 13$). Busulfan was given orally every six hours over four days (16 doses) and at distance from feeding. Capsules were prepared with pure busulfan (Inresa, France) and lactose by the pharmacy department following a strict quality program. Conditioning regimens included busulfan followed by cyclophosphamide (200 mg/kg) or busulfan and cyclophosphamide (200 mg/kg) and etoposide (60 mg/kg) or busulfan and cyclophosphamide (200 mg/kg) and melphalan (140 mg/m^2). Patients received clonazepam as prophylaxis for busulfan related seizures. Therapeutic drug monitoring was performed during the four days of busulfan therapy and nine blood samples per patient were drawn in order to adjust busulfan dosage regimens daily: 1, 2.5, and 5 hours after the first dose, 1.5 and 5 hours after the fifth, ninth and thirteenth dose of busulfan therapy. Those sampling times were chosen to optimize the estimation of pharmacokinetic parameter values, according to the

calculation of Tod et al by using the Fisher matrix for a one compartment model and oral administration (14). A two-sample strategy was developed for the second, third and fourth days of busulfan dosage regimen in the aim to reduce blood spoiling in our pediatric patients (8,15). The Bayesian procedure allowed one to use the information brought by the first busulfan levels measured on the first day to calculate pharmacokinetic parameter values over the four days. In this way, only one level during absorption phase was required to actualize the pharmacokinetic information during each of the following days of conditioning regimen. AUC was estimated every day and for each dose by using a Bayesian modelling program included in the USCPACK software (16). AUC was monitored to reach a target value per 6h dosing interval ranging from 3.5 to 5.5 $\mu\text{g.h.ml}^{-1}$, depending on the indication of BMT (8). Patient files were made using the file manager program (PASTRX) included in the USC*PACK software. They included demographic and clinical data such as diagnosis, age, body weight, doses of busulfan administered and time of administration, precise blood sampling times.

Sample analysis

Blood samples were collected on ice in heparinized tubes and immediately centrifuged. Plasma was picked up without delay in polypropylene tube to avoid adsorption of busulfan on glass. Busulfan plasma concentration was immediately assayed by using a validated high performance liquid chromatographic procedure (17). The limit of quantification was 20 ng/ml. Intra-day and inter-day coefficients of variation were below 5%. The analytical error pattern could be described as the following polynomial equation: $\text{SD} = 0.0135\text{C}^3 - 0.077\text{C}^2 + 0.1493\text{C} + 0.0003$, with C: measured plasma concentration ($\mu\text{g/ml}$) and SD: standard deviation on measured concentration ($\mu\text{g/ml}$). Results were available in time to adjust the evening dose of the same day if necessary. Furthermore, only 200 μl of plasma were necessary for dosage, which was a great advantage in pediatric patients.

Pharmacokinetic analysis

Data were analysed using an iterative 2-stage Bayesian algorithm and the nonparametric adaptative grid (NPAG) developed by Leary et al. (18). NPAG is combined with an interior point rather than an expectation-maximisation algorithm. It begins with a smaller and coarser grid than NPEM. After this is initially solved and the support points are found, the grid is refined by adding extra grid points near them. The problem is again solved using this new grid and the process continues iteratively, until a convergence criterion is met (the difference between the log likelihood obtained consecutively with 2 iterations is less or equal to 0,0001 in this study) (19). This program allows population modelling with percentile estimates of the dispersion of the parameter distribution. NPAG provides estimates of the entire population parameter marginal density function from the entire patient data set in one step, and can use sparse data with single drug concentration measurements per patient (18-20). When the range of possible parameter values specified for each NPAG run is not precise enough, IT2B program can provide parametric estimates of PK parameters and also the corresponding likely realistic ranges of the various parameters for NPAG to work with (21). The program starts with uniformed parameter marginal or joint probability density set up on a discrete grid covering the specified parameter space. Based on data from each patient, new and more likely marginal or joint probability densities are then computed and the process is iterated to convergence. Another advantage is that the assay error is taken into account for the determination of pharmacokinetic parameters, as each drug concentration measured is weighted by the reciprocal of the variance associated with the assay method. This permits one to assign a credibility level to each measured serum concentration, increasing the accuracy of the pharmacokinetic parameter estimates (22). Moreover, NPAG and IT2B computes a so-

called gamma-coefficient, which multiplied by the polynomial assay error allows an approximation of the overall contribution of the remaining environmental sources of variability such as uncertainty about the administered doses, times of administration, mis-specification of the pharmacokinetic model (residual variability) (19).

The pharmacokinetic behaviour of busulfan in our population was modelled by using a linear one-compartment model (2,23,24). The parameterization of the model was K_a , V_s and Cl/F with K_a : first order absorption rate constant, V_s : volume of distribution related to the body weight and Cl/F : apparent oral clearance. PK analyses were performed on the overall population ($n = 100$) and on subgroups of patients, according to their initial diagnosis (inborn errors of metabolism, hemoglobinopathies, malignant diseases and immunodeficiencies). Pharmacokinetic parameter estimates obtained for each subgroup were compared to each others. Models were compared by final log likelihood, by evaluating the possible decrease in pharmacokinetic interindividual variability and by comparing their predictive performance. Predictive performance of each model was calculated by comparing observed busulfan plasma levels to those estimated by using the model pharmacokinetic parameter values and based on individual Bayesian posterior values. Results are given as mean error (ME) as a measure of bias, mean squared error (MSE) as a measure of precision and coefficient of determination (R^2) between measured and estimated busulfan plasma concentrations (25).

Statistical analysis

Kruskal-Wallis test was used to assess the possible differences between pharmacokinetic parameter values between the subgroups of pathology, as they were assumed to follow a nongaussian distribution. T-Test (or Mann-Whitney test when the number of patients was less than 30) was used to assess the significance of bias and precision. All statistical analyses were performed by using SPSS for Windows (version 11.0, SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Gamma was set at 2.888, the value obtained with the IT2B analysis. Taking account gamma, total error SD was:

$$\text{Total error SD} = 0,001 + 0.43127C - 0.22243C^2 + 0.039C^3 \text{ (figure 1)}$$

Busulfan pharmacokinetic parameter estimates and AUC, for the overall population and for each group of pathology, are summarized in table 1. Kruskal-Wallis analysis showed that neither the absorption rate constant K_a nor the volume of distribution V_s significantly differed in the four subgroups. The apparent oral clearance was significantly higher in the "hemoglobinopathies" group ($p = 0,002$) with a mean value at 7.78 l.h^{-1} whereas the "immune deficiencies" group was characterised by the lowest Cl/F (3.59 l.h^{-1}). The AUCs, per dose and normalized by the total amount of busulfan administered, were also significantly different in these subpopulations ($p < 0.001$ and $p = 0.001$ respectively). The AUCs were greater in patients with malignant diseases (mean AUC = $4.49 \pm 0.83 \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$) and with metabolic diseases (mean AUC = $4.43 \pm 1.28 \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$) than in the two other groups. When the AUCs were normalized by the total amount of busulfan administered, patients with immune deficiencies clearly presented higher values than the remaining population.

Furthermore, mean and median values of most of the busulfan pharmacokinetic parameters were distant (for example, 3.38 versus 0.75 h^{-1} respectively for mean and median absorption rate constant for patients with immune deficiencies), showing the heterogeneity and the asymmetry of their distribution. These results were also observed in the overall population and showed that the distributions of busulfan pharmacokinetic parameter values were not Gaussian neither the whole population of patients nor in the subgroups. Mean values

of K_a in each subpopulation were higher than in the overall population: it underlines the non gaussian distribution of this parameter. Examples of K_a marginal density probability functions (overall population and patients with malignant diseases) are given in figure 2 and graphs show that the distribution shapes are clearly non gaussian.

The inter-individual variability could be visualized on the 2D plot of the joint density probability functions of the parameter estimates. The figure 3 shows graphs obtained for the whole population and for patients with metabolic diseases. Each point on the plot represents a couple of pharmacokinetic parameters (Cl/F and V_s) profile and can be assumed to possible sub-groups of patients with different pharmacokinetic behaviour. The dispersion of the plot is the consequence of a great inter-individual pharmacokinetic variability. The whole population and all groups of pathology showed great interindividual variability with high to very high interindividual parameter percent coefficients of variation (CV%) but suggesting less diversity in the population parameter distributions for V_s in the three subgroups "Metabolic diseases", "hemoglobinopathies", "malignant diseases" and Cl/F for patients with hemoglobinopathies. Visual display of the average steady state concentration (C_{ss}) versus time also showed a wide interpatient variation: the cases of the overall population the "hemoglobinopathies" group are represented on figure 4 and we can see that dispersion is decreased in this subgroup compared to the overall population. Similar results were obtained for patients with immune deficiencies.

The values of quality criteria for the evaluation of the pharmacokinetic models predictive performance (such as ME, MSE and coefficient of determination) are given in table 2 for the different analyses, i.e. the overall population and the four groups of pathology. Fit was good for predictions based on Bayesian individual posterior values, with broadly little bias and good precision. In comparison with the overall population, the only model of subgroup presenting a greater precision was patients with hemoglobinopathies ($p = 0.002$). Bias was not significantly improved in none of the subgroups. Adequacy of the models can be visualized on figure 5, which represents the plots of predicted versus observed busulfan plasma concentrations, obtained by using Bayesian feedback and median parameter estimates. Some of the weighted residuals versus busulfan concentrations can also be visualized on this figure: the weighting was as the inverse of the estimated observation variance to provide an approximation to the heteroscedastic assumption. In comparison with the overall population, weighted residuals decreased and could be included in acceptable ranges $[-3; +3]$ for each sub-group, except for the "malignant diseases" group.

DISCUSSION

One application of population modelling consists in the analysis of sparse data such as in pediatrics. To individualize any drug-dosing regimen for any patient, it is necessary to explore the interindividual pharmacokinetic variability of this drug. However a part of this variability is often due to the degree of precision of the analytical method. Indeed, the assay error model must be carefully quantified because it will condition the variability allowed to the pharmacokinetic parameter estimates. NPAG approach allows one to take into account the analytical variability, leading to a more accurate estimation of the pharmacokinetic parameter values. This is particularly of interest for studies carried out in small populations such as cohorts of children. Moreover the accuracy of the pharmacokinetic parameter estimation is enhanced by the optimal sampling times used in this study and by measuring busulfan plasma levels on each day of treatment by busulfan.

NPAG analyses of the data showed a great inter-individual variability of busulfan pharmacokinetics in children. Pharmacokinetic parameter estimates sometimes showed great differences between median and mean values. This was the case particularly for K_a as well as for V_s for patients with immune deficiencies. These results reflect the non gaussian

distribution of the parameters and confirm the relevance of a nonparametric method. NPAG and other non parametric algorithms, having no constraints on the shape of the population parameter distributions, and which compute the likelihood exactly and estimate parameter values with great precision, detect the more likely greater diversity in the parameter values in the population studied (18). The high values of interindividual parameter percent coefficients of variation (CV% of the absorption rate constant reached 136%) confirmed the wide inter-individual variability. The dispersion of the probability density functions distribution was also important in the overall population. Nevertheless, dividing the patients into four subpopulations according to their pathology allowed reducing moderately this dispersion.

The interindividual variability remained extensive in the “malignant diseases” group. This could be related to anticancer drugs previously administered, which are known to impair liver metabolism and gut integrity (26). The susceptibility of each patient to anticancer drugs and dose intensity may also play a role. Furthermore, this population was the largest one ($n = 50$ patients) and could influence results obtained for the overall population ($n = 100$ patients). That might be a reason for the lack of improvement of the predictive performance of this model compared to the overall population model.

To our knowledge, our population PK study is the first one reporting such a high number of pediatric patients ($n = 100$) with various types of diseases. Our results agree with previous studies which showed the influence of the underlying disease on busulfan pharmacokinetics. Hassan and co-workers (13) demonstrated that patients with leukemia ($n = 11$) had a significantly faster elimination half-life compared to children with inherited disorders ($n = 9$) such as Wiskott-Aldrich syndrome, combined immunodeficiency or osteopetrosis. In the present study, Cl/F of the 50 patients with hematological malignancies was higher than in other subgroups, excepted for patients with hemoglobinopathies. Only one case of thalassemia was reported in the results of Hassan et al. which did not present a high Cl/F . Vassal et al. (10) reported that children under three years old with metabolic storage diseases ($n = 6$) had a higher distribution volume and apparent oral clearance compared to children with immune deficiencies or leukemia ($n = 27$). Our results are in contradiction but the limited number of children in Vassal’s study ($n = 6$ patients versus $n = 24$ patients in the present study) might explain these discrepancies. The patients age might also be discussed : children in our study are not all under three years of age (median age = 2.1 yr, range [0.3 – 16.3 yr] for patients with metabolic diseases). Moreover, blood samples have to be carefully treated otherwise busulfan plasma concentration could be underestimated. This concern may particularly influence results drawn from multicenter studies. The “immune deficiencies” group presented the most important pharmacokinetic parameter estimates variability. It can be explained by the slight number of patients ($n = 13$) and the great differences between the ages of these patients (median age: 9 months, range [0.1-18.1 yr], three patients were over ten years old). Best improvement of predictive performances was obtained with the “hemoglobinopathies” population model. This might be due to the relative homogeneity of the underlying disease, thalassemia or sickle cell anemia, which are both abnormalities of hemoglobin and affect the same organs (active or chronic persistent hepatitis, fibrosis, siderosis). It is necessary to underline the high values obtained for the clearance (median = 7.36 l. h^{-1} , range [2.94 – 15.73]) in comparison with the other subgroups. Results obtained for the pharmacokinetic parameters are similar to those found by Pawlowska (27) in a study concerning 64 children and young adults with thalassemia. The authors did not find any correlation between busulfan pharmacokinetics and pre-transplant liver status nor age.

AUCs reported in this present study result of daily monitored and adjusted busulfan dosage regimen. Higher busulfan systemic exposures were obtained for children with metabolic diseases (mean AUC = $4.43 \pm 1.28 \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$) and malignant diseases (mean AUC = $4.49 \pm 0.83 \mu\text{g.ml}^{-1}.\text{h}$), which is in accordance with the target values per 6h dosing interval

fixed for these pathology. Children with metabolic storage disease require high busulfan systemic exposure to achieve bone marrow displacement before allogeneic transplantation. For malignant diseases, busulfan-contained conditioning regimen aims at achieving bone marrow displacement but also at eradicating residual leukemic cells. On the other hand, patients with hemoglobinopathies are at high risk of complications, especially VOD, and lower busulfan AUCs are required (mean AUC = $3.94 \pm 0.87 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}$).

In our study, we found that age was not a relevant covariate of busulfan clearance (data not shown). Busulfan is extensively biotransformed in the liver and mainly conjugated with glutathione, reaction that is catalysed by the isoform glutathione-S-transferase A1. Age has been tested as a covariate of busulfan hepatic metabolism but did not improve the model, i.e. did not decrease the interindividual variability. This supports the findings of other studies (26) and our opinion that age is not the major factor that may affect metabolic functions in these children: underlying disease may also play an important role in impairing busulfan metabolism (10,24,26).

But what is very important to note is that interpatient variability of busulfan pharmacokinetics was not completely explained by underlying disease. A wide range of pharmacokinetic parameters values remained possible for patients belonging to a given group, especially in patients with malignant disorders. Recently, Bullock et al. developed a one compartment pharmacokinetic model with a mixture model for oral absorption (1 to 3 absorption phases) which provides good results with adult patients (28) and should be tested in pediatrics because the absorption is clearly an important part of the inter and inpatient variability. Individualisation of busulfan drug dosage regimens is more than ever essential and therapeutic drug monitoring should be systematically performed.

In summary, we confirmed differences in the busulfan plasma pharmacokinetics previously reported according to the underlying disease. Using the initial diagnosis to classify the patient in a specific population pharmacokinetic model proved to be superior at predicting busulfan plasma concentrations for a homogenous patient subpopulation with thalassemia or sickle cell anemia but we failed to demonstrate this improvement for the other types of diseases. Nevertheless and because of the differences in the pharmacokinetics, these models obtained with NPAG program will now be used for Bayesian adaptative control of busulfan plasma concentrations in children based on feedback from busulfan plasma levels. The advantage of these more specific models of a given disease could result in a more accurate individualisation of busulfan dosage regimens, especially in very sparse blood sampling situation. However, intraindividual variability during the four days of busulfan treatment remains important and needs to be further investigated.

ACKNOWLEDGEMENTS

Many thanks to Pr RW. Jelliffe of the Laboratory of Applied Pharmacokinetics, USC Keck School of Medicine, Los Angeles, for his very thoughtful helps and critiques in the preparation of this manuscript.

REFERENCES

- 1) Dix SP, Wingard JR, Mullins RE *et al.* Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1996; **17**:225-2302
- 2) Hassan M, Ehrsson H, Ljungman P. Aspect concerning busulfan pharmacokinetics and bioavailability. *Leuk Lymphoma* 1996; **22**:395-407
- 3) Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB *et al.* Pharmacokinetics of busulfan : correlation with veno-occlusive disease in patient undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; **25**:55-61
- 4) Chattergoon DS, Saunders EF, Klein J *et al.* An improved limited sampling method for individualized busulfan dosing in bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 1997; **20**:347-354
- 5) Slattery JT, Risler LJ. Therapeutic monitoring of busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit* 1998; **20**:543-549
- 6) Vassal G, Challine D, Koscielny S *et al.* Chronopharmacology of high-dose busulfan in children. *Cancer Res* 1993; **53**:1534-1537
- 7) Jelliffe RW, Schumitzky A, Van Guilder M. Individualizing drug dosage regimens: roles of population pharmacokinetic and dynamic models, Bayesian fitting, and adaptative control. *Ther Drug Monit* 1993; **15**:380-393
- 8) Bleyzac N, Souillet G, Magron P, *et al.* Improved clinical outcome of pediatric bone marrow recipient using a test-dose and Bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. *Bone Marrow Transplant* 2001; **28**:743-751
- 9) Mc Cune J, Gibbs JP, Slattery JT. Plasma concentration monitoring of busulfan : does it improve clinical outcome? *Clin Pharmacokinet* 2000; **39**:155-165
- 10) Vassal G, Fischer A, Challine D, *et al.* Busulfan disposition below the age of three : alteration in children with lysosomal storage disease. *Blood* 1993; **82**:1030-1034
- 11) Vassal G. Pharmacologically-guided dose adjustment of busulfan in high-dose chemotherapy regimens : rationale and pitfalls. *Anticancer Res* 1994; **14**:2363-2370
- 12) Poonkuzhali B, ChandyM, Srivastava A. GST activity influences busulfan pharmacokinetics in patients with β thalassemia major undergoing bone marrow transplantation. *Drug Metab Dispos* 2001; **29**:264-267
- 13) Hassan M, Fasth A, Gerritsen B *et al.* Busulphan kinetics and limited sampling model in children with leukemia and inherited disorders. *Bone Marrow Transplant* 1996; **18**:843-850
- 14) Tod M, Mentre F, Merle Y *et al.* (1998) Robust design for the estimation of hyperparameters in population pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm* 1998; **26**:689-711

- 15) Schiltmeyer B, Klingebiel T, Schwab M, *et al.* Population pharmacokinetics of oral busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003; **52**: 209-216
- 16) Laboratory of Applied Pharmacokinetics. USC* Pack P.C. Collection Clinical Research Programs, Los Angeles. University of Southern California, School of Medicine, 1995, version 10.7.
- 17) Bleyzac N, Barou P, Aulagner G. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; **742**:427-432
- 18) Leary, R., R. Jelliffe, A. Schumitzky, *et al.* A unified parametric/nonparametric approach to population PK/PD modelling. Annual Meeting of the Population Approach Group in Europe; 2002 Jun 6-7; Paris
- 19) Bustad A, Terziivanov D, Leary R, *et al.* Parametric and nonparametric population methods: their comparative performance in analysing a clinical dataset and two Monte Carlo simulation studies. *Clin Pharmacokinet* 2006; **45**(4):365-383
- 20) Jelliffe RW, Schumitzky A, Bayard D *et al.* Model-based, goal oriented, individualized drug therapy. *Clin. Pharmacokinet* 1998; **34**:57-77
- 21) Jelliffe RW, Gomis P, Tahani B *et al.* A population pharmacokinetic model of Trimethoprim in patients with pneumocystis pneumonia, made with parametric and non parametric method. *Ther Drug Monit* 1997; **19**:450-459
- 22) Jelliffe RW, Tahani B. Effect of assumptions concerning assay error patterns upon pharmacokinetic parameter values and model behavior. *J Vet Pharmacol Ther*; 1994; **17**:105-109
- 23) Vassal G, Gouyette A, Hartmann O *et al.* Pharmacokinetics of high-dose busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; **24**:386-390
- 24) Tran HT, Madden T, Petropoulos D. *et al.* Individualizing high-dose oral busulfan : prospective dose adjustment in a pediatric population undergoing allogeneic stem cell transplantation for advanced hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2000; **26**:463-470
- 25) Sheiner L, Beal S. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet Biopharm* 1981; **9**:503-512
- 26) Wiela-Hojenska A, Gorczynska E, Orzechowska-Juzwenko K *et al.* Metabolic functions of the liver during chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Clin Pharm Ther* 2001; **39**:246-250
- 27) Pawlowska AB, Blazar BR, Angelucci E *et al.* Relationship of plasma pharmacokinetics of high dose oral busulfan to the outcome of allogeneic bone marrow transplantation in children with thalassemia. *Bone Marrow Transplant* 1997; **20**:915-920

28) Bullock J, Smith P, Booker B. et al. Development of a pharmacokinetic and Bayesian optimal sampling model for individualisation of oral busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit* 2006; **28**(1):62-66

TABLE 1 : Pharmacokinetic parameter values estimated in the overall population and according to the group of pathology (mean: mean values, med: median values, CV: coefficient of variation). *Group I*: metabolic diseases, *group II*: hemoglobinopathies, *group III*: malignant diseases, *group IV*: immune deficiencies

Population		Overall population n = 100	Group I n = 24	Group II n = 13	Group III n = 50	Group IV. n = 13
Log Likelihood		68.4	32.6	45.7	14.5	35.1
Ka (h ⁻¹)	mean	2.32	3.41	3.93	3.59	3.38
	med	1.59	2.15	1.47	1.91	0.75
	CV (%)	102	93	110	107	136
Vs (l.kg ⁻¹)	mean	0.70	0.58	0.79	0.81	0.72
	med	0.75	0.66	0.78	0.80	0.39
	CV (%)	65	48	21	42	125
Cl/F (l. h ⁻¹)	mean	4.84	4.25	7.78	4.63	3.59
	med	4.14	3.70	7.36	3.80	2.24
	CV (%)	59	59	42	54	77
AUC (µg.ml ⁻¹ .h)	mean	4,29	4,43	3,71	4,49	3,84
	med	4,12	4,16	3,59	4,30	3,69
	CV (%)	22	29	18	18	11
AUC/mg * (µg.ml ⁻¹ .h)	mean	0,328	0,379	0,158	0,298	0,517
	med	0,250	0,249	0,148	0,269	0,501
	CV (%)	74	79	45	56	65

* AUC normalized by the total amount of busulfan administered

TABLE 2: Coefficient of determination (R^2), bias (ME) and precision (MSE) obtained a posteriori for the overall population and for each group of underlying disease (results obtained with the median pharmacokinetic parameter estimates)

Population	Whole	Group I	Group II	Group III	Group IV
R^2	0.78	0.85	0.79	0.76	0.75
ME	- 0.041	-0.041	-0.028	-0.047	-0.045
MSE	0.039	0.035	0.027	0.043	0.038

R^2 : coefficient of determination between measured and estimated busulfan plasma concentrations, ME: mean error, MSE: mean squared error

Whole: overall population, *group I*: metabolic diseases, *group II*: haemoglobinopathies, *group III*: malignant diseases, *group IV*: immune deficiencies

FIGURE 1 : Total error SD, i.e. analytical error pattern multiplied by gamma coefficient

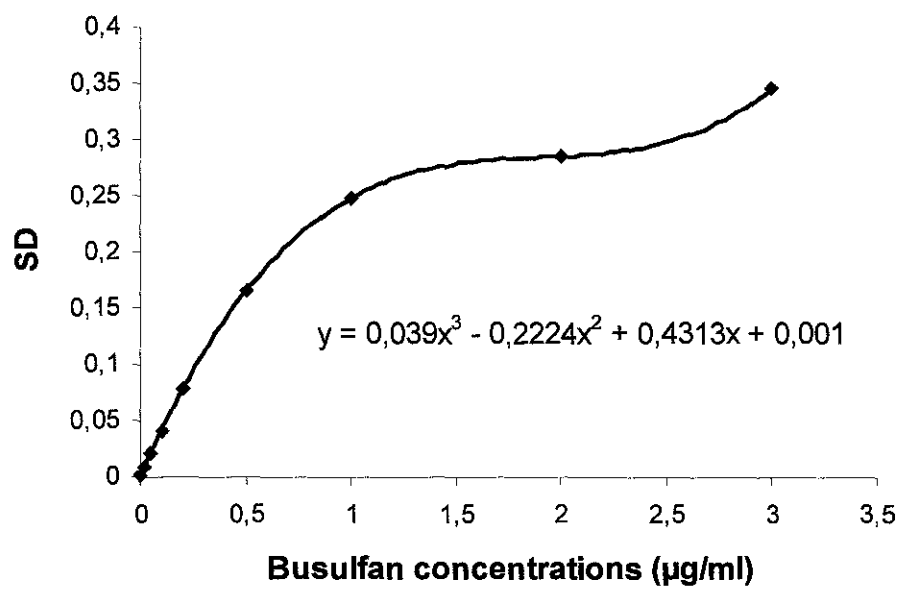
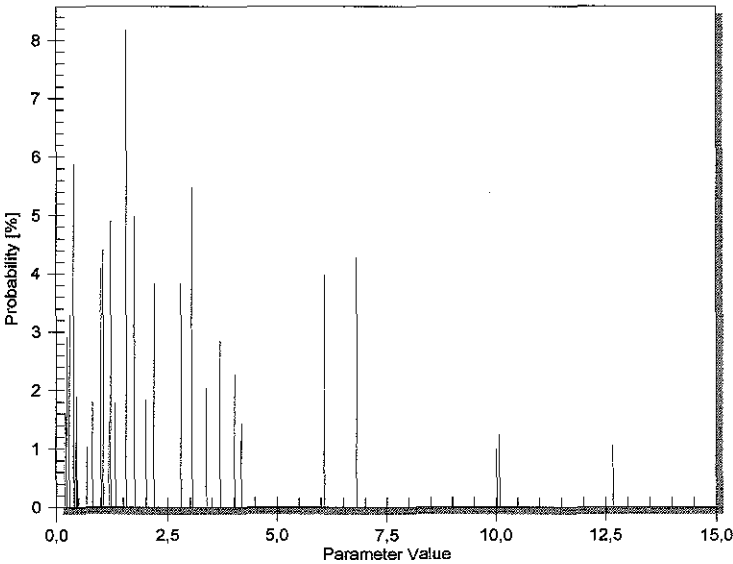
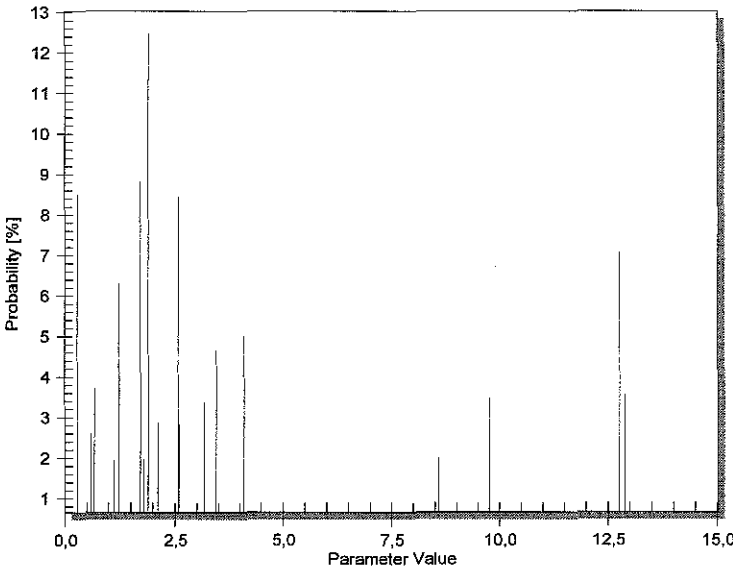


FIGURE 2 : Ka marginal density probability functions (a : Overall population, b : Malignant diseases)

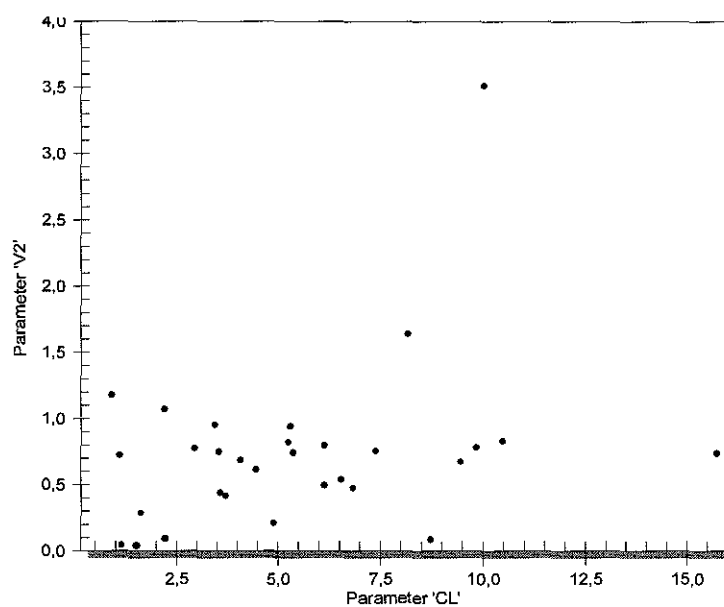


a. Overall population

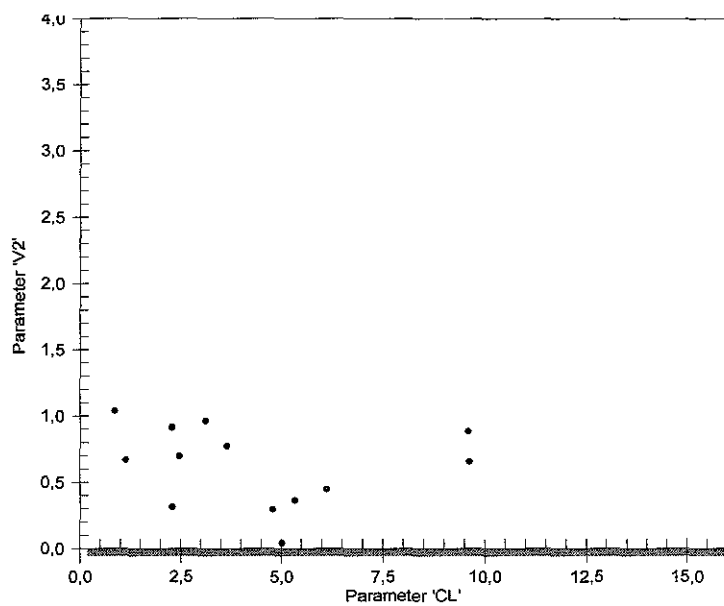


b. Malignant diseases

FIGURE 3: 2D plot of the joint density probability of Cl/Vs parameterizations (**a** : Overall population, **b** : Metabolic diseases)

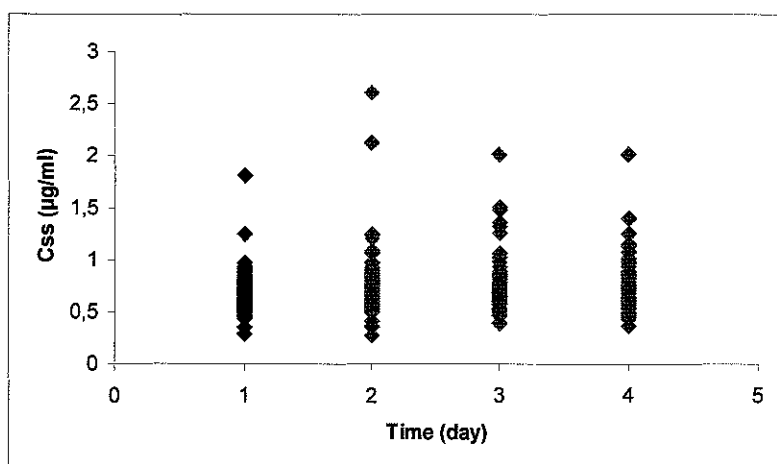


a. Overall population

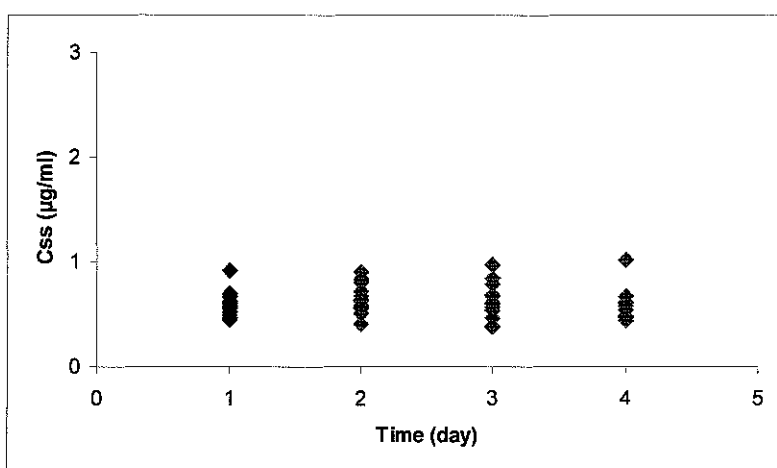


b. Metabolic diseases

FIGURE 4 : Average steady state busulfan concentration (C_{ss}) time profile (**a** : Overall population, **b** : Hemoglobinopathies)

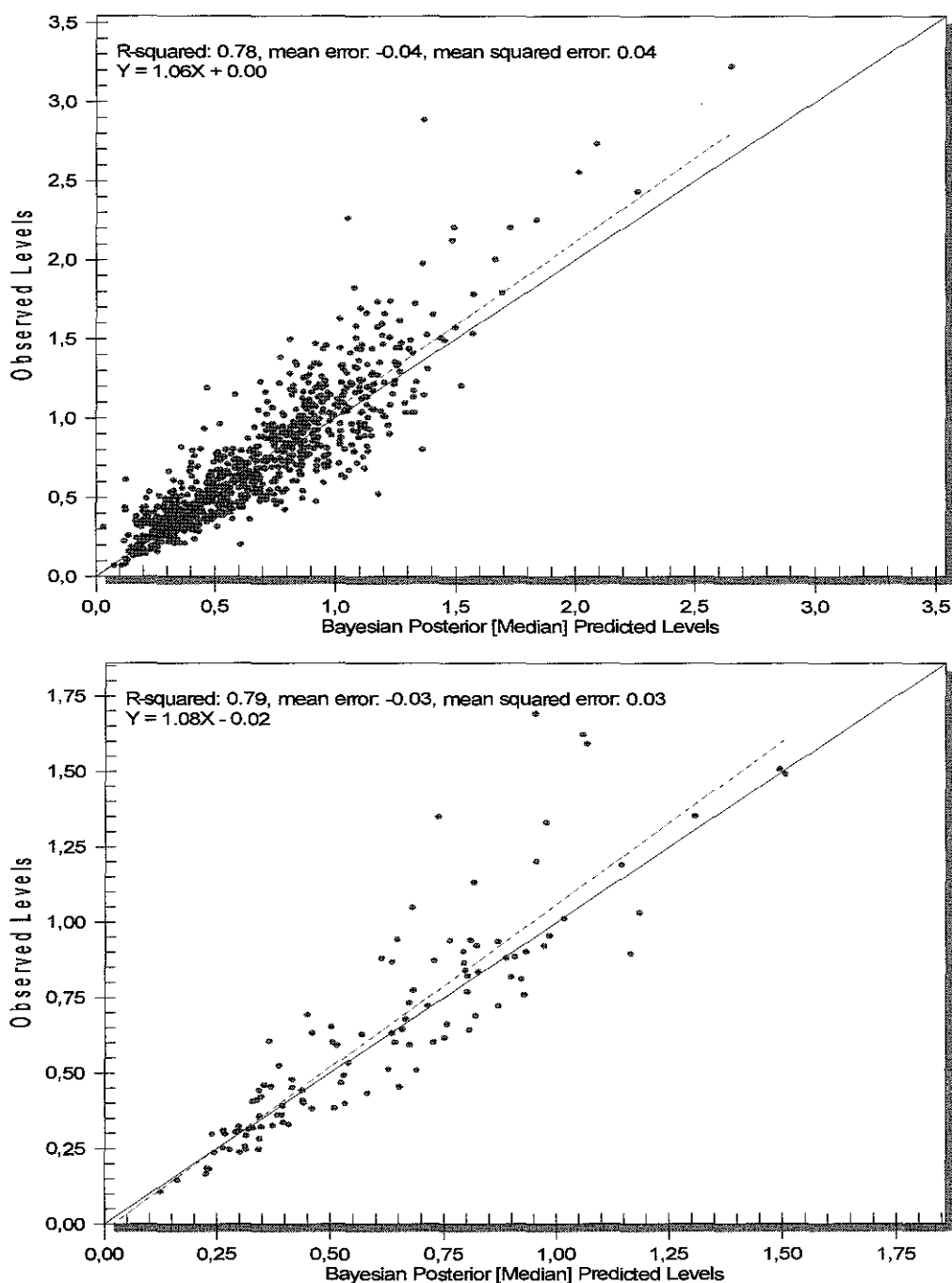


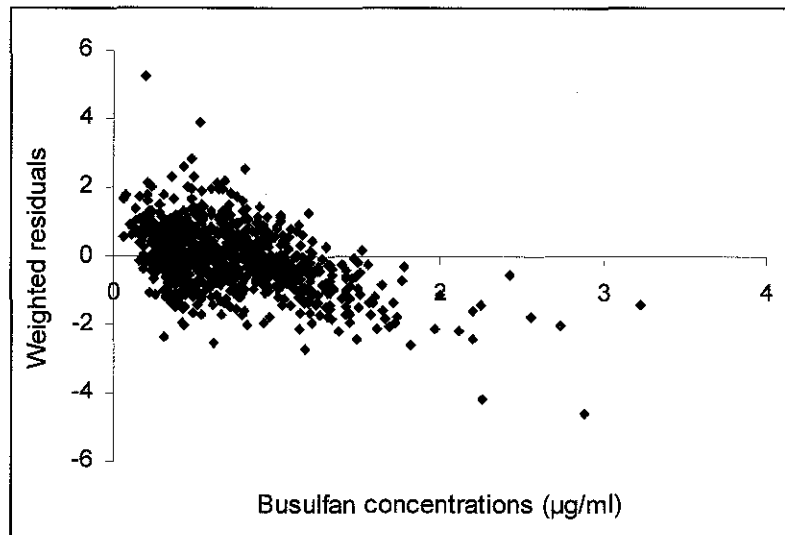
a. Overall population



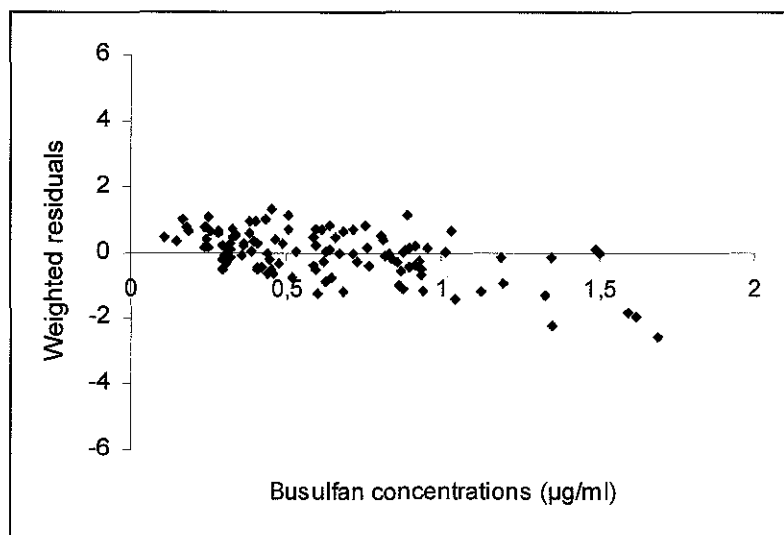
b. Hemoglobinopathies

FIGURE 5: Examples of (I) predicted versus observed busulfan concentrations plots obtained by using Bayesian feedback and median parameter estimates and of (II) weighted residuals versus busulfan concentrations (a: Overall population, b: Haemoglobinopathies)





II a. Overall population



II b. Hemoglobinopathies

TITLE :

RISK-ADJUSTED MONITORING OF VENO-OCCLUSIVE DISEASE FOLLOWING
BAYESIAN INDIVIDUALIZATION OF BUSULFAN DOSAGE FOR BONE MARROW
TRANSPLANTATION IN PAEDIATRICS.

AUTHORS :

B KITIO¹, V BERTHOLLE¹, C. GALAMBRUN², V. MIALOU², Y. BERTRAND², N.
BLEYZAC¹,

4- Department of Pharmacy, Debrousse Hospital, 29 Rue Sœur Bouvier, 69005 Lyon, France

*5- Department of Paediatric Immuno-haematology and Bone Marrow Transplantation,
Debrousse Hospital, 29 Rue Sœur Bouvier, 69005 Lyon, France*

KEY WORDS: Veno-occlusive disease -busulfan – paediatrics – BMT – Bayesian
pharmacokinetic monitoring – Risk-adjusted cumulative sum.

Correspondence and reprint requests should be sent to:

Dr. Nathalie Bleyzac
Pharmacy Department - Debrousse Hospital
29 rue Sœur Bouvier
69005 Lyon, France
Tel: (33) 4 72 38 57 76 / Fax: (33) 4 72 38 55 15
Email: nathalie.bleyzac@chu-lyon.fr

SUMMARY

In order to assess the performance of Bayesian individualization of busulfan (BU) dosage regimens, veno-occlusive disease (VOD) rate was monitored for paediatric patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation (BMT).

Consecutive patients undergoing allogeneic BMT with BU as conditioning regimen during five years period (January 2000 – February 2006) were reviewed. VOD was major outcome variable. Preconditioning risk of VOD was estimated for each patient using a scoring system that included type of transplant, recipient CMV-positive status and total parenteral nutrition provided pretransplantation. A risk-adjusted cumulative sum method was used to compare observed versus predicted outcome by assigning a risk score, based on log-likelihood ratios, to each patient. These cumulative scores were sequentially plotted with preset control limits for “signalling” where results were substantially different than expected (doubling or halving of odds ratio).

Sixty-six children received BMT after a oral busulfan-based conditioning regimen with median age 3.9 years, 63.6% of male. Median preconditioning risk of VOD was 0.34 range (0.23 – 0.84). Observed VOD rate was 16.7% (n= 11) which was 17 (60.7%) fewer than the expected number estimated by the risk score. The resulting risk-adjusted score for each patient was plotted sequentially. This plot adopt early a negative slope, crossing the lower control limit twice, after 27 and 66 patients, indicating improved results compared to those expected.

Bayesian individualization of oral busulfan dosage regimens is useful to reduce VOD rate in children undergoing allogeneic BMT.

INTRODUCTION

Oral busulfan (BU) was introduced into conditioning regimens for bone marrow transplantation in early 1980s. Therapeutic index of BU is narrow, and its digestive absorption is highly variable, particularly in infants and children (1,2). Low exposure to BU have been correlated with an increased incidence of graft rejection or relapse (3,4). Conversely high levels were associated with overall poor outcome and fatal toxicity, particularly veno-occlusive disease (VOD). VOD represents a major problem with a mean incidence of 20-30 % and a mortality varying from 3 to 67% in different series (5-9).

These observations suggest that individualization of the therapy may be necessary. In a previous study, Bleyzac et al (10) found that Bayesian individualization of oral BU dosage improved early post-transplantation outcome, by reducing the probability of developing VOD and increasing 90-day survival. After this result, Bayesian individualization of oral BU was implemented as a routine protocol for patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) with BU-based conditioning regimens in our center. Since this procedure allows controlling patients' exposure to oral BU, any deviation from optimum standard may lead to VOD. VOD is thus an important measure of performance of Bayesian individualization of oral BU.

Monitoring of the procedure is necessary to detect a change in outcome so the process can be examined, reinforcing beneficial practice and eliminating factors that may degrade performance. The cumulative sum method (CUSUM) is a technique of continuous monitoring derived from industrial statistical process control techniques. CUSUM monitoring provides a graphical summary of change in performance over time, while also avoiding the problem of repeated significant testing. It has been shown to be ideally suited for detecting small but persistent process change (11).

Monitoring health care process is not entirely straightforward since patients are different in their clinical presentation and their physiology. For VOD, different risk factors have been described (12) thus, there is a great heterogeneity in patients' preconditioning risk to develop VOD. This suggests the need of risk-adjustment method when VOD is monitored. Recently, Steiner et al (13, 14) developed a risk-adjustment method permitting clinical implementation of CUSUM in diverse patient populations.

The purpose of this study was to use risk-adjust cumulative sum (RA-CUSUM) technique (13, 14) to assess the performance of oral busulfan Bayesian therapeutic drug monitoring in decreasing the incidence of VOD for patients who underwent HSC transplantation with BU-based conditioning.

MATERIALS AND METHODS

Patients.

From January 2000 to the end of February 2006, 128 children aged of 1.2 months up to 17 years were consecutively submitted to allogeneic HSCT in Debrousse Hospital (Lyon, France). Among them, all patients who had oral BU-based conditioning regimen were included in this study, namely 66 patients. Since it had been reported that intra venous (IV) BU-based conditioning reduced risk of VOD patients who received intra venous busulfan as preconditioning regimen were also excluded (15).

Procedure for Bayesian pharmacokinetic individualization of BU.

This procedure is described in detail elsewhere (10). Briefly, the procedure can be summarized as follow. i) patient first oral dose of BU was determined by USCPACK software (16). Oral BU was given as an individualized dose every 6 hours for 4 days. Capsules of BU were prepared by the pharmacy department and were administered orally on an empty stomach. Capsules were swallowed by older patients or opened in stewed apples for the youngest ones. ii) Three blood samples were drawn on heparin: 1, 2.5 and 5 hours after the first administration of oral BU and 1.5 and 5 hours after the 5th, 9th and 13th doses. These sampling times were chosen according to the theories of optimal sampling design (17, 18) .iii) BU plasma concentrations were determined by liquid chromatography assay (19). iv) Afterwards, pharmacokinetic parameter values of a one-compartment model were estimated by using the Bayesian modelling program included in USCPACK software (16). Patients' pharmacokinetic parameters values were used to predict future BU plasma levels and doses needed to reach a target AUC per 6 hour dosing interval could be determined.

Outcome.

The diagnosis of VOD was made according to the Seattle clinical criteria (20) which required at least two of the following three features: hyperbilirubinemia (total serum bilirubin > 2 mg/dl or 34.2 μ mol/l), hepatomegaly or right upper quadrant pain of liver origin, and sudden weight gain (> 2% of baseline body weight) because of fluid accumulation, along with no other explanation of these signs and symptoms. VOD was scored as mild, moderate, or severe, as described by McDonald et al (20).

Case-mix adjustment.

In assessing performance of medical technique, there is a need to adjust for case-mix. To assign a risk score of VOD to each patient, we used estimates from the literature. While little empirical data existed, we were able to locate one estimate (21) where logistic regression was used to estimate the probability of developing a VOD. The model included type of transplant, cytomegalovirus positive status in the recipient, induction with busulfan and total parenteral nutrition (TPN) provided pretransplantation.

Risk-adjusted cumulative sum (RA-CUSUM) procedure.

The development of the RA-CUSUM approach has been described in detail by Steiner et al (13, 14). In order to construct a RA-CUSUM chart with control limits to detect when performance has become unacceptable (acceptable), four parameters were specified; i) the standard or target rate of VOD that is considered acceptable (p_0), ii) the unacceptable rate of VOD under our procedure (p_1), iii) α , a false positive or type 1 error rate would lead to the conclusion that the rate of VOD is 'out of control' when it is not, iv) β a false negative or type 2 error rate which would lead to the conclusion that the VOD rate is 'in control' when it is not.

To detect an increase in odds of VOD with Bayesian individualization of BU, a RA-CUSUM chart was created by plotting X_t versus patient number t where

$$X_t = \max(0, X_{t-1} + W_t) \quad (1)$$

Similarly, to detect a decrease in odds of VOD with RA-CUSUM chart the following function was plotted :

$$X_t = \min(0, X_{t-1} - W_t) \quad (2).$$

The patient's score (W_t) depends on estimated risk of early VOD, the patient's outcome (y_t), where $y_t = 0$ for patient with no VOD and $y_t = 1$ for patient with VOD, and odds ratio (OR_A) defining an alternative level of performance to be detected.

In the present study each patient's risk of VOD, pt , was derived from Barker et al (21) model. Because each patient risk of VOD varies, OR_A was set as an odds ratio to detect doubling or halving in odds of VOD.

The score (Wt) for each patient was derived using a log likelihood ratio. This is defined by the logarithm of the ratio of the probability of the observed outcome to that expected by the estimated risk defined as pt .

If the patient 't' had VOD, the score given to that patient was :

$$Wt = \log_e (OR_A / 1 - pt + OR_A pt) \quad (3)$$

If the patient did not have VOD the score was :

$$Wt = \log_e (1 / 1 - pt + OR_A X pt) \quad (4)$$

Interpretation.

The RA-CUSUM value (equation 1,2) has accumulated the information from all previous allogeneic BMT. It will become large if the performance of Bayesian individualization of oral BU deteriorates (improves), but will fluctuate to 0 for a long period of time if no change occurred. Thus, interpretation of RA-CUSUM chart comes from its position relative to the boundary lines. While the chart remains between the lines no conclusions can be drawn and monitoring should continue. If the chart crosses the upper boundary line it is said to have signalled that performance has deteriorated. In contrast, performance is confirmed to be acceptable when lower boundary is crossed.

Baseline risk of VOD was set at 3.4%, which was VOD rate reported in a previous study (10). RA-CUSUM chart was design to detect a doubling or halving in odds of VOD. This was equivalent to an increase of VOD rate to 6.7 % or decrease to 1.7%. α and β were set at 5% and 20% respectively to signal an alarm. With these parameters, upper control limit was calculated at +2.25, and lower control limit was -4. Details of the analysis method are given in the appendix.

All statistical analyses were performed with R2.20 (22)

RESULTS

Between January 2000 and February 2006, 66 patients underwent allogeneic BMT with oral BU-based conditioning regimens in our university-affiliated medical center. The median age was 3.9 years (range 1.2 month to 15.7 years). This study cohort consisted of 42 males and 24 females. Haematological malignant diseases were the most frequent diagnosis. The most common conditioning regimens was busulfan-cyclophosphamide (200 mg/kg). The table 1 summarises patients characteristics.

Risk score.

Figure 1 illustrates the distribution of preconditioning risk score of VOD in the sample.. Median risk score was 0.34 ranged from 0.23 to 0.84.

Incidence of VOD.

Eleven episodes of VOD occurred during the study period (overall rate of 16.7%), which was 17 (60.7%) fewer than the expected number estimated by the risk score. VOD resulted moderate and severe in 8 and 3 patients, respectively . Two of this VOD patients' died; one of infectious disease and the second with VOD. Table 2 summarizes the main clinical characteristics of the VOD patients.

RA-CUSUM.

Each patient was plotted sequentially using two sided risk-adjusted CUSUM graph (figure 2). The upper graph remained firmly within the boundary lines ($h=2.25$) which suggests no evidence of increase in odds of VOD from what was predicted by the risk score. This graph showed that the performance of the procedure was stable until patient number 40. After that it seems that performance was declining but failed to reach control limit. The longest run of consecutive VOD was two, and this occurred twice (patient N° 41, 42 and 57, 58). The lower graph adopted early a negative slope such that by patient number 27 the graph decreased below the lower control limit ($h = -4$) indicating a halving of the odds of VOD. Following this first signal, the RA-CUSUM graph was reset to zero and another signal occurred at patient number 66.

DISCUSSION

This study was design to detect a doubling or halving of the odds of VOD incidence under Bayesian individualization of dosage for patients who underwent allogenic BMT with BU-based conditioning. Over the five years study period, we found no evidence of increase in odds of VOD, conversely, the evidence of good performance was reached after 27 procedures and was sustained until the end of the study period.

The overall VOD rate was 16.7% in this study. There is an important variability in incidence of VOD post transplant among studies (5-9) and these rates are difficult to compare since studies differed in many features including definition of VOD, institutional management factors and patients' pre-existing risk factors.

The upper graph of figure 2 showed no evidence of deterioration of the performance of our procedure. However, this graph signaled an increase in VOD rate after patient number 40. Since the graph failed to cross control limit ($h=2.25$), the formal statistical interpretation is that it does not represent anything other than random variation about a constant VOD rate and monitoring should be continued. However for clinical care, even small shift in process mean is of concern. We thus sought other possible explanations. Patients' population could have changed in a way not adequately modelled by risk adjustment. It is also possible that with experience, we were more liberal in process of target AUC over time. However distribution patients' risk score was quiet the same during the two periods; median [range] 0.34 [0.26 – 0.84] and 0.31 [0.23 – 0.79] respectively before and after patient number 40. This unstability could also be explained by a change in practice. Investigation of this possibility revealed that the only change which occurs during this period was the introduction in our laboratory of a new liquid chromatography apparatus for the measurement of BU plasma concentration. However it is not clear how this could affect VOD incidence. Further investigation is needed to understand this phenomenon.

The lower graph of figure 2 adopted early a negative downward trend, cumulating in the crossing of the lower control limit at patient 28 and 66 This indicates halving the odds of VOD. This apparent decrease in VOD rate might occur if either the actual VOD rate has decreased or if the initial estimate of VOD risk were too high. However, higher risk patients were equally distributed during the study period. Another possibility is that this represents a false alarm. Although the control limit was set to minimize the chances of this possibility ($h = -4$), it is difficult to assign a likelihood to such a false alarm. Following first signal, the plot was reset and monitoring continued. The same negative slope was observed and the chart crossed the control limit twice at patient 66. This indicates improvement in performance of

Bayesian individualization of BU during this patient interval. Thus, a likely explanation of this reduction in VOD rate is that the performance of the Bayesian individualization of BU dosage regimens was good. This result confirms the good performance of Bayesian individualization of oral BU which has been suggested in a previous study (10) and by others (23, 24, 25). Previous studies in oral BU monitoring focused on control of BU exposure (10, 25, 26). The control of exposure allows to maintain BU area under the curve (AUC) within a patients' specific target. BU AUC is a surrogate endpoint of allogeneic BMT whose control improves clinical outcome by reducing drug related toxicity. The methodology applied in the present study allowed to formally relate performance of oral BU Bayesian individualization to VOD which is an important outcome after allogeneic BMT.

We used RA-CUSUM approach proposed by Steiner et al (13, 14), to monitor the performance of Bayesian individualization of oral BU for patient who underwent allogeneic BMT. The RA-CUSUM is suitable for this purpose because: i) The RA-CUSUM procedure explicitly accounts for the impact of time as a variable. Thus, multiple VOD within a short period are more likely to generate a signal than if the same number of VOD were randomly spread across a longer period of analysis (27) ii) RA-CUSUM chart is suited for detecting small but persistent process change (11) and is more efficient than other statistical control process (28). iii) Unlike standard modelling technique, the RA-CUSUM procedure does not suffer from problem of multiple testing of overlapping data, which is likely to produce false positive alarm. iv) RA-CUSUM is suited to accommodate rare events that otherwise would require large samples to yield adequate statistical sensitivity. v) Given the graphical nature of RA CUSUM, the slope of chart can provide a valuable insight into procedure performance even before a signal occurs.

To our knowledge, this study was the first study applying RA-CUSUM to monitor the risk of VOD after allogeneic BMT. This procedure has been used in other fields of health care including surgery where it has been used to evaluate the learning curve inherent in new technique (29). Rogers et al. (30) used this methodology to monitor 30 day mortality after cardiothoracic transplantation, Axelrod et al (31) demonstrated the usefulness of this method to analyse multicenter outcome for patients who underwent kidney and liver transplantation.

As it is common in observational studies, our study has weaknesses. While the risk adjustment model we used was derived in a heterogeneous patients' sample, it remains probably imperfect since it did not include some important VOD risk factors described elsewhere (32). Thus performance of Bayesian individualization of oral busulfan could be due to unmeasured factors affecting case mix. However, risk factors of VOD often differ between studies (12, 33, 34). Further refinement of the model may require the collection of more detailed data.

Given the retrospective nature of our analysis, we were not able to investigate all the potent factors which could explain the instability of our procedure after patient 40. This suggests that RA-CUSUM might be used routinely to monitor performance.

The implicit assumption of our analysis was that occurrence of VOD during BU-based conditioning was entirely attributable to BU and thus to the quality of Bayesian individualization of the dosage regimens. However VOD is influenced by many factors, including patient-related risk factors, other treatments (12, 34) and natural variation.

Our study has several implications. We showed the safety of Bayesian individualization of oral BU in children who underwent allogeneic BMT. Previous study (10) found that this procedure increased 90-day survival. These results highlight Bayesian individualization of oral BU for allogeneic BMT. RA-CUSUM methodology could be used routinely in the context of BMT to monitor important outcomes. The approach is appealing because it provides a tool to accumulate evidence over many patients while adjusting for

patient characteristic that significantly affect the risk (14). The adjustment of patients' case mix provides way to compare outcome for different centers with different procedures.

Conclusion

This study found that Bayesian individualization of oral BU reached high standard of care in paediatric allogeneic BMT during more than five years. We used RA-CUSUM methodology to accumulate evidence of decrease of VOD rate over many patients while adjusting for variability in patients' preconditioning risk of VOD. With its risk adjustment capabilities, RA-CUSUM is a valuable tool for the monitoring of VOD, allowing the early detection of any changes in VOD rate.

REFERENCES

- 1- Grochow LB. Busulfan disposition : the role of therapeutic monitoring in bone marrow transplantation induction regimens. *Semin Oncol.* 1993 ; 20 : 18-25.
- 2- Grochow LB, Krivit W, Whitley CB, et al. Busulfan disposition in children. *Blood.* 1990 Apr 15;75(8):1723-7.
- 3- Slattery JT, Sanders JE, Buckner CD, et al. Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 16 : 31-42.
- 4- Slattery JT, Risler LJ. Therapeutic monitoring of busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. *Ther Drug Monit.* 1998; 20: 543-9
- 5- Styler MJ, Crilley P, Biggs J, Moul J, et al. Hepatic dysfunction following busulfan and cyclophosphamide myeloablation : a retrospective, multicenter analysis. *Bone Marrow Transplant* 1996 ; 18 :171-6
- 6- Morris JD, Harris RE, Hashmi R, et al. Antithrombin III for the treatment of chemotherapy induced organ dysfunction following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20:871-8
- 7- Hartman AR, Williams SF, Dillon JJ. Survival, disease-free survival and adverse effects of conditioning for allogeneic bone marrow transplantation with busulfan/cyclophosphamide versus total body irradiation: a meta-analysis. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22:439-43
- 8- Comcowich SA, Spitzer TR, Tsunoda SM. Ursodiol to prevent hepatic veno-occlusive disease. *Ann Pharmacother* 1997;31:1249-52
- 9- Baglin TP. Veno-occlusive disease of the liver complicating bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13:1-4
- 10- Bleyzac N, Souillet G, Magron P, et al. Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipient using a test-dose and bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 28: 743-51.
- 11- Montgomery D. Introduction to statistical quality control. 2nd edition. New York: Wiley; 1991
- 12- Carreras E. Veno-occlusive disease of the liver after hemopoietic cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2000 May;64(5):281-91.
- 13- Steiner SH, Cook RJ, Farewell VT, et al. Monitoring surgical performance using risk-adjusted cumulative sum charts. *Biostatistics.* 2000 Dec;1(4):441-52.
- 14- Steiner SH, Cook RJ, Farewell VT. Risk-adjusted monitoring of binary surgical outcomes. *Med Decis Making.* 2001 May-Jun;21(3):163-9.
- 15- Kashyap A, Wingard J, Cagnoni P, et al. Intravenous versus oral busulfan as part of a busulfan/cyclophosphamide preparative regimen for allogeneic hematopoietic stem cell

transplantation: decreased incidence of hepatic venoocclusive disease (HVOD), HVOD-related mortality, and overall 100-day mortality. Biol Blood Marrow Transplant. 2002;8(9):493-500.

16- Laboratory of Applied Pharmacokinetics.(1995) USC*Pack P.C. Collection Clinical Research Programs. Los Angeles. University of Southern California. School of Medicine. version 10.7

17- D'Argenio DZ. Optimal sampling times for pharmacokinetic experiment. J Pharmacokinet Biopharm. 1981 ; 9 : 739-56.

18- Tod M, Mentre F, Merle Y, et al. Robust optimal design for the estimation of hyperparameters in population pharmacokinetics. J Pharmacokinet Biopharm. 1998; 26 : 689-716.

19- Bleyzac N, Barou P, Aulagner G. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. J Chromatogr Biomed Appl 2000 ; 742 :427-432

20- Mc Donald GB, Hinds MS, Fisher LD, et al Veno-occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. Ann Intern Med. 1993 Feb 15;118(4):255-67.

21- Barker CC, Butzner JD, Anderson RA, et al. Post transplant complications. Incidence, survival and risk factors for the development of veno-occlusive disease in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. Bone Marrow Transplant. 2003 ; 32 : 79-87.

22- R [computer program]. Version 2.1.0. <http://cran.r-project.org>;2005

23- Bullock JM, Smith PF, Booker BM, et al. Development of a pharmacokinetic and Bayesian optimal sampling model for individualization of oral busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. Ther Drug Monit. 2006 Feb;28(1):62-6.

24- Sandström M, Karlsson MO, Ljungman P, et al. Population pharmacokinetic analysis resulting in a tool for dose individualization of busulfan in bone marrow transplantation recipients. Bone Marrow Transplant, 2001, 28:657-664

25- Tran HT, Madden T, Petropoulos D, et al. Individualizing high-dose oral busulfan: prospective dose adjustment in a pediatric population undergoing allogeneic stem cell transplantation for advanced hematologic malignancies. Bone Marrow Transplant, 2000, 26:463-470

26- Krivoy N, Hoffer E, Tabak A, et al. Therapeutic monitoring of busulfan in pediatric bone marrow transplantation. Pediatr Hematol Oncol. 2002 Jan-Feb;19(1):31-7.

27- Altman D, Royston JP. The hidden effect of time. Stat Med. 1988 Jun;7(6):629-37.

28- Grigg OA, Farewell VT, Spiegelhalter DJ. Use of risk-adjusted CUSUM and RSPRT charts for monitoring in medical contexts. Stat Methods Med Res. 2003 Mar;12(2):147-70.

- 29- Novick RJ, Fox SA, Stitt LW, et al. Effect of off-pump coronary artery bypass grafting on risk-adjusted and cumulative sum failure outcomes after coronary artery surgery. *J Card Surg*. 2002 Nov-Dec;17(6):520-8.
- 30- Rogers CA, Ganesh JS, Banner NR, et al. Cumulative risk adjusted monitoring of 30-day mortality after cardiothoracic transplantation: UK experience. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005 Jun;27(6):1022-9.
- 31- Axelrod DA, Guidinger MK, Metzger RA, et al. Transplant center quality assessment using a continuously updatable, risk-adjusted technique (CUSUM). *Am J Transplant*. 2006 Feb;6(2):313-23.
- 32- Reiss U, Cowan M, McMillan A, et al. Hepatic venoocclusive disease in blood and bone marrow transplantation in children and young adults: incidence, risk factors, and outcome in a cohort of 241 patients. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002 Dec;24(9):746-50.
- 33- Hasegawa S, Horibe K, Kawabe T, et al. Veno-occlusive disease of the liver after allogeneic bone marrow transplantation in children with hematologic malignancies : incidence, onset time and risk factors. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 22 : 1191-7.
- 34- Cesaro S, Pillon M, Talenti E, et al. A prospective survey on incidence, risk factors and therapy of hepatic veno-occlusive disease in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2005 Oct;90(10):1396-404.

Appendix:

The construction of risk-adjusted cumulative sum (RA-CUSUM) chart with control limits requires specification of four parameters, p_0 , the acceptable VOD rate, p_1 the unacceptable VOD rate we want to detect, α , the type 1 error rate and β , type 2 error rate.

As proposed by Steiner et al (13, 14), the CUSUM (X_t) is calculated as a continuous sum of W_t , a weighted score that depends upon the patient's predicted preconditioning risk (21)

If the VOD occurs, the log-likelihood formula for the weight is

$$W_t = \log_e (OR_A / 1 - pt + OR_{Apt})$$

And if VOD does not occur it is

$$W_t = \log_e (1 / 1 - pt + OR_{Apt})$$

where pt is the risk adjusted probability of VOD for patient "t", $\log_e$ is the natural logarithm. To detect a doubling of the odds, $OR_A = 2$, to detect a halving of the odds $OR_A = 0.5$.

RA-CUSUM to detect an increase in odds is created by plotting X_t against patient number t , where :

$$X_t = \max(0, X_{t-1} + W_t) \text{ and } t = 1, 2, 3, \dots ; X_0 = 0.$$

and to detect a decrease in odds ($OR_A < 1$), X_t is defined as :

$$X_t = \min(0, X_{t-1} - W_t)$$

To complete the CUSUM design we calculate control limits as follow.

The upper control limit h_1 (to detect and increase from p_0 to p_1), and lower control limit h_0 (to accept p_0) are defined by :

$$h_1 = \log_e \{ (1 - \alpha) / \beta \} / \log_e (OR)$$

$$h_0 = \log_e \{ (1 - \beta) / \alpha \} / \log_e (OR)$$

Note that OR is the corresponding odds ration corresponding to an increase (decrease) in VOD rate from p_0 to p_1

Table 1. Patients characteristics

Variables	N = 66	%
Patients age (years) Median (range)	3.9 (0.1 – 15.7)	
Patient sex (male)	42	63.6
Patient CMV status (positive)	24	33.4
TPN pretransplantation	11	16.7
Diagnosis		
Malignant		
ALL	5	7.6
AML	19	28.8
MDS	6	9.1
JMML	2	3.0
Non malignant		
Aplastic anemia	2	3.0
Fanconi	1	1.5
Thalassemia	2	3.0
Sickle cell disease	7	10.6
Metabolic disease	14	21.2
Immunodeficiency	8	12.1
AUC busulfan ($\mu\text{g.h.ml}^{-1}$) Mean $\pm$ SD	3.99 $\pm$ 0.5	
Donor sex (male)	31	47
Donor CMV seropositive (yes)	29	28.8
Graft type		
Sibling donor	25	37.9
MUD	18	27.3
MMUD	23	34.8
Busulfan based conditioning regimens		
BU + Cy	49	74.3
BU + Cy + etoposide	5	7.1
BU + Cy + L-Pham	9	14.3
BU + Cy + Flu	2	2.9
BU + Cy + L-Pham + etoposide	1	1.4
Risk of VOD before conditioning regimens Median (range)	0.34 (0.23 – 0.84)	

MUD: match unrelated donor; MMUD : mismatch unrelated donor; CMV cytomegalo virus, TPN : total parenteral nutrition; ALL: Acute Lymphoblastic leukemia; AML: Acute Myelogenous Leukemia; MDS: Myelodysplastic syndrom; JMML: Juvenile MyeloMonocytare Leukemia; BU: Busulfan; etoposide (60 mg/kg); Cy: cyclophosphamide (200 mg/kg); L-pham: melphalan (140 mg/m²); Flu: fludarabine

Table 2 : Main clinical and biochemical characteristics of the 11 patients who developed VOD

Variables	N = 11	%
Age (years)		
Median (range)	4 (0.42 – 8.2)	
Gender (male)	7	63.6
Risk score		
Median (range)	0.34 (0.29 – 0.78)	
Busulfan AUC ($\mu\text{g.h.ml}^{-1}$)		
Median (range)	4.1 (3.9 – 5.1)	
Severity of VOD		
Moderate	8	72.7
Severe	3	27.3
Death from any cause	2	18.2

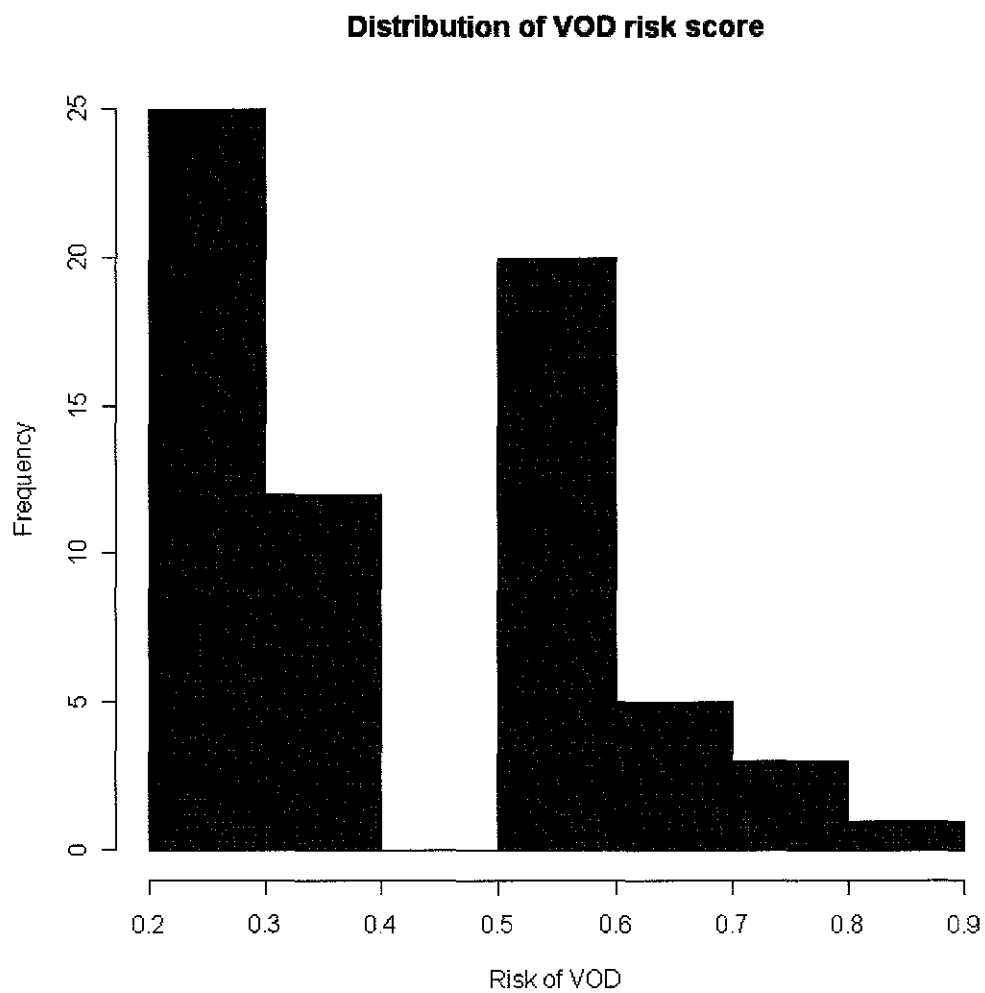


Figure 1: Distribution of patients' preconditioning risk score of veno occlusive disease (VOD). The risk score was estimated as proposed by Baker et al (21)

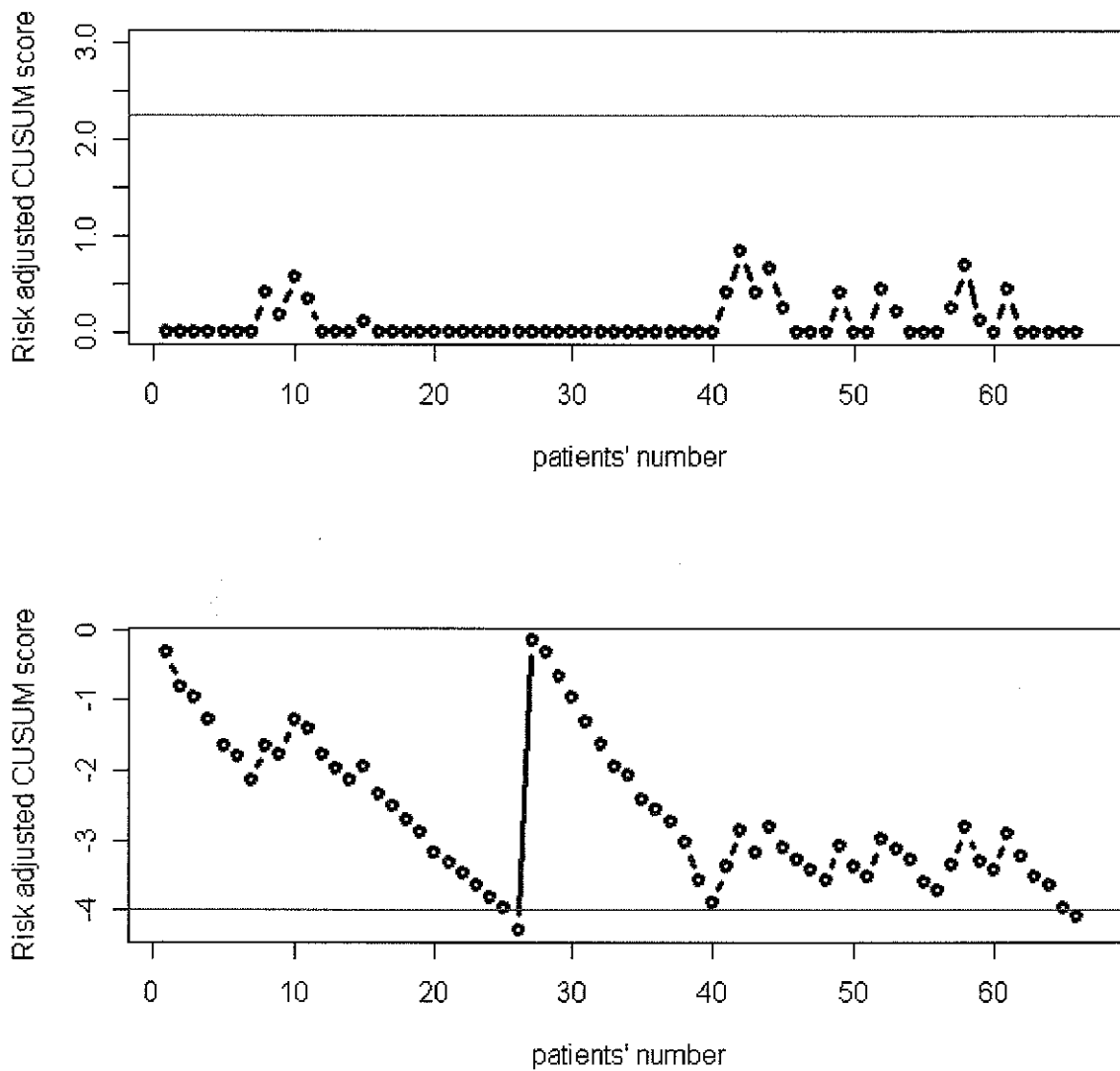


Figure 2: Risk-adjusted cumulative sum (RA-CUSUM) of veno-occlusive disease (VOD) following busulfan based conditioning with bayesian individualization of dosage. Boundary lines are constructed to detect an doubling in odds of VOD (upper graph) or an halving in odds (lower graph). These lines correspond to false positive rate (α) at 5% and false negative rate (β) at 20%.

TITTLE :

BUSULFAN: WHICH DOSES IN INFANTS LESS THAN 9 KG OF BODY WEIGHT ?

AUTHORS :

V. BERTHOLLE¹, C. GALAMBRUN ², V. MIALOU ², T. BASSET¹, B. KITIO¹, Y. BERTRAND ², N. BLEYZAC ¹

1 Department of Pharmacy, Debrousse Hospital, 29 Rue Sœur Bouvier, 69005 Lyon, France

2 Department of Paediatric Immuno-haematology and Bone Marrow Transplantation, Debrousse Hospital, 29 Rue Sœur Bouvier, 69005 Lyon, France

KEY WORDS: busulfan – paediatrics – BMT – Bayesian pharmacokinetic monitoring

Correspondence and reprint requests should be sent to:

Dr. Nathalie Bleyzac

Pharmacy Department - Debrousse Hospital

29 rue Sœur Bouvier

69005 Lyon, France

Tel: (33) 4 72 38 57 76 / Fax: (33) 4 72 38 55 15

Email: nathalie.bleyzac@chu-lyon.fr

SUMMARY

Although IV form of busulfan seems to allow to achieve a safe and efficient systemic exposure, young children less than 9 kg might present over or under dosage with the recommended regimen (i.e. 1 mg/kg/dose), both with oral or IV form. To evaluate which dosage regimen was necessary to achieve target AUC, 19 patients, weighting between 3,9 and 8,5 kg and receiving busulfan (IV : 4, oral : 15) with BU individualization dosage regimen were enrolled. Mean total dose was 15,3 mg/kg but with very large range (8,7 – 24,5 mg/kg). Incidence of VOD was 26,3% with AUC in the target range. Incidence of mixed chimerism <95% donor was 42%. Significant linear relationship was found between the estimated dose per 6 hour dosing interval necessary to reach a target AUC value of 4 $\mu\text{g.h.ml}^{-1}$ and body weight ($p < 0.001$). The optimal doses of busulfan per 6 hour dosing interval should be: 0.8 mg/kg for BW between 4 and 6 kg, 0.9 mg/kg for BW between 6 and 8 kg, and 1.0 mg/kg for BW around 9 kg.

INTRODUCTION

Busulfan-based conditioning regimens are still widely used in young children before hematopoietic stem cell transplantation. Busulfan pharmacokinetic (PK) variability is well known to affect the safety and the efficiency of the drug (1-3). The introduction of IV busulfan has much decreased this variability by controlling the part due to digestive absorption. Intraindividual PK variability is much lower than those observed with oral route (4) but interindividual variability remains important (5) and can reach 30% even when age and weight are taken into account (4). The use of IV busulfan has improved the number of patients achieving a safe and efficient plasmatic exposure of the drug as about 75% of them are in the targeted AUC range of 900-1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}$ without therapeutic drug monitoring. But for very young patient this rate is much lower 54% (4).

Some studies report a VOD rate of 26% in children treated with IV busulfan, i.e. comparable to the oral formulation (5). This might be due to a worse definition of IV dosage regimens in the youngest patients, as far as they have been based on a population of only 24 patients (4). This is strengthened by the results of the study from Kletzel et al., where 86% of the patients who did not achieve the optimal AUC window with IV busulfan were aged less than 2 years (6). The manufacturer recommends a dosage regimen of 1 mg/kg every 6 hours for children less than 9 kg. Using this dosage in infants less than 10kg, Dalle et al. report a substantial interindividual pharmacokinetic variability, suggesting that therapeutic drug monitoring might be useful in these patients (7). AUC range was found to be 992-1986 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}$, showing that, if 1mg/kg/6h dosing is suitable for some patients, some others have been overdosed (7). That is what we observed in our clinical practice when a fatal VOD occurred in a child transplanted for immune deficiency and conditioned with 1 mg/kg/6h of IV busulfan. Conscious that data on children less than 9 kg are still scarce, we report our experience on a quite large cohort of infants. As the IV recommended regimen is the same that standard oral regimens i.e. 1 mg/kg/dose, it was thought to be interesting to include the experience acquired with oral busulfan in children less than 9 kg. In contrary to the study of Dalle et al; which was designed to describe which values of AUC were obtained by administering 1 mg/kg of busulfan, our study is rather turned to evaluate which dosage regimen was necessary to achieve the target AUC. Moreover, another potential interest of reporting our cohort is that no metabolism inducer like phenytoin was used to prevent seizures as it was in the majority of the patients of Dalle et al, who state that dose reduction was necessary in 83% of their patients treated with a benzodiazepine (7).

MATERIALS AND METHODS

Patients

This retrospective study enrolled all the consecutive patients needing busulfan-based conditioning regimen and weighting less than 9 kg. Nineteen patients aged from 3 to 17 months (mean age $\pm$ SD = 7.3 $\pm$ 3.8 months) and weighting between 3.9 and 8.5 kg underwent allogeneic stem cell transplantation in our unit between June 2000 and August 2006, after a busulfan-based conditioning regimen without irradiation. Indications for transplantation were: metabolic diseases (n=5), combined immunodeficiency or CID (n=7), and malignant diseases (ALL: n=2, AML: n=3, JMML: n=1, MDS: n=1). Table 1 summarises the patients characteristics. Conditioning regimens were busulfan-cyclophosphamide (200 mg/kg) in 15 patients, busulfan-cyclophosphamide (200 mg/kg)-etoposide (60 mg/kg) in 2 patients and busulfan-cyclophosphamide (200 mg/kg)-melphalan (140 mg/m²) in 2 patients.

Clonazepam (0.1 mg/kg/d) was given to prevent busulfan-related seizures during the whole pre-transplant period. Ursodiol was administered as VOD prophylaxis.

Busulfan was given as an individualized dose every 6 hours during 4 days (16 doses). For oral route, capsules of busulfan were prepared by the pharmacy department and were administered orally on an empty stomach. For IV route, busulfan was those marketed by Pierre Fabre Laboratories (Busilvex®).

Busulfan assay in plasma

Busulfan plasma concentrations were determined by liquid chromatography (8). Blood samples were immediately placed in ice and were centrifuged without delay. Plasma was then immediately transferred into polypropylene tubes to avoid adsorption on glass. Sampling times were chosen according to the theories of optimal sampling design for pharmacokinetic parameters estimation (9, 10). Three blood samples were drawn 1, 2.5 and 5 hours after the first administration of oral busulfan and 1.5 and 3 hours after the 5th, 9th and 13th doses. For IV route, 2 blood samples were drawn 30 minutes and 5 hours after the end of the 1st and the 5th administration and were repeated only if an intraindividual pharmacokinetic variability was observed between the first two days of conditioning.

Individualization of busulfan dosage regimens

Pharmacokinetic parameter values of a one-compartment model (first order absorption rate constant: K_a for oral route only, volume of distribution related to body weight: V_s and elimination rate constant: K_{el}) were estimated by using the Bayesian modelling program included in USCPACK software (11). In order to enhance the accuracy of the estimates (12), error on busulfan plasma concentration measurement was implemented in the Bayesian algorithm under a polynomial form: $SD = 0.0135 C^3 - 0.077 C^2 + 0.1493 C$, where SD is the assay standard deviation and C the observed busulfan concentration. Patient values of K_a , V_s and K_{el} were used to predict future busulfan plasma levels and doses needed to reach a target AUC per 6 hour dosing interval could be determined. Target AUC was 3.7 to 4.9 ($\mu\text{g/ml}$).h (i.e 900-1200 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$) depending on the indication of transplantation. A lower exposition to busulfan was desired for patients presenting a poor marrow as observed in aplastic anemia, and for patients presenting a liver function weakened by previous courses of anticancer agents or associated pathologies.

Because of possible intraindividual pharmacokinetic variability, AUC was monitored during the four days of oral busulfan preparative regimen and dosage regimes were daily adjusted to keep AUC values in the desired range.

Clinical evaluation

Incidence and severity of liver veno-occlusive disease (VOD) was assessed and linked to doses of busulfan administered and AUC observed. Engraftment was evaluated too: incidence of graft failure (defined as evidence of no donor cells), mixed chimerism and full engraftment (defined as 100% donor chimerism) with regards to busulfan AUC obtained.

RESULTS

Busulfan dose adjustments performed in the 19 patients and AUC values are presented in Table 2. Mean total dose of busulfan was 15.3 mg/kg but the deviation and range were wild (SD: 4.0 mg/kg, range: 8.7 - 24.5 mg/kg). Only 2 patients received a dose close to 16 mg/kg. Thirty seven percent of patients received a higher dose than 16 mg/kg while 53 % received a

lower one. Doses administered (divided in 3 classes: 8-11, 12-16 and >16 mg/kg) were not different in patients transplanted for malignant diseases than in others ($p=0.127$).

Values of mean AUC reached for a 6 hour interval were in the target range (table 2). Patients with osteopetrosis were targeted in low AUC values as they were at high risk of busulfan toxicity (13).

Incidence of VOD was 26.3 %; two patients had severe VOD while the three others had mild events. These patients received doses of busulfan varying from 10.2 to 24.5 mg/kg: 2 patients below 12 mg/kg, 1 patient near 16 mg/kg and 2 patients over 19 mg/kg. AUC were all in the target range for these patients (from 971 to 1164 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$). One patient died from its VOD: he received IV busulfan at a total dose of 10.2 mg/kg but the treatment had started at 1 mg/kg dose as recommended by the manufacturer. Unfortunately, therapeutic drug monitoring could not start before the second day due to difficulties in blood sampling and doses have been decreased from the 7th dose only to 0.38 mg/kg/dose (dose necessary to obtain a mean AUC of 4.76 ($\mu\text{g}/\text{ml}$).h / 1164 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$, but with a great standard deviation. Indeed, AUC estimated for the first doses of 1 mg/kg was 7.6 $\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{h}$ (1859 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$), i.e. largely above the target values. The other patient with severe VOD received 15.7 mg/kg and presented the lowest AUC (971 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$).

Results for engraftment are shown in table 2. Incidence of mixed chimerism < 95% donor was high (42 %), despite AUC values were in the targeted range. Mean AUC reached in patients with complete engraftment ($4.40 \pm 0.69 \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$) was not different (Mann-Whitney, $p=0.216$) from AUC observed when mixed chimerism was observed ($4.10 \pm 0.45 \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Whereas a trend to a positive relationship was observed between mean AUC values and total dose of busulfan, correlation remained poor ($r^2=0.12$) (figure 1). We also observed a trend to a positive relationship between the total dose of busulfan administered and body weight and age of the patients. Among the linear regressions tested (dose really administered, dose normalized by AUC value reached, estimated dose to reach a target AUC of 4 $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$, busulfan clearance versus age and body weight), significant relationships were found between the dose of busulfan really received by our patients and their age ($p=0.032$) or body weight ($p<0.001$), total clearance and body weight ($p<0.001$), and estimated dose per 6 hour dosing interval necessary to reach a target AUC value of 4 $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$ and body weight ($p<0.001$). Total clearance and dose for AUC of 4 $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$ were not correlated with age ($p=0.074$). Figure 2 shows the main regressions. If we consider the linear relationship between dose per 6 hour dosing interval necessary to reach a target AUC value of 4 $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$ (dose AUC 4) and body weight (BW), Dose AUC 4 = $1.148 \text{ BW} - 1.5363$, the optimal doses of busulfan per 6 hour dosing interval should be: 0.8 mg/kg for BW between 4 and 6 kg, 0.9 mg/kg for BW between 6 and 8 kg, and 1.0 mg/kg for BW around 9 kg.

DISCUSSION

This study is the rare one to collect data on busulfan pharmacokinetics from a quite important number of children less than 9kg of body weight (BW), moreover treated without metabolism inducers like phenytoin. Busulfan dosage regimens administered in our cohort are comprised in a wide range of values even though they were relayed to BW.

This report does not allow to answer precisely to the question of the optimal dosage regimen of busulfan in low body weight children, but it gives some leads to explore. Particularly, dosages should be decreased proportionally to BW for patients less than 9 kg. Indeed, if clearance of busulfan in children aged of 1 to 4 years has been found to be higher than older ones or adults (14), it could be different in children less than 1 year old. Busulfan is

metabolized by hepatic glutathione conjugation which process has been shown to mature gradually during the first months of life (15, 16). Moreover, maturation of physiologic process in infants can yield progressive changes in absorption and distribution of drugs (17), which may also account for a lower rate of systemic clearance. This is illustrated by the very wide range of busulfan total doses used to reach target AUC values between 3.5 and 4.5 $\mu\text{g.h.ml}^{-1}$ (8.7 – 24.5 mg/kg) in a finally narrow body weight interval (3.9 - 8.5 kg), even though mean total dose (15,7 mg/kg) was closed to the theoretical dosage regimen of 16 mg/kg.

Among the four patients who received IV busulfan, all needed a dose adjustment: 3 received a lower dose and one a higher one. These results confirm those mentioned in a study by Dalle (7) where IV busulfan doses had to be decreased for at least 50% of the infants. As previously observed in a study where 74% of the patients received a dose differing from the standard dose (3), we could not identify any factor to determine which patients would need a dose adjustment. Doses adjustment were independent of disease, age and even BW as a great dispersion could be observed for a given small interval of BW (for example doses varied from 15.7 to 24.5 mg/kg for body weight between 7.7 and 8.3 kg). That is a reason why busulfan therapeutic drug monitoring and individualized forecasting regimen appear to be essential for young to very young patients. If it is now well admitted that it is essential for oral busulfan (18), it is still controversial for IV busulfan. However other studies suggested that therapeutic monitoring of IV busulfan was necessary for low weight children (7, 19). Our results confirm the need of busulfan monitoring in this particular group of children. This is strengthened by the fact that we found no correlation between mean AUC values and total dose of busulfan.

This report confirms too that body weight is a more relevant covariate of busulfan clearance than age, as it has been stated previously (4). Consequently, new dosage regimens in infants should be better optimized considering BW. The interval of BW values below 9 kg should be further divided into smaller interval of 2 or 3 kg. Our results suggest a starting dose (before TDM) per 6 hours of 0.8, 0.9, 1.0 mg/kg for respectively BW between 4 and 6 kg, 6 and 8 kg, and around 9 kg but these dosage regimens have to be refined by further studies.

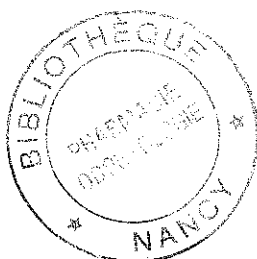
The VOD rate was higher in these 19 infants than what we usually observe in our clinical practice (3.4% in a previous study) (18), although all children received an individualized busulfan dosage regimen and reached AUC values within the target ranges. Many studies have reported VOD risk factors but age is not systematically included as a risk factor. Cesaro et al (20) reported in a multivariate analysis that busulfan based conditioning regimen and age below 6.7 years old (i.e. median age in this study) were two major VOD risk factors. It seems that young children would present a higher sensibility to VOD than older ones but this concern needs to be further addressed. Among the five infants who developed VOD, we could not establish a relationship between the systemic exposure and the VOD onset or severity. In a study including children with haematological malignancies, Hasegawa et al. (21) did not find any relation between busulfan based conditioning regimen, doses of busulfan and VOD incidence.

Data obtained on engraftment showed that mixed chimerism rate (42%) was higher than the rate we usually obtain in our center. A previous study concluded to a mixed chimerism rate of 27%, 30%, 25% and 29% respectively at 1, 3, 6 and 12 months post BMT (22). Sixty patients were included in this previous study, with a mean age of 6 ± 5 years. Patient age seems to be one of the more relevant factor that could explain this difference as these two studies were conducted in the same center while using the same procedures. With this slight number of patients ($n = 19$), mean AUC reached in patients with complete engraftment ($4.40 \pm 0.69 \mu\text{g.h.ml}^{-1}$) was not significantly different from AUC observed when mixed chimerism was observed ($4.10 \pm 0.45 \mu\text{g.h.ml}^{-1}$). Similar results were reported (18, 23), but positive correlation between systemic exposure and engraftment were also mentioned in

other studies (1-3). Further investigations are needed to clarify the relationship between systemic exposure and chimerism.

CONCLUSION

Busulfan dosage regimens must be carefully chosen in young children less than 9 kg. They should be decreased proportionally to the patient body weight. But therapeutic drug monitoring and dose individualization should be systematically performed for infants as their systemic exposure of busulfan seems difficult to predict.



REFERENCES

- 1- Slattery JT, Sanders JE, Buckner CD, *et al.* Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16 : 31-42
- 2- Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, *et al.* An evaluation of engraftment, toxicity and busulfan concentration in children receiving bone marrow transplantation for leukemia or genetic disease. *Bone Marrow Transplant* 2000 ; 25 : 925-930
- 3- Bolinger AM, Zangwill AB, Slattery JT, *et al.* Target dose adjustment of busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28 : 1013-1018
- 4- Nguyen L, Fuller D, Lennon S, *et al.* IV busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 979-987
- 5- Zwaveling J, Bredius RGM, Cremers SCLM, *et al.* Intravenous busulfan in children prior to stem cell transplantation: study of pharmacokinetics in association with early clinical outcome and toxicity. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35:17-23
- 6- Kletzel M, Jacobsohn D, Duerst R. Pharmacokinetics of a test dose of intravenous busulfan guide dose modifications to achieve an optimal area under the curve of a single daily dose of intravenous busulfan in children undergoing a reduced-intensity conditioning regimen with hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 472-479
- 7- Dalle JH, Wall D, Theoret Y, *et al.* Intravenous busulfan for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in infants: clinical and pharmacokinetic results. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32: 647-651
- 8- Bleyzac N, Barou P, Aulagner G. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000; 742 : 427-432
- 9- D'Argenio DZ. Optimal sampling times for pharmacokinetic experiments. *J. Pharmacokin Biopharm* 1981; 9: 739-756
- 10- Tod M, Mentre F, Merle Y, *et al.* Robust design for the estimation on hyperparameters in population pharmacokinetics. *J Pharmacokin Biopharm* 1998; 26:689-711
- 11- Laboratory of Applied Pharmacokinetics.(1995) USC*Pack P.C. Collection Clinical Research Programs. Los Angeles. University of Southern California. School of Medecine. version 10.7
- 12- Jelliffe RW, Tahani B. Effect of assumptions concerning assay error patterns upon pharmacokinetic parameter values and model behavior. *J Vet Pharmacol Ther* 1994; 17:105-109

- 13-Steward CG, Pellier I, Mahajan A, *et al.* The Working Party on Inborn Errors of the European Blood and Marrow Transplantation Group. Severe pulmonary hypertension: a frequent complication of stem cell transplantation for malignant infantile osteopetrosis. *Br J Haematol* 2004; 124: 63-71
- 14-Gibbs JP, Murray G, Risler L, *et al.* Age-dependent tetrahydrothiophenium ion formation in young children and adults receiving high-dose busulfan. *Cancer Res* 1997; 57(24): 5509-5516
- 15-Baars AJ, Arnoldussen S, Rauh DC, *et al.* Developmental aspects of hepatic glutathione S-transferase activities in male rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1980; 5(3):153-159
- 16-Holt DE, Hurley R, Harvey D. Metabolism of chloramphenicol by glutathione S-transferase in human fetal and neonatal liver. *Biol Neonate* 1995; 67(4):230-239
- 17-McLeod HL, Relling MV, Crom WR, *et al.* Disposition of antineoplastic agents in the very young child. *Br J Cancer Suppl.* 1992 Aug;18:S23-29
- 18-Bleyzac N, Souillet G, Magron P, *et al.* Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipient using a test-dose and bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 743-751
- 19-Tran H, Petropoulos D, Worth L, *et al.* Pharmacokinetics and individualized dose adjustment of intravenous busulfan in children with advanced hematologic malignancies undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10(11):805-812
- 20-Cesaro S, Pillon M, Talenti E, *et al.* A prospective survey on incidence, risk factors and therapy of hepatic veno-occlusive disease in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2005; 90(10):1396-1404
- 21-Hasegawa S, Horibe K, Kawabe T, *et al.* Veno-occlusive disease of the liver after allogeneic bone marrow transplantation in children with hematologic malignancies : incidence, onset time and risk factors. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22:1191-1197
- 22-Sahakian P. Evaluation of liver VOD and chimerism after busulfan dosage regimens individualization in paediatric bone marrow transplantation. Pharm D thesis, 2004, Lyon University, France
- 23-Copelan EA, Bechtel TP, Avalos BR, *et al.* Busulfan levels are influenced by prior treatment and are associated with veno-occlusive disease and early mortality but not with delayed complications following marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27:1121-1124

Figure 1: Linear regression model between mean AUC values and total dose of busulfan

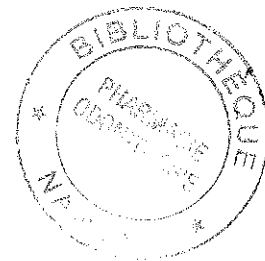
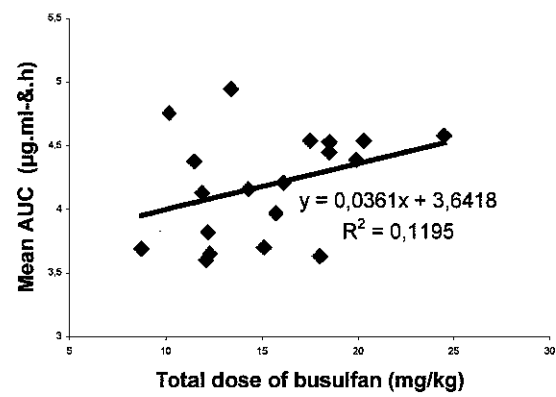


Figure 2: Linear regression models between body weight/ age and doses/clearance of busulfan

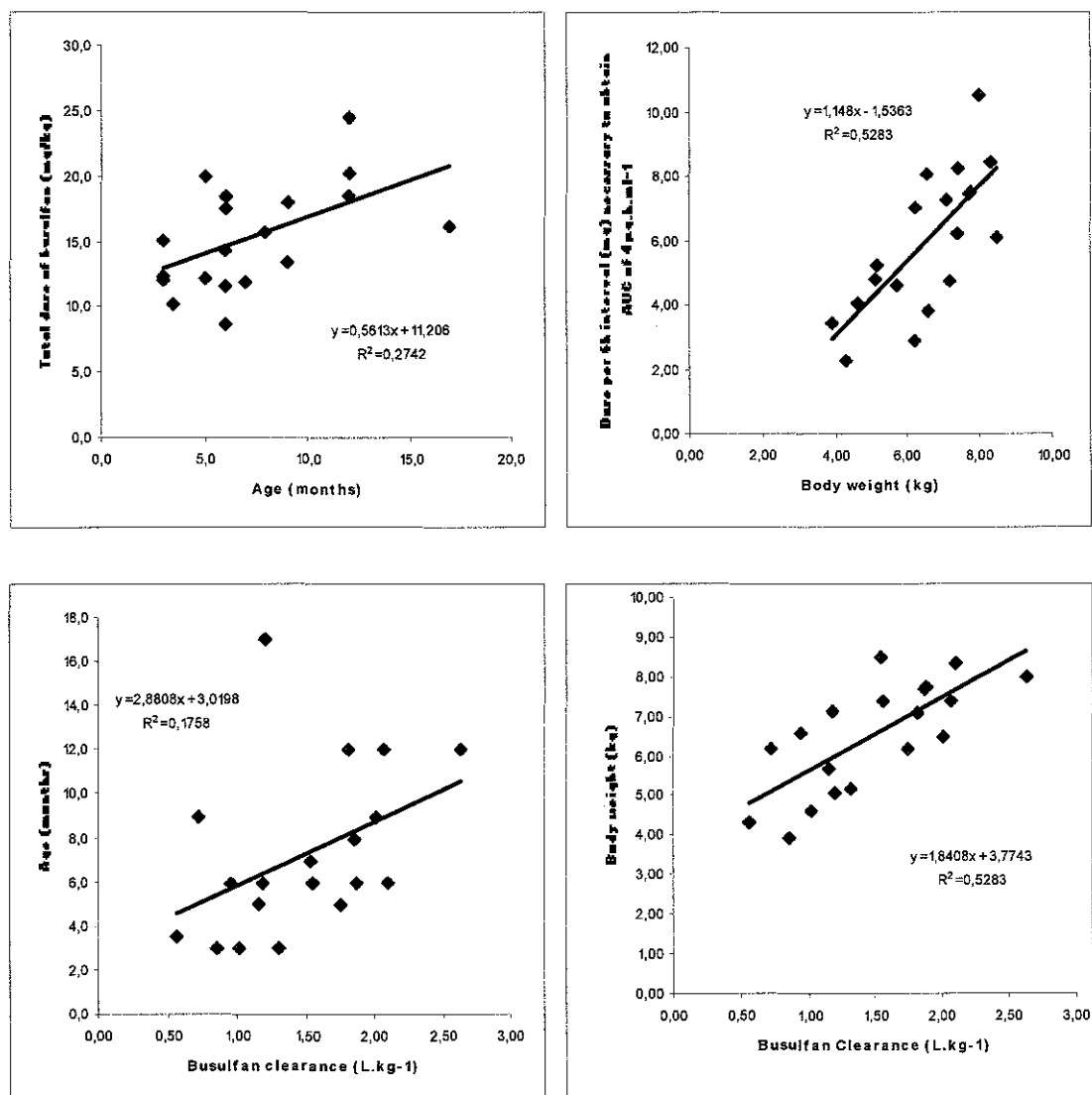


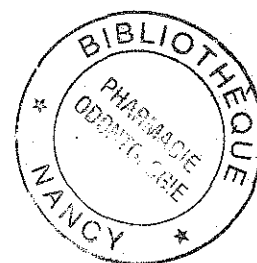
Table 1. Patients characteristics

Patient nb (sex)	Indication of BMT	Age (months)	Poids (Kg)	Donor	Conditioning regimen
1 (M)	CID	9	6.50	MMUD	Bu Cy
2 (M)	CID	6	6.60	MMUD	Bu Cy
3 (M)	CID	3	5.17	MUD	Bu Cy
4 (F)	CID	9	6.20	MMUD	Bu Cy
5 (M)	CID	8	7.70	MMUD	Bu Cy
6 (M)	CID	3	4.30	MMUD	Bu Cy
7 (M)	CID	6	7.16	MMUD	Bu Cy
8 (F)	ALL	12	7.07	MMUD	Bu Cy VP16
9 (M)	ALL	12	8.00	SIB	Bu Cy VP16
10 (F)	AML	6	8.32	SIB	Bu Cy
11 (M)	AML	6	7.76	MUD	Bu Cy
12 (F)	AML	6	7.41	MMUD	Bu Cy
13 (M)	JMML	5	6.18	MUD	Bu Cy Mel
14 (M)	MDS	7	8.50	MUD	Bu Cy Mel
15 (F)	Metabolic disease	12	7.38	MMUD	Bu Cy
16 (F)	Metabolic disease	17	5.10	MMUD	Bu Cy
17 (M)	Metabolic disease	5	5.70	SIB	Bu Cy
18 (F)	Metabolic disease	3	3.90	MMUD	Bu Cy
19 (M)	Metabolic disease	3	4.60	MMUD	Bu Cy

SIB: sibling donor; MUD: match unrelated donor; MMUD: mismatch unrelated donor

Table 2: Total doses of busulfan administered, AUC obtained and incidence of VOD and mixed engraftment

Patients	Indication of BMT	Route	Total adjusted dose of busulfan (mg/kg)	AUC ($\mu\text{g.h.ml}^{-1}/\mu\text{M.min}$)	VOD	Engraftment (% donor)
1	CID	PO	18.0 mg/kg	3.63 / 888	No	84
2	CID	PO	8.7 mg/kg	3.69 / 902	No	54
3	CID	PO	15.1 mg/kg	3.70 / 905	No	86
4	CID	PO	13.4 mg/kg	4.95 / 1211	No	100
5	CID	PO	15.7 mg/kg	3.97 / 971	Yes (severe)	12
6	CID	IV	10.2 mg/kg	4.76 / 1164	Yes (severe)	88
7	CID	IV	11.5 mg/kg	4.38 / 1071	No	65
8	ALL	IV	18.5 mg/kg	4.53 / 1108	No	100
9	ALL	PO	24.5 mg/kg	4.58 / 1120	Yes (mild)	96
10	AML	PO	18.5 mg/kg	4.45 / 1088	No	100
11	AML	PO	17.5 mg/kg	4.54 / 1110	No	100
12	AML	IV	14.3 mg/kg	4.16 / 1017	No	100
13	JMML	PO	19.9 mg/kg	4.39 / 1074	Yes (mild)	96
14	MDS	PO	11.9 mg/kg	4.13 / 1010	Yes (mild)	100
15	Fucosidosis	PO	20.3 mg/kg	4.54 / 1110	No	96
16	Mucopolipidosis	PO	16.1 mg/kg	4.21 / 1030	No	67
17	Nieman-Pick	PO	12.2 mg/kg	3.82 / 934	No	100
18	Osteopetrosis	PO	12.1 mg/kg	3.60 / 880	No	85
19	Osteopetrosis	PO	12.3 mg/kg	3.65 / 893	No	96



Prénom, Nom : **Valérie BONNET - BERTHOLLE**

Nature de la thèse :

**Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie - Santé - Environnement**

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER *N°1290*

Nancy, le *29/11/06*

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I



BONNET-BERTHOLLE Valérie

Etude la variabilité pharmacocinétique, du busulfan et évaluation clinique de l'adaptation bayésienne des posologies dans le conditionnement de greffe de moelle osseuse en pédiatrie

RESUME : Le busulfan est un agent alkylant utilisé dans les conditionnements de greffe de moelle osseuse. Cette molécule présente un index thérapeutique étroit : une exposition systémique trop faible expose à un risque de non prise de greffe ou de rejet alors que les surdosages sont corrélés à des toxicités majeures dont la survenue d'une maladie veno-occlusive (MVO). De plus, le busulfan se caractérise par une variabilité pharmacocinétique marquée, particulièrement chez les enfants. Dans ce contexte, notre laboratoire effectue des adaptations bayésiennes des posologies de busulfan lors des conditionnements pré-greffe en pédiatrie afin d'ajuster au mieux la dose administrée au patient en tenant compte de ses caractéristiques pharmacocinétiques.

L'influence de la pathologie sur les paramètres pharmacocinétiques du busulfan oral et sur l'exposition systémique a été étudiée en utilisant une approche de pharmacocinétique de population sur une cohorte de cent patients. Le regroupement des patients en fonction de leur pathologie (maladies métaboliques, hémoglobinopathies, maladies hématologiques malignes et déficits immunitaires) a fourni des données de pharmacocinétiques qui ont permis l'élaboration de modèles de population spécifiques. Ces modèles seront utilisés pour la réalisation des adaptations de posologie de busulfan. Du fait de leurs caractéristiques pharmacocinétiques, une étude spécifique a été réalisée chez les nourrissons de moins de 9 kg recevant du busulfan IV ou oral. La posologie standard (1 mg/kg/6h) a dû être modifiée (augmentée ou diminuée) chez 90% des patients afin d'atteindre l'AUC cible et avec une très grande variabilité. Le poids semble être le facteur principal pour l'ajustement des doses : les posologies devraient être réduites proportionnellement au poids chez les patients de moins de 9 kg mais l'adaptation des posologies reste nécessaire afin d'obtenir une exposition systémique conforme à l'index thérapeutique du busulfan. Enfin, l'application d'une méthode d'analyse des sommes cumulées avec ajustement en fonction du risque (RA-CUSUM) au suivi de l'incidence des MVO a permis de confirmer l'importance et la qualité de notre procédure d'individualisation des posologies de busulfan au regard de cette complication.

MOTS CLES : Busulfan – Pharmacocinétique – Greffe de moelle osseuse – Pédiatrie

JURY

Madame le Professeur Saux (rapporteur)

Madame le Docteur Bleyzac

Monsieur le Professeur Aulagner

Monsieur le Professeur Sassard (rapporteur)

Monsieur le Professeur Vigneron

DATE DE SOUTENANCE

10 Novembre 2006

ADRESSE DE L'AUTEUR

35 Chemin de Plantefort – 69370 SAINT DIDER AU MONT D'OR