

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2015

THESES 2015 TOU3 2093

**THESE**

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

Présentée et soutenue publiquement  
par

**Camille MERIENNE**

Né le 19 Novembre 1987 à Saint-Malo

---

**Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique des  
inhibiteurs de tyrosine kinases et mise en place d'une  
technique de dosage.**

---

Soutenu le 13 Novembre 2015

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Stéphane Bouchet

**JURY**

Président :	Pr Etienne Chatelut, PU-PH IUC Oncopôle Toulouse
1er assesseur :	Pr Mathieu Molimard, PU-PH CHU de Bordeaux
2ème assesseur :	Dr Florent Puisset, MCU-PH IUC Oncopôle Toulouse
3ème assesseur :	Dr Zoubeir Ramjaun, Pharmacien CHU de Toulouse

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier  
au 1<sup>er</sup> octobre 2015

**Professeurs Émérites**

M. BASTIDE R	Pharmacie Clinique
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G	Physiologie
M. CHAVANT L	Mycologie
Mme FOURASTÉ I	Pharmacognosie
M. MOULIS C	Pharmacognosie
M. ROUGE P	Biologie Cellulaire

**Professeurs des Universités**

**Hospitalo-Universitaires**

M. CHATELUT E	Pharmacologie
M. FAVRE G	Biochimie
M. HOUIN G	Pharmacologie
M. PARINI A	Physiologie
M. PASQUIER C (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A	Pharmacologie
Mme SALLERIN B	Pharmacie Clinique
M. SIÉ P	Hématologie
M. VALENTIN A	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BARRE A	Biologie
Mme BAZIARD G	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S	Mathématiques – Biostat.
M. BENOIST H	Immunologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B	Biochimie
M. CUSSAC D (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme DOISNEAU-SIXOU S	Biochimie
M. FABRE N	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E	Pharmacologie
Mme MULLER-STAUMONT C	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F	Chimie analytique
M. SALLES B	Toxicologie
M. SÉGUI B	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P	Chimie analytique
Mme TABOULET F	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P	Chimie Thérapeutique

## Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires	Universitaires
<p>M. CESTAC P                      Pharmacie Clinique  Mme GANDIA-MAILLY P (*)    Pharmacologie  Mme JUILLARD-CONDAT B      Droit Pharmaceutique  M. PUISSET F                    Pharmacie Clinique  Mme SÉRONIE-VIVIEN S        Biochimie  Mme THOMAS F                  Pharmacologie</p>	<p>Mme ARÉLLANO C. (*)        Chimie Thérapeutique  Mme AUTHIER H                Parasitologie  M. BERGÉ M. (*)                Bactériologie - Virologie  Mme BON C                      Biophysique  M. BOUJILA J (*)                Chimie analytique  Mme BOUTET E                 Toxicologie - Sémiologie  M. BROUILLET F                Pharmacie Galénique  Mme CABOU C                 Physiologie  Mme CAZALBOU S (*)         Pharmacie Galénique  Mme CHAPUY-REGAUD S        Bactériologie - Virologie  Mme COSTE A (*)              Parasitologie  M. DELCOURT N                Biochimie  Mme DERAËVE C                Chimie Thérapeutique  Mme ÉCHINARD-DOUIN V      Physiologie  Mme EL GARAH F                Chimie Pharmaceutique  Mme EL HAGE S                Chimie Pharmaceutique  Mme FALLONE F                Toxicologie  Mme FERNANDEZ-VIDAL A      Toxicologie  Mme GIROD-FULLANA S (*)     Pharmacie Galénique  Mme HALOVA-LAJOIE B        Chimie Pharmaceutique  Mme JOUANJUS E                Pharmacologie  Mme LAJOIE-MAZENC I        Biochimie  Mme LEFEVRE L                Physiologie  Mme LE LAMER A-C             Pharmacognosie  M. LEMARIE A                 Biochimie  M. MARTI G                     Pharmacognosie  Mme MIREY G (*)              Toxicologie  Mme MONTFERRAN S          Biochimie  M. Olichon A                    Biochimie  M. PERE D                      Pharmacognosie  Mme PORTHE G                Immunologie  Mme REYBIER-VUATTOUX K (*)  Chimie Analytique  M. SAINTE-MARIE Y            Physiologie  M. STIGLIANI J-L              Chimie Pharmaceutique  M. SUDOR J                     Chimie Analytique  Mme TERRISSE A-D            Hématologie  Mme TOURRETTE A             Pharmacie Galénique  Mme VANSTEEELANDT M        Pharmacognosie  Mme WHITE-KONING M        Mathématiques</p>

(\*) titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
<p>Mme COOL C                    Physiologie  Mme FONTAN C                 Biophysique  Mme KELLER L                 Biochimie  Mme PALUDETTO M.N (**)      Chimie thérapeutique  M. PÉRES M.                    Immunologie  Mme ROUCH L                 Pharmacie Clinique  Mme ROUZAUD-LABORDE C      Pharmacie Clinique</p>	

(\*\*) Nomination au 1<sup>er</sup> novembre 2015

# REMERCIEMENTS

## **À Monsieur le Professeur Étienne Chatelut,**

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Votre compétence est connue et reconnue, votre implication dans la chronophage formation des internes nous permet d'acquérir de solides aptitudes. Votre implication dans la vie de l'internat de pharmacie quel qu'en soit la filière est remarquable et nous aide à réussir notre formation. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

## **À Monsieur le Professeur Mathieu Molimard,**

Je vous remercie tout d'abord de m'avoir accepté dans votre équipe de recherche, de m'avoir permis de travailler avec vous sur un sujet aussi passionnant, également d'accepter de juger ce travail. Votre dynamisme, votre bonne humeur et votre bienveillance m'ont aidé à le réaliser! Vous savez transmettre votre passion pour la pharmaco', c'est une évidence !  
Merci pour votre savoir et vos immenses compétences.

## **À mon directeur de mémoire, Monsieur le Docteur Stéphane Bouchet,**

Merci à toi de m'avoir accueilli et encadré au cours de cette aventure ... !

Durant cette année tu as su apporter ton aide et tes précieux conseils à chaque instant. Merci pour les longues heures et les soirées que tu m'as consacrées, tes conseils, ton expérience et tes lumières lors de ce travail. Ce fut un plaisir de partager ta bonne humeur, ta sympathie et ton humour.

## **À Monsieur le Docteur Florent Puisset,**

Merci Florent, c'est un plaisir et un honneur d'avoir pu travailler à tes côtés à l'ICR. Ton implication acharnée au travail, ton talent, tes connaissances affutées dans tous les domaines de notre passionnant métier, mais également ta personnalité généreuse font de toi, un peu notre modèle à suivre ! Je te suis également vraiment reconnaissant d'accepter de juger ce travail.

# REMERCIEMENTS

**À Monsieur le Docteur Zoubeir Ramjaun,**

Merci Zoubeir, c'est un peu grâce à toi si j'ai choisi cette orientation et réalisé le master qui précède ce travail. Tes talents de Pharmacien, ta rigueur très pro, tes bons conseils mais aussi ta sympathie, ton humour ont fait que ça a été un plaisir de travailler avec toi. Merci de m'avoir, au préparatoire, confié toutes ces missions géniales. Tu m'as appris énormément sur notre beau métier. Je te suis très reconnaissant pour toutes ces raisons, ainsi que pour avoir accepté de juger ce travail.

**À l'ensemble de l'équipe du laboratoire** de pharmacologie et de toxicologie de Pellegrin, merci pour votre aide, votre soutien, vos pipettes..., et votre sens de l'humour. Merci aux biologistes, Nadège et Karine, pour votre disponibilité et votre encadrement. Merci aux technicien(nes) pour ces bons moments, Karine, Mathieu, Marlène, Evelyne, Georgia, Maité, Françoise, Jérémie, Delphine et Anika et bien sûr, Danielle.

**À Dominique, Mr l'ingénieur,** la tête pensante de ce travail... Ce mémoire est un peu le tien, il t'est au moins dédié. Il n'aurait été aussi abouti sans ton aide précieuse. Merci pour ta générosité typiquement Landaise, pour ta patience et tes talents pour la pédagogie... !

Merci à tous, pour votre accueil, votre encadrement et votre aide.

**À ma famille,** je vous remercie pour votre présence aujourd'hui, qui compte beaucoup pour moi. Merci pour ces valeurs que vous m'avez transmises, qui me permettent d'être moi, et que vous retrouverez également à travers ce travail. Mes parents, Mes frangin(es), mes cousin(es), oncles, tantes, et grands-parents. Ce travail vous est aussi dédié.

**A mes amis,** tous, votre présence heureuse qui me permet d'être moi ...

**De Saint-Malo,** ces belles rencontres du collège, du lycée (dans la plus belle ville du monde(!)), Benji, depuis la 5<sup>ème</sup> !! Ces années de collège, de lycée, de fac, on s'est suivi dans les bons coups et ces 400 idées qui nous ont toujours réussies... ! Sans oublier notre belle collo et son narguilé emblématique, je vous souhaite à toi, à Cécile et bien sûr à Igloo, en attendant, plein

# REMERCIEMENTS

de bonheur dans votre séjour sudiste. Dex, LE pianiste, ta bonne humeur et ton humour nous manquent, et Lucie que je suis content d'avoir rencontré, Romain le néo-Normand, ta lucidité, ton humour, toutes celles belles aventures ici, et aux 4 coins de l'Europe, et surtout ton anagramme, Marion, our roommate, the translator, our friend, it is the bilouc, heureux que cela ait marché aussi longtemps... et plus encore entre vous deux ! Et bien sûr Monsieur MIKO, le génial inventeur mayennais des glaces éponymes ! Nous avons connu tout, la guerre, la famine, la misère ! Tout ! Et toutes ces aventures, depuis ce fameux J1 de seconde, jusqu'à maintenant ... Toujours les fenêtres ouvertes !

**De Rennes**, ces amis des bancs de la fac ... ou plutôt de télétravail... Notre promo exceptionnelle, grand cru 2007,

Patou, c'est un plaisir de pouvoir te suivre aux 4 coins du monde, Olier l'ami de tous les instants, et son Talent Palindromique, Céline depuis Saint-Malo-Des-Amériques, Pierre ta gentillesse et ton talent pour dénicher des lieux improbables pour déplier la tente..., et pour te faire des milliers de petits amis ..., je vous souhaite plein de plaisir avec Marine, Monsieur Vincent à la gentillesse Bretonne, à l'humour Belge et au flegme bien Suisse, Béré bien sûr, ton humour (et tes volutes de noirceurs... comme disait un grand philosophe), Panpan, ce pur produit du Trégor, définition du jovial et du sympathique, Morgane, notre copine mec, tous ces moments géniaux que l'on a passés, et Lolo et sa folie qu'on adore..., la mémoire vivante de la promo ! Vivement votre PACS ! Modez, génie parmi les génies, de *Lannenjenn* à Paris, je vous souhaite de vous y plaire au mieux avec Bahia, Anthonio, le seul et l'unique Brestpagnol, caractérisé par la gentillesse brestoïse et la sincérité Andalouse ! J'espère que vous aurez beaucoup de bonheur avec Morgane et le petit Rafael ! Manue, ma compère, amie de tous les instants, Claire entre Calvi, Paris et Val-André, Marie MoussMouss, Ben Soso le champion ! La fac n'aurait pas été aussi drôle sans vous tous.

Vous me manquez beaucoup !

**Les amis Toulousains**, sans qui Toulouse aurait été beaucoup moins rose ...

Tata fannoch ma marraine CELTE, Jean-Clém l'amateur de vins d'Andorre, Marie-Lola ma compagne bordelaise, bizuth d'or émérite, merci pour tes relectures, Jean-Diane-Marie-Charlotte, tes blagues géniales, sans tes bons conseils je n'aurai pu réaliser ce travail, pense

## REMERCIEMENTS

bien à ton gilet pare-balle à Marseille, peuchère, Sandra, qu'on entendait déjà à l'autre bout de PDV, tes râlements nous feront toujours plaisir, Jean-Léa et Léa-Jean, merci pour votre humour et votre générosité voironnaise, Jeanne-Alicia et Jean-Julien, des amis à la fois drôles, et compétents, ces 6 mois à l'ICR resteront dans les annales, merci aux géniales préparatrices, Cécile et Sophie, sans qui évidemment les journées auraient été bien tristes. Marie-Olivia et Jean-Bricou, merci pour votre gentillesse et vos blagues, Serri et ta bonne humeur très contagieuse, Hugo, toujours motivé pour tout, profite bien de ton voyage à l'autre bout du monde, Angèle, notre Clounie préférée, ce si bon semestre passé dans la mégacolloc de Ranguel, Pierre ton humour et ta sympathie bien auvergnate, Louis le Parisien FOU ! et Jenn qui nous a quitté pour la boîte, une petite pensée pour vous. Une petite pensée aussi à Manu et Morgane, le subtil mélange bitero-breton.

A tous les cointernes et amis toulousains, AnneSo, Manue, Marie Nono, Anaelle, et tous mes collègues ou amis, Elisa, Carole à PDV, Mylène et Laurence à Marchant..., avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler.

### **Aux Bordelais,**

Mon bon vieux Noiro... bien sûr ! ... Le meilleur ... Le King ... Le TOP !! HA ! Il le sait, il le sait... !! Soso, la saucisse, Clement le SEC, Anne la Normande, Mister Bubu Néo-Parisien à ses heures perdues et Marie, amusez-vous bien dans la CAPITALEEEE, Paul le multi-sportif, Lucie l'orga, Louis (le BG bien sûr), Caro et Pierre les aveyronnais, Fanny et Max, je vous souhaite plein de bonheur à Bordeaux City et vous dédie un peu ce travail... C'était un plaisir de vous rencontrer dans ce beau Pays.

Merci aux potes du labo d'à côté au fond du couloir à gauche, Julien et Julian, pour votre humour et vos beaux cheveux !

Et surtout Merci à ma Pauline, sans qui rien n'aurait été pareil. Merci pour ton amour, ton soutien, tes relectures, ta patience. Tu es définitivement la meilleure !

Merci à tous, les présents, les absents, ce travail vous est un peu dédié !

# SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION .....	1
II.	INHIBITEURS DE TYROSINE-KINASES D'INTERETS : MODALITES D'UTILISATION ET OPTIMISATION .....	4
A.	Leucémie myéloïde chronique .....	4
1.	Physiopathologie .....	4
2.	Protéines cibles pharmacologiques .....	6
3.	Les ITK indiqués dans la LMC .....	8
a)	Imatinib .....	8
b)	Dasatinib .....	8
c)	Nilotinib .....	10
d)	Ponatinib .....	11
e)	Bosutinib .....	12
B.	Cancers bronchiques .....	13
1.	Physiopathologie .....	13
2.	Les protéines cibles pharmacologiques .....	14
A.	La famille des récepteurs ErbB .....	14
B.	Anaplastic Lymphoma Kinase .....	15
3.	Inhibiteurs de tyrosine-kinases d'intérêt .....	16
a)	Gefitinib .....	16
b)	Erlotinib .....	17
c)	Afatinib .....	18
d)	Crizotinib .....	20
C.	Carcinome à cellules rénales et autres carcinomes à VEGF-R dérégulé .....	21
1.	Physiopathologie .....	21
a)	Carcinome cellulaire rénal .....	21
b)	Carcinome hépatocellulaire et carcinome colorectal .....	22
2.	Récepteurs d'intérêt .....	23
a)	Le récepteur au facteur de croissance endothélial vasculaire .....	23
b)	La dérégulation de VEGF-R .....	24
3.	ITK d'intérêt dans le CCRm .....	25
a)	Sorafenib .....	25
b)	Sunitinib .....	26
c)	Axitinib .....	26
d)	Pazopanib .....	27
e)	Regorafenib .....	28
D.	Mélanome métastatique .....	28
1.	Physiopathologie .....	28
2.	Les cibles pharmacologiques du mélanome .....	29
a)	Vemurafenib .....	30
b)	Dabrafenib .....	31

# SOMMAIRE

E.	Autres inhibiteurs de tyrosine-kinases .....	32
	a) Ruxolitinib.....	32
	b) Lapatinib.....	33
	c) Vandetanib .....	34
F.	Le suivi thérapeutique pharmacologique des inhibiteurs de tyrosine-kinases.....	35
	1. Suivi thérapeutique pharmacologique .....	35
	2. Propriétés pharmacocinétiques des ITK .....	36
	a) Absorption.....	36
	b) Distribution.....	36
	c) Métabolisation .....	37
	d) Élimination.....	38
	3. Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique dans le traitement par inhibiteurs de tyrosines kinases .....	38
	a) Imatinib .....	38
	b) Dasatinib.....	40
	c) Nilotinib .....	41
	d) Ponatinib .....	42
	e) Bosutinib.....	42
	f) Gefitinib.....	43
	g) Erlotinib .....	44
	h) Afatinib .....	45
	i) Crizotinib .....	46
	j) Axitinib.....	46
	k) Sorafenib .....	47
	l) Sunitinib.....	48
	m) Pazopanib .....	49
	n) Lapatinib.....	50
	o) Regorafenib .....	50
	p) Vemurafenib.....	50
	q) Dabrafenib.....	51
	r) Vandetanib .....	51
	s) Ruxolitinib.....	51
	4. Conclusion .....	52
III.	CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES INHIBITEURS DE TYROSINE-KINASES .....	55

A.	Caractéristiques physico-chimiques des ITK .....	55
	1. Propriétés générales.....	55
	2. Classification chimique .....	56
	a) Les dérivés 2 phényl-aminopyrimidine et benzamides .....	56
	b) Dérivés quinazolamines.....	57
	c) Dérivés carboxamides .....	58
	d) Autres dérivés.....	58
	3. Isomérisation.....	59
	a) Axitinib.....	59
	b) Sunitinib.....	59
	4. Structures chimiques proches .....	60

# SOMMAIRE

B.	Dosage plasmatique des inhibiteurs de tyrosine-kinases : état des lieux.....	61
C.	Contraintes.....	62
1.	Contraintes liées à l'échantillon .....	62
2.	Contraintes technico-biologiques.....	62
3.	Contraintes liées à l'appareillage .....	62
D.	Concentrations Cibles .....	63
E.	Étalons internes .....	64
IV.	MATERIEL ET METHODE .....	64
A.	Matériel et réactifs .....	64
1.	HPLC, SM et extraction .....	64
2.	Consommables et matériel de laboratoire.....	64
3.	Poudres et réactifs.....	65
4.	Solutions standards .....	65
a)	Solutions mères.....	65
b)	Solutions filles pour la gamme et les contrôles.....	66
c)	Solution fille étalon interne.....	67
B.	Développement de la méthode de dosage.....	68
1.	Optimisation des paramètres de spectrométrie de masse .....	68
a)	Optimisation des paramètres de la source .....	68
b)	Optimisation du mode multiple réaction monitoring .....	70
c)	Optimisation des temps de lecture des transitions « Dwell ».....	71
2.	Optimisation des paramètres chromatographiques .....	72
a)	Choix de l'approche.....	72
b)	Choix de la colonne .....	72
c)	Choix des phases mobiles.....	75
d)	Optimisation des paramètres d'injection.....	77
3.	Optimisation des paramètres d'extraction.....	77
C.	Validation de la méthode de dosage .....	79
1.	Normes de validation .....	79
2.	Linéarité.....	80
3.	Fidélité et Justesse.....	80
4.	Limites de quantification et de détection .....	80
5.	Coefficient d'extraction et spécificité.....	81
6.	Sélectivité et recherche de contamination .....	82
V.	RESULTATS.....	82
A.	Développement de la méthode de dosage.....	82
1.	Optimisation des paramètres de spectrométrie de masse .....	82
a)	Optimisation des paramètres de la source .....	82
b)	Optimisation du mode multiple réaction monitoring .....	84

# SOMMAIRE

c) Optimisation des temps de lecture des transitions « Dwell ».....	87
2. Optimisation des paramètres chromatographiques .....	88
a) Choix de la colonne .....	88
b) Choix des phases mobiles.....	90
c) Optimisation des paramètres d'injection.....	95
3. Paramètres d'extraction .....	95
B. Validation de la méthode de dosage .....	96
1. Linéarité.....	96
2. Fidélité et Justesse.....	98
3. Limites de quantification et de détection .....	99
4. Coefficient d'extraction et spécificité.....	99
5. Sélectivité et contamination.....	101
VI. DISCUSSION.....	101
VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	106

# ABBREVIATIONS

AA :	Acide Acétique
AAM :	Acétate d'Ammonium
Abl :	Abelson
ACN :	Acétonitrile
AF :	Acide Formique
AGP :	Alfa Glycoprotéine Fœtale
ALB :	Albumine
ALK :	Anaplastic Lymphoma Kinase
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ANOVA :	« ANalysis Of the VAriance », Analyse de variance.
ARS :	Agence Régionale de Santé
ASMR :	Amélioration du Service Médical Rendu
ATP :	Adenine Tri Proosphate
AUC :	Aera Under Curve
Bcr :	Breakpoint Cluster Region
CBNPC :	Cancer Bronchique à Non Petites Cellules
CBPC :	Cancer Bronchique à Petites Cellules
CCR :	Cancer à Cellules Rénales
CHC :	Carcinome Hépatocellulaire
CMT :	Cancer Médullaire Thyroïdien
CQI :	Contrôles Qualité Externes
CYP :	Cytochrome P
CV :	Coefficient de Variation
EUTOS :	European Treatment Outcome Study
EFS :	Etablissement Français du Sang
EGF :	Epidermal Growth Factor
EMA :	« European Medical Agency », Agence de santé européenne.
ESI :	« Electrospray ionization », ionisation par électro-spray.
FDA :	« Food and Drug Administration », Agence de santé états-unienne.
GIST :	Gastro Intestinal Stromatic Tumor
HAS :	Haute Autorité de Santé
HIF :	Hypoxia Induced Factor
INF :	Interféron

# ABBREVIATIONS

ITK :	Inhibiteur de Tyrosine-kinase
JAK :	Janus Kinase
kD :	KiloDaltons
LLOQ :	« Low Limit Of Quantification », limite de quantification basse
LOQ :	« Limit Of Quantification », limite de quantification
LMC :	Leucémie Myéloïde Chronique
MCX :	Mixed Cation eXchange
MP :	Myelodysplasie Primaire
MRM :	Multiple Reaction Monitoring
MS :	« Mass Spectrometry », spectrométrie de masse
NEJM :	New England Journal of Medicine
PAD :	Pression Artérielle Diastolique
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PFC:	Plasma Frais Congelé
Ph(+):	Piladelphie Positif
PK/PD :	Pharmacocinétique / Pharmacodynamie
QC:	Contrôles Qualité
RCyC :	Réponse Cytologique Complète
RHC :	Réponse Hématologique Complète
RMM :	Réponse Moléculaire Majeure
SDM :	Syndrome Myélodysplasique
SF:	Solution Fille
SM:	Solution Mère
SMP :	Syndrome Myeloprolifératif
SMR :	Service Médical Rendu
SPE:	« Solid Phase Extraction », extraction en phase solide
STP:	Suivi Thérapeutique Pharmacologique
TFA:	Acide Tri Fluoro acétique
THF:	Tetra Hydro Furan
TQD:	Triple QuaDripole
UHPLC:	« Ultra High Pressure Liquid Chromatographie » : chromatographie liquide très haute pression.
ULOQ:	« Upper limit of quantification », limite de quantification haute
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor

## I. Introduction

Depuis 2004 en France, le cancer est devenu, devant les maladies cardio-vasculaires, la première cause de décès. En 2012, le nombre de nouveaux cas de cancers en métropole était estimé à 355 000, dont 200 000 chez l'homme et 155 000 chez la femme. Chez l'homme, les trois cancers solides les plus fréquents sont ceux de la prostate (56 841 cas), du poumon (28 211 cas) et du côlon-rectum (23 266 cas). Chez la femme, il s'agit des cancers du sein (48 763 cas), du côlon-rectum (18 926 cas) et du poumon (11 284 cas). Concernant les hémopathies malignes (tumeurs liquides), l'incidence est estimée à 35 000 nouveaux cas par an (19 400 chez l'homme et 15 600 chez la femme)<sup>1</sup>.

Le nombre de décès lié au cancer en 2012 est estimé à 148 000 dont 85 000 chez l'homme et 63 000 chez la femme. Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer chez l'homme (21 326). Chez la femme, c'est le cancer du sein (11 886 décès). Le pronostic est variable d'un cancer à un autre et d'un patient à l'autre. La survie nette à 10 ans est de 1 % pour le mésothéliome pleural et de 93 % pour le cancer du testicule.

Avant les années 2000 environ, le traitement classique du cancer est basé sur trois thérapeutiques : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie cytotoxique. La chirurgie consiste à l'exérèse de la tumeur ainsi qu'une zone péri-tumorale. La radiothérapie repose sur l'irradiation de la tumeur et de la zone péri-tumorale par rayons X. Ces rayons X lèsent les tissus sains et tumoraux et entraînent une réduction de la masse tumorale. Enfin, la chimiothérapie cytotoxique consiste à administrer au patient un cocktail de « poisons » à visée anti-cancéreuse.

Les premières familles de molécules anti-cancéreuses sont des dérivées du gaz moutarde utilisé par les Allemands lors de la 1<sup>re</sup> guerre mondiale : les alkylants. Elles étaient initialement destinées à la fabrication et l'utilisation de gaz de combat. Elles furent testées en 1942 chez des patients atteints de lymphome non Hodgkinien et démontrèrent leur efficacité. Au lieu de tuer, ces molécules pouvaient sauver des vies. Dans les décennies suivant cette découverte, plusieurs médicaments cytotoxiques ont été commercialisés. Malgré le progrès qu'elles apportent dans le traitement de certains cancers, ces molécules possèdent de nombreuses

limites : les toxicités sont très souvent limitantes et altèrent profondément la qualité de vie des patients<sup>2</sup>.

Parmi ces limites, les effets indésirables des chimiothérapies classiques sont nombreux et peuvent sévèrement altérer la qualité de vie du patient, voir entraîner le décès de celui-ci<sup>3</sup>. L'initiation et la poursuite de ces traitements nécessitent une étude approfondie du bénéfice – risque au cas par cas. Ces thérapeutiques, malgré les progrès apportés par leur utilisation, ont atteint une certaine limite dans les possibilités d'utilisation.

Récemment, l'avènement de nouvelles techniques de biologie moléculaire et de cytogénétique permettent une meilleure compréhension des mécanismes d'oncogénèse. Ces processus font intervenir des cascades de réactions intra-cellulaires mettant en jeu de nombreuses protéines constituant de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Ces cibles incluent des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des protéines régulant le cycle cellulaire, des modulateurs d'apoptose et des promoteurs d'angiogenèse. De nombreuses nouvelles molécules apparaissent, visant spécifiquement ces protéines d'intérêt, avec succès. Les années 2000 voient apparaître de nouvelles molécules dites « thérapies ciblées », agissant spécifiquement sur les cellules tumorales exprimant ces facteurs, inhibant leur croissance ou induisant leur apoptose. Ces médicaments présentent de nombreux avantages en termes d'efficacité, de toxicité et d'utilisation pratique pour les patients.

Ainsi, la famille thérapeutique des inhibiteurs de tyrosine-kinases voit le jour. Ces traitements sont conçus pour cibler spécifiquement une protéine soit exprimée uniquement par la cellule cancéreuse, soit surexprimée par celle-ci. De plus, un des avantages proposés par ces médicaments est la possibilité d'administration par voie orale d'une dose unique. En comparaison à la chimiothérapie injectable adaptée à la surface corporelle pour chaque patient, cette prise unique *per os* apporte une facilité d'utilisation supérieure.

Cependant, la dose n'est pas toujours adaptée et optimisée. Certaines populations ne tirent pas le meilleur bénéfice de ces traitements aux posologies usuelles comme il sera détaillé au

cours de ce mémoire. Il existe, comme avec d'autres médicaments, une variabilité d'efficacité dont les facteurs étiologiques sont connus :

- Facteurs biologiques / pharmacodynamiques : présence initiale ou émergence de mutations sur les gènes codant pour les protéines tyrosine-kinases cibles, développement de voies de signalisation secondaires.
- Facteurs cliniques de mauvais pronostic au moment de la prise en charge : masse tumorale importante, métastases.
- Facteurs pharmacocinétiques : toutes ces molécules sont susceptibles de varier au cours du temps et entre les individus. Ces médicaments sont fortement métabolisés par le CYP 450 principalement le CYP 3A4, à l'origine d'une grande variabilité des concentrations plasmatiques intra et surtout inter-individuelles<sup>4</sup>.
- Facteur observance<sup>5</sup>, ou irrégularité de prise.

Parmi ces facteurs d'échec, le facteur pharmacocinétique et le facteur observance peuvent être prévenus. Le suivi thérapeutique pharmacologique, qui sera défini au cours de ce mémoire, permet d'identifier les patients à risque d'échec, de contribuer à en comprendre l'étiologie, et d'apporter des solutions aux cliniciens et aux patients. Il contribue à l'optimisation de l'efficacité d'un traitement. Dans le cas de médicaments anti-cancéreux, cela se traduit concrètement par une durée de vie prolongée des malades.

Ce suivi thérapeutique pharmacologique s'appuie sur la mesure de paramètres cliniques et biologiques chez le patient. Parmi ces paramètres, la mesure des concentrations plasmatiques peut guider la clinique. En les confrontant à des doses seuils d'efficacité et de toxicité définies au cours d'essais cliniques, elles peuvent être indicatrice des probabilités de réussite ou d'échec des traitements. Ainsi, un simple dosage sanguin à un moment défini permet d'anticiper un risque d'échec thérapeutique et de le prévenir.

La mesure de ces concentrations nécessite des outils d'analyse adaptés. Au cours de ce mémoire, nous décrivons les modalités de mise au point et de validation d'une méthode de dosage plasmatique des inhibiteurs de tyrosine-kinases. Nous décrivons dans un premier temps les intérêts des ITK et de leur dosage puis dans un second temps les étapes de développement, d'optimisation et de validation de la méthode de dosage. Extraire les molécules de l'organisme du patient et de ses matrices biologiques, séparer les molécules

d'intérêt entre elles ainsi que des molécules endogènes, pouvoir les identifier et les dénombrer seront les défis principaux de ce travail.

Cette méthode de dosage pourrait être appliquée pour guider les cliniciens via le suivi thérapeutique pharmacologique, mais également permettrait de réaliser des études de définition de seuils pharmacocinétique / pharmacodynamique au cours d'essais cliniques. Enfin, cette méthode pourra être utilisée pour réaliser des études de pharmacocinétique.

## **II. Inhibiteurs de tyrosine-kinases d'intérêts : modalités d'utilisation et optimisation.**

### **A. Leucémie myéloïde chronique**

#### **1. Physiopathologie**

La leucémie myéloïde chronique est un syndrome myeloprolifératif dû à une prolifération clonale acquise lors de la transformation d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente. Cette transformation est une anomalie génétique retrouvée dans les cellules : la présence, dans la grande majorité des cas de LMC, d'un transcrite de fusion Bcr-Abl (pour Break Point Cluster Region et Abelson). En France, la LMC est estimée à 1 ou 2 cas pour 100 000 habitants par an. L'âge moyen au diagnostic est de 54 ans, le ratio homme/femme est de 1,4.

Le transcrite de fusion Bcr-Abl, découvert par PC. Nowell et D. Hungerford à Philadelphie en 1960, est formé lors de la translocation du bras long du chromosome 22 sur celui du chromosome 9 : t(9-22)(q34, q11) comme présenté en Figure 1. Initialement nommé « minute chromosome », il porte désormais le nom de sa ville de découverte, Philadelphie<sup>6</sup>. Ce transcrite anormal entraîne la prolifération des cellules myéloïdes. Le diagnostic est établi par mise en évidence en biologie moléculaire du transcrite Bcr-Abl.

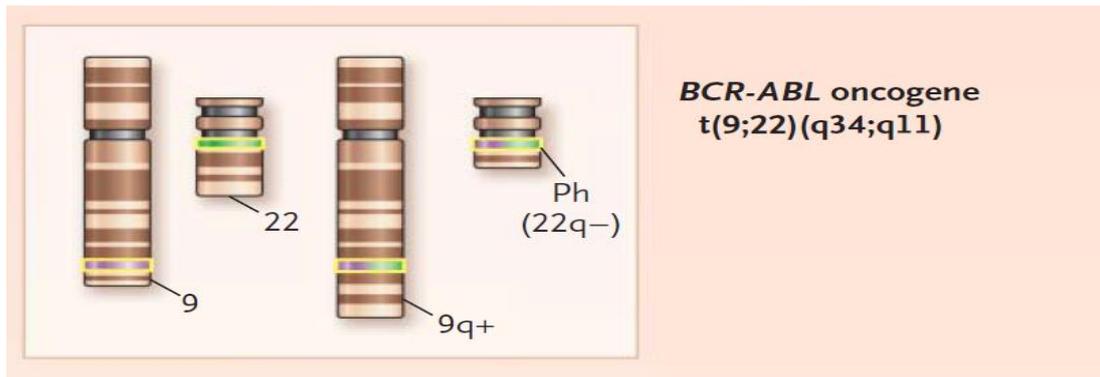


Figure 1: réarrangement chromosome à l'origine du chromosome Philadelphie, d'après Goldman et coll. NEJM 2003.

La pathologie évolue en trois phases : chronique, accélérée et acutisée. En l'absence de traitement, 65 % des patients en phase chronique vont évoluer vers une transformation aiguë de la maladie (acutisation) dans les 3 ans en moyenne, avec alors une médiane de survie de 3 à 6 mois.

Le traitement de référence jusque dans les années 2000 était l'interféron- $\alpha$  + la cytarabine. Celui-ci est d'efficacité moyenne et provoque de nombreux effets indésirables. Ce traitement de référence va être supplanté par les ITK lors de leur apparition dès 2001. Ceux-ci sont désormais indiqués en première et seconde intention dans le traitement de la LMC, la réponse obtenue avec ces traitements étant bien meilleure que celle obtenue avec les chimiothérapies classiques. Les critères de réponse retenus pour comparer ces traitements sont :

- A. La réponse hématologique complète (RHC) caractérisée par une normalisation de la NFS et une abolition de la splénomégalie.
- B. La réponse cytogénétique complète (RCyC) caractérisée par la disparition du chromosome Philadelphie lors de l'analyse cytogénétique de la ponction de moelle osseuse.
- C. La réponse moléculaire majeure (RMM) caractérisée par la diminution de 3log de la présence du transcrite Bcr-Abl sanguin après analyse par PCR.
- D. La réponse moléculaire profonde (RM4 ou RM4,5 ) caractérisée par la diminution du transcrite Bcr-Abl sanguin de 4 log ou 4,5 log (respectivement 0,01 % et 0,0032 %) après analyse PCR.
- E. Une maladie indétectable au niveau moléculaire, lorsque l'analyse PCR ne peut détecter le gène ni dans le sang, ni dans la moelle osseuse.

Ce sont sur ces critères de réponse que les traitements de la LMC seront évalués.

La LMC est donc une hémopathie maligne caractérisée par la présence dans le sang d'un transcrite de fusion anormal : Bcr-Abl. Celui-ci va coder pour une ou des protéines à activité tyrosine-kinases, qui vont constituer des cibles pharmacologiques potentielles.

## 2. Protéines cibles pharmacologiques

Le chromosome de Philadelphie est dû à une translocation entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 : t(9 ;22)(q34, q11). Il mène à la formation d'un transcrite de fusion Bcr-Abl codant pour des protéines à activité tyrosine-kinases.

Dans la majorité des cas (95 %), la cassure au chromosome 22 se produit dans la région M-Bcr (Major Bcr). Les transcrits issus de cette cassure sont traduits en une protéine de 210 kD : la p210<sup>BCR-ABL</sup>. Il existe également des réarrangements moins fréquents, avec des points de cassure dans la région m-Bcr (pour minor Bcr) formant une protéine de 190 kD, ou dans la région  $\mu$ -Bcr pour une protéine de 230 kD. D'autres transcrits plus rares sont décrits<sup>7</sup>.

Le potentiel leucémogène de la protéine Bcr-Abl réside dans le fait que l'activité tyrosine-kinase normale d'Abl est constamment induite par des séquences issues de Bcr. La protéine Bcr-Abl est un peptide membranaire possédant un domaine cytoplasmique. Abl possède le domaine SH1 contenant le site kinase qui fixe l'ATP. La partie Bcr possède un domaine de dimérisation. Cette dimérisation de Bcr-Abl entraîne l'activation constitutive de son site kinase.

Les substrats phosphorylés par Bcr-Abl sont nombreux : GRB-2, SHC, STAT5, DOK, CRK. Leur phosphorylation entraîne l'activation de nombreuses voies de signalisation : MAP-RAS kinases, STAT, PIK3, MYC, SRC, NF-KB comme présenté en Figure 2. Ces voies de signalisation entraînent la dérégulation de la prolifération cellulaire, la diminution de leur adhérence à la moelle osseuse, et la diminution de l'apoptose<sup>8</sup>.

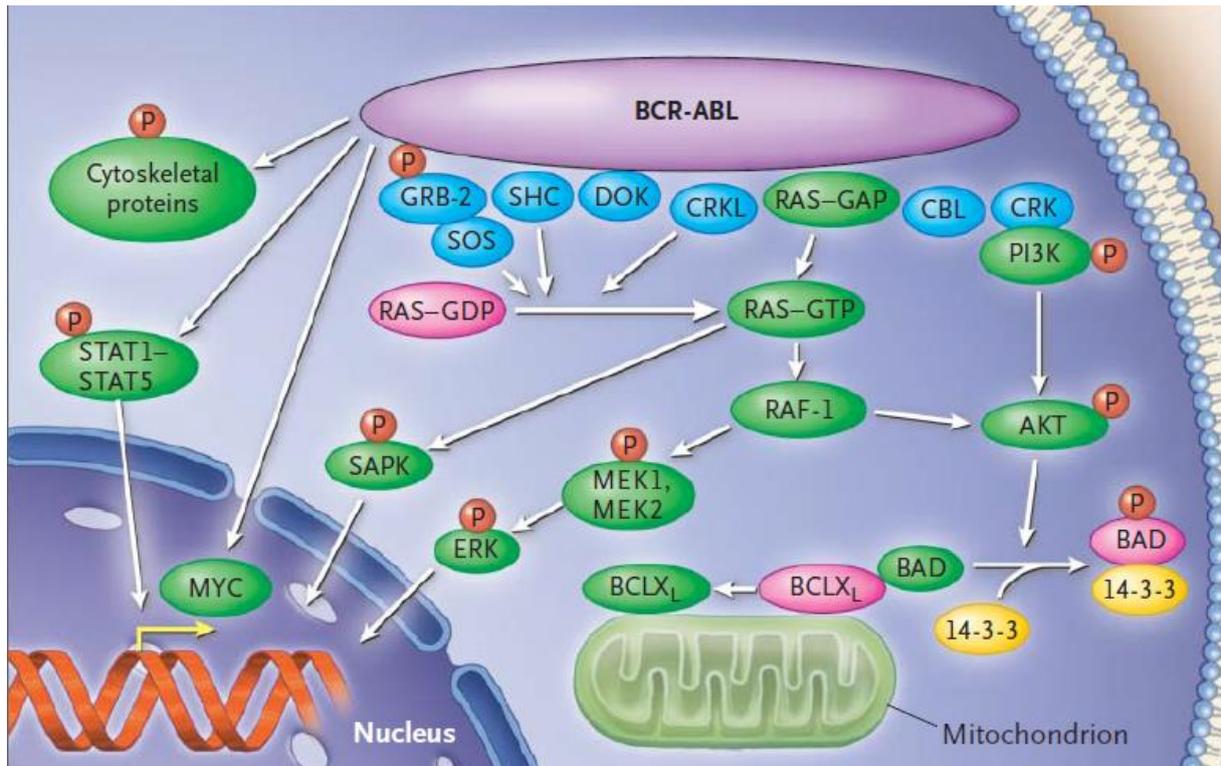


Figure 2: voies de signalisation impliquant la tyrosine-kinase Bcr-Abl, d'après Goldman et coll. NEJM 2003.

La protéine Abl va alors constituer une cible pharmacologique potentielle, notamment son site kinase ATP dépendant. Les études de cristallographie montrent que l'imatinib, en se fixant à des acides aminés d'Abl, provoque une altération d'une boucle ATP-binding. Cette boucle, qui normalement fixe une molécule d'ATP, permet d'apporter l'énergie nécessaire à l'activité de l'enzyme. L'imatinib stabilise une conformation inactive de la protéine et séquestre l'accès au site fixant l'ATP. Ainsi, la tyrosine kinase est inhibée entraînant l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'apoptose des clones anormaux.

Une mutation des acides aminés fixant l'imatinib pourrait altérer son efficacité. C'est le cas de la mutation T315I<sup>9</sup> (thréonine 315 > isoleucine). Elle diminue l'affinité de cet ITK ainsi que de plusieurs autres pour leurs cibles pharmacologiques, entraînant des échecs thérapeutiques.

Ces cibles pharmacologiques et leur variabilité ont conduit au développement de nombreuses molécules de la famille des inhibiteurs de tyrosine-kinase.

### 3. Les ITK indiqués dans la LMC

Il existe actuellement 5 molécules ITK : l'imatinib, le dasatinib, le nilotinib, le ponatinib et le bosutinib.

#### a) Imatinib

Premier représentant de la famille des inhibiteurs de tyrosine-kinases, l'imatinib reçoit en 2001 une AMM européenne. Il inhibe la protéine kinase Bcr-Abl.

En 2003, une étude prospective comparant l'imatinib contre l'interféron- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) combiné à la cytarabine chez 1106 patients atteints de LMC en phase chronique a montré après 19 mois de suivi que :

- La réponse cytogénétique majeure était atteinte chez 87,1 % des patients dans le groupe imatinib contre 34,7 % des patients dans le groupe INF- $\alpha$ /Cytarabine ( $p < 0,001$ ).
- La réponse cytogénétique complète était de 76,2 % dans le groupe imatinib contre 14,5 % dans le groupe INF- $\alpha$ /Cytarabine ( $p < 0,001$ ).
- La survie sans progression était maintenue chez 96,7 % des patients du groupe imatinib contre 91,5 % du groupe INF- $\alpha$ /Cytarabine ( $p < 0,001$ ).
- L'imatinib était mieux toléré que la thérapie classique.

Les résultats de cette étude sont très positifs. L'imatinib est utilisé immédiatement en première ligne dans la LMC, et le médicament est cité jusque dans la presse généraliste, notamment fait la Une du « Time Magazine » en 2001, confère annexe 1.

Dans ce contexte, la HAS accorde au Glivec® un SMR « important » et un ASMR de classe I « majeure » dans la prise en charge des leucémies myéloïdes chroniques Philadelphie positive à la posologie de 400 mg/jour chez l'adulte. D'autres « me too », c'est à dire des molécules aux pharmacophores similaires, ayant les mêmes propriétés pharmacologiques, apparaissent très rapidement en ciblant spécifiquement la protéine Bcr-Abl sur le modèle de l'imatinib.

#### b) Dasatinib

Le dasatinib est un inhibiteur de la kinase Bcr-Abl, ainsi que des kinases SRC, C-Kit, des récepteurs de l'éphrine EPH et du récepteur PDGF- $\beta$ . Il est indiqué dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique Philadelphie positive.

Une étude prospective publiée en 2010 dans le NEJM chez 519 patients atteints de LMC en phase chronique comparant l'imatinib à la dose de 400 mg par jour (N = 260) au dasatinib à la dose de 100 mg/jour (N = 259) démontre après 12 mois de suivi que :

- La réponse cytogénétique complète « confirmée » par deux contrôles était de 77 % chez les patients sous dasatinib contre 66 % chez les patients sous imatinib ( $p = 0,007$ ).
- La réponse cytogénétique complète observée au moins une fois était de 83 % sous dasatinib contre 72 % sous imatinib ( $p = 0,001$ ).
- La réponse moléculaire majeure des patients sous dasatinib était de 46 % contre 28 % pour les patients sous imatinib ( $p < 0,00001$ ).

Selon cette étude, le dasatinib serait plus puissant que l'imatinib<sup>10</sup>. Cependant, cette étude montre que 10 % des 258 patients sous dasatinib ont présenté un épisode d'épanchement pleural de grade 1 ou 2 ayant conduit à une diminution des doses administrées ou un arrêt du traitement, contre 0 % dans le groupe imatinib. L'étude ne présente pas de comparaison statistique sur cette donnée.

Une méta-analyse publiée en 2013 compilant les résultats de sept études cliniques portant sur le dasatinib (N=981) chez des patients atteints de LMC avait pour but de caractériser la relation dose activité aux quatre posologies étudiées : 100 mg par jour, 50 mg 2 fois par jour, 140 mg par jour et 70 mg deux fois par jour. Il apparaît que la dose de 100 mg par jour diminue la fréquence des effets indésirables tout en maintenant une efficacité similaire à 70 mg deux fois par jour. Les autres posologies étaient soit trop toxiques, trop peu efficaces. La  $C_{min}$  de dasatinib était le facteur prédictif le plus statistiquement déterminant afin de prévoir la survenue d'un épanchement pleural. Un autre facteur de risque important de survenue d'épanchement pleural était l'âge du patient > 55 ans<sup>11</sup>.

Le recul que nous avons aujourd'hui sur l'utilisation du dasatinib dans la LMC peut nous le faire préférer en 1ere intention. Celui-ci possède un spectre d'activité plus large que l'imatinib sur les tyrosine-kinases impliquées dans la LMC et une affinité plus forte (environ 350 fois) pour ces protéines<sup>12</sup>. Cependant, du fait de leur gravité, les effets indésirables doivent être prévenus convenablement.

Au regard de ces données, la HAS a accordé au SPRYCEL® en 2006 un SMR important, une ASMR de niveau II (importante) dans la LMC et une ASMR de I (majeure) en cas de résistance ou d'intolérance à l'imatinib.

### c) Nilotinib

Le nilotinib est un inhibiteur de la tyrosine kinase Bcr-Abl ainsi que des kinases C-Kit et PDGF-R $\alpha$ . Il est indiqué en première intention dans la LMC Philadelphie positive.

L'étude « ENEST » publiée en 2010 dans le NEJM comparait le nilotinib chez 846 patients inclus dans l'étude recevant soit le nilotinib 300 mg 2 fois par jour, le nilotinib à 400 mg 2 fois par jour ou l'imatinib à 400 mg par jour (1:1:1). Après 12 mois de suivi, l'étude montre que :

- La réponse moléculaire majeure des patients sous nilotinib 300 mg et 400 mg était de 44 % et 43 % respectivement, contre 22 % pour l'imatinib ( $p < 0,001$  pour les deux comparaisons).
- La réponse cytogénétique complète était de 80% et 78% dans les groupes nilotinib 300 mg et 400 mg, contre 65 % dans le groupe imatinib ( $p < 0,001$  pour les deux comparaisons).
- Les profils d'effets indésirables étaient différents pour les deux molécules.

Cette étude démontre la supériorité du nilotinib contre l'imatinib<sup>13</sup>. Effectivement, *in vitro* le nilotinib aurait une affinité 30 fois supérieure pour son récepteur, et ciblerait de nombreuses mutations du récepteur ABL résistantes à l'imatinib.

Une méta-analyse publiée en 2014 compare les études précédentes « ENEST » (nilotinib versus imatinib) et deux études « DASASION » et « S0325 Intergroup Trial » (dasatinib versus imatinib) sur 12 mois chacune. Les patients traités par nilotinib avaient 97 % de chance d'avoir le taux de réponse moléculaire majeure le plus élevé. Ceci correspond à une RMM de 55,2 % pour le groupe nilotinib, 44,8 % pour le dasatinib et 26,7 % pour l'imatinib à 12 mois<sup>14</sup>.

EN 2007, l'EMA octroyait une AMM au Tassigna® dans l'indication LMC Philadelphie positive. La HAS lui accordait un SMR important et une ASMR mineure (niveau IV) compte tenu de l'existence de l'imatinib dans cette indication et en l'absence alors d'essais cliniques

importants comparant directement les deux médicaments. En 2011, la HAS revoit son avis et accorde une ASMR de niveau I eu égard aux publications des études « ENEST ».

#### d) Ponatinib

Le ponatinib est un inhibiteur de la tyrosine-kinase Bcr-Abl. Il est le seul actif contre la protéine mutée et non mutée, notamment la substitution T315I (thréonine 315 isoleucine), appelée « mutation du diable ». Cette mutation est présente chez 20 % des patients résistants aux ITK, et confère une résistance à tous les ITK disponibles sur le marché. Jusqu'avant le ponatinib, la mutation était de mauvais pronostic, à l'exception du petit groupe de patients éligibles à la greffe allogénique de cellules souches.

Lors de l'étude de phase II « PACE », publiée en 2013 dans le NEJM, le ponatinib était administré à 45 mg/jour chez N = 449 patients atteints de LMC ou de leucémie aiguë lymphoblastique Philadelphie positive, résistants ou intolérants aux dasatinib ou nilotinib, ou porteurs de la mutation Bcr-Abl T315I. Le suivi était de 15 mois. L'étude a démontré que :

- 56 % des patients (N = 267) avaient atteint une réponse cytogénétique majeure, dont 51 % du sous-groupe résistant ou intolérants aux autres molécules et 70 % du sous-groupe des porteurs de la mutation T315I.
- 34 % avaient une réponse cytogénétique complète, dont respectivement 27 % et 56 % des patients des sous-groupes précédents.
- Plusieurs effets indésirables graves ont été observés : 9 % d'épisodes de thrombose artérielle grave, 37 % de thrombocytopénies, 34 % d'éruptions cutanées. Au total, 12 % des patients traités ont arrêté le traitement pour cause d'effet indésirable<sup>15</sup>.

Les résultats de cette étude sont encourageants au regard du pronostic de la pathologie notamment chez les patients porteurs de la mutation T315I. Naturellement, une étude de phase III comparative viendra compléter ces données. La survenue d'épisodes de thrombose artérielle grave de tropisme cardiovasculaire, cérébrovasculaire et périphérique sont remarquables et nécessitent la mise en place d'un suivi chez les patients traités.

En conséquence, la haute autorité de santé accordait en 2015 un SMR pour l'ICLUSIG® important, un ASMR de niveau III (modérée) chez les patients porteurs de la mutation T315I

et un ASMR V (pas d'amélioration) chez les patients non-porteurs de cette mutation. Ce niveau est dû à l'absence d'étude comparative de phase III.

#### e) Bosutinib

Le bosutinib est un inhibiteur de tyrosine-kinases ciblant la protéine Bcr-Abl, ainsi que les protéines kinases Src/Abl, c-Kit et PDGF-R. Son AMM européenne a été accordée en 2013.

L'étude « BELA » publiée dans le JCO en 2012 comparait chez 502 patients atteints de LMC chronique Ph(+) récemment diagnostiquée, le bosutinib à 500 mg/jour et l'imatinib à 400 mg/jour (1 :1). Après 12 mois de suivi, *Cortes et Coll.* présentent les résultats suivants :

- La réponse cytogénétique complète n'était pas statistiquement différente entre le groupe bosutinib (70 %) et imatinib (68 %),  $p = 0,601$ .
- La réponse moléculaire majeure était supérieure avec le bosutinib (41 %) comparé à l'imatinib (27 %),  $p < 0,001$ .
- Les profils de tolérance étaient similaires entre les deux groupes.
- L'étude n'était pas encore terminée, le suivi des patients toujours en cours.

Il est à ce jour difficile de tirer une conclusion de cette étude, mis à part que nous pouvons noter l'arrivée dans l'arsenal thérapeutique d'un nouvel ITK à priori comparable à l'imatinib. Il sera intéressant alors de le comparer au dasatinib, au nilotinib et au ponatinib afin de le situer dans la stratégie thérapeutique.

La HAS lui accorde une SMR importante et une ASMR à V (inexistante). Il constitue alors un traitement de recours aux autres ITK.

Pour conclure, il existe actuellement de nombreuses options thérapeutiques disponibles dans la prise en charge de la LMC. En cas d'échec de ces traitements, la thérapeutique classique interféron- $\alpha$ /cytarabine ou l'allogreffe de cellules souches constituent une alternative. Les succès des ITK indiqués dans la LMC ont inspiré d'autres laboratoires. Il existe maintenant d'autres molécules de cette classe pharmacologique indiquées contre d'autres cancers.

## B. Cancers bronchiques

### 1. Physiopathologie

En France en 2012, le cancer du poumon était diagnostiqué chez 39 495 personnes, 28 211 hommes pour 11 284 femmes respectivement à 66 ans et 65 ans. La survie à 5 ans est de 14 % et de 9 % à 10 ans. C'est la première cause de décès chez l'homme entre 45 et 64 ans en France.

Parmi les cancers du poumon, les cancers broncho-pulmonaires à non petites cellules (CBNPC) représentent 85 % des diagnostics (dont les épidermoïdes, les adénocarcinomes et les grandes cellules ou indifférenciés), et 15 % pour les cancers broncho-pulmonaires à petite cellule (CBPC). Le diagnostic et la différenciation reposent sur l'analyse anatomopathologique des biopsies. Un bilan d'extension précise la taille et l'extension locorégionale de la tumeur (T), la présence de métastases ganglionnaires (N), thoraciques et extra-thoraciques (M).

Le CBPC est une urgence thérapeutique. La prise en charge repose sur la radio-chimiothérapie pour les formes exclusivement localisées ou la chimiothérapie pour les autres formes (notamment bithérapie à base de sels de platine et d'étoposide).

Les modalités thérapeutiques de la prise en charge du CBNPC sont définies en fonction du stade d'avancée du cancer. En situation adjuvante ou néo-adjuvante, elles reposent sur des protocoles de chimiothérapies classiques comportant un sel de platine (3 ou 4 cycles) associé à un autre cytotoxique. En situation métastatique, le traitement se fait par bithérapie cytotoxique comportant au moins un sel de platine, éventuellement associé à un anti-angiogénique (bévacizumab). En cas de progression tumorale, des traitements de seconde intention sont proposés, parmi ceux-ci les médicaments ITK du CBNPC.

Les cellules mutées du CBNPC expriment différents récepteurs. Ces récepteurs, mis en évidence ces dernières années, peuvent être d'intéressantes cibles pharmacologiques pour des candidats médicaments actuels et futurs.

## 2. Les protéines cibles pharmacologiques

### A. La famille des récepteurs ErbB

La famille des récepteurs à tyrosine-kinases ErbB est constituée de 4 membres :

- ErbB-1 ou EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) mis en évidence par Ullrich *et coll.* en 1984.
- ErbB-2, ou HER-2 pour Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 découvert par Yamamoto *et coll.* en 1986.
- ErbB-3 ou HER-3, découvert en 1989 par Kraus *et coll.*
- ErbB-4 ou HER-4 (Plowman *et coll.* en 1993).

Ces récepteurs portent le nom de « Erb-B » car les gènes codant pour ces protéines ont de nombreuses similitudes avec les proto-oncogènes v-erb-B du virus de l'érythroblastose<sup>16</sup>.

Il existe de nombreux ligands à ces récepteurs appelés EGF-like : EGF lui-même, le HB-EGF (héparine binding), le BTC (betacelluline), le TGF- $\alpha$ , l'amphiréguline (AREG), l'épigène (EPGN), l'épiréguline (EREG), les neurégulines (NRG). Actuellement, 11 EGF-like ont été mis en évidence. Aucun ne semble fixer ErbB-2 : ce récepteur est dit « sourd » et ne peut être dimérisé dans les conditions normales. De plus, ErbB-3 n'a pas d'activité kinase (récepteur dit « muet »), ses homodimères sont inactifs et seuls ses hétérodimères transmettent un signal<sup>17</sup>.

Ces récepteurs ErbB activent des cascades de protéines kinases bien connues, telle que la voie RAS/RAF/MEK/ERK ainsi que les voies PIP3/AKT, comme présentées en Figure 3. Ces voies sont impliquées dans la croissance cellulaire, la synthèse de protéines et la survie.

Une surexpression du gène codant pour ErbB-1 est observée dans de nombreux cancers, notamment ovaire, vessie, colon et pulmonaire. Cette anomalie est présente dans 62 % des CBNPC et serait plus fréquemment retrouvée dans les échantillons de CBNPC provenant de patients est-asiatiques. Elle est de mauvais pronostic<sup>18</sup>.

La protéine ErbB-1 est proposée comme cible thérapeutique intéressante pour traiter les cancers du poumon présentant une mutation du gène codant pour EGFR. Cependant, comme présenté par la suite, les molécules ayant cette cible sont assez décevantes. D'autres protéines

kinases ont été identifiées et pourraient constituer des cibles pour les molécules en développement.

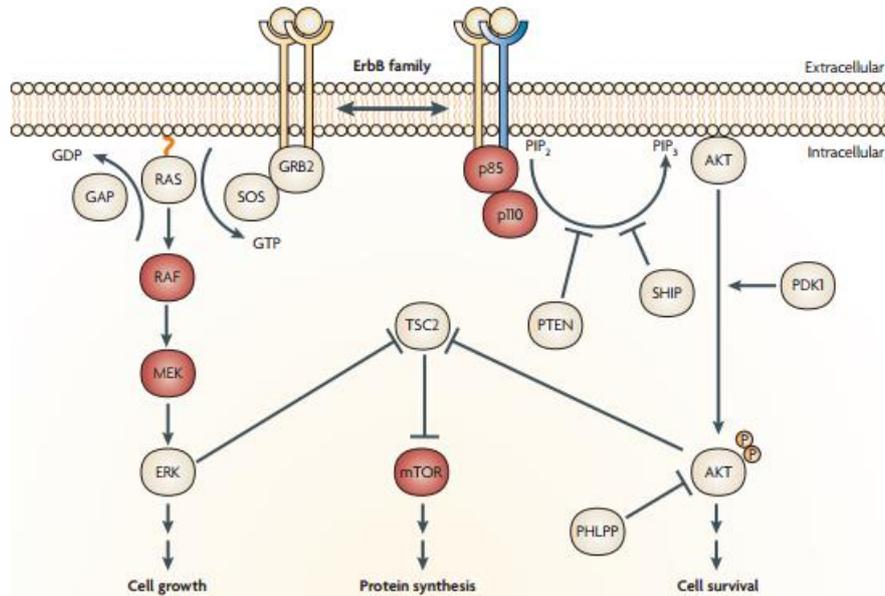


Figure 3: voies de signalisation et effets pharmacologiques impliquant les récepteurs ErbB, d'après Sharma et Coll. Nature 2007.

### B. Anaplastic Lymphoma Kinase

L'Anaplastic Lymphoma Kinase (=ALK) a été identifiée sur des cellules de lymphomes non hodgkinien par Morris *et coll.* en 1994<sup>19</sup>. Elle est issue de la fusion de deux protéines : la nucléophosmine (NPL) et la protéine de fusion ALK.

ALK est un récepteur tyrosine-kinase classique comportant un domaine de liaison extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine tyrosine kinase intracellulaire.

En août 2007, Soda *et coll.* publient dans « Nature » la découverte d'une mutation oncogène spécifique, EML4-ALK chez certains patients, Japonais dans la publication, atteints de CBNPC. Cette mutation serait due à la fusion de deux protéines, EML4 et ALK, toutes deux situées sur le chromosome 2p (2p21 pour ALK et 2p23 pour EML-4). À la suite d'un réarrangement (de type inversion) se forme un gène de fusion codant pour EML4-ALK. Cette protéine dérégulée active de nombreuses voies kinases dépendantes (PLC- $\gamma$ , RAS, PI3K, STAT) et provoque une prolifération cellulaire<sup>20</sup>.

La mutation est retrouvée chez 3 à 5 % des patients atteints de CBNPC, quelle que soit son ethnie. Ces patients ont tendance à être plus jeunes et non-fumeurs comparés aux patients non mutés.

La protéine issue de cette mutation est la cible de plusieurs inhibiteurs de tyrosines-kinase dont le crizotinib, et à venir le ceritinib.

### 3. Inhibiteurs de tyrosine-kinases d'intérêt

#### a) Gefitinib

Le gefitinib est un inhibiteur sélectif de la tyrosine kinase présente sur EGF-R. Son AMM européenne date de 2009. Il est indiqué dans le traitement du CBNPC avancé ou métastatique avec EGFR muté.

L'étude « IPASS » publiée dans le NEJM en 2009 étudiait en première intention l'effet du gefitinib 250 mg/jour comparé à une chimiothérapie à base de carboplatine/paclitaxel chez 1217 patients asiatiques atteints de CBNPC (1 :1). Après 12 mois de suivi, les résultats de l'étude sont :

- Une survie sans progression (au 12<sup>e</sup> mois) chez 24,9 % des patients traités par gefitinib contre 6,9 % des patients inclus dans le bras chimiothérapie ( $p < 0,001$ ). Cependant, l'étude détaillée des courbes de survie contraste ce résultat : les courbes de Kaplan-Meier se croisent au 6<sup>e</sup> mois de l'étude, en faveur du gefitinib. L'analyse d'une telle courbe ne peut en aucun cas conclure à sa supériorité dans la population globale, malgré le résultat positif au 12<sup>e</sup> mois de l'étude. Les courbes de survie sont présentées en annexe 2.
- Dans un sous-groupe de N = 261 patients porteurs de la mutation EGF-R, la survie sans progression était supérieure chez les patients traités par erlotinib (hasard ratio de 0,48 [0,36 ; 0,64]  $p < 0,001$ ).
- Dans le sous-groupe de N = 176 patients non-porteurs de la mutation EGF-R, la survie sans progression était supérieure chez les patients traités par chimiothérapie classique ( $p < 0,001$ )<sup>21</sup>.

Conclure sur cette étude est difficile. Les courbes de survie en population globale ne sont pas interprétables. La population recrutée est composée de patients asiatiques, non-fumeurs et en grande majorité de sexe féminin. Ils ne sont pas représentatifs des patients traités dans les centres français, c'est-à-dire à majorité des hommes et fumeurs. Cependant, le sous-groupe des patients porteurs d'EGFR muté pourrait conférer un intérêt au gefitinib dans cette population.

Une autre étude, « INTEREST » publiée en 2008 dans le Lancet, comparait le gefitinib au docetaxel en seconde intention dans le CBNPC après traitement par chimiothérapie à base de sels de platine chez 1466 patients randomisés (1 :1). L'étude montre que :

- La survie médiane était de 7 mois dans le groupe gefitinib contre 8 mois dans le groupe docetaxel. Le gefitinib a démontré sa non-infériorité sur la survie globale (hasard ratio 1 [0,095 ; 1,150]<sub>0,05</sub>).
- La supériorité du gefitinib dans le groupe des patients mutés EGF-R n'était pas démontrée ( $p = 0,62$ ).
- Les patients traités par gefitinib ont présenté plus de troubles cutanés (éruptions, acné) et de diarrhées, mais moins de troubles hématologiques.

Le gefitinib en seconde position pourrait donc être une option de traitement convaincante<sup>22</sup>.

La HAS accordait à l'IRESSA® en 2009 un SMR jugé important et une ASMR de niveau IV (mineure) en première ligne dans l'indication CBNPC à EGF-R muté et de niveau V (insuffisant) en 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> ligne, car la mutation est présente alors chez 5 % des patients traités.

Le gefitinib, malgré le faible bénéfice clinique qu'il apporte, peut constituer une alternative à la chimiothérapie classique, notamment dans les sous-populations à EGF-R muté.

#### b) Erlotinib

L'erlotinib est un ITK inhibiteur de la phosphorylation du récepteur du facteur de croissance EGFR de type 1 (ou HER-1). Il agit sur la partie intracellulaire du récepteur. EGFR est exprimé à la surface des cellules cancéreuses et non cancéreuses. Son inhibition conduit *in vitro* à l'arrêt de la prolifération cellulaire et/ou à l'apoptose.

L'étude « EURTAC », publiée en 2012 dans le Lancet Oncology, comparait l'erlotinib à un protocole de chimiothérapie classique chez 174 patients atteints de CBNPC à EGFR positif (1 :1). L'étude concluait que :

- La survie sans progression médiane était de 9,7 mois dans le groupe erlotinib contre 5,2 mois dans le groupe chimiothérapie ( $p < 0,0001$ ).
- Une éruption cutanée de grade 3 ou 4 était retrouvée chez 13 % des patients traités par erlotinib, contre 0 % chez les patients traités par chimiothérapie classique.
- Les troubles hématologiques classiques de la chimiothérapie (anémie, neutropénie) n'étaient pas ou peu retrouvés chez les patients traités par erlotinib.

Les résultats de cette étude, malgré un effectif faible, démontrent la supériorité de l'erlotinib dans la prise en charge du CBNPC à mutation EGF-R. La survenue d'une éruption cutanée doit être systématiquement surveillée chez les patients traités par cet ITK<sup>23</sup> ainsi que les autres inhibiteurs d'ErbB.

La HAS accorde au Tarceva® en première ligne dans le CBNPC à mutation EGFR positive un SMR jugé important et une ASMR de niveau IV (mineure).

### c) Afatinib

L'afatinib est un inhibiteur irréversible, puissant et sélectif des récepteurs de la famille ErbB. Il se fixe de manière covalente à ErbB1 (EGF-R), ErbB2 (HER2), ErbB3 et ErbB4. Il est indiqué dans le traitement du CBNPC localement avancé ou métastatique, présentant une mutation d'EGF-R, en monothérapie. L'AMM centralisée a été accordée en 2013.

L'étude LUX-Lung 3 comparait chez 1269 patients atteints d'adénocarcinome bronchique avancé ou métastatique à mutation EGF-R positive l'afatinib 40mg/jour à une chimiothérapie classique cisplatine/pemetrexed. La randomisation des patients était stratifiée selon le type de mutation EGF-R et sur l'ethnie (asiatique ou non asiatique). Les résultats présentés sont :

- La survie sans progression était de 11,1 mois chez les patients traités par afatinib contre 6,9 mois dans le groupe chimiothérapie ( $p < 0,001$ ).
- La survie sans progression dans le sous-groupe porteur de la mutation du récepteur EGF-R de type délétion de l'exon 19 (N=308) était de 13,6 mois contre 6,9 mois dans le sous-groupe chimiothérapie classique ( $p < 0,001$ ).

- Les effets indésirables les plus fréquents dans le groupe afatinib étaient des troubles cutanés (éruptions et acné).

L'afatinib pourrait être une option intéressante dans la prise en charge du CBNPC à EGFR muté. D'après l'analyse des hasards ratio, il serait plus efficace dans certains sous-groupes, notamment les femmes, asiatiques, non-fumeuses comme présenté annexe 3. Cependant, les auteurs de l'étude relativisent ces conclusions en précisant le défaut de puissance statistique sur ces critères dus au faible nombre de patients dans les groupes<sup>24</sup>.

L'étude LUX-Lung 8 publiée en août 2015 comparait chez 795 patients atteints de CBNPC, après échec d'au moins quatre cycles de chimiothérapie à base de platine, l'afatinib 40 mg/jour à l'erlotinib 150 mg/jour (1 : 1). L'étude démontre que :

- La survie sans progression était meilleure chez les patients traités par afatinib comparée à ceux traités par erlotinib (2,4 mois contre 1,9 mois,  $p = 0,0427$ ).
- La survie globale à 18 mois était de 7,9 mois dans le groupe afatinib contre 6,8 mois dans le groupe erlotinib ( $p = 0,0077$ ).
- Les profils d'effets indésirables étaient similaires dans les deux groupes.

Les sous-groupes d'ethnie asiatique étaient d'encore meilleurs répondeurs au traitement par afatinib. Cette étude peut faire préférer l'afatinib à l'erlotinib chez les patients pour lesquels le traitement par ITK est envisagé<sup>25</sup>.

En 2014, la HAS accordait à l'afatinib un SMR important et une ASMR V (inexistant) dans la prise en charge du CBNPC présentant une mutation EGF-R. Les résultats de l'étude LUX-Lung-8 ont été publiés après cet avis. Il ne tient donc pas compte de cette étude.

Les ITK ciblant le récepteur ErbB peuvent constituer une option intéressante dans la prise en charge du cancer du poumon à non petite cellule. Cependant, leur efficacité reste modérée comparée à ce que peuvent être les inhibiteurs de Bcr-Abl dans la LMC. En effet, des voies de signalisation secondaires peuvent se développer. De plus, des mutations du récepteur EGF-R ont été identifiées conférant une résistance aux ITK existants<sup>26</sup>.

L'icotinib est un ITK ciblant les mêmes protéines kinases. Il n'a pas encore obtenu d'AMM européenne. Une étude de phase 3 publiée récemment le compare au gefitinib dans le CBNPC

et conclut à la « non-infériorité » de l'icotinib dans cette indication<sup>27</sup>. D'autres essais pourront éventuellement compléter ces données à l'avenir.

D'autres kinases peuvent potentiellement être ciblées dans le CBNPC, c'est le cas de l'ALK.

#### d) Crizotinib

Le crizotinib est un inhibiteur sélectif de la tyrosine kinase ALK et de ses variants mutés. Il inhibe également H-GFR (facteur de croissance hépatocytaire) et c-Met. Il est indiqué en seconde ligne dans le traitement du CBNPC avancé avec une mutation ALK positive. Cette mutation concerne 4,6 % des patients.

Une première étude, « 1007 », publiée en 2013 dans le NEJM compare, chez des patients atteints de CBNPC porteurs de la mutation ALK (N=347) et ayant déjà reçu une première ligne de chimiothérapie à base de sels de platine, le crizotinib au pemetrexed. L'étude démontre que :

- La survie sans progression moyenne était de 7,7 mois dans le groupe crizotinib contre 3 mois dans le groupe pemetrexed ( $p < 0,001$ ).
- Il n'y a pas d'amélioration de la survie globale apportée par le crizotinib ( $p = 0,54$ ) à la fin de l'étude.
- Une amélioration globale de la qualité de vie des patients sous crizotinib.
- Des effets indésirables de types hépatiques prépondérants dans le groupe crizotinib (élévation des transaminases).

Le crizotinib améliore la survie sans progression dans le sous-groupe de patients porteurs d'une mutation ALK. L'étude, peut-être limitée dans le temps, n'a pas démontré d'amélioration de la survie globale. Cependant, la qualité de vie est meilleure dans le groupe des patients traités par l'inhibiteur de tyrosine-kinases

Une seconde étude, dite « 1014 » compare en première ligne le crizotinib 250 mg/jour à la chimiothérapie à base de pemetrexed associé à un sel de platine, chez 343 patients atteints de CBNPC à mutation ALK positive. Il apparaît que :

- Les patients traités par crizotinib présentent une survie sans progression de 10,9 mois contre 7 mois dans le bras chimiothérapie classique ( $p < 0,001$ ).

- Les objectifs de réponse étaient atteints chez 74 % des patients traités par ITK contre 45 % par chimiothérapie ( $p < 0,0001$ ).
- Les patients du groupe crizotinib avaient une qualité de vie meilleure que ceux du groupe chimiothérapie.
- Le crizotinib n'apportait pas d'amélioration de la survie globale ( $p = 0,36$ ).

Le crizotinib apporte une amélioration de la survie sans progression, mais aucune amélioration de la survie globale, comparé à la chimiothérapie classique. Il constitue une option intéressante en première ligne, mais non révolutionnaire.

À ce jour, le crizotinib est indiqué chez les patients atteints de CBNPC porteurs de la mutation ALK positive, en seconde intention. La HAS lui accordait en 2013 un SMR important et une ASMR de niveau III (modérée) en seconde ligne.

Il existe un autre ITK ciblant spécifiquement ALK : le ceritinib. Il a obtenu une AMM centralisée le 06/05/2015 dans l'indication BPNPC à ALK muté après échec du crizotinib. Les études cliniques portant sur cette molécule sont toujours en cours. D'autres médicaments viendront sûrement s'insérer dans l'arsenal thérapeutique.

En conclusion, malgré les progrès apportés par ces molécules ciblant ALK ou ErbB, le cancer du poumon à non petites cellules reste toujours très difficile à traiter. Les taux de survie à 1 an sont très faibles et les traitements récents apportent un progrès relativement modéré. Il en est de même pour d'autres ITK indiqués dans d'autres cancers.

## C. Carcinome à cellules rénales et autres carcinomes à VEGF-R dérégulé

### 1. Physiopathologie

#### a) Carcinome cellulaire rénal

Le cancer du rein était diagnostiqué chez 10 125 personnes en France en 2009, touchant deux hommes pour une femme d'âge moyen autour de 65 ans. La survie à 5 ans est de 63 %, elle passe à plus de 90 % lors de cancers localisés.

Parmi ces cancers du rein, 85 sont des carcinomes à cellules rénales (CCR). Les autres cancers rénaux (15 %) concernent des entités histologiques différentes et font l'objet d'une prise en charge très spécialisée ne faisant pas intervenir les inhibiteurs de tyrosine-kinases.

De découverte généralement fortuite (60 %), le CCR peut s'exprimer cliniquement par une hématurie, une douleur ou la présence d'une masse palpée. Parfois, une métastase est révélatrice du primitif. Il est alors qualifié de CCRm pour métastatique. Comme le CBNPC, la prise en charge thérapeutique de ce cancer est fonction de l'avancement de la maladie.

En cas de métastase, six facteurs de risque permettent d'évaluer le pronostic du patient, selon l'échelle de « Motzer »<sup>28</sup>. Cette échelle, calculée à partir de paramètres cliniques et biologiques (albumine, phosphatase alcaline, hémoglobine, lactate déshydrogénase, calcémie corrigée, intervalle entre diagnostique et traitement) est présentée en Figure 4. Elle permet de définir une stratégie thérapeutique.

**Table 6.** Risk Groups Derived From Multivariate Analysis Applied to Patients Enrolled Prior to 1990

No. of Risk Factors	Patients*		No. of Patients Alive	Median Survival (months)	95% CI	1-Year Survival (%)	3-Year Survival (%)
	No.	%					
0	29	26	0	14.4	11.6 to 23.4	62	17
1	31	28	4	13.7	9.4 to 16.9	54	7
2 or 3	50	45	0	3.4	1.9 to 5.3	6	2

\*Four patients are missing data on one of the risk factors.

*Figure 4: échelle pronostique de Motzer de survie des patients en fonction de leurs facteurs de risque d'après Motzer et coll. JCO 2004.*

Les thérapeutiques médicamenteuses possibles sont l'immunothérapie (INF- $\alpha$  et IL-2), les thérapies ciblées de type anticorps (bévacizumab), les inhibiteurs de sérine/thréonine kinases (everolimus et temsirolimus) et les inhibiteurs de tyrosine-kinases. Ces médicaments vont également cibler d'autres carcinomes à VEGF-R dérégulé, incluant le CBNPC vu précédemment, ainsi que le carcinome hépatocellulaire et le carcinome colorectal.

#### b) Carcinome hépatocellulaire et carcinome colorectal

L'incidence en 2012 du cancer primitif du foie était de 7 500 nouveaux cas (80 % d'hommes) en France. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente 80 à 90 % des cancers primitifs du foie. Les autres cancers se développent à partir de types histologiques plus rares. Le CHC fait

presque toujours suite à une hépatopathie chronique principalement d'origine alcoolique, virale ou métabolique. 90 % de ces cancers sont précédés par un stade pré-cirrotique. Le taux de survie à 5 ans est de 10 %. Il peut atteindre 25 % lors de cancers localisés.

L'incidence du cancer colorectal était de 40 000 personnes en 2010, dont 52 % de sexe masculin. La moyenne d'âge au diagnostic était 70 ans, 95 % des patients ayant plus de 50 ans. Il est de bon pronostic lorsqu'il est pris en charge à temps : la survie relative à 5 ans est de 91 % pour les stades localisés et de 11 % pour les situations métastatiques. Environ 17 000 décès annuels lui sont imputables.

Ces deux cancers ont un point commun : une dérégulation des mécanismes VEGF dépendants. Une surexpression du récepteur VEGF-R peut être observée dans 50 % des cancers colorectaux et 60 à 80 % des cancers hépatocellulaires<sup>29,30</sup>. Les ITK ciblant spécifiquement le récepteur VEGF-R pourraient avoir un effet pharmacologique dans la prise en charge de ces deux cancers, ainsi que du CCRm.

## 2. Récepteurs d'intérêt

### a) Le récepteur au facteur de croissance endothélial vasculaire

Judah Folkman introduit en 1971 dans le NEJM la notion d'angiogenèse et émet une hypothèse : la croissance tumorale est liée à sa néo-vascularisation. L'inhibition de l'angiogenèse pourrait conduire à une guérison<sup>31</sup>. Cette même année, Folkman *et coll.* publient dans le Journal of Experimental Medicine la découverte d'un facteur tumoral responsable d'angiogenèse « composé d'ARN et de protéines » qu'ils nomment le Tumor Angiogenesis Factor (TAF). Folkman suggère déjà l'idée de cibler cette protéine pour obtenir une réduction de la masse tumorale. Les travaux de Dvorak *et coll.* en 1984 permettent d'identifier spécifiquement une glycoprotéine qui prend par la suite le nom de VEGF (pour Vascular Endothelial Growth Factor), puis VEGF-A<sup>32,33</sup>, c'est-à-dire de sous forme A.

Aujourd'hui, nous connaissons six glycoprotéines responsables de l'angiogenèse : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF-1 et PlGF-2 (pour Placenta Growth Factor). Ces protéines sont solubles, présentes dans la matrice extracellulaire et pèsent quelques kilodaltons (45 kDa pour VEGF-A). Elles sont activées après clivage par des protéases et sont

indispensables à la vie. En effet chez la souris la délétion du gène codant pour VEGF est létale pour l'embryon.

Les glycoprotéines VEGF induisent un effet angiogénique par activation de nombreux récepteurs. Deux principaux sont présents notamment sur les cellules endothéliales : le VEGFR-1 et VEGFR-2. Le VEGFR-3 est découvert par la suite. Ils sont composés de sept domaines extra-cellulaires immunoglobuline-like, un domaine transmembranaire et un domaine tyrosine-kinase intra-cellulaire. VEGFR-1 et 2 stimulent l'angiogenèse et la vascularisation, tandis que VEGFR-3 stimule la lymphangiogenèse. Ces trois récepteurs, activés, induisent de nombreuses voies de signalisation intracellulaire conduisant à leurs effets pharmacologiques<sup>34</sup>.

Le rôle du VEGF via les récepteurs VEGFR dans l'angiogenèse tumorale est bien établi pour de nombreux cancers, liquides et solides. L'inhibition des VEGF et VEGFR est un axe de recherche dans la lutte contre le cancer.

#### b) La dérégulation de VEGF-R

Une analyse cytogénétique de biopsies tumorales de CCR met en évidence dans 75 % des échantillons la présence d'une mutation, acquise ou non, au niveau d'un gène particulier : le gène von Hippel-Lindau (VHL)<sup>35</sup>. Le gène VHL code pour un peptide, inclus dans un complexe multi-protéique chargé de l'ubiquitination transcriptionnelle du facteur nommé « Hypoxia Induced Factor 1 $\alpha$  » (HIF-1 $\alpha$ ).

HIF-1 $\alpha$  est chargé de la régulation positive de nombreux gènes en réponse à un stress hypoxique. Il induit, entre autres, VEGF-R (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor), GLUT-1 (transporteur de glucose). Ces protéines sont impliquées dans des processus d'angiogenèse, de survie cellulaire, de régulation du pH et de métabolisme du glucose. La stimulation de ces protéines serait à l'origine du processus tumoral dans le CCR<sup>36</sup>.

HIF-1 $\alpha$  en condition normale est sous forme hydroxylée. Cette forme est reconnue par la protéine VHL et ubiquitinée, pour être ensuite détruite par le protéasome. Lors d'une hypoxie

cellulaire, la HIF-1 $\alpha$  va être sous forme oxydée et en conséquence ne sera pas détruite via la protéine VHL. Lors de la mutation du gène VHL, la protéine HIF-1 $\alpha$  va persister dans la cellule, même en dehors d'un stress hypoxique, et induira en continu la transcription et la traduction de nombreuses protéines parmi lesquelles VEGF-R et EGF-R impliquées dans les processus d'angiogenèse et de survie cellulaire.

Ces protéines sont des tyrosine-kinases pouvant constituer des cibles pharmacologiques intéressantes en thérapeutique.

### 3. ITK d'intérêt dans le CCRm

#### a) Sorafenib

Le sorafenib a démontré sa capacité à inhiber *in vitro* de nombreuses tyrosines-kinases. Ces protéines sont impliquées dans les processus de vascularisation tumorale (VEGFR-2 et 3, CRAF, PDGF-R $\beta$ ) ou autres mécanismes oncogènes (BRAF, VRAF V600E, c-Kit, FLT-3). Il est indiqué dans le carcinome rénal avancé en seconde intention. Il aurait également un intérêt chez les patients atteints de CHC et de cancer colorectal métastatique en association aux inhibiteurs de mTOR.

L'étude « TARGET 11213 » publiée en 2007 au NEJM comparait chez 903 patients atteints de CCR résistants à la chimiothérapie standard, le sorafenib 400mg 2 fois par jours à un placebo (1 :1). Après 18 mois de suivi l'étude concluait que :

- La survie sans progression était de 5,5 mois dans le groupe sorafenib contre 2,8 mois dans le groupe placebo ( $p < 0,01$ ).
- Le sorafenib était un facteur réduisant le risque de décès (hasard ratio 0,72 [0,54 ; 0,94]<sub>0,05</sub>  $p = 0,02$ ).
- Des cas d'érythrodysesthésie palmo-plantaires étaient signalés avec le sorafenib.

Le sorafenib démontre donc son efficacité comparé au placebo en seconde ligne sur la survie sans progression<sup>37</sup>.

Cependant, les résultats complémentaires de cette étude, publiés en 2009 dans le JCO contrastent cette donnée : en effet, dans cette étude, le sorafenib n'entraîne pas d'augmentation de la survie globale des patients traités comparé au placebo (17,8 mois

contre 15,2 p = 0,146). Néanmoins, l'analyse post cross-over (patients inclus dans le groupe placebo basculés dans le groupe sorafenib) met en évidence différence de survie globale entre les deux groupes. Celle-ci devient alors significative en faveur de l'ITK (17,8 mois contre 14,3 mois p = 0,029). De plus, cette étude suggère de réserver le sorafenib notamment aux patients ayant un fort taux de VEGF circulant<sup>38</sup>.

La HAS accordait au NEXAVAR® en 2006 dans l'indication CCR avancé en seconde ligne un SMR important et une ASMR à II (importante).

#### b) Sunitinib

Le sunitinib est un inhibiteur de nombreuses tyrosine-kinases impliquées dans la croissance tumorale et l'angiogenèse. Il agit sur VEGFR-1 ; 2 et 3, sur PDGF-R $\alpha$  et PDGF-R $\beta$ , Kit, FLT-3, CSF-1R et RET.

Publiée en 2007 dans le NEJM, l'étude comparant le sunitinib 50 mg/j pendant 4 semaines à l'INF- $\alpha$  chez 750 patients (1 :1) atteints de CCRm concluait que :

- La survie sans progression était plus longue dans le groupe sunitinib (11 mois contre 5 mois p < 0,001).
- Les effets indésirables étaient plus fréquents et plus sérieux dans le groupe INF- $\alpha$ .
- La qualité de vie était meilleure pour les patients inclus dans le groupe sunitinib (p < 0,001).

La survie sans progression et la qualité de vie des patients traités par sunitinib ont été significativement meilleurs<sup>39</sup> comparé à l'interféron. Le sunitinib apporte donc une amélioration dans la prise en charge thérapeutique du CCRm.

En conséquence, la HAS accorde au SUTENT® un SMR important et une ASMR II (importante) dans l'indication CCRm en première intention.

#### c) Axitinib

Axitinib est un inhibiteur puissant et sélectif des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Il inhibe *in vitro* la prolifération et la survie des cellules endothéliales VEGF dépendante. Il a obtenu une AMM en 2013 dans l'indication CCR en seconde intention.

L'étude « AXIS » publiée dans le Lancet en 2011 comparait l'axitinib 5 mg deux fois par jour (augmentation de dose possible) au sorafenib 400 mg deux fois par jour chez 723 patients en seconde intention. Les résultats de l'étude sont :

- La survie sans progression était de 6,7 mois dans le groupe axitinib contre 4,7 mois dans le groupe sorafenib ( $p < 0,0001$ ).
- Les patients inclus dans le groupe axitinib étaient plus hypertendus comparés aux patients du groupe sorafenib et moins sujets au syndrome main-pied.

L'axitinib peut donc être utilisé comme un traitement de seconde intention dans le CCR. Une surveillance des effets indésirables sera réalisée, notamment l'hypertension artérielle et le syndrome main-pied.

La commission de transparence lui accorde en 2013 un SMR jugé important et une ASMR de niveau IV (mineure) en seconde intention chez les patients atteints de CCR avancé.

#### d) Pazopanib

Le pazopanib inhibe de nombreuses kinases, dont VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3, PDGF-R $\alpha$  et PDGF-R $\beta$  ainsi que c-KIT. Il est indiqué en première ou seconde ligne dans le CCR avancé.

Son efficacité a été évaluée au cours de l'essai « VEG105192 » qui comparait chez 435 patients atteints de CCRm en première ou seconde intention le pazopanib 800 mg à un placebo (2 :1).

L'analyse des résultats indique que :

- La survie globale n'était pas améliorée chez les patients traités par placebo comparé aux patients traités par pazopanib (20,5 mois contre 22,9 mois,  $p = 0,224$ ).
- Le traitement améliorait la survie sans progression dans la population globale (9,2 mois contre 4,2 mois  $p < 0,0001$ ).

Le pazopanib ne démontre pas au cours de cet essai clinique son efficacité contre un placebo dans le CCR. De plus, il entraîne de nombreux effets indésirables<sup>40</sup>.

En conséquence, la HAS lui accordait en 2013 en première intention dans le CCRm un SMR jugé faible et une ASMR V (inexistante). Cependant, ces résultats doivent être contrastés : le dosage plasmatique du pazopanib pourrait apporter une amélioration dans la prise en charge

thérapeutique des patients, comme développé par la suite au cours du chapitre consacré au suivi thérapeutique pharmacologique.

#### e) Regorafenib

Le regorafenib est un inhibiteur des kinases VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 impliquées dans l'angiogenèse tumorale, ainsi que des protéines KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAF<sup>V600E</sup>. De plus, il aurait une action anti PDGF-R et FGF-R. Il est indiqué dans le cancer colorectal métastatique en seconde intention. Il a été testé également chez des patients atteints de CCRm et le CHC.

L'étude « CORRECT » publiée en 2013 dans le Lancet comparait chez 760 patients atteints de cancer colorectal métastatique ayant bénéficié d'une chimiothérapie standard, le regorafenib 160 mg/jour à un placebo. L'étude démontre après 12 mois de suivi que :

- La survie globale moyenne était de 6,4 mois dans le groupe regorafenib contre 5 mois dans le groupe placebo ( $p < 0,001$ ).
- Le risque de décès était diminué de 23 % dans le groupe regorafenib (HR = 0,77)
- Les patients inclus dans le groupe regorafenib présentaient plus d'effets indésirables, notamment des erythrodysesthésie palmo-plantaires, des troubles cutanés de type éruptions desquamantes, et de l'hypertension artérielle.

Le regorafenib possède une efficacité modérée dans la prise en charge du cancer colorectal métastatique. Celui-ci entraîne de nombreux événements indésirables pour un gain de survie plutôt médiocre.

La commission de transparence accorde en 2014 au Stivarga® dans l'indication cancer colorectal métastatique en seconde intention un SMR faible ou insuffisant, en fonction du score ECOG de performance du patient, et une ASMR de niveau V, c'est-à-dire inexistante.

## D. Mélanome métastatique

### 1. Physiopathologie

En 2010 en France, 8250 cas de mélanomes cutanés ont été diagnostiqués, 47 % chez l'homme, à environ 56 ans. Le taux de survie à 5 ans est de 88 % pour les stades localisés et 18 % en situation métastatique.

La confirmation du diagnostic est réalisée après exérèse complète de la tumeur par examen anatomopathologique. La tumeur est classée selon la taille de la lésion et son degré d'envahissement (pTNM). Le stade d'avancement des lésions déterminera la stratégie thérapeutique à appliquer.

La chirurgie reste le traitement de référence du mélanome cutané non métastatique. Les traitements proposés en situation adjuvante ou métastatique sont l'immunothérapie (INF- $\alpha$ ), la chimiothérapie à base de dacarbazine et de fotémustine ainsi que les thérapies ciblées : l'ipilimumab et les inhibiteurs de protéines kinases. Ces derniers ciblent une serine thréonine kinase particulière : la protéine B-Raf.

## 2. Les cibles pharmacologiques du mélanome

Les travaux de Megan Robinson et Melanie Cobb conduisent en 1997 à la publication dans la revue *Cell Biology* de l'identification de nombreuses voies de signalisation associées aux MAP-Kinases et leurs génomes<sup>41</sup>. Ainsi, le proto-oncogène BRAF code pour une BRAF kinase, incluse dans la famille des sérines thréonines kinases de type RAF. Elles agissent dans la régulation de la croissance, de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

B-Raf, ou BRAF est un polypeptide soluble de 766 acides aminés composé de 3 domaines caractéristiques des RAF kinases : CR1, CR2 et CR3. CR1 est une séquence régulatrice de l'activité kinase de la protéine. CR2 est une zone charnière riche en acides aminés sérine. CR3 est le domaine comportant la protéine kinase effectrice.

Lors d'une analyse ADN de cellules issues de 530 prélèvements, Davies *et coll.* ont mis en évidence des mutations de gènes codant pour la kinase BRAF. Ces mutations étaient retrouvées dans 60 % des prélèvements de mélanomes ainsi que dans certains prélèvements issus de cancers colorectaux, de gliomes, de sarcomes, de cancers hépatiques, ovariens et du sein.

Plus de 43 types de mutations sur BRAF sont identifiées. La plus fréquente se situait au niveau du nucléotide 1796, une adénine remplace une thymine. Cette mutation était retrouvée dans 35 des 38 prélèvements issus de mélanomes. Curieusement, l'étude souligne que cette

mutation, T1796A, ne ressemble pas à celles généralement observées lors d'une exposition prolongée aux UV, à savoir la formation de dimères de thymines. Pourtant, l'exposition au soleil est le facteur de risque prépondérant du mélanome. Les auteurs suggèrent un mécanisme secondaire UV dépendant, lié à la biologie du mélanome, qui serait à l'origine de cette mutation.

Le triplet de nucléotides résultant de cette mutation code pour un autre acide aminé en position 600 : une valine est alors remplacée par un glutamate. Cette mutation, V600E, entraîne l'activation constitutive de la kinase et de ses voies de signalisation ainsi que la prolifération cellulaire tumorale<sup>42</sup>. La mutation de BRAF est plus fréquente en position 600.

Cette serine thréonine kinase pourrait être une cible pharmacologique intéressante dans le traitement du mélanome métastatique.

#### a) Vemurafenib

Le vemurafenib est un inhibiteur des BRAF kinases mutées. Il est indiqué dans le traitement des patients adultes atteints d'un mélanome non résecable ou métastatique, à mutation BRAF<sup>V600E</sup> positive.

L'étude « BRIM-3 » publiée dans le NEJM en 2011 comparait chez 675 patients atteints de mélanome métastatique à mutation BRAF V600E positive, le vemurafenib 960 mg deux fois par jour à la dacarbazine à posologie usuelle. À 6 mois, l'étude démontrait que :

- La survie globale du groupe vemurafenib était de 84 % contre 64 % dans le groupe dacarbazine. Le hazard ratio du décès dans le groupe vemurafenib était de 0,37 [0,26 ; 0,55]<sub>0,05</sub> p < 0,0001. La réduction du risque relatif de décès dans le groupe vemurafenib était de 63 %.
- La survie sans progression était significativement meilleure dans le groupe vemurafenib comparé au groupe dacarbazine (hazard ratio 0,26 [0,2 ; 0,33]<sub>0,05</sub> p < 0,001).
- Le vemurafenib provoque de nombreux effets indésirables principalement de types cutanés et rhumatologiques, dont 5 % de grade 3 et plus.

Malgré une efficacité meilleure, le vemurafenib n'est pas encore la révolution attendue dans la prise en charge de ce cancer au pronostic difficile. L'étude dénombrait 43 décès sur 336 patients du groupe vemurafenib après seulement 3 mois de suivi. La survie médiane globale restait limitée à 13,2 mois (lors d'un suivi de 9 mois supplémentaires non prévu initialement par l'étude) et certains effets indésirables pouvaient nuire à la qualité de vie des patients traités<sup>43</sup>. De plus, au bout de 6 mois, il était observé une perte d'efficacité des inhibiteurs de BRAF, probablement due au développement de voies de signalisations secondaires. C'est pourquoi d'autres inhibiteurs (de MEK) ont été proposés en association.

La HAS accordait en 2012 au Zelboraf® un SMR important et une ASMR de niveau III (modérée) tenant compte du fait que celui-ci provoque de nombreux effets indésirables.

#### b) Dabrafenib

Le dabrafenib est un inhibiteur des sérines/thréonines RAF kinases. Il agit sur BRAF V600E, BRAF V600K, BRAF V600D, BRAF WT, CRAF WT. *In vitro*, il a démontré une action inhibitrice sur le biomarqueur phosphorylé ERK (témoin de prolifération cellulaire). Il est indiqué depuis 2012 dans le traitement du mélanome non résecable ou métastatique à mutation BRAF.

L'étude « BREAK-3 » comparant le dabrafenib 150 mg deux fois par jour à la dacarbazine à posologie usuelle chez 250 patients répartis respectivement en (3 :1), démontre que :

- La survie sans progression moyenne était de 5,1 mois dans le groupe dabrafenib contre 2,7 mois dans le groupe dacarbazine ( $p < 0,0001$ ).
- Le hazard ratio de survie globale n'était pas augmenté sur la durée de l'étude (12 mois).
- Des effets indésirables de grade 2 ou plus étaient retrouvés chez 53 % des patients inclus dans le groupe dabrafenib (cutanés et rhumatologiques) contre 44 % des patients inclus dans le groupe dacarbazine.

Tout comme le vemurafenib, le dabrafenib apporte une amélioration de la survie sans progression, et ce, au prix de nombreux événements indésirables notamment cutanés.

En conséquence, la HAS accordait au dabrafenib en 2014 un SMR important et une ASMR à V (inexistante). En effet, une étude le comparant directement au vemurafenib est en cours et permettra de le situer plus précisément dans la prise en charge du patient.

Ces deux inhibiteurs de kinases ont une efficacité modérée comparée aux ITK de la LMC. D'autres voies de signalisation ont été identifiées et doivent encore l'être afin de comprendre plus précisément les mécanismes intracellulaires de prolifération et de développement.

Le mélanome métastatique est un cancer dont le pronostic est difficile s'il n'est pas résectable. Les inhibiteurs de kinases utilisés dans cette indication sont d'efficacité modérée. En parallèle, d'autres ITK ont été développés et sont utilisés contre d'autres cancers.

## E. Autres inhibiteurs de tyrosine-kinases

### a) Ruxolitinib

Le ruxolitinib est un inhibiteur sélectif des Janus Kinases 1 et 2 (JAK1/JAK2). Ces kinases sont impliquées dans la signalisation de différents facteurs de croissance et cytokines responsables de l'hématopoïèse et de la fonction immunitaire. Il est indiqué dans le traitement des symptômes liés à la myélofibrose primitive (splénomégalie) ainsi que de la polyglobulie de Vaquez.

L'étude « COMFORT 2 » visait à évaluer le ruxolitinib chez 309 patients atteints de myélofibrose en le comparant à un placebo. La réussite du traitement était confirmée lors d'une réduction du volume de la rate d'au moins 35 % à l'IRM après 24 semaines. L'étude démontre que :

- L'objectif de traitement était atteint chez 41,9 % des patients dans le groupe recevant le ruxolitinib contre 0,7 % des patients dans le groupe placebo ( $p < 0,001$ ).
- Une amélioration de plus de la moitié du score des symptômes (défini par l'étude) était observée chez 45,9 % des patients traités par ruxolitinib contre 5,3 % des patients traités par placebo ( $p < 0,001$ ).
- Treize patients étaient décédés dans le groupe ruxolitinib contre vingt-quatre dans le groupe placebo (HR 0,5 [0,25 ; 0,98]<sub>0,04</sub>).

- Des effets indésirables (anémies et thrombocytopénies) étaient observés plus fréquemment dans le groupe des patients traités par ruxolitinib.

Le ruxolitinib apporte donc de solides arguments en faveur de son utilisation dans ces indications<sup>44</sup>.

En conséquence, la HAS accordait au Jakavi® en 2013 dans l'indication « Myelofibrose primaire ou secondaire à une maladie de Vaquez » un SMR important et une ASMR modérée (III).

#### b) Lapatinib

Le lapatinib est un inhibiteur des domaines intracellulaires des tyrosine-kinases ErbB1 (EGF-R) et ErbB2 (HER-2). Il inhibe in vitro la croissance des cellules tumorales ErbB dépendantes chez plusieurs espèces animales. Il est indiqué dans la prise en charge du cancer du sein surexprimant les récepteurs HER-2 en association à la capécitabine, au trastuzumab ou à un inhibiteur de l'aromatase. La surexpression de HER-2 concerne 20 à 30 % des cancers du sein<sup>45</sup>.

L'étude « EGF100151 » compare l'association lapatinib + capécitabine à la capécitabine seule, chez 399 patientes en seconde ligne de traitement d'un cancer du sein surexprimant HER-2. Les résultats démontraient la supériorité de l'association comparée à la monothérapie sur la survie sans progression (36,9 semaines contre 19,7 semaines, HR = 0,51 [0,34 ; 0,74]<sub>0,05</sub> p < 0,0001)<sup>46</sup>. Il est à noter que cette étude n'incluait pas d'hommes atteints de cancers du sein.

Une autre étude, « EGF104900 » publiée en 2010 dans le JCO, compare le lapatinib seul au lapatinib associé au trastuzumab. Les patients inclus dans l'étude étaient atteints de cancer du sein HER-2 positif et avaient déjà subi un échec thérapeutique avec le trastuzumab. L'étude démontrait la supériorité légère de la bithérapie sur la survie sans progression (HR = 0,73 [0,57 ; 0,93]<sub>0,05</sub> p < 0,008)<sup>47</sup>.

En conséquence, la HAS accorde au Tyverb® en seconde ligne dans le cancer du sein, associé au Xeloda® (capécitabine) un SMR important et une ASMR de niveau III, modérée. Associé à l'Herceptin® (trastuzumab), le SMR accordé est « modéré » et l'ASMR est de niveau V, absente.

Le lapatinib apporte une alternative thérapeutique au trastuzumab dans la prise en charge du cancer du sein métastatique surexprimant HER-2. L'arrivée du pertuzumab diminuera probablement encore l'intérêt du Tyverb®.

#### c) Vandetanib

Le vandetanib est un inhibiteur de tyrosine kinase agissant sur la partie intracellulaire du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR-2), ainsi que du facteur de croissance épidermique EGF-R et du récepteur kinase RET. Il est indiqué dans le traitement des patients atteints de cancer médullaire de la thyroïde (CMT) agressif localement avancé ou métastatique.

L'étude 58/ZETA de phase III comparait le vandetanib 300 mg/j à un placebo chez 331 patients atteints de cancer médullaire de la thyroïde localement avancé ou métastatique. Les résultats de l'étude suggèrent une survie sans progression supérieure dans le groupe vandetanib comparée au placebo (30,5 mois contre 19,3 mois respectivement,  $p = 0,0001$ ). Aucune différence de survie globale n'a pu être mise en évidence au cours de cette étude. Seuls 56,5 % des patients de l'étude étaient porteurs de la mutation RET positive.

En conséquence, la HAS accordait au CAPRELSA en 2012 un SMR important et une ASMR de niveau IV, c'est-à-dire mineure.

Ces ITK ont globalement un intérêt en clinique. Ils améliorent le pronostic de certaines pathologies, parfois drastiquement, ils entraînent moins d'effets indésirables que les chimiothérapies cytotoxiques, et sont plus simples et plus maniables. Les facteurs d'échec aux traitements sont nombreux et pour certains peuvent être corrigés. Parmi les outils disponibles pour prévenir ces échecs et optimiser le traitement, le suivi thérapeutique pharmacologique a démontré son efficacité.

## F. Le suivi thérapeutique pharmacologique des inhibiteurs de tyrosine-kinases

### 1. Suivi thérapeutique pharmacologique

Le « Standards of Laboratory Practice Committee » de l'association internationale de suivi thérapeutique pharmacologique et de toxicologie clinique (international association of therapeutic drug monitoring and clinical toxicology) propose une définition du STP :

« Le STP est une spécialité clinique multidisciplinaire visant à l'amélioration du soin des patients en adaptant individuellement la posologie du médicament pour lequel l'expérience clinique ou les essais cliniques ont montré qu'il a amélioré l'efficacité dans les populations générales ou spéciales. Il peut être basé *a priori* sur la pharmacogénétique, les informations démographiques et cliniques et/ou *a posteriori* sur la mesure des concentrations sanguines en médicament (suivi pharmacocinétique) ainsi que des biomarqueurs (suivi pharmacodynamique).

Le STP *a priori* consiste à déterminer la dose initiale qui doit être administrée à un patient, basée sur un objectif clinique et établie sur des relations pharmacocinétique de population / pharmacodynamique (PKpop/PD). Ces relations permettent d'identifier des sous-populations de patients nécessitant des posologies différentes en utilisant des données démographiques et cliniques, des résultats de biochimie clinique, et/ou, si possible, les caractéristiques pharmacogénétiques.

Le STP *a posteriori* inclut des phases pré-analytiques, analytiques et post-analytiques, ayant chacune la même importance. Il consiste le plus souvent en un dosage spécifique, exact et précis, au bon moment, de formes actives et/ou toxiques d'un médicament dans les échantillons biologiques recueillis aux temps appropriés dans des contenants corrects (suivi PK), ou peut employer la mesure de biomarqueurs comme un marqueur d'efficacité (suivi PD), par exemple la concentration d'un composé endogène, l'activité enzymatique, ou encore l'expression de gènes, comme complément au suivi PK, voire comme outil principal du STP.

Le STP *a posteriori* exige l'interprétation des résultats en tenant compte des conditions pré-analytiques, des renseignements cliniques et de l'efficacité de la posologie actuelle. Cela peut impliquer la modélisation PK/PD. De plus, il peut profiter des approches PKpop/PD potentiellement combinées avec des techniques d'adaptation individuelle pharmacocinétique, voir des données pharmacogénétiques. »

## 2. Propriétés pharmacocinétiques des ITK

Les paramètres pharmacocinétiques des ITK leur confèrent un avantage comparé aux chimiothérapies classiques. Une prise par voie orale quotidienne, une marge thérapeutique plus large, une bonne diffusion dans les fluides de l'organisme sont des arguments apportant une simplicité d'utilisation et une bonne maniabilité. C'est vrai d'une part en comparaison avec les chimiothérapies injectables classiques, mais d'autre part vis-à-vis des thérapies « ciblées » injectables, telles que les anticorps monoclonaux.

Les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'excrétion sont relativement homogènes à quelques exceptions :

### a) Absorption

Les ITK sont administrés par voie orale. La clairance orale est variable : le ruxolitinib est résorbé à 98 % tandis que le pazopanib ne l'est qu'autour de 14 à 40 %. Ce dernier possède une absorption très variable d'un individu à un autre, ceci à l'origine d'une forte variabilité inter-individuelle et chez un même individu, d'où variabilité intra-individuelle. Pour la plupart des molécules, la prise concomitante à un repas augmente ou diminue l'absorption. Les pics plasmatiques de concentration sont atteints pour tous les ITK en moins de 6 heures.

### b) Distribution

La liaison aux protéines plasmatiques est très forte pour la plupart des ITK. En effet, comme nous le détaillons par la suite, ces molécules possèdent de nombreuses fonctions amines dans leur structure, leur conférant un caractère basique. À pH sanguin, celles-ci sont ionisées et sont en conséquence prises en charge par les protéines de transport, telles que l'albumine (ALB), ou l' $\alpha$ -glycoprotéine acide (AGP). Les distributions sont variables, mais globalement suffisantes.

### c) Métabolisation

Quasi toutes sont biotransformées par les cytochromes hépatiques, notamment le complexe P450 3A4. Seul l'afatinib ne subit aucune métabolisation. Certains ITK possèdent des métabolites actifs. C'est le cas de l'imatinib, du sunitinib, du regorafenib (2 métabolites), du sorafenib, du dabrafenib et de l'erlotinib. Pour certains, la demi-vie du métabolite va être longue et il ne pourra être exclu une incidence de leur concentration plasmatique sur l'efficacité globale du médicament. En conséquence, l'adaptation posologique dans le cadre du STP devra tenir compte aussi de l'exposition aux métabolites.

Molécules	Absorption		Distribution		Métabolisme	Excrétion	Élimination T <sub>1/2</sub>
	F	Pic	Vd	Liaison PP			
Ruxolitinib JAKAVI®	95 %	1 h	~60L	~ 97 %	Essentiellement hépatique via CYP3A4 et CYP2C9	22 % biliaire 74 % urinaire	3 h
Imatinib GLIVEC®	~98 %	2-4 h	295-590L	~95 % (Alb, AGP)	Essentiellement hépatique via CYP3A4/5; 1 métabolite actif (~16 % AUC imatinib)	68 % biliaire 13 % urinaire	18 - 22 h
Dasatinib SPRYCEL®	~80 %	0,5-3 h	2500L	~ 96 %	Essentiellement hépatique via CYP3A4	85 % biliaire 4 % urinaire	3 – 6 h
Nilotinib TASIGNA®	~30 % ☹☹	2-4 h	579-800L	~ 98 %	Essentiellement hépatique via CYP3A4	Exclusivement biliaire	17 h
Bosutinib BOSULIF®	ND ☹☹	6h	10000L	~96 %	Essentiellement hépatique via CYP3A4	Principalement biliaire (~92 %)	34h
Ponatinib ICLUSIG®	ND	4h	1100L	>99 %	Essentiellement hépatique via CYP3A4	87 % biliaire 5 % urinaire	22 h
Vandetanib CAPRELSA®	ND	4-10h	7500L	~94 %	Essentiellement hépatique via CYP3A4	60 % biliaire 30 % urinaire	19 j
Sunitinib SUTENT®	ND	6-12 h	2230L	~95 %	Essentiellement hépatique via CYP3A4. 1 métabolite actif (~20 % AUC sunitinib)	61 % biliaire 16 % urinaire	40 – 60 h
Pazopanib VOTRIENT®	14-39 % ☹☹	2-4 h	~9-13L	~ 99 %	Essentiellement hépatique via CYP3A4	Principalement biliaire (~90 %)	30 h
Axitinib INLYTA®	58%	4 h	160L	>99 %	Essentiellement hépatique via CYP3A4	60 % biliaire 23 % urinaire	2,5 – 6 h
Regorafenib STIVARGA®	<70% ☹☹	3,5-4h	76L	~99,5 %	Hépatique via CYP3A4 et UGT1A9. 2 métabolites actifs (>50% AUC regorafenib)	71 % biliaire 19 % urinaire	20 – 30 h 60 h pour RMS
Sorafenib NEXAVAR®	38-49% ☹☹	2-6 h	213-400L	~99,5 %	Hépatique via CYP3A4 et UGT1A9. 1 métabolite actif	77 % biliaire 19 % urinaire	25 – 48 h
Vemurafenib ZELBORAF®	ND ☹☹	4h	90L	>99 %	Essentiellement hépatique via CYP3A4	Principalement biliaire (>90 %)	50 h
Dabrafenib TAFINLAR®	95% ☹☹	2h	46L	~99,7 %	Hépatique via CYP3A4 et CYP2C8. 2 métabolites actifs (>50 % AUC dabrafenib)	71 % biliaire 23 % urinaire	8 – 10 h
Crizotinib XALKORI®	43 %	4-6 h	1700L	~ 91 %	Essentiellement hépatique via CYP3A4	63 % biliaire 22 % urinaire	42 h
Erlotinib TARCEVA®	~59 % ☹☹	4 h	232L	~95 % (Alb, AGP)	Essentiellement hépatique via CYP3A4 et CYP1A2; 2 métabolites actifs (~10 % AUC erlotinib)	Principalement biliaire (>90 %)	36 h
Gefitinib IRESSA®	~59 %	3-7 h	1400L	~90 % (Alb, AGP)	Essentiellement hépatique via CYP3A4/5 et CYP2D6	Principalement biliaire (>90 %)	42 h
Afatinib GIOTRIF®	ND ☹☹	2-5 h	4500L	~95 %		Principalement biliaire (>85 %)	37 h
Lapatinib TYVERB®	ND ☹☹	4 h	2200L	>99% (Alb, AGP)	Essentiellement hépatique via CYP3A4/5 et CYP2C19, 2C8	Principalement biliaire (>90 %)	24 h

Tableau 1: propriétés pharmacocinétiques des principaux ITK.

#### d) Élimination

Les demi-vies d'élimination sont très variables. Cela va de 3 à 6 heures pour le dasatinib, à plusieurs dizaines de jours pour le vandetanib. Les voies d'excrétions varient en fonction des molécules, la voie biliaire étant globalement la principale.

Ainsi, les ITK ont une pharmacocinétique relativement homogène, avec tout de même quelques différences à souligner. L'application de ces données dans le cadre du STP devra tenir compte de leurs individualités afin d'être pertinente. Ces données de cinétique sont regroupées dans le Tableau 1. La connaissance de ces données sera indispensable afin de guider au mieux les cliniciens au cours du STP.

### 3. Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique dans le traitement par inhibiteurs de tyrosines kinases

#### a) Imatinib

Le STP définit précédemment a démontré son utilité clinique dans de nombreuses classes pharmacologiques : anticonvulsivants de première génération, antibiotiques, antipsychotiques, immunosuppresseurs, antiviraux. Une des principales limites à son utilisation en cancérologie était alors l'absence de définition de relation exposition/réponse<sup>48</sup>.

Or, les ITK, plus récents, ont démontré qu'ils avaient des seuils d'efficacité ainsi que des concentrations inhibitrices bien définies. Ces concentrations pourraient alors être utilisées afin de réaliser un STP et ainsi permettre aux patients de tirer un bénéfice maximal de ces traitements, pour un risque minimal. L'imatinib, premier ITK, est naturellement le premier étudié dans le cadre du STP. Actuellement, il existe un niveau de preuve suffisant pour émettre des recommandations de concentrations plasmatiques cibles.

Une première étude de seuil réalisée par Picard *et coll.* démontrait l'existence d'un seuil d'efficacité situé autour de 1 000 ng/ml associé à une probabilité plus élevée d'atteindre une RMM<sup>49</sup>. Ce seuil a été par la suite confirmé de manière rétrospective via l'étude IRIS, ainsi que de manière prospective au travers de l'étude EUTOS

L'étude IRIS portait sur 351 patients atteints de LMC suivis pendant 5 ans, Larson *et coll.* y démontrent qu'à J29, une  $C_{min} > 1\,000$  ng/ml d'imatinib était un facteur prédictif de CCyR et de RMM (respectivement  $p = 0,01$  et  $p = 0,02$ )<sup>50</sup>.

A l'issu de l'étude « EUTOS » publiée en 2012 dans « Fundamental & Clinical Pharmacology », Bouchet *et coll.* démontrent chez 1216 patients européens qu'une  $C_{min}$  d'imatinib supérieure à 1 000 ng/ml et un traitement prolongé ( $> 4$  ans) étaient associés à une probabilité d'atteindre une réponse cytogénétique majeure plus élevée (Odds Ratios 2,08 [1,09 ; 2,99]<sub>0,05</sub> et 1,69 [1 ; 2,84]<sub>0,05</sub> respectivement). Les résultats sont présentés en Figure 5 et dans le Tableau 2. Il apparait de plus que de nombreux patients ont une dose résiduelle infra-thérapeutique, ce qui compromet la réussite du traitement.

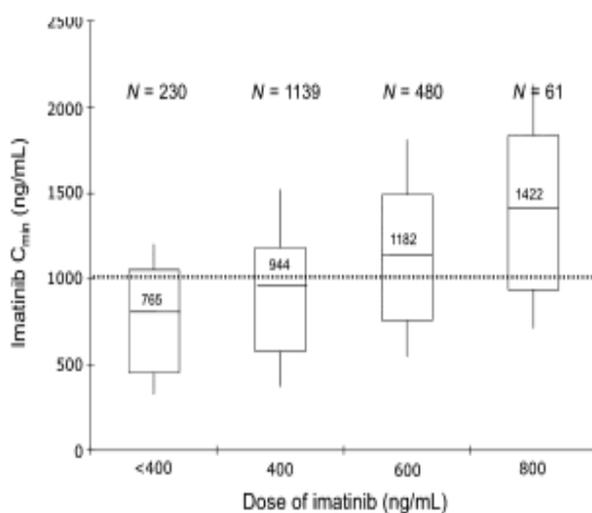


Figure 5: concentrations plasmatiques résiduelle en imatinib, en fonction de la posologie, d'après Bouchet *et coll.* Fundamental & Clinical Pharmacology 2012.

	Outcome, n (%)			
	MMR (n = 151)	No MMR (n = 126)	Odds ratio [CI]	P
Treatment duration (years)				
<4	85 (49%)	89 (51%)	1.00	0.0214
≥ 4	66 (64%)	37 (36%)	1.81 [1.09–2.99]	
Trough plasma $C_{min}$ (ng/mL)				
<1000	93 (50%)	93 (50%)	1.00	0.0481
≥ 1000	58 (64%)	33 (36%)	1.69 [1.00–2.84]	

	Outcome, n (%)			
	CMR (n = 41)	No CMR (n = 236)	Odds ratio [CI]	P
Treatment duration (years)				
<4 years	17 (10%)	157 (90%)	1.00	0.0047
≥ 4 years	24 (23%)	79 (77%)	2.68 [1.35–5.32]	
Trough plasma $C_{min}$ (ng/mL)				
<1000	21 (11%)	165 (89%)	1.00	0.0360
≥ 1000	20 (22%)	71 (78%)	2.08 [1.05–4.13]	

Tableau 2 : régression logistique de la RMM (MMR) et RCM (CMR) en fonction de la durée du traitement et des concentrations plasmatiques résiduelles, d'après Bouchet *et coll.* Fundamental & Clinical Pharmacology 2012.

D'autre part, chez 73 patients atteints de GIST, Demetri *et coll.* reportent que les patients ayant une  $C_{min} > 1\,100$  ng/ml ont un temps avant progression de la tumeur supérieur ( $p = 0,0029$ ) et un bénéfice global au traitement amélioré ( $p = 0,0001$ ) comparé à ceux n'atteignant pas cette concentration résiduelle<sup>51</sup>. Cependant, la méthodologie par analyse de

quartiles n'a pas permis d'affiner cette valeur. De plus, l'équipe de Bouchet *et coll.* a montré que ce seuil pourrait se situer plutôt autour de 800 ng/ml.

Le suivi thérapeutique pharmacologique de l'imatinib apparaît donc indispensable afin d'optimiser la prise en charge des patients atteints de LMC et de GIST. Ce traitement chronique onéreux est plus efficace s'il est convenablement suivi. Le bénéfice médico-économique du STP dans ces indications est très probable. Il peut être alors intéressant d'étendre ce suivi à tous les ITK.

#### b) Dasatinib

Le dasatinib est l'inhibiteur de Bcr-Abl le plus puissant existant actuellement. Il inhibe la protéine de fusion avec une intensité 300 fois supérieure à l'imatinib et cible de nombreuses mutations. Cependant, c'est aussi celui qui entraîne de plus d'effets indésirables, notamment des pleurésies.

Lors des études *in vitro*, la concentration inhibitrice  $IC_{50}$  cible est de 48,8 ng/ml<sup>52</sup>. Une  $C_{max} > 50$  ng/ml pourrait être un objectif d'efficacité intéressant. De plus, cette concentration testée chez trois patients atteints de LMC, provoquait l'apoptose des cellules cancéreuses<sup>53</sup>.

Lors de l'étude dose réponse de Wang *et coll.*, les patients séparés en trois quartiles en fonction de leur  $C_{min}$  (< 2,5 ng/ml ; 2,5 à 5 ng/ml ; > 5 ng/ml) avaient une probabilité de développer une pleurésie respectivement de 4 %, 14 % et 25 %<sup>54</sup>.

Une autre étude suggère une corrélation entre  $C_{min}$  et toxicité : chez 191 patients atteints de LMC en phase chronique, une  $C_{min} > 1,5$  ng/ml à J15 était associée à un risque de pleurésie (suivi de 24 mois, 14,7 % contre 6,9 %  $p = 0,021$ )<sup>55</sup>.

Une  $C_{min} < 1,5$  ng/ml et  $C_{max} > 50$  ng/ml pourraient être des objectifs thérapeutiques intéressants. Cela doit être démontré au cours d'un essai de poids statistique adéquat.

### c) Nilotinib

Le nilotinib a démontré son intérêt dans la prise en charge de la LMC Philadelphie positive au cours des études cliniques présentées précédemment. Il pourrait également être intéressant dans le suivi de ce traitement chronique onéreux d'évaluer la réponse pharmacocinétique et pharmacodynamique afin d'en tirer un bénéfice optimal.

C'est l'objectif visé par l'étude de Richard *et coll.* chez 455 patients atteints de LMC traités par nilotinib. Cette analyse suggère qu'une  $C_{min} > 761$  ng/ml serait associée de manière significative à l'obtention de la RMM au bout de 12 mois de suivi (ROC de sensibilité à 76,2 % et spécificité à 77,8 %) chez les patients atteints de LMC<sup>56</sup>.

Il n'existe pas encore à ce jour de seuil toxique. Cependant une augmentation des concentrations en nilotinib est associée à une augmentation de l'intervalle QT corrigé. De plus, une corrélation positive significative a été observée entre AUC et effets indésirables connus du nilotinib<sup>57</sup>.

Plasma concentration (ng/mL)

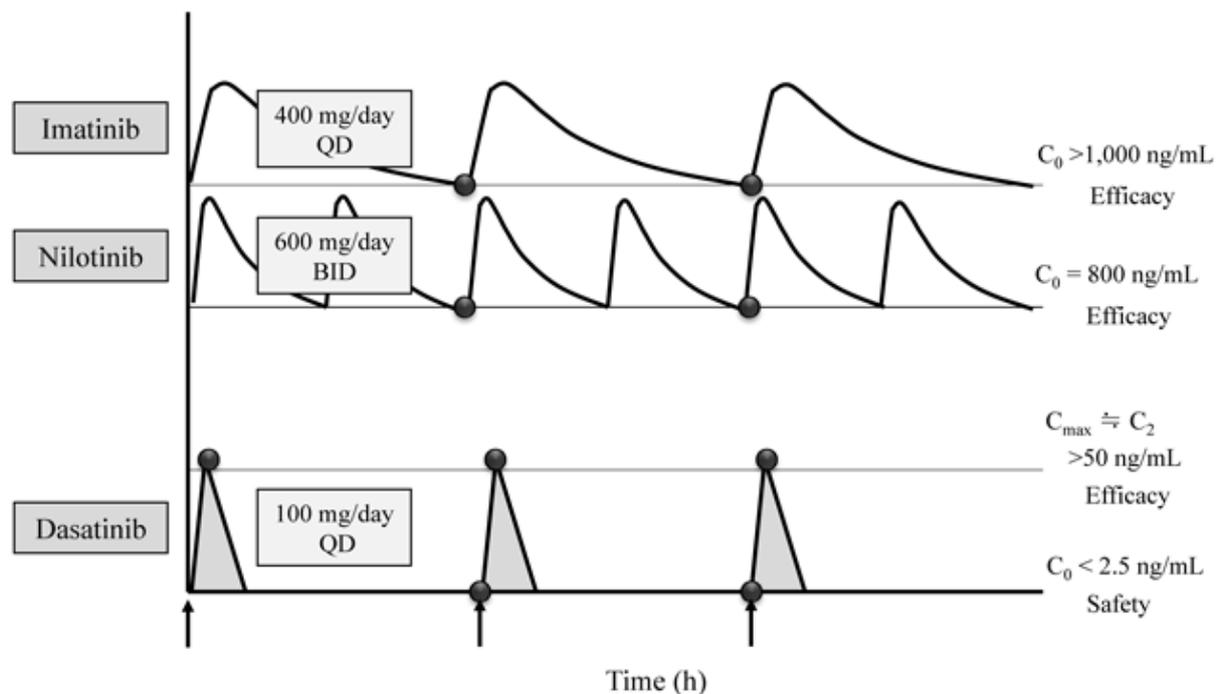


Figure 6 : concentrations plasmatiques cibles du dasatinib, de l'imatinib et du nilotinib, d'après Miura *et coll.*, *Biological and Pharmacological Bulletin* 2015

Il pourrait être intéressant pour cette molécule de définir des seuils de concentrations efficaces et toxiques au cours d'autres investigations. Ces études intéressent à la fois le nilotinib, mais également les autres ITK. Actuellement, le dasatinib, le nilotinib et l'imatinib ont été évalués sur un nombre de patients importants. Il est possible d'adapter les posologies au regard des concentrations plasmatiques avec un niveau de preuve suffisant. Les paramètres de STP pour ces médicaments sont présentés en Figure 6.

#### d) Ponatinib

Le ponatinib détient une AMM dans la LMC depuis 2015. Relativement récent, il n'existe pas encore de publication permettant d'établir avec certitude des seuils d'efficacité et de toxicité. Cortes *et coll.* proposent au décours de l'étude PACE de phase II une  $C_{min}$  de 21,9 ng/ml qui serait associée à une suppression de la protéine Bcr-Abl.

En parallèle, le ponatinib est responsable d'effets indésirables potentiellement graves : thromboses artérielles, thrombocytopénies, éruptions cutanées. Une corrélation entre concentration plasmatique, efficacité et toxicité devrait être réalisable. Cette analyse permettrait d'optimiser au mieux l'efficacité du ponatinib, tout en réduisant la probabilité d'induire des effets indésirables chez les patients traités.

Tout comme ses prédécesseurs, et notamment le dasatinib, le ponatinib pourrait révéler son potentiel grâce à un STP approprié.

#### e) Bosutinib

Le bosutinib est un inhibiteur de Bcr-Abl, arrivé récemment sur le marché en Europe. Il existe actuellement quelques études de dose / réponse intéressant cette nouvelle molécule.

L'étude de Hsyu *et coll.* portant sur 749 patients propose des concentrations seuils afin de prédire la réussite du traitement : comme présenté Figure 7, la probabilité d'atteindre à 1 an une CCyR, une MMR et une CHR augmente conjointement à la  $C_{min}$ . De plus, sans proposer de dose maximale toxique, l'étude suggère un lien fort entre concentration plasmatique et apparition d'effets indésirables (éruptions cutanées ou diarrhée)<sup>58</sup>.

Cependant, cette étude ne permet pas de définir une  $C_{min}$  cible d'efficacité, et encore moins une  $C_{max}$  de toxicité. Seule une probabilité de réussite du traitement à 1 an peut être proposée au regard de la  $C_{min}$ .

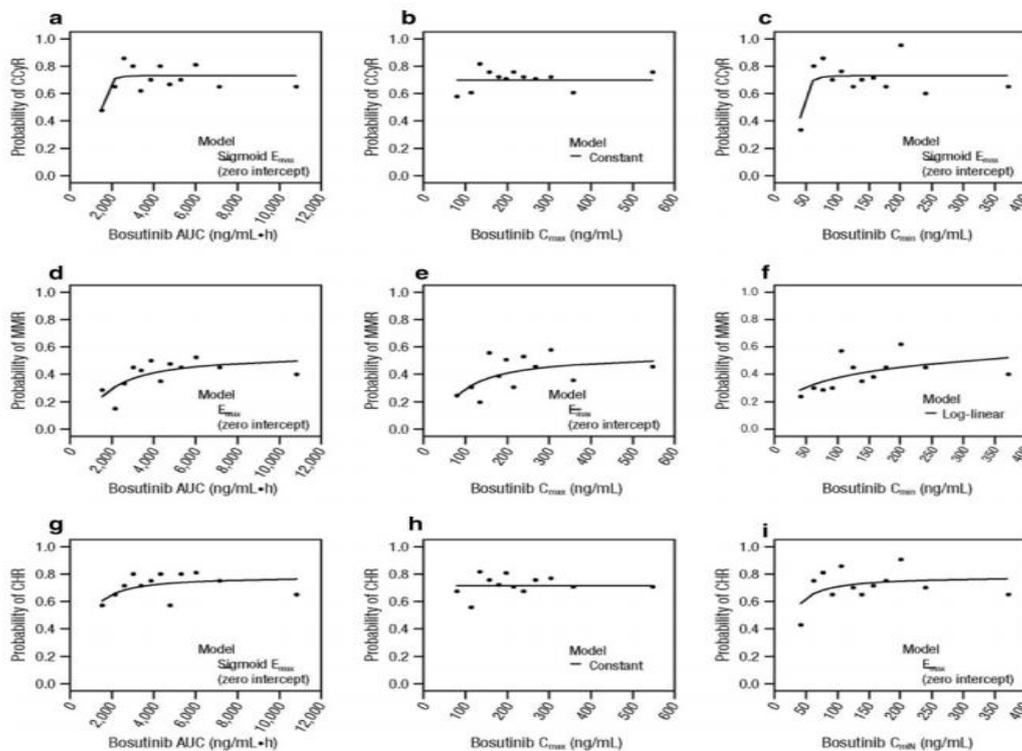


Figure 7: probabilités de réponse à 1 an comparé à l'exposition au bosutinib chez des patients atteints de LMC Ph(+): CCyR (a, b et c), MMR (d, e, f) et CHR (g, h, i), d'après Hyus et coll. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, Aug 2012.

Le bosutinib est donc un bon candidat au STP, il est malheureusement trop tôt aujourd'hui pour proposer aux cliniciens des concentrations seuils d'efficacité et de toxicité.

#### f) Gefitinib

Il existe peu d'études ayant exploré la relation entre exposition au gefitinib et réponse thérapeutique.

Une étude de Zhao *et coll.* met en évidence chez 30 patients (dont 10 % de patients ne portant pas la mutation EGFR) qu'une  $C_{min} > 200$  ng/ml était associée à une survie globale moyenne de 14,6 mois (contre 4,7 mois  $p < 0,009$ ) ainsi qu'une incidence de la survenue d'éruptions cutanées supérieure (85,7% contre 42,9%  $p = 0,043$ )<sup>59</sup>.

Dans la majorité des cas, la survenue d'éruptions cutanées était associée à une meilleure réponse au traitement. Il n'existe pas à ce jour de paramètre pharmacocinétique discriminant entre efficacité et éruptions cutanées. La courbe de survie est présentée en Figure 8.

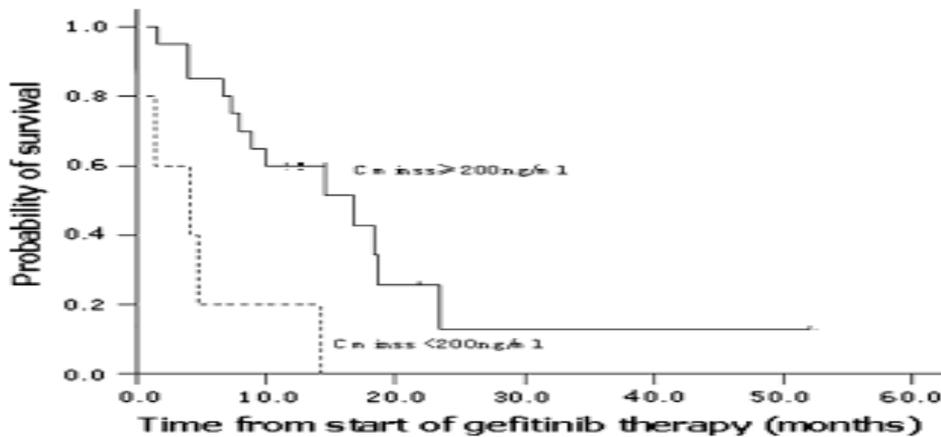


Figure 8: Courbes de survie globale chez des patients atteints de CBNPC traités par gefitinib en fonction de leurs concentrations plasmatiques, d'après Zhao et coll. *Med. Oncol.* 2011.

Cet évènement indésirable (éruptions cutanées) est commun à tous les inhibiteurs de tyrosine-kinases ciblant ErbB, incluant l'erlotinib.

#### g) Erlotinib

Tout comme son prédécesseur le gefitinib, peu d'études ont démontré la corrélation dose effet de l'erlotinib. Les études s'intéressant à cette problématique n'ont globalement pas pu mettre en évidence de dose effectrice cible.

Une étude de Soulière *et coll.* démontre que la survenue d'une éruption cutanée de grade 2 ou supérieure était associée à une meilleure efficacité du traitement (chez des patients atteints de cancer des cellules squameuses de la tête et du cou). La survie globale était plus longue dans ce groupe de patients ( $p = 0,045$ )<sup>60</sup>. De plus, la  $C_{min}$  dans les deux groupes n'était pas statistiquement différente (803 ng/ml contre 1 097 ng/ml,  $p = 0,49$  ;  $n = 115$ ).

Défaut de puissance ou non, il semblerait que la toxicité cutanée soit un signe de bonne imprégnation au traitement par les inhibiteurs d'EGF-R. L'étude précédente indique que la toxicité de grade 2 était retrouvée chez 79 % des patients à dose initiale (150 mg/jour) et

l'augmentation des doses par paliers afin d'atteindre un tel niveau de toxicité n'apportait pas d'amélioration des taux de réponse.

Une étude de Tiseo *et coll.* indique qu'une  $C_{\min} > 1\ 810$  ng/ml pouvait être prédictive de la survenue d'une toxicité cutanée (grade 0-2 contre grade 3) avec une sensibilité de 70% et une spécificité de 70%. Cette toxicité était associée à une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale comme présenté Figure 9. Paradoxalement, l'étude démontre que cette concentration n'est pas prédictive d'une réponse (survie sans progression :  $p = 0,127$  ; survie globale  $p = 0,351$ )<sup>61</sup>.

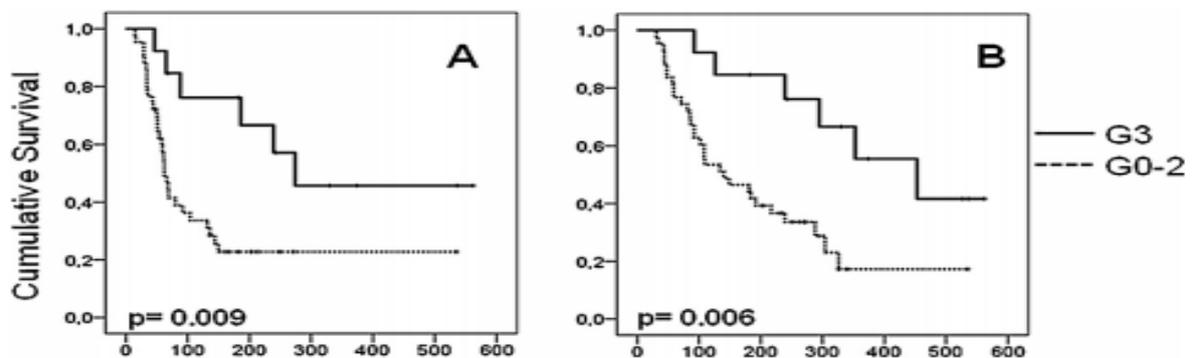


Figure 9: courbes de Kaplan-Meier de la survie sans progression (A) et de la survie globale (B) en fonction de la toxicité cutanée (grade 0-2 contre grade 3), d'après Tiseo *et coll.* Lung Cancer 2014.

Dans ce contexte, seule l'étude préclinique proposée par Hidalgo *et coll.* propose une  $C_{\min} > 500$  ng/ml afin d'atteindre une inhibition d'EGF-R suffisante chez l'homme<sup>62</sup>.

Aucun paramètre pharmacocinétique n'apporte une corrélation de certitude entre dose, efficacité et effets indésirables pour l'erlotinib. La survenue d'une éruption cutanée de grade 3 est un signe d'efficacité du traitement. La question de la qualité de vie du patient dans ces conditions, condamné à quelques mois de survie dans le cas du CBNPC métastatique, est centrale.

#### h) Afatinib

L'afatinib, récemment mis à la disposition des patients, a démontré son efficacité dans le CBNPC notamment EGF-R muté. Il n'existe à ce jour aucune étude ayant défini d'une part une corrélation entre concentrations plasmatiques maximales / minimales et réponse ou effets

indésirables du traitement. Cependant, une telle étude aurait un fort intérêt, d'autant que l'afatinib est un traitement chronique qui provoque des effets indésirables pouvant nuire à la qualité de vie du patient.

L'afatinib, au même titre que le gefitinib et l'erlotinib est un inhibiteur d'ErbB. Ces trois médicaments provoquent des toxicités cutanées. Il a été démontré pour le gefitinib et l'erlotinib que ces évènements indésirables étaient dose dépendants et pouvaient être corrélés à une efficacité. Il est probable que, par effet classe, l'afatinib puisse se comporter comme les deux autres molécules anti-ErbB. Dans ce contexte, des concentrations seuils de toxicité et d'efficacité pourraient être intéressantes à établir. Ceci permettrait de guider la prise en charge thérapeutique des patients traités par afatinib, et ainsi d'optimiser au maximum l'efficacité de ce traitement.

#### i) Crizotinib

Le crizotinib, inhibiteur d'ALK mutée, est un ITK relativement récent. Il n'existe pas encore d'étude de poids statistique important permettant d'indiquer des seuils thérapeutiques et toxiques significatifs.

Malgré tout, quelques études suggèrent qu'une  $C_{min}$  autour de 250 ng/ml serait associée à une inhibition suffisante de la kinase ALK mutée, *in vitro*<sup>63</sup>. Aucune étude n'a défini de  $C_{max}$  limitante.

Le crizotinib pourrait également faire l'objet d'une étude plus approfondie. Définir des seuils d'efficacité et de toxicité serait de même intéressant pour affiner l'utilisation de cette molécule.

#### j) Axitinib

Il existe quelques publications de pharmacocinétique ainsi que quelques études de relation dose / réponse chez des patients atteints de carcinome rénal métastatique traités par axitinib. Ces analyses décrivent une corrélation entre première dose,  $AUC_{SS}$  et efficacité / effets indésirables.

Ainsi, une étude de Rini *et coll.* publiée en 2013 classait les patients en quartiles selon leurs

concentrations plasmatiques post première dose d'axitinib. Les patients ayant une  $C_{max}$  comprise entre 45,2 et 56,4 ng/ml ( $n = 12$ ) atteignaient la durée de survie sans progression la plus longue (28,3 mois) pour des effets indésirables acceptables<sup>64</sup>. Les patients du quartile 4 ayant la  $C_{max}$  post première dose la plus élevée avaient la plus forte probabilité de développer un évènement indésirable de grade 3 ou supérieur. Si elle indique bien une corrélation entre dose et activité, cette étude souffre d'un poids statistique insuffisant.

Le marqueur le plus connu de suivi de l'axitinib est la pression artérielle diastolique (PAD). Rini *et coll.* démontrent un lien entre PAD supérieure à 90 mmHg et risque relatif de décès diminué (Hasard ratio = 0,55 [0,39 ; 0,77]<sub>0,05</sub>  $p < 0,001$ )<sup>65</sup>. La pression artérielle est donc un bon marqueur de l'imprégnation au traitement par axitinib. De plus, une PAD supérieure à 105 mmHg serait associée à la survenue plus fréquente d'évènements indésirables.

Une autre étude que publient Rini, Motzer *et coll.* propose des résultats surprenants : la PAD et l'AUC seraient des marqueurs indépendants d'une plus longue survie sans progression et survie globale<sup>66</sup>. Les auteurs n'apportent pas d'explications supplémentaires à ce constat.

De plus, une seconde publication plus récente des mêmes auteurs réaffirme cette donnée, et indique que la pression artérielle et l'AUC n'étaient pas des paramètres de suivi suffisants. Les auteurs indiquent d'une part que la concentration plasmatique est un marqueur de suivi thérapeutique difficile à gérer dans le cas de l'axitinib, d'autre part que la PAD est un paramètre plus fiable pour réaliser ce suivi<sup>67</sup>.

La PAD est donc actuellement toujours le marqueur le plus fiable pour réaliser le suivi des patients traités par axitinib. La cible est comprise entre 90 et 105 mmHg en diastolique.

#### k) Sorafenib

Il n'existe pas encore à ce jour d'étude pharmacocinétique ayant défini avec certitude une concentration seuil d'efficacité ou de toxicité chez les patients atteints de CCRm traités par sorafenib. Il n'est possible de se baser que sur quelques études corrélant l'AUC avec l'efficacité, ou encore définissant des groupes de concentrations plasmatiques en fonction des évènements indésirables.

Une étude de Blanchet *et coll.* démontre que les patients ayant développé une erythrodysesthésie palmo-plantaire avaient une  $C_{min}$  significativement supérieure à ceux n'ayant pas présenté cet évènement indésirable (7 700 ng/ml contre 4 400 ng/ml en moyenne  $p = 0,0083$ )<sup>68</sup>. Cette étude suggère un lien fort entre dose et toxicité.

Une étude japonaise présentée par Fukudo *et coll.* définit chez 52 patients japonais atteints de CCRm et de cancer hépatocellulaire une  $C_{max}$  provoquant un syndrome main-pied (grade 2) à partir de 5 780 ng/ml et une hypertension artérielle à partir de 4 780 ng/ml<sup>69</sup>. Cependant, il n'existe pas à ce jour de dose cible  $C_{min}$  démontrant l'efficacité du sorafenib avec certitude.

Il serait donc intéressant de développer les investigations concernant le sorafenib, afin d'établir des doses seuils et plafonds avec un poids statistique suffisant et discernant efficacité et évènements indésirables avec précision. C'est un travail actuellement mené au CHU de Bordeaux à travers deux études, portées par le service d'hépto-gastro-entérologie.

#### l) Sunitinib

Une étude présentée par Houk *et coll.* chez 639 patients atteints de GIST ou de CCRm, traités par sunitinib, visait à définir la relation entre exposition, efficacité et tolérance. Cette analyse proposait également la relation entre ces paramètres et les taux de métabolite actif du sunitinib, le desethylsunitinib. Chez les patients atteints de CCRm, l'étude démontre la relation entre  $AUC_{SS}$  et survie globale ( $p < 0,001$ )<sup>70</sup>.

Plusieurs études démontrent que la  $C_{min}$  de sunitinib, indiqué dans le CCRm à la dose de 50 mg/jour, doit être supérieure à 50 ng/ml afin d'atteindre la probabilité de réponse la plus élevée<sup>71,72,73</sup>. De plus, il est proposé une dose  $C_{max}$  de 100 ng/ml au-delà de laquelle les effets indésirables étaient prépondérants et le bénéfice/risque du traitement n'était plus intéressant.

Par ailleurs, chez les patients atteints de GIST traités par sunitinib à la dose de 37,5 mg par jour et au regard des données bibliographiques des études de phase I et II dans cette

indication, les Néerlandais de l'équipe de Schellens, Beijnen et Huitema proposent une dose efficace  $C_{\min} > 37,5$  à 50 ng/ml et une dose limitante  $C_{\max} < 75$  à 100 ng/ml.

De nombreux auteurs ont étudié la relation dose activité du sunitinib. Celle-ci est aujourd'hui bien caractérisée. Il serait intéressant d'officialiser ces seuils au cours de recommandations et de proposer aux cliniciens ces indicateurs afin de les guider pour favoriser la meilleure prise en charge de leurs patients.

#### m) Pazopanib

Le pazopanib est connu pour sa grande variabilité inter-individuelle. Plusieurs publications s'y intéressent. L'étude de Imbs *et coll.* explique notamment cette disparité par une variabilité de la clairance orale apparente (CL/F) du pazopanib : chez 25 patients traités par cet ITK pendant 15 jours, la CL/F variait de 40% entre les individus<sup>74</sup>. Il apparaît intéressant alors de maîtriser cette variabilité grâce à un suivi approprié.

Parmi toutes les publications concernant les relations pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du pazopanib, celle de Suttle *et coll.* est remarquable. Chez 225 patients atteints de CCRm traités par pazopanib, la  $C_{\min}$  a été mesurée à la 4<sup>ème</sup> semaine. Concernant les patients dont la  $C_{\min}$  était supérieure 20 600 µg/ml, la survie sans progression était de 49,4 semaines, contre seulement 20,3 semaines chez les patients n'ayant pas atteints ce seuil ( $p = 0,0041$ ). Un gain de 30 semaines est rendu possible par un simple contrôle de la  $C_{\min}$  à 4 semaines de traitement.

Une étude de Djoek de Wit *et coll.* nous indique que le STP sera probablement difficile à réaliser au regard de la grande variabilité des concentrations plasmatiques intra-individuelles du pazopanib chez les patients<sup>75</sup>. Cependant, cette étude n'inclut que 13 patients, sur une durée très courte (2 fois 2 semaines). L'exploration de cette variabilité doit être approfondie afin de comprendre les mécanismes impliqués et de les prévenir pour d'optimiser la prise en charge thérapeutique des patients.

#### n) Lapatinib

La relation concentration effet du lapatinib n'a que peu été explorée à l'heure actuelle. Seules quelques études sont disponibles afin de l'estimer au mieux. Parmi celles-ci, une étude de phase I indique que la majorité des répondeurs à cette molécule auraient une concentration plasmatique résiduelle  $C_{\min}$  située entre 300 et 600 ng/mL (n = 67). Cependant, l'étude est préliminaire, les populations sont hétérogènes et sa durée était très limitée dans le temps. Il serait intéressant de définir au cours d'un essai de poids statistique suffisant des concentrations efficaces et toxiques.

#### o) Regorafenib

À ce jour il n'existe pas d'étude étudiant spécifiquement les concentrations plasmatiques de regorafenib et les réponses et toxicités observées. Les études de pharmacocinétiques publiées ne font pas état de dose seuils efficaces ou toxiques<sup>76</sup>, mais seulement suggèrent une linéarité entre dose administrée et effets indésirables. Deux métabolites du regorafenib sont actifs : le regorafenib M2 et le regorafenib M5. Le dosage de ces deux composés additionné à celui du regorafenib sera utile lors des définitions de relation dose/réponse.

#### p) Vemurafenib

Le vemurafenib, nouveau venu dans la famille des inhibiteurs de protéines kinases, n'a pas encore bénéficié d'études de définition de seuil pharmacocinétique pharmacodynamique. Il existe toutefois quelques publications exploratoires.

Une étude de phase I indiquait que les patients traités par vemurafenib à la posologie de 960 mg 2 fois par jour atteignaient des  $C_{\max}$  comprises entre 26 000 et 58 000 ng/ml (N = 32) le tout en ayant une tolérance relativement bonne. Cette  $C_{\max}$  est très stable, car la demi-vie du vemurafenib est aux alentours de 50 heures. De plus, une relation entre dose administrée et effets indésirables avait pu être démontrée<sup>77</sup>.

La définition de doses efficaces et toxiques pourrait permettre également dans le cas du vemurafenib d'adapter les doses à chaque individu et d'optimiser l'efficacité du traitement.

#### q) Dabrafenib

Tout comme le vemurafenib, le dabrafenib est très récemment arrivé dans l'arsenal thérapeutique. Les résultats des études cliniques, comme présentés précédemment, sont encourageants, mais ce n'est pas encore le médicament qui entrainera la guérison certaine des patients.

Quelques études préliminaires suggèrent une relation entre la dose administrée et l'efficacité clinique. De plus, les études précliniques indiquent une activité des métabolites (desmethyl-dabrafenib et hydroxy-dabrafenib) qui pourrait être significative, notamment pour ceux de demi-vie plus longue<sup>78</sup>.

Il conviendra de mettre en évidence la relation entre concentration et efficacité / effets indésirables puis dans un second temps de définir des seuils.

#### r) Vandetanib

Au cours des études précliniques, le vandetanib a montré une action inhibitrice sur la kinase portée par les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Les  $CI_{50}$  associées étaient respectivement de 238 ng/ml et de 19 ng/ml. Le vandetanib apportait une inhibition complète de la prolifération de cellules issues de carcinome papillaire thyroïdien à partir de 2 377 ng/ml<sup>79</sup>.

Au cours des études de phase I, la concentration minimale de vandetanib à l'équilibre était comprise entre 1 000 et 1 497 ng/ml aux posologies usuelles (la demi-vie étant d'environ une centaine d'heures)<sup>80</sup>.

Dans ce contexte, définir une dose seuil pour l'efficacité de cette molécule n'est pas possible. Cependant, tout comme les autres ITK, d'autres études seraient intéressantes afin de comprendre les mécanismes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques d'efficacité.

#### s) Ruxolitinib

Le ruxolitinib a lui aussi obtenu une AMM récemment. Les résultats encourageants obtenus lors des essais cliniques lui confèrent un intérêt particulier. En conséquence, quelques publications déjà de pharmacocinétique ont été proposées.

Une publication de Shi *et coll.* indique qu'une inhibition de la voie JAK/STAT serait atteinte *in vitro* à partir d'une concentration supérieure à 225 nM, c'est-à-dire à partir de 70 ng/ml environ. L'inhibition totale et durable de JAK/STAT étant délétère pour le patient, considérant son rôle central dans l'hématopoïèse, seule une exposition de quelques heures à des concentrations inhibitrices de ruxolitinib est souhaitable. Par conséquent, la dose proposée par l'étude de phase I était de 25 mg 2/J. Elle correspond chez le petit groupe de patients (n = 18) concernés par l'étude à des C<sub>max</sub> aux alentours de 300 ng/ml et une C<sub>min</sub> autour de 30 ng/ml<sup>81</sup>. La cible thérapeutique pourrait se trouver entre ces deux bornes.

Cependant, aucune publication de STP n'est à ce jour disponible. L'intérêt d'un suivi portant sur cette molécule sera fort, dans la mesure où c'est un traitement chronique, prometteur et très sensible aux variations d'activité du CYP3A4. En effet, lors de co-administration de ruxolitinib et de ketoconazole, l'AUC du ruxolitinib augmentait de 91 %, entraînant une recrudescence des effets indésirables. De même, la co-administration avec la rifampicine diminuait l'AUC de 71 %<sup>82</sup>, entraînant des conséquences sur son activité anti-tumorale.

Le STP du ruxolitinib pourra donc être un outil prometteur qui apportera aux cliniciens des solutions afin de les guider dans leurs choix thérapeutiques. C'est déjà le cas pour de nombreux médicaments, ainsi que pour les premiers inhibiteurs de tyrosine-kinases.

#### 4. Conclusion

Pour terminer ce chapitre sur le STP, toutes les données présentées précédemment ont été regroupées dans le Tableau 3. Il indique pour chaque médicament son nom commercial, les indications, les posologies usuelles, les concentrations minimales et maximales plasmatiques proposées, ainsi que le temps de C<sub>max</sub> et le T<sub>1/2</sub>. Les C<sub>min</sub> et C<sub>max</sub> proposées sont accompagnées d'un indice du niveau de preuve des publications retrouvées dans la littérature. Cinq niveaux de preuve ont été définis :

- Niveau I (Preuve scientifique établie) : plusieurs études réalisées, randomisées, de puissance suffisante, ou méta-analyse d'essais comparatifs randomisés, ou analyse de décision fondée sur des études bien menées.

- Niveau II (Présomption scientifique) : essais comparatifs randomisés de faible puissance ou études comparatives non randomisées bien menées, ou études de cohortes.
- Niveau III (Faible niveau de preuve scientifique) : études comparatives comportant des biais importants, études rétrospectives, séries de cas, études épidémiologies descriptives, ou études cas-témoins.
- Niveau IV (Très faible niveau de preuve) : concentration étudiée sur un modèle animal ou pré-clinique, ou faible série de cas.
- Niveau V (Aucune preuve) : concentrations issues des études de phase I chez l'homme. Les concentrations proposées dans le tableau pour ce niveau de preuve sont les médianes issues des essais de pharmacocinétiques de phase I.

Cette échelle permet de situer rapidement le niveau de preuve des concentrations plasmatiques proposées. Ainsi, il sera aisément possible de confronter les concentrations plasmatiques mesurées chez les patients aux données de la littérature, et guider au mieux les cliniciens. De plus, ces propositions pourront être faites tout en gardant un certain recul sur la validité de ces données. Ce tableau devra être dynamique.

En conclusion, de nombreuses publications démontrent l'intérêt pour les patients traités par ITK de réaliser un STP. Ceci permet d'identifier au plus tôt les patients à risque d'échec, ou de toxicité, et de les prévenir. Ce STP devra s'appuyer sur des outils analytiques afin de mesurer de manière fiable et précise les concentrations plasmatiques de ces médicaments. Ces outils analytiques devront être choisis pertinemment au regard des caractéristiques physico-chimiques de ces molécules. Ainsi, au cours de la partie suivante, nous expliquerons pourquoi nous avons choisi l'extraction en phase solide, la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse pour réaliser ces analyses.

Médicament	Indications et posologie	Concentrations cibles à l'équilibre		PK		RQ
		C <sub>min</sub>	C <sub>max</sub>	T <sub>MAX</sub>	T <sub>1/2</sub>	
Afatinib GIOTRIF®	CBNPN EGF-R muté 40 mg/J	~ 20 ng/ml [V]	~ 50 ng/ml [V]	2 – 5 h	37 h	D'après Freiwald et coll. <sup>83</sup>
Axitinib Inlyta®	CCRm 5mg 2/J	~ 10 ng/ml [V]	45,2 à 56,4 ng/ml [IV]	4 h	2,5 – 6 h	PAD ≥ 90 mmHg PAD ≤ 105 mmHg
Bosutinib Bosulif®	LMC 500 mg/J	> 150 ng/ml [IV]	< 600 ng/ml [V]	6 h	34 h	
Crizotinib XALORKI®	CBNPC à ALK muté 500 mg/J	> 250 ng/ml [IV]		4-6 h	42 h	
Dabrafenib Tafinlar®	Mélanome à BRAF muté 150 mg 2/J	~ 50 ng/ml [V]	~ 1 400 ng/ml [V]	2 h	8 – 10 h	
Dasatinib Sprycel®	LMC, LLA (Ph+) 100 mg/J	< 1,5 ng/ml [I]	> 50 ng/ml [IV]	0,5 – 3 h	3 – 6 h	
Erlotinib Tarceva®	CBNPC (EGF-R muté) 150 mg/J Cancer du pancréas 100 mg/J	> 500 ng/ml [IV] < 1 800 ng/ml [III]		4 h	36 h	
Gefitinib Iressa®	CBNPC (EGF-R muté) 250 mg/J	> 200 ng/ml [III]		3 – 7 h	36 h	Eruption cutanée = imprégnation
Imatinib Glivec®	LMC (Ph+) GIST SMP/SMD 400 mg/J LAL (Ph+) 600 mg/J SHE 100 mg/J DFP 800 mg/J	> 1 000 ng/ml [II] > 800 ng/ml [III]		2 – 4 h	18 – 22 h	
Lapatinib Tyverb®	Cancer du sein à HER2 muté 1 250 mg/J	> 300 à 600 ng/ml [III]		4 h	24 h	
Nilotinib Tasigna®	LMC Ph(+) 400 mg/J	> 800 ng/ml [III]		2 – 4 h	17 h	
Pazopanib Votrient®	RCCm Sarcome des tissus mous 800 mg/J	> 20 600 ng/ml [II]		2 – 4 h	22 h	
Ponatinib Iclusig®	LMC Ph(+) actif sur T315I 45 mg/J	> 22 ng/ml [IV]		6 h	34 h	
Regorafenib Stivarga®	Cancer Colorectal métastatique, GIST 160 mg/J	~ 1 000 ng/ml [V]	~ 2 500 ng/ml [V]	3,5 – 4 h	20 – 30 h	Patients Japonais <sup>84</sup>
Ruxolitinib Jakavi®	Myélofibrose 15 ou 20 mg 2/J Maladie de Vaquez 10 mg 2/J	~ 30 ng/ml [IV]	~ 300 ng/ml [IV]	1 h	3 h	
Sorafenib Nexavar®	CHC, CCRm, Carcinome thyroïdien différencié 400 mg 2/J	< 5 800 ng/ml [III]		2 – 6 h	25 – 48 h	Patients Japonais
Sunitinib Sutent®	RCCm, GIST 50 mg/J (4 Sem) Fenêtre (2 Sem)	> 50 ng/ml [II] > 37,5 ng/ml [II]	< 100 ng/ml [III]	6 – 12 h	40 – 60 h	
Vandetanib Caprelsa®	Cancer Médullaire de la Thyroïde à RET muté 300 mg/J	1 000 à 1 497 ng/ml [IV]		4 – 10 h	19 jours	
Vemurafenib Zelboraf®	Mélanome BRAF muté 960 mg/J		26 000 à 58 000 ng/ml [III]	4 h	50 h	

Tableau 3: Indications, posologies, concentrations cible en fonction du niveau de preuve ([I], [II], [III], [IV], [V]), pic d'absorption et demi-vies des ITK.

### III. Caractéristiques physico-chimiques des inhibiteurs de tyrosine-kinases

Molécule	Masse Molaire (g/mol)	LogP	pKa (domaine de l'eau)	pH iso-électrique	Chlore	Brome	Fonction Sulfoxyde	Fluor
Afatinib	485,9	1,56	4,43 ; 8,81 ; 12,49	10,5	1	0	0	2
Axitinib	386,47	4,15	1,19 ; 4,59 ; 13,07	9,5	0	0	1	0
Bosutinib	530,5	2,56	2,64 ; 4,18 ; 8,43	12,5	2	0	0	0
Crizotinib	450,3	3,57	1,38 ; 5,83 ; 10,2	13	2	0	0	1
Dabrafenib	519,56	4,8	2,91 ; 7,16	5	0	0	1	3
Dasatinib	488	3,6	1 ; 5,9 ; 7,22 ; 8,52 ; 11,87	7,75	1	0	1	0
Erlotinib	393,44	3,3	4,59	> 7	0	0	0	0
Gefitinib	446,9	3,75	4,57 ; 6,85	9	1	0	0	1
Imatinib	493,6	3	2,11 ; 2,7 ; 4,28 ; 6,27	10,5	0	0	0	0
Lapatinib	581	4,64	3,8 ; 7,2	> 9,5	1	0	0	0
Nilotinib	529,52	4,9	2,29 ; 4,26 ; 6,3 ; 12,86	9,5	0	0	0	3
Ponatinib	532,56	4,1	1,69 ; 2,9 ; 8,03 ; 13,51	10,5	0	0	0	3
Regorafenib	482,8	4,2	2 ; 10,52 ; 13,9	4 << 8,5	1	0	0	4
Regorafenib M2	498,1	3,28	9,55 ; 10,57	10,5	1	0	0	4
Regorafenib M5	484,1	3,05	9,12 ; 10,53	10,2	1	0	0	4
Ruxolitinib	306,4	2,1	1,25 ; 2,23 ; 7,7	> 7,5	0	0	0	0
Sorafenib	464,8	4,8	2 ; 11,5	3 << 10,5	1	0	0	3
E-Sunitinib	398,47	2,9	9,04 ; 11,46	9,9	0	0	0	1
Vandetanib	475,35	4,54	4,46 ; 9,13	12	0	1	0	1

Tableau 4: propriétés physicochimiques des ITK.

#### A. Caractéristiques physico-chimiques des ITK

##### 1. Propriétés générales

Les ITK constituent une famille de petites molécules relativement hétérogènes du fait de leurs caractéristiques physico-chimiques. Leurs masses molaires sont comprises entre 306,1 g/mol et 581 g/mol. Leurs coefficients de partage (LogP) varient entre 1,56 et 4,8. Leurs structures chimiques sont hydrocarbonées. Certaines possèdent des groupements fluorés, sulfoxydes, bromes et chlores comme décrit au Tableau 4.

Ces propriétés nous permettent de choisir des outils d'analyse adaptés afin de développer une technique à la fois d'identification univoque et de quantification précise de ces molécules. Les LogP sont exploités pour optimiser la séparation des molécules par chromatographie en phase inverse. Les pKa et les points isoélectriques nous permettent de choisir le mode d'extraction. La connaissance des masses molaires et de la composition chimique des molécules nous

permet de travailler sur une méthode de détection par spectrométrie de masse. De plus, il est intéressant avec ce type de détecteur de connaître la composition de ces molécules en atomes possédant des isotopes stables en quantité significative dans la nature (Chlore, Brome). Le choix des outils d'analyse est discuté par la suite.

## 2. Classification chimique

Les ITK peuvent être regroupés en 3 familles chimiques : les dérivés du 2-phényl-aminopyrimidine, les dérivés carboxamides, les dérivés du phényl-quinazolinamine. Il existe un 4<sup>e</sup> groupe des « non classables ». Les nomenclatures IUPAC complètes sont présentées en annexe 4. Les formules développées des molécules classées selon leurs familles chimiques sont présentées en Figure 10, Figure 11, Figure 12 et Figure 13.

### a) Les dérivés 2-phényl-aminopyrimidine et benzamides

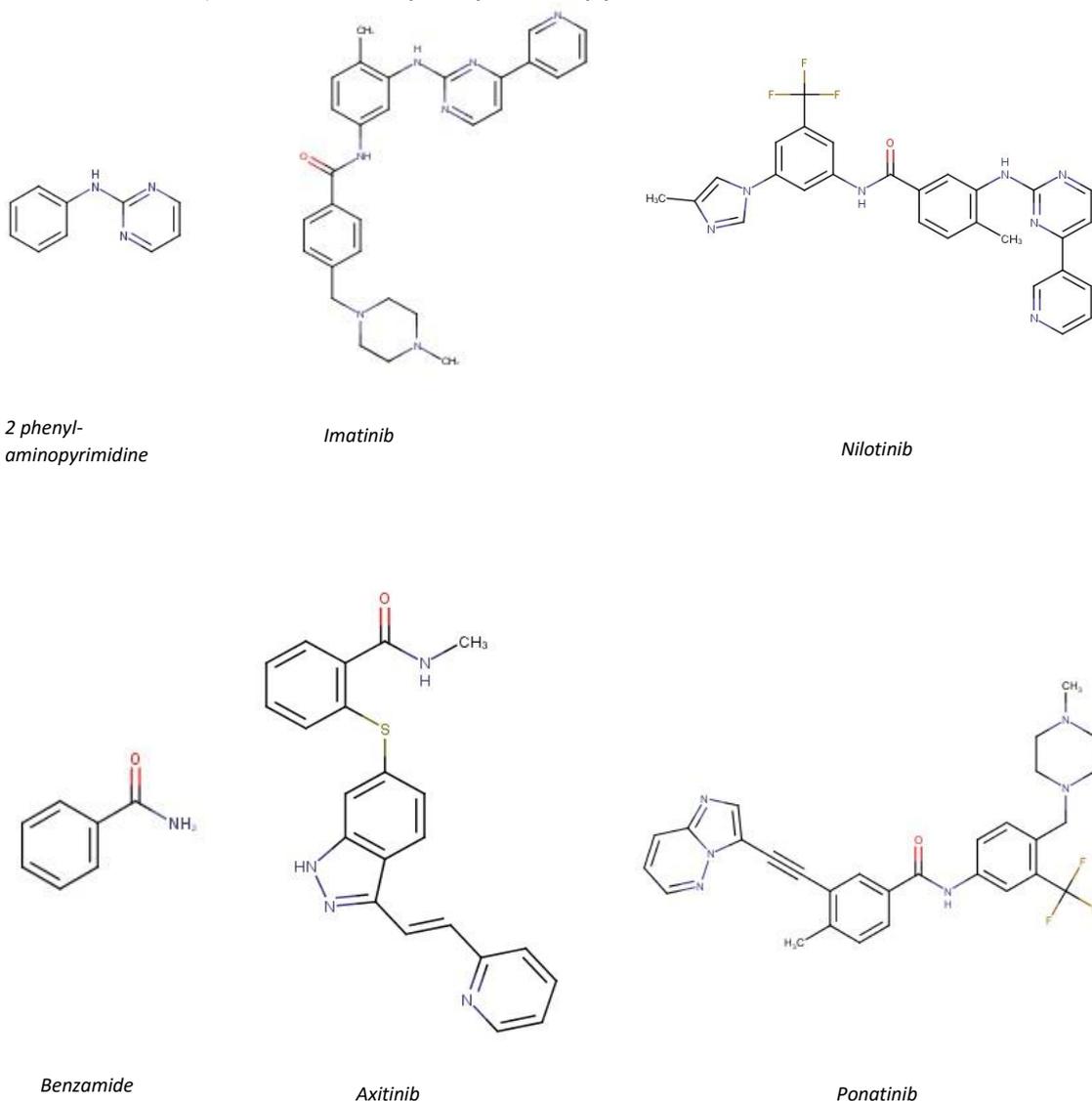
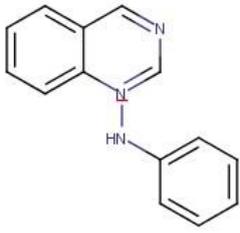
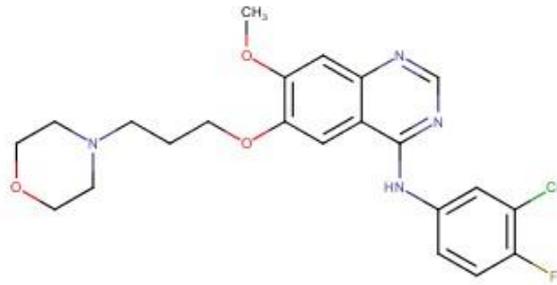


Figure 10: formules développées des dérivés 2-phénylaminepyrimidine

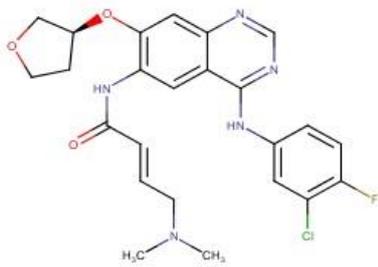
b) Dérivés quinazolamines



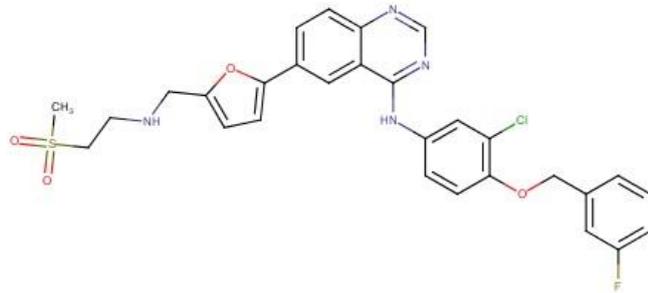
*Phenyl-quinazolamine*



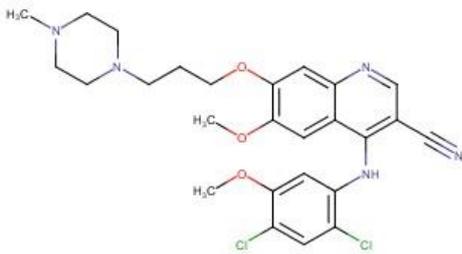
*Gefitinib*



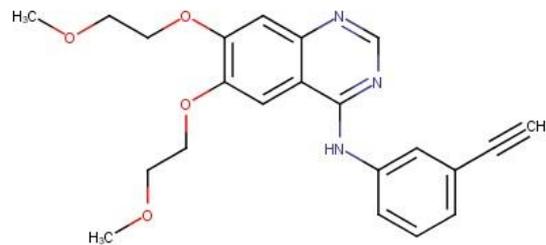
*Afatinib*



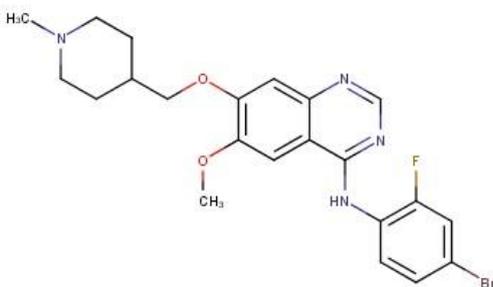
*Lapatinib*



*Bosutinib*



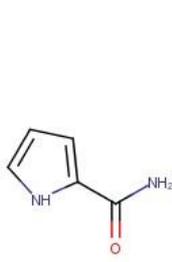
*Erlotinib*



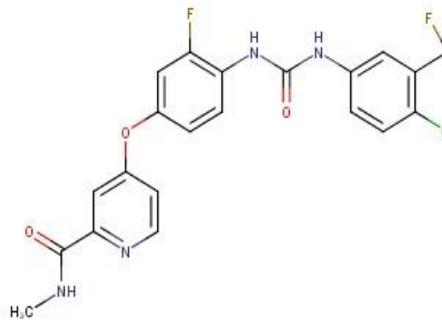
*Vandetanib*

*Figure 11: dérivés quinazolamines*

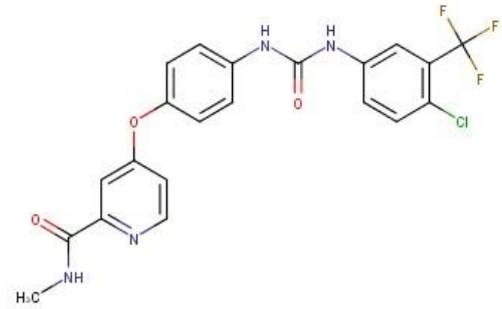
c) Dérivés carboxamides



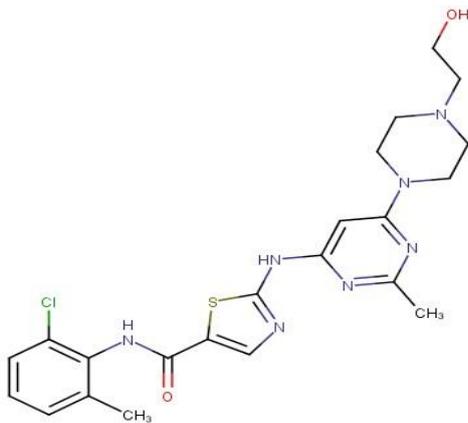
Azole-carboxamide



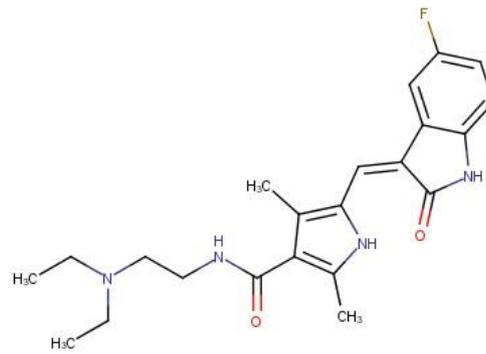
Regorafenib



Sorafenib



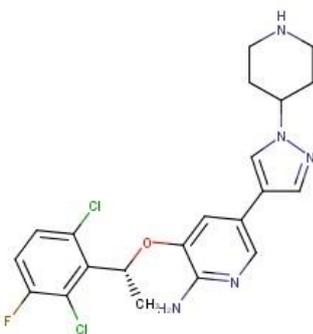
Dasatinib



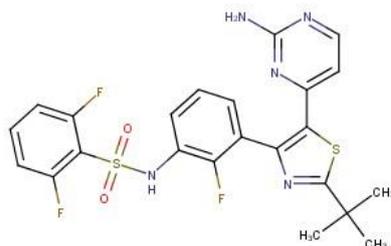
Sunitinib

Figure 12: dérivés du carboxamide

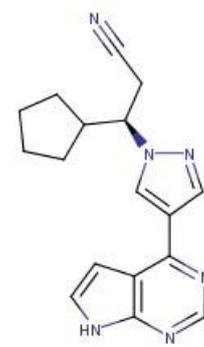
d) Autres dérivés



Crizotinib



Dabrafenib

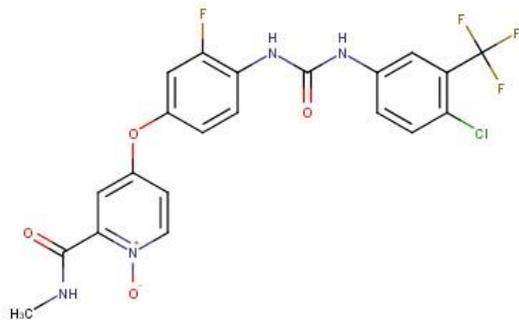


Ruxolitinib

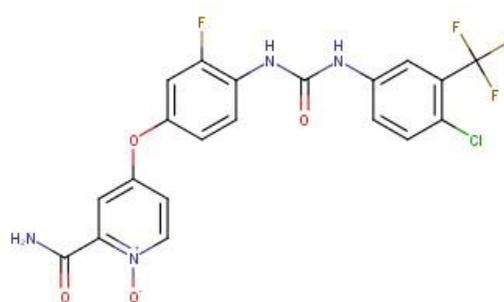
Figure 13: autres dérivés







*N-Oxyde Regorafenib : Regorafenib M2*



*N-Demethyl-N-Oxyde Regorafenib : Regorafenib M5*

*Figure 17: métabolites actifs du regorafenib.*

Nous sommes donc en présence de 4 molécules très proches que nous regrouperons sous le nom de « sorafenib-like » : N-oxyde-fluoro-sorafenib, N-demethyl-N-oxyde-fluoro-sorafenib, le fluoro-sorafenib et le sorafenib. L'identification de ces composés chimiquement proches doit donc comporter une étape séparative efficace. Le choix de la chromatographie, des phases, de la colonne, de l'injection et de la détection est donc crucial afin d'identifier de manière univoque et de quantifier de manière précise ces composés en mélange.

## B. Dosage plasmatique des inhibiteurs de tyrosine-kinases : état des lieux

Nous nous focaliserons sur 17 molécules ayant des concentrations plasmatiques compatibles avec une analyse multi-résiduelle ne dépassant pas les 5 mg/L, afin de ne pas saturer les phases d'extraction et éviter les trop grandes disparités de concentrations plasmatiques.

Plusieurs méthodes de dosage ont été publiées, utilisant la chromatographie liquide couplée à des détecteurs à barrette de diodes d'une part (afatinib<sup>87</sup>) ou plus fréquemment par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (axitinib<sup>88</sup>, crizotinib<sup>89</sup>, dabrafenib<sup>90</sup>, dasatinib<sup>91</sup>, erlotinib<sup>92</sup>, gefitinib<sup>93</sup>, imatinib<sup>94</sup>, lapatinib<sup>95</sup>, nilotinib<sup>96</sup>, regorafenib<sup>97</sup>, ruxolitinib<sup>98</sup>, sorafenib<sup>99</sup>, sunitinib<sup>100</sup>, vandetanib<sup>101</sup>). Deux molécules n'ont pas de méthode de dosage publiée (bosutinib, ponatinib).

L'objectif est de mettre en place une seule méthode de dosage pour tous les identifier. Il existe dans la littérature des méthodes de dosage multi-résiduelles <sup>102,103,104,105</sup>. Cependant, il n'existe pas de méthode incluant tous ces ITK en même temps.

## C. Contraintes

### 1. Contraintes liées à l'échantillon

Le suivi thérapeutique des ITK est réalisé par quantification des médicaments dans le plasma du patient. Le plasma est une matrice complexe composée d'ions, de protéines, d'acides aminés, de lipides, de glucides et de nombreuses molécules endogènes ou exogènes. L'ensemble forme un mélange riche dans lequel la quantification et l'analyse des ITK sont perturbées par les effets de matrice liés aux composants plasmatiques<sup>106 107</sup>. La mise au point de la technique de dosage doit tenir compte de ces effets, les évaluer et réduire leur impact au maximum.

### 2. Contraintes technico-biologiques

L'organisation de l'activité de dosage pharmacologique du laboratoire en fonction des demandes des prescripteurs, du matériel et personnel disponible, la recherche de simplicité et de lisibilité fait que l'on regroupe les dosages par classes pharmacologiques. Le dosage plasmatique des ITK doit être inséré dans la routine hebdomadaire, avec une gamme et une série de contrôles pour toutes les molécules.

Le rendu des résultats se fait après validation technique puis biologique, acte médical, selon la norme NF ISO 15189 et les recommandations du Comité Français d'Accréditation (COFRAC) ainsi que selon le Guide de Bonne Exécution des Analyses (GBEA).

### 3. Contraintes liées à l'appareillage

Le laboratoire dispose d'un parc instrumental riche afin de répondre au mieux aux demandes des services cliniques. Les appareils d'analyse à disposition sont des chromatographies liquides et gazeuses, des détecteurs UV-Visible ou à barrette de diode, ainsi que des spectromètres de masse type triple quadripolaire.

Au regard de la littérature ainsi que des contraintes technico-biologiques évoquées précédemment, le choix de la technique d'analyse s'est orienté plutôt vers de la Chromatographie Liquide Ultra Haute Pression (Ultra High Pressure Liquid Chromatography UHPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). L'UHPLC

nous permettra de séparer nos mélanges multi-résidus de manière adéquate, rapide et efficace. La MS/MS permettra d'être à la fois sensible et spécifique.

Enfin, considérant la grande différence de pKa et de points isoélectriques, une extraction liquide/liquide semble difficile à mettre en place. De plus, au regard de la bibliographie et afin de réduire au maximum les effets de matrice dus au plasma et pouvant perturber le dosage, le choix d'une extraction en phase solide (solid phase extraction = SPE) est privilégié.

#### D. Concentrations Cibles

Les ITK font partie des molécules anticancéreuses administrées par voie orale. Les posologies sont standardisées contrairement aux chimiothérapies cytotoxiques classiques qui, elles, sont adaptées à la surface corporelle du patient.

Les concentrations plasmatiques des ITK varient, comme tout médicament, en fonction des individus (variation inter-individuelle) et du temps (variation intra-individuelle). La recherche bibliographique des paramètres pharmacocinétiques des molécules, notamment des concentrations plasmatiques au pic d'administration (juste après la prise) et en résiduel (juste avant la prise suivante) nous permet de les classer en 3 groupes de concentrations:

Groupe A de 25 à 5000 ng/ml : erlotinib<sup>108</sup>, dabrafenib<sup>109</sup>, imatinib<sup>110</sup>, lapatinib<sup>111</sup>, nilotinib<sup>112</sup>, regorafenib, regorafenib M2, regorafenib M5<sup>113</sup> et sorafenib<sup>114</sup>.

Groupe B de 4 à 800 ng/ml : afatinib<sup>115</sup>, bosutinib<sup>116</sup>, crizotinib<sup>117</sup>, gefitinib<sup>118</sup>, ruxolitinib<sup>119</sup>.

Groupe C de 1 à 200 ng/ml : axitinib<sup>120</sup>, ponatinib<sup>121</sup>, sunitinib<sup>122</sup>, vandetanib<sup>123</sup>.

Le dasatinib<sup>124</sup> du fait de concentrations plasmatiques pouvant descendre en dessous du ng/ml, sera classé dans le groupe C' : de 0,1 à 200 ng/ml.

Les amplitudes des gammes sont larges et de nombreuses molécules et étalons internes seront à doser au cours de ce projet. Le développement de la méthode devra se focaliser sur une séparation optimale des molécules afin de ne pas générer d'effet matrice ni d'interférence

entre les molécules. De plus, nous optimiserons l'appareillage de détection afin de pouvoir couvrir l'ensemble des concentrations tout en gardant un signal stable.

## E. Étalons internes

Lors d'un dosage analytique par chromatographie UPLC couplée à la spectrométrie de masse, il existe une incertitude de mesure systématique. Parmi les facteurs pouvant induire cette incertitude, certains peuvent être corrigés par la technique de l'étalon interne. C'est le cas de la variabilité issue de l'extraction, des effets de matrice, ou encore des variations de volume injecté.

Le principe consiste à ajouter dans chaque échantillon, contrôle et standard une quantité connue et constante d'une molécule aux propriétés physico-chimiques similaires à celles étudiées. En spectrométrie de masse, un isotope de la molécule d'intérêt contenant des atomes de deutérium ( $^2\text{H}$ ), de carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) ou d'azote 15 ( $^{15}\text{N}$ ) est idéal. Celui-ci est absent des échantillons, se distingue facilement de la molécule initiale en MS et possède des propriétés physico-chimiques similaires. La quantification de l'analyte par le rapport du signal de l'analyte sur celui de l'étalon interne permet de s'affranchir des variations de la méthode.

## IV. Matériel et Méthode

### A. Matériel et réactifs

#### 1. HPLC, SM et extraction

Le système d'analyse que nous utiliserons est un système UHPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem commercialisé par la société Waters®. Nous travaillons sur un système UPLC® Acquity/TQD, comportant une source « ElectroSpray Ionisation ». Les colonnes UPLC testées sont fabriquées par la société Waters® : BEH C8, BEH C18, phénylhexyl CSH et de type CORTECS C18+. Les plaques pour la SPE ont été fournies par Waters® : plaques Oasis® MCX 30  $\mu\text{m}$  pour micro-élution.

#### 2. Consommables et matériel de laboratoire

Les réactifs consommables : acétonitrile, méthanol, eau, acide trifluoroacétique, acide acétique, ammoniacque, acide orthophosphorique de qualité HPLC sont fournis par VWR

Prolabo®. Les produits dérivés du sang : plasma frais congelé (PFC) et sang total prélevés sur des patients sains volontaires sans traitement médicamenteux sont fournis par l'Établissement Français du Sang (EFS) de Bordeaux.

Le matériel de pipetage est fourni par la société BioHit® et qualifié tous les trois mois par le service de métrologie du CHU de Bordeaux. La verrerie est achetée auprès du distributeur VWR®. La verrerie et les consommables sont approvisionnés par WVR® et sont de qualité laboratoire.

### 3. Poudres et réactifs

L'afatinib, l'afatinib-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, le bosutinib, le bosutinib-<sup>2</sup>H<sub>9</sub>, le crizotinib, le crizotinib-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, le dabrafenib, le dabrafenib-<sup>2</sup>H<sub>9</sub>, le gefitinib, le gefitinib-<sup>2</sup>H<sub>8</sub>, l'imatinib, l'imatinib-<sup>2</sup>H<sub>8</sub>, le ponatinib, le ponatinib-<sup>2</sup>H<sub>8</sub>, le regorafenib et ses métabolites M2 et M5, le regorafenib-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>, le ruxolitinib, le ruxolitinib-<sup>2</sup>H<sub>9</sub>, le sorafenib, le sorafenib-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>-<sup>2</sup>H<sub>3</sub> ont tous été fournis par Alsachim®. L'axitinib, l'axitinib-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>, le lapatinib et le vandetanib ont été achetés auprès du laboratoire Sequoia Research Products®. Le sunitinib, le sunitinib-<sup>2</sup>H<sub>10</sub>, l'erlotinib, l'erlotinib-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, le nilotinib, le nilotinib-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>-<sup>2</sup>H<sub>3</sub> sont fabriqués par Selleckchem®. Le dasatinib et son étalon interne dasatinib-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> ont été fournis par Toronto Research Chemicals®.

### 4. Solutions standards

#### a) Solutions mères

Deux solutions mères sont réalisées pour chacune des molécules à doser et une pour les étalons internes à la concentration de 1mg/ml. Une solution mère « SM Gamme » (SM<sub>G</sub>), une solution mère « SM Contrôle » (SM<sub>QC</sub>) pour les molécules à doser et une solution mère « SM étalon interne » (SM<sub>EI</sub>), selon l'instruction du laboratoire IN-LAB 030 du manuel qualité du laboratoire. La dilution est réalisée dans un mélange ternaire : 1/3 acétonitrile, 1/3 méthanol et 1/3 DMSO. Les poudres sont diluées dans un solvant ternaire afin de favoriser au mieux leurs dissolutions, toutes n'ayant pas les mêmes propriétés physico-chimiques.

À l'aide d'une balance de précision, dans un flacon brun taré, une quantité adéquate de poudre est pesée (P en mg). La quantité de solvant à ajouter est calculée au cas par cas selon la formule :

$$P_{solv} (g) = \frac{\left[ P(mg) \times \% \text{ pureté poudre} \times \frac{\text{Masse molaire Base}}{\text{Masse molaire Base} + \text{Sel}} \times \text{densité du solvant} \right]}{C (mg/ml)}$$

La densité du solvant à 25°C est :

$$\rho(\text{solvant}) = \frac{1}{3} \rho(\text{ACN}) + \frac{1}{3} \rho(\text{MeOH}) + \frac{1}{3} \rho(\text{DMSO}) = 0,8913 \text{ g/cm}^3$$

Chaque flacon est étiqueté selon l'IN-LAB 030 : Nom – Gamme/Contrôle – Date de fabrication – Date de Péréption – Concentration. Les solutions mères sont réalisées dans des flacons bruns et stockées à -20°C.

#### b) Solutions filles pour la gamme et les contrôles

L'objectif du travail est de quantifier et qualifier ces médicaments anticancéreux dans le sang des malades. Pour cela, nous devons adapter notre méthode de dosage aux concentrations sanguines et plasmatiques attendues chez nos patients. Les points de gamme et de contrôle adaptés sont réalisés selon le mode opératoire MO-MEL 02 du manuel qualité du laboratoire.

Une revue de la littérature nous permet de choisir des gammes de concentrations adaptées pour chaque molécule. Ainsi nous classons les ITK en trois groupes, selon leurs concentrations plasmatiques :

Groupe A de 25 à 5000 ng/ml : erlotinib, dabrafenib, imatinib, lapatinib, nilotinib, regorafenib, regorafenib M2, regorafenib M5 et sorafenib.

Groupe B de 4 à 800 ng/ml : afatinib, bosutinib, crizotinib, gefitinib, ruxolitinib.

Groupe C de 1 à 200 ng/ml : axitinib, dasatinib, ponatinib, sunitinib, vandetanib.

Deux points de gamme sont ajoutés pour le dasatinib afin de quantifier des concentrations pouvant aller jusqu'à 0,1 ng/ml.

Les concentrations des Solutions Filles Gamme (SF<sub>G</sub>) correspondant aux points de gamme sont disponibles au Tableau 5. Les poudres sont diluées dans du plasma sanguin sans médicament.

	SF G0	SF G1	SF G2	SF G3	SF G4	SF G5	SF G6	SF G7	SF G8	SF G9	SF G10
Concentration groupe A (ng/ml)	0			25	62,5	250	625	1250	2500	3750	5000
Concentration groupe B (ng/ml)	0			4	10	40	100	200	400	600	800
Concentration groupe C (ng/ml)	0	0,1 (dasatinib)	0,25 (dasatinib)	1	2,5	10	25	50	100	150	200

Tableau 5: concentrations des points de gamme.

Les points de contrôles, réalisés à partir de solutions mères différentes de celles des gammes, correspondent à 3 fois la LOQ pour le point de contrôle bas (= QC<sub>A</sub>), 30% du dernier standard de la gamme (SF<sub>G10</sub>) pour le point de contrôle moyen (= QC<sub>B</sub>) et 80% du SF<sub>G10</sub> pour le point de contrôle haut (= QC<sub>C</sub>). Un point de contrôle correspondant à la limite de quantification basse (low limit of quantification = LLOQ) est ajouté pour les molécules des groupes A (LLOQ = 25 ng/ml), B (LLOQ = 4 ng/ml) et C (LLOQ = 1 ng/ml). Pour le dasatinib, un point de contrôle LLOQ<sub>dasat</sub> est ajouté à 0,1 ng/ml. Les concentrations des contrôles sont disponibles au Tableau 6.

	LLOQ <sub>dasat</sub>	LLOQ	QCA	QCB	QCC
Concentration groupe A (ng/ml)		25	75	1000	4000
Concentration groupe B (ng/ml)		4	12	162,5	650
Concentration groupe C (ng/ml)	0,1 (dasatinib)	1	3	40	160

Tableau 6: concentrations des points de contrôle.

### c) Solution fille étalon interne

Selon le mode opératoire MO-MEL 02 du manuel qualité du laboratoire, la quantification des analytes doit se faire en présence d'un étalon interne de préférence isotopique. Celui-ci permet de corriger les variations induites par la méthode.

Une solution fille étalon interne est réalisée (SF<sub>EI</sub>) par addition de quantités d'étalons internes dilués dans un mélange méthanol/acétonitrile 50/50. La SF<sub>EI</sub> est stockée dans un flacon brun, à l'abri de la lumière à -20°C.

Les concentrations cibles de la SF<sub>EI</sub> sont : 30 µg/ml pour le sorafenib-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>, l'erlotinib-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> et le regorafenib-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>, 20 µg/ml pour l'imatinib-<sup>2</sup>H<sub>8</sub>, le nilotinib-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>-<sup>2</sup>H<sub>3</sub> et le ponatinib-<sup>2</sup>H<sub>8</sub>, 15 µg/ml pour le bosutinib-<sup>2</sup>H<sub>9</sub>, 12 µg/ml pour le dasatinib-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> et le ruxolitinib-<sup>2</sup>H<sub>9</sub>, 6 µg/ml pour le sunitinib-<sup>2</sup>H<sub>10</sub>, 3 µg/ml pour l'afatinib-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, le crizotinib-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-<sup>2</sup>H<sub>5</sub> et 2 µg/ml pour le dabrafenib-<sup>2</sup>H<sub>9</sub>, le gefitinib-<sup>2</sup>H<sub>8</sub> et l'axitinib-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>. Un volume fixe de 10 µL de cette SF<sub>EI</sub> est ajouté à chacun des échantillons, des points de gamme et de contrôles. Les quantités d'étalons internes sont optimisées afin que leur signal dans la solution finale soit équivalent au signal du point de gamme SF<sub>G6</sub> considéré comme intermédiaire. La quantification des analytes en solution sera corrigée selon le rapport :

$$\text{Réponse} = \frac{\text{Aire analyte}}{\text{Aire étalon interne}}$$

Toutes les molécules à doser n'ont pas d'étalon interne isotopique : le lapatinib, le vandetanib, le regorafenib M2 et M5. Nous utiliserons pour ces molécules un étalon interne présent dans notre SF<sub>EI</sub>, adapté au mieux au cas par cas.

## B. Développement de la méthode de dosage

### 1. Optimisation des paramètres de spectrométrie de masse

#### a) Optimisation des paramètres de la source

Au cours du processus chromatographique, les molécules sont séparées et arrivent au spectromètre de masse en solution dans les solvants constituant la phase mobile. Afin de pouvoir les détecter, celles-ci doivent être désolvatées et ionisées en phase gazeuse. C'est le rôle de la source du spectromètre de masse. Le TQD Acquity de la société Waters® est équipé d'une source d'ionisation par électrospray (electrospray source ionisation ESI).

L'objectif de l'optimisation des paramètres de la source permet d'obtenir un signal élevé et stable pour chacune de nos molécules. Une forte intensité du signal rapporté au bruit de fond nous permet d'obtenir des limites de quantification adéquates et d'éviter la suppression des signaux. La stabilité du signal nous permet d'obtenir une bonne robustesse de la méthode.

Les paramètres de la source ayant un impact sur le signal sont : le diamètre de capillaire, la tension de capillaire, la distance avec la contre-électrode, la température du gaz, le champ électrique, et la saturation de l'air ambiant en solvant<sup>125</sup>. Seuls la température du gaz de désolvatation, le débit du gaz et la tension du capillaire sont modifiables.

Le TQD Acquity® de la société Waters utilise un gaz d'azote N<sub>2</sub> chauffé pour la désolvatation. Le débit et la température sont paramétrables. En règle générale, plus le débit et la température sont élevés, meilleure est la qualité de la désolvatation<sup>126</sup>. Un plus grand nombre de molécules atteint les quadripôles et le signal de détection est plus élevé.

Le TQD Acquity® permet aussi de paramétrer la tension du capillaire. La tension optimale permettant la formation de l'electrospray dépend de la composition du solvant de la phase mobile :

$$V_{ON} \approx \left( \frac{r_c \gamma \cos \theta}{2 \varepsilon_0} \right)^{\frac{1}{2}} \ln \left( \frac{4d}{r_c} \right)$$

Où  $r_c$  est le diamètre du capillaire,  $\varepsilon_0$  la permittivité,  $\gamma$  la tension de surface et  $\theta$  l'angle du cône de Taylor. Pour l'eau pure, la tension à appliquer est d'environ 4 kV (pour une tension de surface à 0,073 Newton/mètre). Pour l'acétonitrile, elle est de 2,5 kV (tension de surface à 0,03 N/m)<sup>127</sup>. La tension idéale pourrait donc se situer entre 2,5 et 4 kV, correspondant à un mélange acétonitrile/eau. Cependant, la présence d'acide et de base dans la phase mobile peut modifier cette tension idéale.

L'objectif va être d'évaluer la précision et l'intensité du signal dans différentes conditions de tension de capillaire, de débit et de température de gaz.

Dans un premier temps, nous testons différentes conditions de température de la source (120°C et 150°C), de température de désolvatation (390°C et 420°C) et du débit de gaz de désolvatation (700 L/H et 1000 L/H). La tension de capillaire sera fixée à 1,5 kV correspondant à la tension appliquée dans la publication de Bouchet *et coll.* Les objectifs sont d'obtenir le signal le plus intense et le plus stable pour chaque molécule et de confirmer l'augmentation du signal lorsque les paramètres cités précédemment sont augmentés avec comme

problématique de ne pas dénaturer les molécules à de trop fortes températures. Nous ne tiendrons ici pas compte des étalons internes. Nous injectons 2 solutions pures de contrôles qualité haut et bas correspondant aux QC<sub>C</sub> et QC<sub>A</sub> trois fois chacune. Nous analysons l'intensité du signal brut : moyenne et écart type.

Dans un second temps, nous testons différentes tensions de capillaires (0,5 kV ; 1 kV ; 2 kV ; 3 kV ; 3,5 kV). L'objectif est de trouver la tension de capillaire donnant le signal le plus stable. Pour cela, nous injectons des solutions pures de contrôles haut et bas (QC<sub>C</sub> et QC<sub>A</sub>), 5 injections par point. Nous analysons la précision des mesures.

#### b) Optimisation du mode multiple réaction monitoring

Le spectromètre Triple Quadripôle Detector (TQD) est utilisé en mode « Multiple Reaction Monitoring » (MRM). À la sortie de la colonne chromatographique, les molécules sont ionisées par la source electrospray du spectromètre de masse et amenées vers le premier quadripôle selon une tension de cône paramétrable : la tension de cône, ou « Cône Voltage » (CV). Un ion parent est sélectionné par le premier quadripôle Q1 selon son rapport masse/charge ( $m/z$ ). Celui-ci rentre dans une zone appelée cellule de collision. Les ions sont accélérés avec une énergie paramétrable : l'Énergie de Collision ou « Collision Energy » (EC) afin qu'ils percutent l'argon présent dans la cellule (Q2) et soient fragmentés. Les ions fils issus de cette fragmentation sont triés par le quadripôle Q3 et détectés par une dynode de conversion couplée à un photomultiplicateur.

Cette seconde partie du paramétrage du spectromètre de masse va consister à optimiser les tensions de cône et énergies de collision pour chacune des molécules. Il faut aussi choisir, pour un ion parent donné, un ion fils pour la quantification ainsi qu'un ion fils de confirmation. Afin de ne pas saturer le spectromètre de masse, l'ion fils de confirmation est recherché uniquement pour les molécules à quantifier et non pour les étalons internes.

Nous recherchons dans un premier temps un ion parent pour des tensions de cône comprises entre 5 et 100 V. Ce parent peut être de forme  $[M,H]^+$ ,  $[M,Na]^+$ , ou encore  $[M,NH_4]^+$  au regard de nos phases mobiles et solutions d'injection.

Dans un second temps, nous recherchons des ions fils générés par la collision entre les ions parents et l'argon de la cellule de collision. Nous testons des énergies de collision comprises entre 5 et 100 eV. Nous choisissons, parmi les formes possibles des ions parents, ainsi que parmi les ions fils générés, des transitions sélectives et présentant la plus forte intensité. L'ion fils le plus intense sera utilisé pour la quantification. Le second ion fils le plus intense sera utilisé comme ion de confirmation.

Une solution de 1 000 ng/ml est réalisée pour chaque molécule et chaque étalon interne, diluée dans un mélange 49/25/15/5/1 eau/acétonitrile/méthanol/ammoniaque/acide formique. Ce mélange correspond à la phase de reprise lors de la SPE, et donc phase d'injection de nos molécules proposée par Bouchet *et coll.*

Nous effectuons 3 injections. Lors de la première, nous réalisons une recherche de tous les ions parents générés par la source pour chacune des tensions de cône. Nous choisissons la tension de cône permettant de produire l'ion parent le plus intense. Dans un second temps, nous recherchons les ions fils issus de la fragmentation de l'ion parent choisi précédemment, pour plusieurs énergies de collision. Enfin, afin de tester la sélectivité, nous injectons la molécule seule afin de nous assurer qu'elle ne soit pas détectée à la place d'une autre molécule.

Chaque molécule à quantifier est donc définie par un ion parent, deux transitions (une seule pour les étalons internes), une tension de cône et une énergie de collision, tous optimisés. Ces paramètres de spectrométrie de masse nous assurent une détection idéale sensible et spécifique pour nos molécules.

#### c) Optimisation des temps de lecture des transitions « Dwell »

Le « Dwell Time » est le temps de balayage des quadripôles pour chaque ion fils généré par le MS. Le signal représente le nombre d'ions fils détectés sur la durée du balayage pour chaque ion fils. Ce temps de balayage est paramétrable, et doit être ajusté afin d'obtenir un signal stable et fiable. Il doit permettre d'obtenir environ 15 à 20 points par pic chromatographique. Ce nombre de points de mesure par pic permet à l'algorithme d'intégration de reconstituer une trace fidèle du pic chromatographique.

## 2. Optimisation des paramètres chromatographiques

Le spectromètre de masse est un outil de détection à la fois sensible et spécifique. Il permet de quantifier des molécules de très faible concentration ainsi que leur caractérisation univoque lors de leurs fragmentations spécifiques. Cependant, un phénomène de saturation apparaît lorsque plusieurs molécules sont quantifiées simultanément. Malgré sa grande puissance, le spectromètre de masse ne peut détecter toutes les transitions des 34 molécules en même temps. Une séparation doit donc être réalisée en amont. L'outil de séparation choisi est la chromatographie liquide haute performante, adaptée entre autres à de petites molécules basiques.

### a) Choix de l'approche

La plupart des ITK sont des bases faibles de petite masse molaire (<700 g/mol). Leur polarité nous oriente vers la chromatographie en phase inverse. La colonne à choisir doit être donc constituée d'une phase stationnaire apolaire. La phase mobile doit être constituée de solvants polaires.

Lors de la réflexion initiale, la question d'une approche de type « Quality by Design (QdB) » s'est posée. En effet, les publications scientifiques fournies par les fabricants peuvent paraître convaincantes<sup>128</sup>. Nous avons réalisé une revue des logiciels de développement disponibles sur le marché, parmi lesquels DryLab® ou encore Fusion®. Nous possédions déjà une licence du logiciel Osiris®, celui-ci a fait ses preuves en HPLC, mais ne semble pas vraiment adapté à l'UPLC.

Cependant, cette approche n'a pas été retenue. Les délais étaient courts pour mettre en place le logiciel et le bénéfice de l'investissement incertain. Les fabricants n'ont pu/voulu nous présenter une version d'essai que nous aurions évaluée. Nous avons donc développé la méthode chromatographique manuellement.

### b) Choix de la colonne

La recherche d'une colonne idéale est une étape critique dans le processus de développement de la méthode. L'objectif est de sélectionner la colonne qui permettra la meilleure séparation

pour un temps d'analyse minimum. Nous évaluerons donc les colonnes sur leur capacité à séparer les molécules, en calculant les résolutions  $R_s$ , ainsi que la durée totale de l'analyse.

Le choix de la colonne est décidé en fonction des caractéristiques physico-chimiques des molécules à doser ainsi que des propriétés propres à la colonne. Nous savons que les ITK à doser ont des caractéristiques de lipophilie et de polarité différentes. Leurs coefficients de partage (LogP) varient entre 1,56 et 4,8.

Colonne	Longueur (cm)	Dc (mm)	Dp ( $\mu\text{m}$ )	$U_{\text{optimale}}$ (cm/s)	Vm (ml)	Débit (ml/min)	N théorique
Waters® BEH C8	5	2,1	1,7	0,29	0,2	0,45	9804
Water® BEH C18	5	2,1	1,7	0,29	0,2	0,45	9804
Waters® Cortecs C18+	5	2,1	1,6	0,31	0,2	0,4	10417
Waters® CSH Phenyl-hexyl	10	2,1	1,7	0,29	0,4	0,45	19608

Figure 18: caractéristiques des colonnes à l'essai

Nos essais portent sur 4 colonnes, présentant des caractéristiques différentes présentées en Figure 18. Ces 4 colonnes sont toutes recommandées pour la séparation par UHPLC de petites molécules basiques.

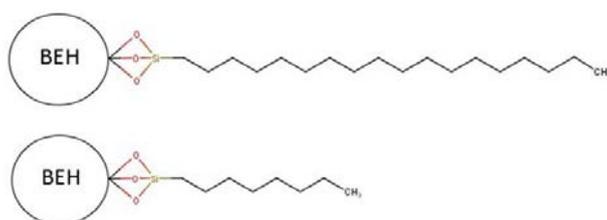


Figure 19: illustration des chimies des colonnes BEH C8 et BEH C18.

Les Waters BEH pour Bridge Ethylène Hybrid, sont des colonnes adaptées à l'UHPLC. Leur chimie consiste en des chaînes carbonées de 8 ou 18 carbones, greffées sur silice et rattachées au support BEH par trois atomes d'oxygène, comme présenté en Figure 19.

Ces colonnes diffèrent par leur mécanisme rétentif : la BEH C18 retiendra plus les composés apolaires. Nous pouvons nous attendre avec cette colonne à une séparation plus fine et une analyse plus longue. De plus, d'après le fabricant, ces colonnes sont adaptées à la séparation de petites molécules basiques et sont résistantes vis-à-vis d'une large gamme de pH (1-12) et de température (20-80°C).

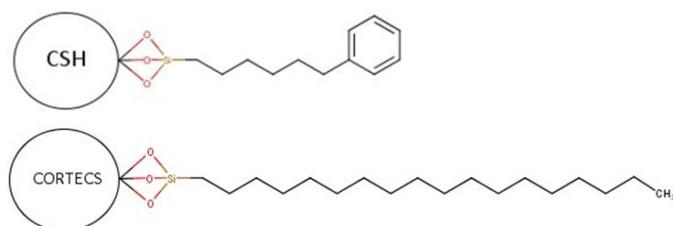


Figure 20: illustration des chimies des colonnes CSH phényl-hexyl et CORTECS C18.

La colonne CSH phényl-hexyl est composée d'un résidu (phényl-hexyl) greffé sur un atome de silice, rattaché au support CSH par trois atomes d'oxygène comme présenté en Figure 20. Le support CSH pour Charged Surface Hybrid, est constitué de charges de surface de faible intensité. D'après le fabricant, cela garantirait une meilleure hauteur de pic pour une largeur à la base équivalente pour les molécules basique, une rééquilibrage de la colonne plus rapide, une meilleure reproductibilité et une bonne stabilité à pH bas. Cette colonne a été choisie pour son tropisme vis-à-vis des molécules polaires : le résidu phényle pourrait retenir les molécules riches en liaisons  $\pi$ . Cependant, la longueur de la colonne ( $L = 10$  cm) augmentera la durée de l'analyse.

Enfin, la dernière colonne testée est une colonne CORTECS C18+. C'est une colonne dont les particules possèdent un noyau dense (Solid Core Particle Column) et une zone poreuse sur laquelle est greffée la phase stationnaire comme présenté en Figure 20. Sur la silice sont greffées les chaînes aliphatiques en C18. D'après le fabricant, les particules solides garantiraient une efficacité équivalente, mais supporteraient des pressions beaucoup plus élevées. De plus, le « + » indiquerait la présence sur le support de charges de surface de bas niveau, comme sur les CSH. Dans tous les cas, le diamètre des particules est inférieur aux autres colonnes, ce qui aura pour effet entre autres d'augmenter le nombre de plateaux théoriques de la colonne.

Ces chimies de colonnes sont protégées par brevet. Le fabricant ne nous a pas communiqué les compositions exactes des supports ni leurs mécanismes chimiques précis. Nous tiendrons compte des arguments commerciaux avancés par la société en gardant un regard critique.

Temps (mn)	% A (1 mL AF dans 1L d'H <sub>2</sub> O)	%B (ACN + 10% de A)	Débit
0,00	88	12	0,4
0,25	85	15	0,4
2,00	77	23	0,4
3,50	70	30	0,4
4,00	60	40	0,4
5,50	45	55	0,4
6,50	10	90	0,4
6,60	85	15	0,4
7,00	85	15	0,4

Tableau 7: gradient chromatographique d'essai méthode N° 01.

Les différents essais de colonne sont réalisés, dans un premier temps avec des conditions de phase mobile constantes, précisées au Tableau 7. La phase A est composée d'eau + 0,1 % d'acide formique (AF). La phase B est composée d'acétonitrile (ACN) + 10% de phase A. Nous injectons dans

le système chromatographique une solution de contrôle QC<sub>C</sub> (contrôle haut) dilué dans un mélange eau/acétonitrile 60/40.

### c) Choix des phases mobiles

Après avoir sélectionné une colonne, nous procédons aux essais de différentes phases mobiles. L'objectif est de trouver une composition et un gradient de phase mobile apportant une séparation suffisante et un temps d'analyse acceptable pour nos molécules.

En polarité inverse, nos phases mobiles sont composées d'eau et de solvant organique, avec ou sans tampon. Il convient dans un premier temps de sélectionner des solvants compatibles avec les colonnes et la spectrométrie de masse. Une liste de solvants compatibles est disponible auprès du fabricant. Parmi ceux-ci figurent l'eau, l'acétonitrile, le méthanol, le tétrahydrofurane (THF). Les additifs/tampers compatibles sont l'acide formique (AF), l'acide acétique (AA), l'ammoniaque, l'acide tri-fluoro acétique (TFA).

Nous réalisons nos essais avec un mélange de phases mobiles composé d'eau en voie A et d'acétonitrile en voie B. Ces deux solvants sont choisis pour leur différence de polarité et pour leur faible toxicité. La différence de polarité nous permet de jouer sur la rétention des molécules : plus le pourcentage d'acétonitrile de la phase mobile est élevé, moins les molécules sont retenues. Concernant les critères de toxicité, nous préférons l'eau et l'acétonitrile aux méthanol et THF du fait d'une plus grande nocivité de ces deux derniers. Nous nous conformons de plus aux pratiques du laboratoire.

Nous procédons par injection d'une solution pure contenant les 19 molécules à quantifier diluées à la concentration du contrôle haut QC<sub>c</sub> dans un mélange eau/ACN 60/40.

Dans un premier temps, nous souhaitons mieux connaître nos molécules afin de prédire leur comportement face aux variations de gradient de phase mobile. Dans cet objectif, nous effectuons une étude préliminaire en mode isocratique et construisons les droites  $\ln(k) = f(\%ACN)$  pour chacune des molécules.  $k$  est le facteur de rétention de chaque molécule, et %ACN est le pourcentage d'acétonitrile en élution isocratique.

Dans un second temps, nous fixons un gradient de concentration (« Méthode 01 » comme présentée au Tableau 7) et nous essayons plusieurs tampons additionnés à la phase A (eau) parmi les possibilités présentées au Tableau 8. L'analyse des chromatogrammes nous permet de choisir le tampon qui nous semble le plus adapté.

<b>Additif / Tampon ajouté à la phase A (0,1 %)</b>	<b>pKa</b>	<b>Zone Tampon</b>	<b>Compatibilité MS</b>	<b>Commentaires</b>
<i>Acide Trifluoroacétique</i>	0,3		Oui	Suppression signal MS par formation de paires d'ions.
<i>Acide Acétique</i>	4,76		Oui	
<i>Acide formique</i>	3,75		Oui	
<i>Acétate d'ammonium</i>	4,76	3,76-5,76	Oui	
<i>Formiate d'ammonium</i>	3,75	2,75-4,75	Oui	

*Tableau 8: additifs et tampons compatibles avec la MS et leurs caractéristiques.*

Enfin, une fois la composition de la phase mobile choisie, nous ajustons pas à pas le gradient d'acétonitrile en nous aidant de la courbe  $\ln(k) = f(\%ACN)$  afin de séparer nos molécules au maximum et de réduire le temps d'analyse au minimum.

L'objectif de ce gradient et du mélange de phase mobile est d'obtenir une bonne séparation avec un temps d'analyse court. La sélectivité du détecteur en spectrométrie de masse ne nous impose pas nécessairement une résolution chromatographique supérieure à 1,5 pour toutes nos molécules. Il nous faut donc trouver un compromis entre séparation, détection et temps d'analyse.

#### d) Optimisation des paramètres d'injection.

Le TQD Acquity Waters® propose divers modes d'injection : boucle partielle, boucle partielle avec surremplissage, boucle complète. Le volume de la boucle est fixe : « Fixed Loop Injector ». Seules les modalités d'injection sont interchangeables. De plus, cette boucle est démontable.

Nous utilisons des solvants de rinçage « Strong » et « Weak » adaptés. Le rinçage « Strong » doit être capable de dissoudre les résidus d'analytes pour rincer le système. Son pouvoir éluant doit donc être élevé. Il est recommandé de le faire aussi fort que les conditions finales de gradient. Le rinçage « weak » doit être assez faible pour ne pas induire de perturbation chromatographique, notamment en cas de mode d'injection « boucle partielle ». Il doit correspondre aux conditions initiales du gradient.

Le mode « boucle partielle » est le standard. L'injection de l'échantillon se fait en le mélangeant au rinçage « weak ». Il est recommandé pour des échantillons rares et une analyse rapide. Le mode « boucle partielle avec sur remplissage », d'après le fabricant, garantit une meilleure reproductibilité que la boucle partielle simple, mais consomme plus d'échantillon d'injection. Enfin, le mode « boucle complète » apporte une meilleure précision, mais consomme beaucoup plus de soluté d'injection (trois fois plus). Nous optimiserons le mode d'injection au regard de ces différentes possibilités. L'objectif est d'obtenir un signal stable et intense.

Enfin, le volume d'injection dépend du mode d'injection. Nous essayons plusieurs volumes d'injection dans la gamme du possible et choisissons le plus petit volume permettant d'obtenir des LLOQ supérieures à dix fois le bruit de fond.

### 3. Optimisation des paramètres d'extraction

Le protocole d'extraction est une phase critique du développement de méthode. Il permet d'extraire les molécules du plasma afin de rendre l'échantillon injecté compatible avec le système chromatographique. De plus, une bonne extraction permet de limiter les effets de matrice<sup>129</sup>.

Les ITK sont de petites molécules basiques. Leurs points isoélectriques sont très différents comme présenté au Tableau 4, ce qui réduit les possibilités d'extraction : l'extraction liquide/liquide ne pourra être utilisée, car aucune valeur de pH ne peut assurer une extraction complète pour toutes les molécules simultanément.

Nous préférons donc l'extraction en phase solide (SPE). La société Waters® fournit différents types de cartouches SPE comme présentées en Figure 21.

La structure de base est la « HLB » pour « Hydrophile Liphophile Base ». Elle comporte des groupements amphiphiles et retient les molécules d'intérêt par liaisons de faible énergie. Sur ces supports HLB peuvent être greffés des groupements échangeurs d'anions et de cations. C'est le cas des structures de type WAX ou MAX contenant respectivement des amines primaires et quaternaires qui sont cationiques. Des anions peuvent aussi y être greffés : c'est le cas des WCX et des MCX comportant respectivement des résidus carboxyles et sulfonates.

Les ITK sont pour la plupart des bases faibles, comportant une ou plusieurs fonctions amines primaires ou secondaires. Celles-ci, au pH de travail dans le mélange pré-extraction, sont généralement protonées. Le support idéal doit comporter un greffage anionique afin de générer un mécanisme rétentif de type ionique en plus des liaisons hydrophiles et lipophiles. D'après le fabricant, le support WCX est adapté plutôt à des composés fortement basiques de type amines quaternaires. Nous travaillons donc sur un support de type MCX.

Notre choix se porte sur une extraction en phase solide, sur plaque Waters® Oasis MCX® (= Mixed mode Cation eXchange), support d'extraction solide en phase inverse et échangeur de cations grâce à des fonctions sulfonates ( $\text{SO}_3^-$ ) de  $\text{pK}_a < 1$ .

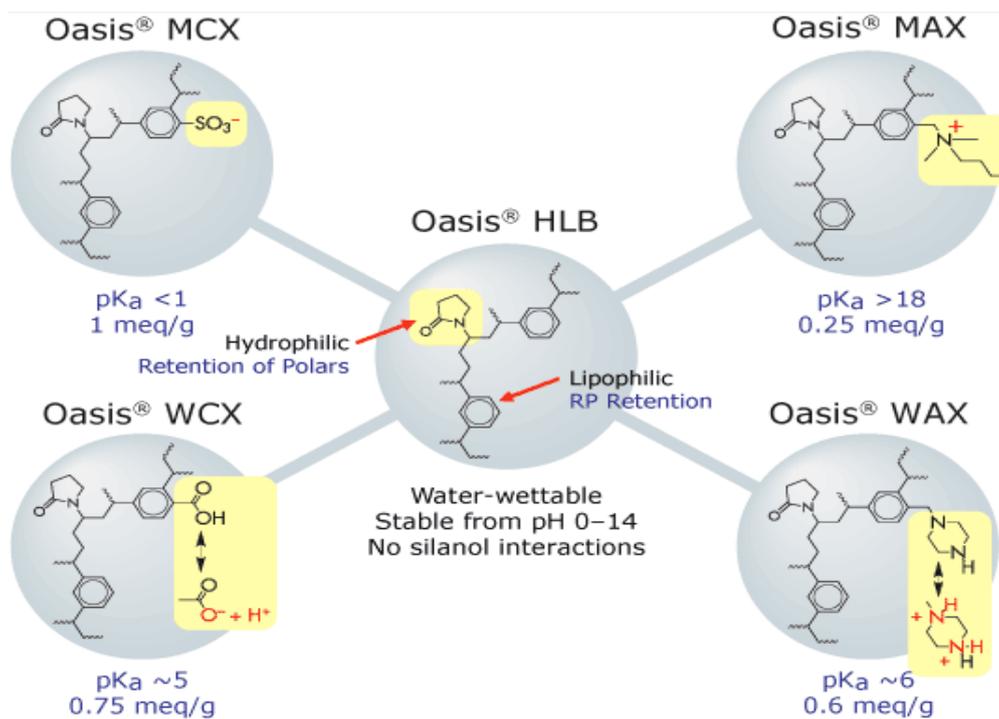


Figure 21: chimie des cartouches SPE commercialisées par la société Waters®.

### C. Validation de la méthode de dosage

Une méthode analytique correctement validée nous permet d'obtenir des résultats fiables interprétables de façon satisfaisante. Les critères de validation définis par la norme NF ISO 15189 applicable aux laboratoires comprennent la spécificité, la sélectivité, la répétabilité, la reproductibilité, l'exactitude, la linéarité, la limite de quantification, la limite de détection ainsi que les essais de stabilité.

#### 1. Normes de validation

Le laboratoire suit les exigences qualité de la norme NF ISO 15189 applicable aux laboratoires de biologie médicale. Les procédures de validation suivent les recommandations du SH GTA 04 validation de méthodes et SH GTA 14 incertitudes des mesures issues des guides COFRAC (Santé Humaine, Guides Techniques d'Accréditation), ainsi que les recommandations de l'EMA « Guideline on bioanalytical method validation 2012 » et de la FDA : « Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics »<sup>130,131</sup>.

## 2. Linéarité

Nous établissons une gamme d'étalonnage composée de 8 points et du standard 0. Nous ajoutons deux points de gamme pour le dasatinib. Trois gammes sont réalisées : une par jour pendant 3 jours. Nous définissons la relation entre concentration de l'analyte en solution et réponse correspondante du détecteur. La droite de calibration est pondérée par un facteur  $1/x$  afin de donner plus de poids statistique dans la régression linéaire aux valeurs basses. Pour être validés, au moins 75% des standards de calibration doivent avoir un coefficient de variation (CV)  $< 15\%$  et  $20\%$  pour les LLOQ. De plus, le coefficient de détermination ajusté ( $R^2a$ ) doit être supérieur à  $0,99$ .

## 3. Fidélité et Justesse

L'essai de fidélité comprend la répétabilité (fidélité intra-jour) et la reproductibilité (fidélité inter-jour). Nous réalisons 3 niveaux de concentration contrôle et un niveau limite de quantification. Chaque contrôle est répété 5 fois par jour pendant 3 jours. Les coefficients de variation (CV) sont calculés par une analyse des variances (ANOVA). Ceux-ci doivent être  $< 15\%$  pour les points de contrôle  $QC_A$ ,  $QC_B$ ,  $QC_C$  et  $< 20\%$  pour la LLOQ, selon les normes de validation approuvées par les agences de santé européennes (EMA) et américaines (FDA).

L'étude de justesse se fera *a posteriori*, en comparant la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible. Selon le guide SH-GTA 14, la justesse est évaluée à partir de l'évaluation externe de la qualité (EEQ). Seule l'externalisation des contrôles qualité, c'est-à-dire la comparaison avec d'autres laboratoires sur les mêmes échantillons peut garantir la justesse. En l'absence de valeur extérieure, la justesse peut être évaluée à partir des contrôles qualité internes en calculant le biais moyen sur plusieurs dosages.

## 4. Limites de quantification et de détection

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte pouvant être quantifiée. Elle correspond au premier point de la gamme d'étalonnage. Les paramètres de répétabilité, reproductibilité et biais doivent être inférieurs à  $20\%$  pour ce point.

Notre limite de quantification est choisie sur des critères cliniques : c'est la plus petite quantité de médicaments retrouvée en concentration résiduelle dans les études pharmacocinétiques. En dessous de cette limite, les prélèvements sanguins sont considérés comme négatifs. Elle ne correspond donc pas forcément à la définition analytique de la limite de quantification.

La limite de détection est la plus petite quantité d'analyte pouvant être détectée. Elle est évaluée à 3 fois le bruit de fond. Nous validons pour chaque analyte la quantité injectée qui donne un signal supérieur à trois fois le bruit de fond.

## 5. Coefficient d'extraction et spécificité

Le coefficient d'extraction, comme introduit dans leur étude par Buhrman *et coll.*, mesure le pourcentage de l'analyte retrouvé après extraction<sup>132</sup>. Ce coefficient d'extraction, ou rendement d'extraction, doit être suffisant afin de pouvoir quantifier l'analyte en aval. De plus, celui-ci doit être stable sur l'ensemble de la gamme de valeurs.

Pour l'évaluer, nous calculons le rapport des réponses d'un blanc matrice dopé puis extrait à un blanc matrice extrait puis dopé, à la même concentration. Le rendement d'extraction sera étudié à 3 niveaux de concentrations correspondant aux 3 niveaux de contrôle. Celui-ci devra dans la mesure du possible être supérieur à 80%, et stable pour l'ensemble de la gamme de concentration.

La spécificité doit être étudiée par recherche d'un effet matrice correspondant à la suppression ou augmentation de l'ionisation des analytes dus à la matrice. Cet effet matrice est particulièrement présent en électrospray ionisation ESI. Il peut présenter un réel problème pour certaines analyses, notamment lors d'utilisation d'une source ESI. La SPE permet théoriquement de limiter ces effets.

Afin d'évaluer l'effet matrice, le signal obtenu avec une solution pure sera comparé au signal obtenu avec un blanc matrice extrait auquel sera ajouté l'analyte à la même concentration. Les signaux doivent être comparables.

## 6. Sélectivité et recherche de contamination

La sélectivité s'effectuera par analyse de 6 blancs matrice en démontrant l'absence de réponse aux temps de rétention de chacun des analytes et étalons internes par comparaison à une solution pure des analytes et de leurs étalons internes.

Afin d'évaluer l'absence de contamination (carry-over), lors des jours de validation, un blanc sera injecté après le STD haut. L'aire du blanc sera comparée à l'aire de la LOQ. Le pourcentage de contamination ne doit pas excéder 20% de la LOQ et 5% de l'étalon interne.

## V. Résultats

### A. Développement de la méthode de dosage

#### 1. Optimisation des paramètres de spectrométrie de masse

##### a) Optimisation des paramètres de la source

L'objectif va être d'évaluer la précision et l'intensité du signal dans différentes conditions de tension de capillaire, de température de la source, de débit et de température de gaz.

	Tension de capillaire (kV)	Tension de l'extracteur (V)	Température de la source (°C)	Température de désolvatation (C°)	Débit de N <sub>2</sub> (L/h)
Condition A	1,5	4	120	350	700
Condition B	1,5	4	150	420	1000

Tableau 9: conditions de la source ESI.

Dans un premier temps, nous évaluons la réponse brute pour chacune des molécules dans des conditions différentes de température de source, température de désolvatation et débit de N<sub>2</sub> comme décrit au Tableau 9. Deux points de contrôle sont injectés (QC<sub>C</sub> et QC<sub>A</sub>) 3 fois chacun dans des conditions de source différentes. Les moyennes des réponses pour chacun des points de contrôle en condition A et B, ainsi que la différence de réponse entre les deux conditions sont présentées en annexe 5. La condition A de départ correspond aux paramètres décrits dans la méthode de dosage de Bouchet *et coll.*

Nous observons une augmentation des réponses des molécules lorsque la désolvatation est plus forte. En effet, une meilleure évaporation du solvant semble favoriser le passage des molécules vers le triple quadripôle.

La condition B favorise une réponse plus intense pour nos molécules, sans altérer la précision de la réponse. Ceci nous permettra d'atteindre des valeurs suffisamment basses de LLOQ. Nous n'avons pas augmenté encore plus les températures de désolvatation, car celles de la condition B semblent suffisantes au regard des réponses obtenues pour les points bas QC<sub>A</sub>. De plus, les réponses faibles pour les points bas de l'axitinib (240 cps) et du regorafenib M5 (521 cps) ont été corrigées par la suite en optimisant les transitions des ions fils.

Dans un second temps, nous testons différentes tensions de capillaires. Les mêmes points de contrôle (QC<sub>A</sub> et QC<sub>C</sub>) en solution pure sont injectés 5 fois chacun, selon les conditions présentées au Tableau 10.

	Tension de capillaire (kV)	Tension de l'extracteur (V)	Température de la source (°C)	Température de désolvatation (C°)	Débit de N <sub>2</sub> (L/h)
Condition B1	0,5	4	150	420	1000
Condition B2	1	4	150	420	1000
Condition B3	2	4	150	420	1000
Condition B4	3	4	150	420	1000
Condition B5	3,5	4	150	420	1000

Tableau 10: paramétrage de la source.

Nous évaluons la moyenne de l'intensité du signal brut pour chacune des molécules à chaque point de contrôle, ainsi que la précision pour chacune des molécules. La valeur de tension de capillaire retenue est celle qui apporte un signal intense et stable pour le maximum de molécules. Les moyennes (n=5) des aires brutes obtenues pour chaque molécule ainsi que les coefficients de variation (CV) sont présentés en annexe 6. Les intensités les plus faibles et les CV les plus élevés pour chaque molécule sont surlignés en rouge. Les intensités les plus fortes et les CV les plus faibles sont surlignés en bleu pour chaque molécule.

Il apparait que toutes les molécules n'ont pas le même comportement dans la source. Une tension de capillaire trop faible réduit le rendement d'ionisation dans l'electrospray tandis qu'une tension de capillaire trop élevée peut altérer les molécules. Nous constatons que le signal de toutes les molécules est suffisant pour toutes les tensions de capillaire testées. Cependant, la précision des signaux obtenus n'est pas équivalente en fonction du voltage de capillaire. La tension de 2 kV semble être la seule permettant une variabilité du signal

inférieure à 15% pour toutes les molécules (critère de validation de méthode défini par les référentiels). Il apparaît donc que la tension de 2 kV semble optimale.

Les conditions de source retenues sont donc les conditions B3 : tension de capillaire à 2 kV, tension de l'extracteur à 4V, température de la source à 150 °C, température de désolvatation à 420 °C et débit d'azote 1000 L/H.

#### b) Optimisation du mode multiple réaction monitoring

Au cours de cette partie, nous cherchons à définir pour chaque molécule un ion parent, deux transitions (une seule pour les étalons internes), une tension de cône et une énergie de collision.

Les résultats du paramétrage MRM sont présentés au Tableau 11. Les spectres de masse obtenus pour chacun des ions parents et des ions fils sont donnés en annexe 7.

<i>Molécule</i>	<i>Temps de rétention (min)</i>	<i>Ion parent (m/z)</i>	<i>Ion de quantification (m/z)</i>	<i>Ions de confirmation (m/z)</i>	<i>Tension de cône (V)</i>	<i>Energie de collision (eV)</i>
<i>Sunitinib</i>	1,11/1,80	399,1	283,2	326,15	39	27/21
<i>Sunitinib (EI)</i>	1,11/1,80	409,9	284	-	39	40
<i>Gefitinib</i>	1,31	447	128,1	100,0	44	24/44
<i>Gefitinib (EI)</i>	1,31	455,1	136,1	-	35	30
<i>Vandetanib</i>	1,44	475	112,0	83,0	22	22/78
<i>Crizotinib</i>	1,31	450	177,1	260,2	44	50/25
<i>Crizotinib (EI)</i>	1,31	457,1	177	-	40	35
<i>Afatinib</i>	1,46	486	305,1	371,2	54	40/26
<i>Afatinib (EI)</i>	1,46	492,2	377,0	-	50	28
<i>Imatinib</i>	1,58	494,2	394,2	217,1	50	27
<i>Imatinib (EI)</i>	1,58	502,2	394,2	-	50	27
<i>Dasatinib</i>	1,60	488,2	401,1	232,1	55	30/30
<i>Dasatinib (EI)</i>	1,60	494,6	407,1	-	55	30
<i>Bosutinib</i>	2,14	532,0	141,3	113,2	42	22/48
<i>Bosutinib (EI)</i>	2,14	541,1	150,3	-	42	25
<i>Erlotinib</i>	2,54	394,1	336,2	278,1	25	27/33
<i>Erlotinib (EI)</i>	2,54	400,1	284,1	-	54	28
<i>Axitinib</i>	2,64	387,1	356,3	221,0	37	20/40
<i>Axitinib (EI)</i>	2,64	391,0	356,3	-	38	20
<i>Ruxolitinib</i>	2,60	307,0	186,2	105,1	52	28/60
<i>Ruxolitinib (EI)</i>	2,60	316,1	186,2	-	48	30
<i>Lapatinib</i>	3,01	581,1	365,0	379,1	54	40/38
<i>Ponatinib</i>	2,70	533,0	260,2	101,0	42	30/22
<i>Ponatinib (EI)</i>	2,70	541,2	260,2	-	42	32
<i>Nilotinib</i>	3,28	530,1	289,1	259,1	70	30/55
<i>Nilotinib (EI)</i>	3,28	534,1	289,1	-	60	27
<i>Regorafenib M5</i>	3,36	485,0	202,0	229,0	56	34/22
<i>Regorafenib M2</i>	3,51	499,0	304,2	229,2	60	30/38
<i>Dabrafenib</i>	3,61	520,0	307,2	277,0	62	36/64
<i>Dabrafenib (EI)</i>	3,61	529,0	316,3	-	58	38
<i>Sorafenib</i>	3,74	465,2	252,2	211,2	50	34/43
<i>Sorafenib (EI)</i>	3,73	469,1	256,0	-	50	34
<i>Regorafenib</i>	3,81	483,0	270,0	288,2	58	40/28
<i>Regorafenib (EI)</i>	3,81	487,0	229,1	-	52	42

Tableau 11: transitions MRM, tensions de cône et énergies de collision des 19 molécules ITK et 15 étalons internes (EI).

Nous remarquons que certaines molécules possèdent des transitions proches. C'est le cas du sunitinib et de l'erlotinib EI (respectivement 399,1>283,2 et 400,1>284,1). Cependant, comme décrit par la suite les temps de rétention du sunitinib Z et E ( $t_r = 1,11$  et  $1,80$ ) ainsi que de l'erlotinib EI ( $t_r = 2,54$ ) sont suffisamment différents pour séparer correctement ces molécules.

De plus, lors d'une injection de regorafenib seul en solution pure, nous observons un pic chromatographique au niveau du canal MRM du regorafenib, mais aussi du regorafenib M5, au temps de rétention correspondant au regorafenib comme présenté en Figure 22. En outre, lors d'une injection de regorafenib M5 seul et pur, nous observons un pic au temps de rétention du regorafenib M5, et aucune autre interférence sur les autres canaux MRM.

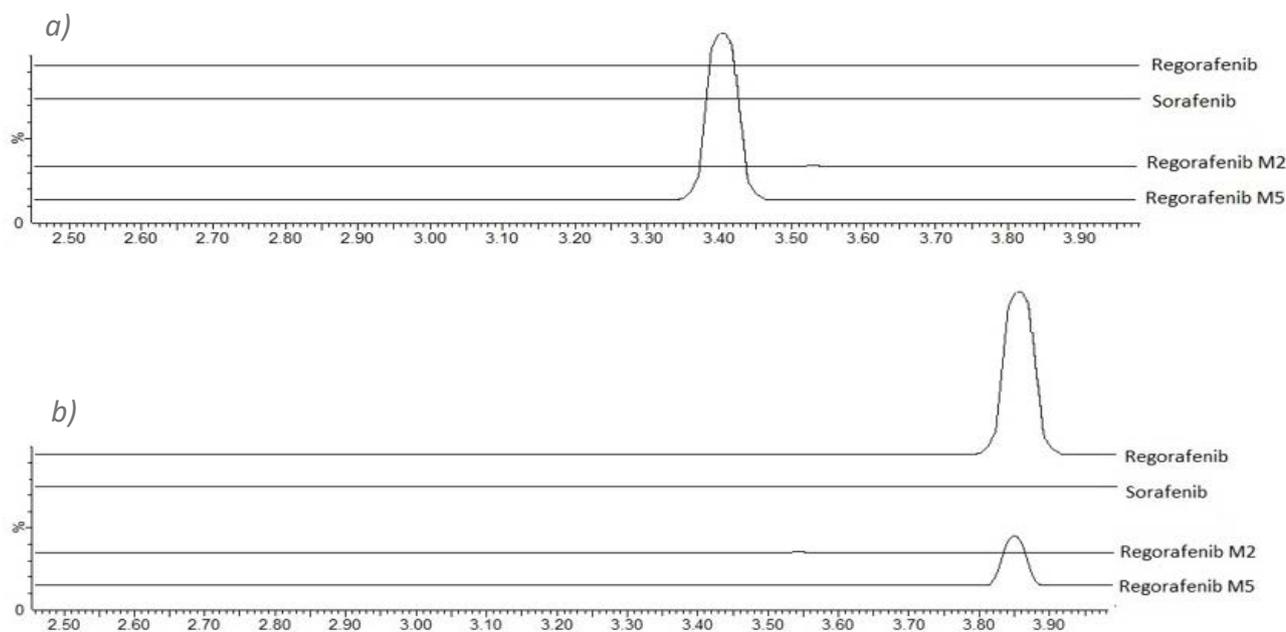


Figure 22: chromatogramme des sorafenib-like après injection de solutions pures a) de regorafenib M5 seul et b) de regorafenib seul. Intensité en fonction du temps (mn).

Comme présenté en Figure 23, le regorafenib produit un ion parent de  $m/z$  483, mais aussi un isotope à 485  $m/z$ . Or, l'ion parent du regorafenib M5 fait 485  $m/z$ . Ces deux molécules ont donc un ion parent en commun. Lors de l'étude des ions fils générés par ces deux molécules présentées sur cette même figure, on constate que les deux molécules ont certaines transitions similaires : 202,2  $m/z$ , 229,1  $m/z$  et 111,1  $m/z$ . Hors l'ion fils 202,2  $m/z$  est utilisé

comme ion de quantification pour le regorafenib M5. Ceci explique pourquoi le regorafenib croise avec son métabolite le regorafenib M5.

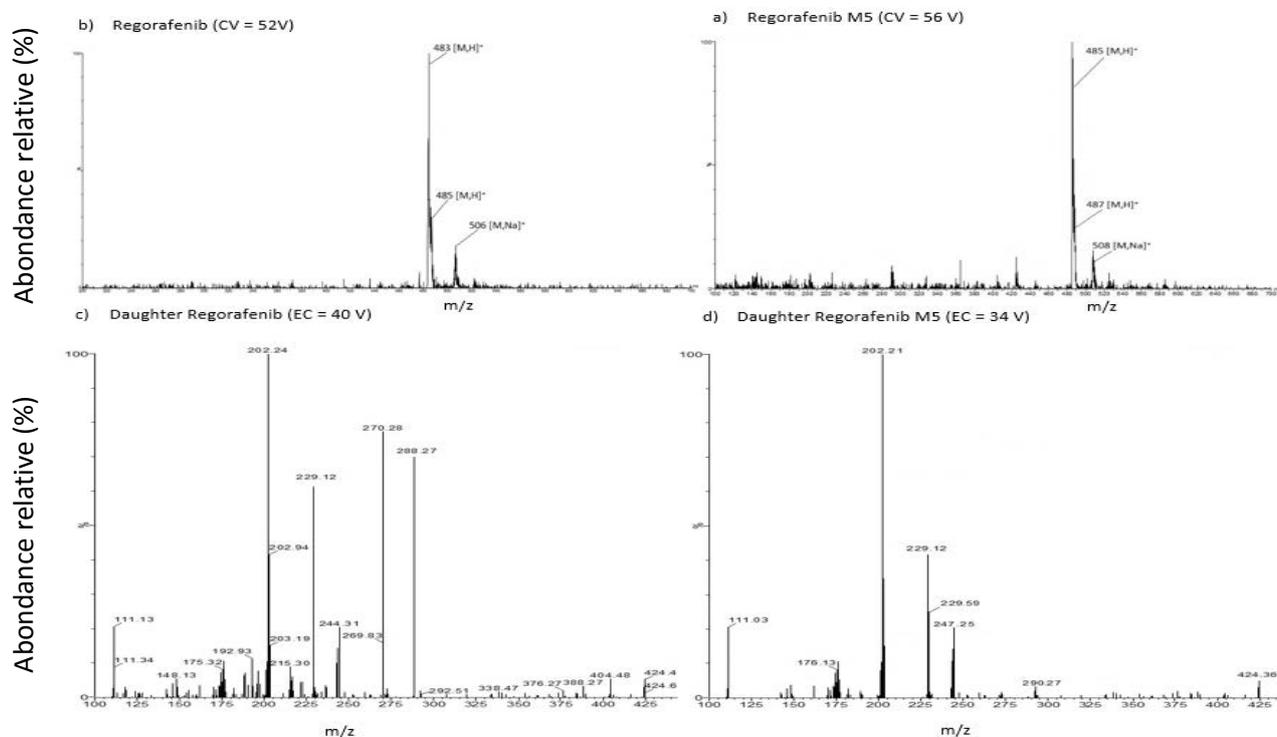


Figure 23: spectre electrospray du regorafenib (a), du regorafenib M2 (b). Spectre issu du scan des ions fils issu du parent m/z 483 du regorafenib (c) et spectre issu du scan des ions fils issu du parent m/z 485 du regorafenib M5 (d). Les tensions de cône et énergies de collision sont celles de la méthode MRM.

Cependant, la différence de temps de rétention entre les deux molécules ( $t_r = 3,36$  pour le regorafenib M5 et  $t_r = 3,81$  pour le regorafenib) permet une sélectivité de la méthode. Nous pouvons donc affirmer qu'il n'y a pas d'interférence entre ces deux composés grâce à la séparation chromatographique.

Enfin, le dasatinib EI et l'imatinib possèdent aussi des ions parents proches (494,6 et 494,2 m/z). Cependant, les  $t_r$  transitions choisies pour les noyaux fils permettent de les différencier. De plus, le dasatinib EI et l'imatinib ne génèrent pas d'ions fils croisés, comme présenté annexe 7.

c) Optimisation des temps de lecture des transitions « Dwell »

Le Dwell Time représente le temps passé par le spectromètre de masse à balayer une transition donnée. L'intensité du signal d'une molécule, défini par le nombre d'ions fils de quantification atteignant le détecteur est dépendant du temps passé par les quadripôles à balayer une transition. Ce signal sera converti en chromatogramme, reconstitué et intégré.

Fonction MRM	Molécule	Transition	Dwell time (ms)	Fonction MRM	Molécule	Transition	Dwell time (ms)
Fonction 1 (de 1,2 à 1,5 mn)	Sunitinib	339,1>283,2	0,04	Fonction 8 (de 2,6 à 3,1)	Ponatinib	533>101	0,01
	Sunitinib	339,1>326,15	0,01		Ponatinib	533>260,2	0,03
	Sunitinib EI	409,9>284	0,025		Ponatinib EI	541,2>260,2	0,025
Fonction 2 (de 1,2 à 1,5 mn)	Gefitinib	447>100	0,05		Lapatinib	581,1>365,03	0,035
	Gefitinib	447>128,1	0,02		Lapatinib	581,1>379,07	0,01
	Crizotinib	450>177,08	0,03	Fonction 9 (de 3 à 3,4 mn)	Nilotinib	530,1>259,1	0,01
	Crizotinib	450>260,16	0,005		Nilotinib	530,1>289,1	0,025
	Gefitinib EI	455,1>136,1	0,015		Nilotinib EI	534,1>289,1	0,02
Fonction 3 (de 1,3 à 1,7 mn)	Crizotinib EI	457,1>177	0,025	Fonction 10 (de 3 à 3,5 mn)	Regorafenib M5	485>202	0,06
	Vandetanib	475>83	0,01		Regorafenib M5	485>229,02	0,03
	Vandetanib	475>112,03	0,04	Fonction 11 (de 3,4 à 3,7 mn)	Regorafenib M2	499>229,2	0,02
	Afatinib	486>305,1	0,05		Regorafenib M2	499>304,2	0,05
Afatinib	486>371,2	0,01	Dabrafenib		520>277	0,015	
Afatinib EI	492,23>377	0,02	Dabrafenib		520>307,2	0,03	
Fonction 4 (de 1,5 à 1,9 mn)	Dasatinib	488,2>232,1	0,01		Dabrafenib EI	529>316,3	0,02
	Dasatinib	488,2>401,1	0,04	Fonction 12 (de 3,6 à 4 mn)	Sorafenib	465,15>211,2	0,01
	Imatinib	494,2>217,1	0,05		Sorafenib	465,15>252,2	0,03
	Imatinib	494,2>394,2	0,015		Sorafenib EI	469,1>256	0,015
	Dasatinib EI	494,6>407,1	0,02		Regorafenib	483>270	0,03
Imatinib EI	502,2>394,2	0,01	Regorafenib		483>288,2	0,01	
Fonction 5 (de 1,8 à 2,1 mn)	Sunitinib	399,1>293,2	0,04	Regorafenib EI	487>229,1	0,015	
	Sunitinib	399,1>326,15	0,01				
	Sunitinib EI	409,9>284	0,02				
Fonction 6 (de 2 à 2,3)	Bosutinib	532>113,17	0,01				
	Bosutinib	532>141,3	0,04				
	Bosutinib EI	541,1>150,3	0,025				
Fonction 7 (de 2,3 à 2,8 mn)	Ruxolitinib	307>105,1	0,005				
	Ruxolitinib	307>186,2	0,015				
	Ruxolitinib EI	316,07>186,26	0,01				
	Axitinib	387,1>221,02	0,01				
	Axitinib	387,1>356,3	0,035				
	Axitinib EI	381>356,3	0,02				
	Erlotinib	394,1>278,1	0,005				
	Erlotinib	394,1>336,2	0,01				
Erlotinib EI	400,1>284,08	0,01					

Tableau 12: fenêtres MRM, transitions et Dwell time des 19 molécules ITK et 15 étalons internes.

Si le temps de balayage est trop court, le nombre de points par pic sera augmenté, mais peu ou pas assez d'ions fils seront détectés pour les valeurs basses. Si le temps est trop long, cela diminuera le nombre de points par pic, la détection sera plus sensible, mais cela au détriment des autres molécules coéluées.

De plus, les molécules sont regroupées en fonctions MRM lorsqu'elles sont coéluées. En effet, le temps de rééquilibrage entre deux fonctions MRM est de plusieurs millisecondes sur notre TQD. Afin de gagner quelques points par pic, l'idéal est de regrouper les fenêtres.

Le réglage des temps de balayage (« Dwell Time ») se fait après mise au point chromatographique, disponible partie III. A. 2., par injection d'un point de contrôle bas. Les molécules coéluées, regroupées en fenêtres MRM et les temps de balayage sont présentés au Tableau 12. L'objectif est d'obtenir 15 à 20 points par pic.

De plus, les chromatogrammes avant et après optimisation des Dwell Time sont disponibles en annexe 8. Cette optimisation nous permettra d'avoir une méthode de dosage sensible et répétable.

## 2. Optimisation des paramètres chromatographiques

La séparation chromatographique intervient en amont de la détection par spectrométrie de masse. Elle est indispensable afin de faciliter son travail. De plus, nous avons montré que certaines molécules devaient être séparées du fait de transitions communes.

L'objectif de cette deuxième partie va être la séparation, partielle, de nos molécules à doser.

### a) Choix de la colonne

Nous apprécions chacune des colonnes dans des conditions constantes (phase mobile, pH, température, volume d'injection, solution d'injection). Le gradient « Méthode 01 » présenté au Tableau 7 est utilisé. 10 µL de solution pure contenant les 19 molécules ITK à la concentration du contrôle haut QC<sub>C</sub> sont injectés. Les colonnes sont maintenues à 25°C.

Pour chaque pic chromatographique, nous évaluons le temps de rétention ( $tr$ ) et la variance  $\sigma_t$  (calculée à partir de  $w$ , mesure de la base du pic). À partir de ces données, nous calculons la résolution  $R_s$  pour chacun des pics adjacents selon la formule :

$$R_s = \frac{tr_2 - tr_1}{\sigma_{t_1} + \sigma_{t_2}}$$

Cette formule est utilisée, car elle permet de calculer la résolution même en condition de phase mobile non isocratique. De plus, elle convient à une interprétation purement expérimentale des données.

Les résultats des essais pour les 4 colonnes sont donnés au Tableau 13. Une résolution pour être suffisante doit être supérieure à 1,5. Les cases en surbrillance rouge indiquent une résolution insuffisante ( $R_s < 1$ ). Les cases en surbrillance orange indiquent une résolution comprise entre 1 et 1,5. Les chromatogrammes sont donnés en annexe 9.

Nous constatons que les colonnes BEH C8 et Cortecs C18+ semblent dans ces conditions apporter une meilleure séparation à nos molécules. La BEH C18 sépare difficilement les molécules les plus polaires : afatinib, sunitinib, vandetanib et crizotinib. La CSH phényl-hexyl apporte un temps de rétention plus long pour une séparation moins bonne. La BEH C18 et la CSH phényl-hexyl semblent donc moins intéressantes.

BEH C18				BEH C8				CORTECS C18+				CSH Phenyl-hexyl			
Molécule	tr	4 $\sigma$ t	R <sub>s</sub>	Molécule	tr	4 $\sigma$ t	R <sub>s</sub>	Molécule	tr	4 $\sigma$ t	R <sub>s</sub>	Molécule	tr	4 $\sigma$ t	R <sub>s</sub>
Gefitinib	2,44	0,1		Gefitinib	1,5	0,12		Gefitinib	1,14	0,12		Gefitinib	1,78	0,11	
Imatinib	2,63	0,15	1,52	Afatinib	1,89	0,12	3,25	Vandetanib	1,46	0,12	2,67	Crizotinib	1,95	0,12	1,48
Afatinib	2,68	0,1	0,40	Imatinib	1,98	0,1	0,82	Afatinib	1,53	0,1	0,64	Vandetanib	2,1	0,11	1,30
Sunitinib 01	2,7	0,07	0,24	Vandetanib	2,09	0,12	1,00	Crizotinib	1,55	0,11	0,19	Afatinib	2,22	0,15	0,92
Vandetanib	2,77	0,15	0,64	Crizotinib	2,29	0,07	2,11	Imatinib	1,77	0,11	2,00	Sunitinib 01	2,46	0,11	1,85
Crizotinib	2,82	0,09	0,42	Sunitinib 01	2,34	0,06	0,77	Sunitinib 01	1,91	0,06	1,65	Imatinib	3,1	0,15	4,92
Axitinib	3,09	0,1	2,84	Bosutinib	2,5	0,1	2,00	Bosutinib	2,3	0,16	3,55	Dasatinib	3,55	0,12	3,33
Ruxolitinib	3,21	0,12	1,09	Axitinib	2,6	0,1	1,00	Dasatinib	2,59	0,09	2,32	Bosutinib	3,57	0,17	0,14
Dasatinib	3,33	0,1	1,09	Ruxolitinib	2,83	0,1	2,30	Axitinib	2,65	0,1	0,63	Sunitinib 02	3,85	0,12	1,93
Bosutinib	3,41	0,15	0,64	Dasatinib	2,89	0,1	0,60	Ruxolitinib	2,7	0,09	0,53	Erlotinib	4,5	0,11	5,65
Erlotinib	3,64	0,12	1,70	Erlotinib	3,05	0,11	1,52	Erlotinib	2,83	0,08	1,53	Lapatinib	5	0,11	4,55
Sunitinib 02	3,85	0,1	1,91	Sunitinib 02	3,2	0,1	1,43	Sunitinib 02	2,92	0,1	1,00	Axitinib	5,14	0,1	1,33
Nilotinib	4,22	0,17	2,74	Nilotinib	3,52	0,1	3,20	Lapatinib	3,31	0,11	3,71	Ponatinib	5,15	0,07	0,12
Lapatinib	4,46	0,2	1,30	Lapatinib	3,65	0,13	1,13	Nilotinib	3,49	0,07	2,00	Ruxolitinib	5,26	0,11	1,22
Ponatinib	4,81	0,12	2,19	Ponatinib	4,33	0,07	6,80	Ponatinib	4,32	0,12	8,74	Nilotinib	5,3	0,1	0,38
RM5	5,59	0,09	7,43	RM5	5,27	0,07	13,43	RM5	5,19	0,08	8,70	Regorafenib M5	6,75	0,11	13,81
Dabrafenib	5,81	0,1	2,32	Dabrafenib	5,4	0,09	1,63	Dabrafenib	5,37	0,07	2,40	Regorafenib M2	6,96	0,14	1,68
RM2	5,83	0,1	0,20	RM2	5,46	0,1	0,63	RM2	5,43	0,1	0,71	Dabrafenib	7,22	0,1	2,17
Sorafenib	6,33	0,1	5,00	Sorafenib	5,9	0,14	3,67	Sorafenib	5,95	0,1	5,20	Sorafenib	7,25	0,11	0,29
Regorafenib	6,43	0,1	1,00	Regorafenib	6,03	0,11	1,04	Regorafenib	6,1	0,12	1,36	Regorafenib	7,3	0,11	0,45

Tableau 13: temps de rétention, dispersion et résolution des 19 molécules ITK pour chacune des 4 colonnes à l'essai. En rouge les résolutions  $< 1$ , en orange les résolutions comprises entre 1 et 1,5.

Pour la suite des essais, nous gardons uniquement la colonne Cortecs C18+, qui semble apporter une meilleure séparation que la BEH C8, pour un temps d'analyse identique.

#### b) Choix des phases mobiles

La colonne qui semble la plus adaptée est la CORTECS C18+. La seconde étape de l'optimisation chromatographique va être le choix d'une composition de phase mobile idéale et d'un gradient adapté.

Pour effectuer les essais de phases mobiles, nous injectons une prise d'essai de 10 µL comportant les 19 molécules ITK en solution pure (mélange eau/acétonitrile 60/40) à la concentration correspondant au contrôle haut QC<sub>C</sub>. La température de la colonne est constante (25°C).

Dans un premier temps, nous construisons la courbe  $\ln(k) = f(\%ACN)$  en mode isocratique. Puis nous testons à gradient constant plusieurs compositions de phase mobile et déterminons laquelle semble être la plus résolutive. Enfin, nous ajustons pas à pas le gradient afin d'optimiser la séparation et de réduire au maximum le temps d'analyse.

La première étape est donc la construction de la courbe  $\ln(k) = f(\%ACN)$ . Les temps de rétention obtenus expérimentalement en fonction des pourcentages d'acétonitrile sont donnés en annexe 10. À partir de ces temps de rétention, nous calculons le facteur de rétention « k » pour chacune des molécules à chaque pourcentage d'acétonitrile selon la formule:

$$k = \frac{tr}{tm} - 1$$

Avec  $tr$  = temps de rétention pour chaque molécule,  $tm$  = temps mort de la colonne (CORTECS C18+). Les résultats sont donnés en annexe 11. Nous pouvons ainsi construire les droites  $\ln(k) = f(\%ACN)$  permettant de prédire les comportements des molécules en fonction du pourcentage isocratique d'acétonitrile. Les courbes sont présentées en Figure 24.

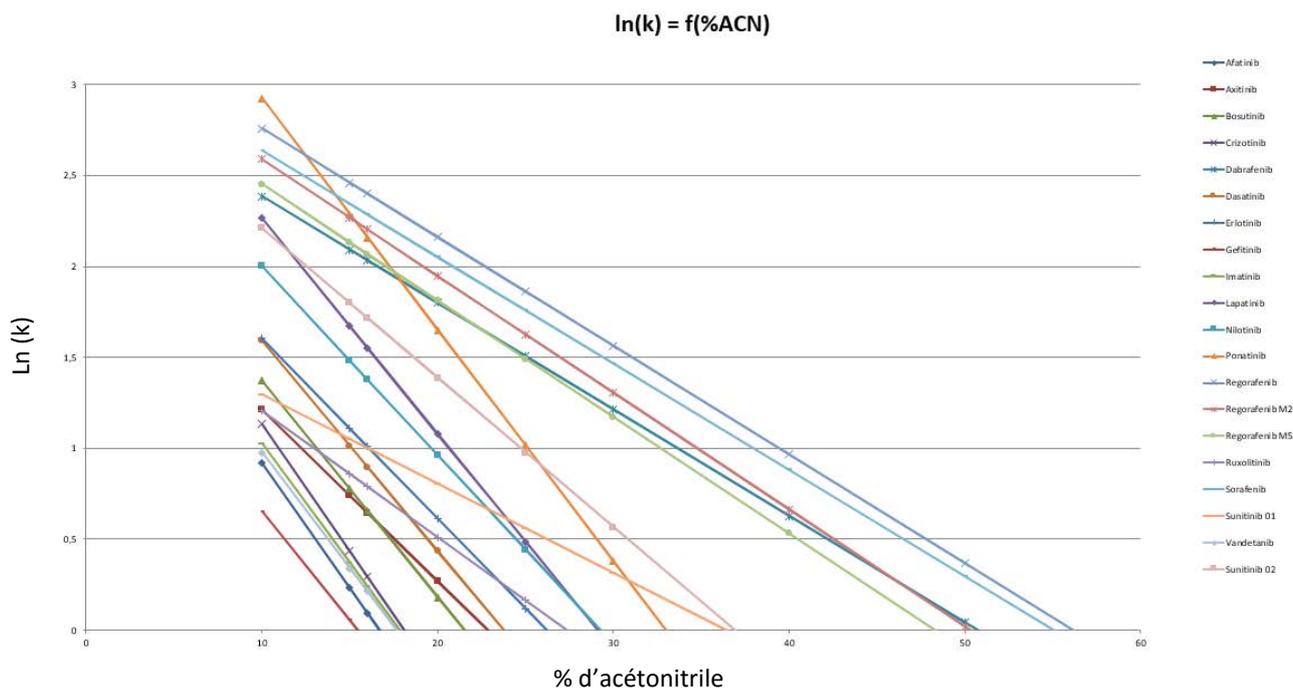


Figure 24: Logarithme néperien ( $\ln$ ) des facteurs de rétention en fonction du pourcentage d'acétonitrile en isocratique. Colonne CORTECS C18+, phase A : eau + AF 0,1%, phase B : acétonitrile + 10% de phase A, température 25°C, injection de 10  $\mu$ L de solution de QCc.

Il apparaît qu'aucun point de séparation ne semble clairement se distinguer. Nous observons un groupe de molécules très polaires (gefitinib, afatinib, vandetanib, crizotinib et imatinib) éluées pour des solubilités plus fortes (% eau élevé). À l'inverse, les molécules les moins polaires (sorafenib-like et dabrafenib) sont fortement retenues sur la colonne (% ACN > 50%). Il existe de nombreuses molécules intermédiaires éluées entre 20 et 40% d'acétonitrile. Dans tous les cas, le mode isocratique n'est pas adapté ici à une séparation rapide des molécules.

Phase Mobile	Phase A	Phase B	pH mesuré de la phase A
Composition AF	Eau + AF 0,1 %	ACN + 10 % A	3,2
Composition AA	Eau + AA 0,1 %	ACN + 10% A	4,25
Composition AAm	Eau + Acétate d'ammonium 0,1 %	ACN + 10% A	5,50

Tableau 14: compositions de phases mobiles à l'essai : acide formique (AF), acide acétique (AA), acétate d'ammonium (AAm) et pH mesurés dans la phase A.

La seconde partie va consister à l'essai de plusieurs compositions de tampons, à gradient constant. Le gradient appliqué est celui de la méthode 01 présenté au Tableau 7. Les

compositions de phase mobile testées sont présentées au Tableau 14. Nous injectons 10  $\mu$ L de solution pure QC<sub>C</sub>, la colonne CORTECS C18+ est maintenue à 25 °C.

Nous évaluons selon les mêmes modalités que précédemment, lors des essais de colonnes, les temps de rétention, la dispersion et la résolution des 19 molécules ITK. Les résultats sont présentés au Tableau 15, les chromatogrammes sont disponibles en annexe 12. Les résolutions surlignées en rouge sont trop faibles ( $R_s < 1$ ) et en orange sont intermédiaires ( $1 < R_s < 1,5$ ).

<b>Acide Acétique 0,1 %</b>				<b>Acide Formique 0,1 %</b>				<b>Acétate d'ammonium 0,1 %</b>			
<b>Molécule</b>	<b>tr</b>	<b>4<math>\sigma</math>t</b>	<b>R<sub>s</sub></b>	<b>Molécule</b>	<b>tr</b>	<b>4<math>\sigma</math>t</b>	<b>R<sub>s</sub></b>	<b>Molécule</b>	<b>tr</b>	<b>4<math>\sigma</math>t</b>	<b>R<sub>s</sub></b>
Gefitinib	0,81	0,1		Gefitinib	1,14	0,12		Sunitinib 01	2,71	0,07	
Vandetanib	1	0,13	1,65	Vandetanib	1,46	0,12	2,67	Gefitinib	3,65	0,14	8,95
Sunitinib 01	1,06	0,14	0,44	Afatinib	1,53	0,1	0,64	Imatinib	3,66	0,12	0,08
Crizotinib	1,1	0,12	0,31	Crizotinib	1,55	0,11	0,19	Vandetanib	3,9	0,15	1,78
Afatinib	1,1	0,12	0,00	Imatinib	1,77	0,11	2,00	Dasatinib	3,92	0,12	0,15
Imatinib	1,55	0,13	3,60	Sunitinib 01	1,91	0,06	1,65	Afatinib	3,95	0,12	0,25
Dasatinib	2,07	0,1	4,52	Bosutinib	2,3	0,16	3,55	Crizotinib	4,06	0,11	0,96
Bosutinib	2,27	0,12	1,82	Dasatinib	2,59	0,09	2,32	Sunitinib 02	4,13	0,12	0,61
Sunitinib 02	2,45	0,11	1,57	Axitinib	2,65	0,1	0,63	Ruxolitinib	4,3	0,07	1,79
Erlotinib	2,5	0,12	0,43	Ruxolitinib	2,7	0,09	0,53	Axitinib	4,6	0,11	3,33
Axitinib	2,75	0,07	2,63	Erlotinib	2,83	0,08	1,53	Erlotinib	4,63	0,11	0,27
Ruxolitinib	3	0,1	2,94	Sunitinib 02	2,92	0,1	1,00	Bosutinib	4,7	0,09	0,70
Lapatinib	3,62	0,12	5,64	Lapatinib	3,31	0,11	3,71	Ponatinib	5,05	0,09	3,89
Nilotinib	3,75	0,12	1,08	Nilotinib	3,49	0,07	2,00	Nilotinib	5,5	0,08	5,29
Ponatinib	4,05	0,09	2,86	Ponatinib	4,32	0,12	8,74	Regorafenib M5	5,65	0,07	2,00
Regorafenib M5	5,05	0,07	12,50	Regorafenib M5	5,19	0,08	8,70	Lapatinib	5,8	0,07	2,14
Regorafenib M2	5,2	0,12	1,58	Dabrafenib	5,37	0,07	2,40	Regorafenib M2	5,9	0,09	1,25
Dabrafenib	5,32	0,07	1,26	Regorafenib M2	5,43	0,1	0,71	Dabrafenib	6,1	0,07	2,50
Sorafenib	5,5	0,09	2,25	Sorafenib	5,95	0,1	5,20	Sorafenib	6,3	0,07	2,86
Regorafenib	5,65	0,1	1,58	Regorafenib	6,1	0,12	1,36	Regorafenib	6,35	0,08	0,67

Tableau 15: temps de rétention, dispersion et résolution des 19 molécules ITK en fonction des compositions de la phase mobile A. Colonne CORTECS C18+, gradient « méthode 01 », température 25°C, injection de 10  $\mu$ L d'une solution pure QC<sub>C</sub>.

Nous constatons que la phase mobile « acide acétique 0,1% » apporte une résolution correcte pour la plupart des molécules, excepté les plus hydrophiles (vandetanib, sunitinib 01, crizotinib, afatinib) qui sont toutes coéluées. La phase mobile « acide formique 0,1% » permet une légère meilleure séparation des molécules hydrophiles, mais plus de molécules sont coéluées au final.

La phase mobile composée d'acétate d'ammonium 0,1% en voie A est remarquable : l'utilisation de cette phase mobile entraîne une augmentation de la rétention de certaines molécules. Le dasatinib par exemple :  $t_r = 2,07$  minutes en milieu acide acétique en A contre 3,92 minutes en acétate d'ammonium. Le gefitinib lui aussi est plus retenu, son temps de rétention passe de 0,81 minute en acide acétique à 3,65 minutes en acétate d'ammonium. Ces deux molécules, ainsi que celles dont la rétention augmente lors de ce 3<sup>e</sup> essai, sont sensibles aux variations de pH. La constante de lipophilie ajustée au pH (LogD) du dasatinib passe de -0,40 à pH = 4 à environ 2 à pH 5,50. De même, le logD du gefitinib passe de 1,1 à pH = 4 à environ 2 à pH 5,5. Les logD sont issus des données bibliographiques sur les ITK. Hors, le pH de la phase A composée d'acétate d'ammonium a été mesurée à pH = 5,50 contre 3,2 pour l'acide formique et 4,75 pour l'acide acétique.

À l'inverse, certaines molécules auront le même temps de rétention malgré l'augmentation du pH des phases mobiles : c'est le cas du regorafenib, par exemple. Celui-ci possède un temps de rétention de 6,1 minutes en milieu acide formique et un  $t_r$  à 6,35 minutes en milieu acétate d'ammonium en voie A. Son logD reste constant (environ 4,35) dans cette zone de variation de pH.

Nous pouvons supposer que l'augmentation du pH entraîne la neutralisation des molécules protonées, et ainsi augmente leur affinité pour les chaînes carbonées C18 de la colonne. Ceci explique la différence des facteurs de rétention  $k$  en fonction des phases mobiles.

La composition de phase mobile la plus optimisée au regard de nos essais semble être la phase composée d'acide acétique à 0,1%. Elle apporte une très bonne résolution entre les molécules tout en gardant un temps d'analyse acceptable.

La dernière étape de l'optimisation des conditions chromatographiques va être l'ajustement pas-à-pas du gradient de concentration. Ayant maintenant choisi la colonne et la composition de la phase mobile, nous optimisons au cours de cette étape le pourcentage de phase B (acétonitrile) en fonction du temps.

Temps (mn)	% A (1 mL AA dans 1L d'H <sub>2</sub> O)	%B (ACN + 10% de A)	Débit
0,00	88	12	0,4
0,25	85	15	0,4
0,75	77	23	0,4
1,5	70	30	0,4
2,00	60	40	0,4
2,90	40	55	0,4
3,60	10	90	0,4
4,20	88	12	0,4
5,00	88	12	0,4

Tableau 16: gradient de concentration final.

Après 14 essais, nous arrivons au chromatogramme présenté en Figure 25. Le temps d'analyse est donc de 4 minutes. Les phases mobiles sont composées des solvants suivants :

- Eau + 0,1% d'acide acétique en phase A.
- Acétonitrile +10% de A en phase B.

Le gradient appliqué est présenté Tableau 16.

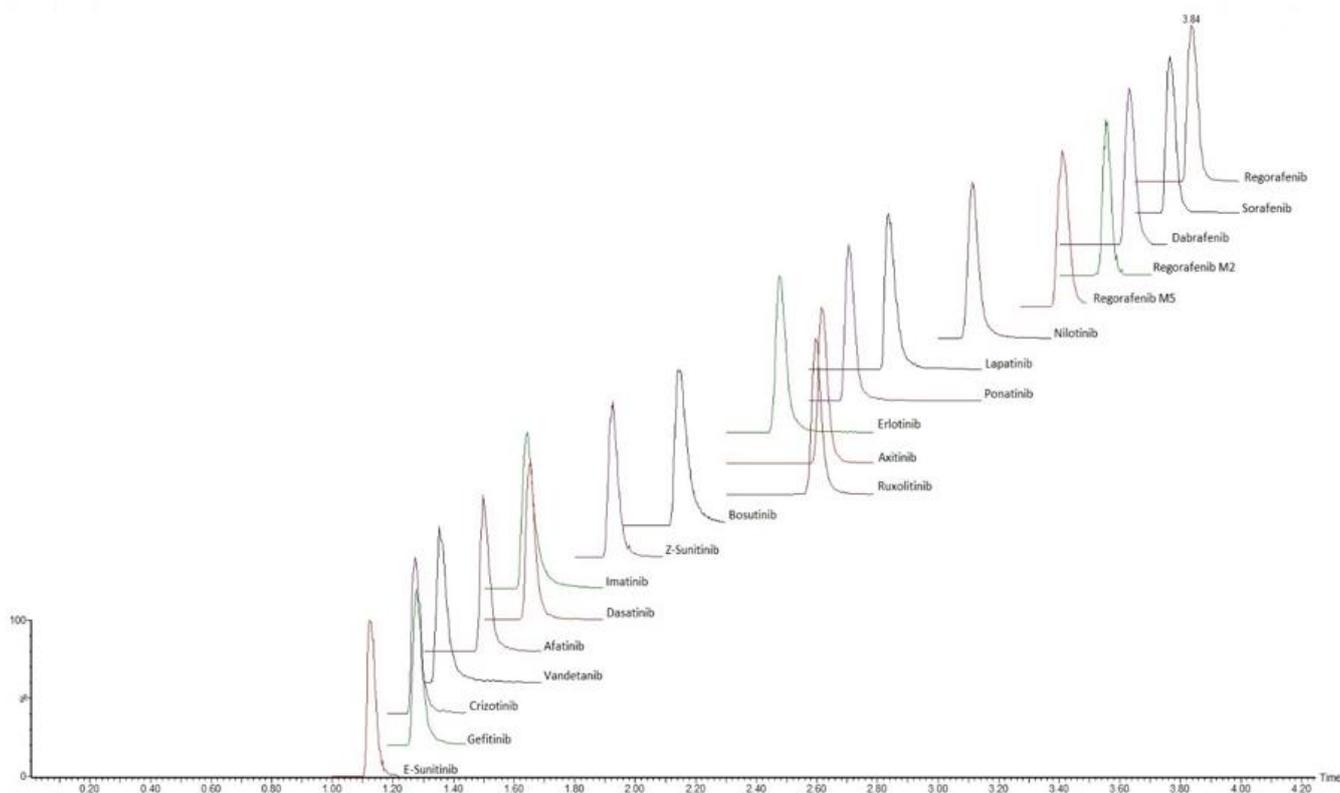


Figure 25: chromatogramme des 19 ITK après injection de 10 µL d'une solution pure QC<sub>C</sub>. Colonne CORTECS C18+, phase mobile composée d'eau + 0,1% d'acide acétique en voie A et d'acétonitrile + 10% de phase A en voie B. Température = 25°C.

### c) Optimisation des paramètres d'injection.

Le mode d'injection sélectionné est le mode « partial loop » c'est-à-dire la boucle partielle. Il permet de sauvegarder l'échantillon et apporte un minimum de contamination dans les circuits.

Pour prévenir encore plus cette contamination, le solvant « Strong » choisi est celui qui correspond au gradient de phase mobile haut : 90 % de phase B et 10% de phase A. Nous ajoutons un cycle d'injection dans la valve permettant un rinçage de celle-ci à 4 minutes c'est-à-dire en fin d'analyse. Le solvant « Weak » correspond aux conditions initiales de gradient: 12% de phase A et 88% de phase B, afin de ne pas perturber le système chromatographique.

Le volume d'injection est ensuite ajusté. De manière générale, plus le volume d'injection est faible, meilleure est la résolution des pics chromatographiques. De plus, un volume trop élevé risque d'apporter trop d'analytes et de saturer la source ESI. À l'inverse, un volume d'injection trop faible diminue la sensibilité du détecteur, car il apporte moins d'analytes quantifiables. La LLOQ est moins basse.

Le volume d'injection choisi est de 5  $\mu\text{L}$ . Il permet de quantifier nos analytes même aux plus faibles concentrations, notamment pour le point de gamme SF<sub>G1</sub> du dasatinib à 0,1 ng/ml. De plus, ce volume ne sature pas la source ESI pour le point de gamme haut SF<sub>G10</sub>.

### 3. Paramètres d'extraction

Le système d'extraction choisi est la SPE sur cartouches Oasis MCX<sup>®</sup> fournit par la société Waters<sup>®</sup>.

La première étape de solvataion des cartouches est réalisée par rinçage avec 200  $\mu\text{L}$  de méthanol, puis 200 $\mu\text{L}$  d'eau. La seconde étape consiste à déposer l'échantillon. Chaque prise d'essai est constituée de 300  $\mu\text{L}$  de plasma à analyser (point de gamme, de contrôle ou échantillons) + 250  $\mu\text{L}$  de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 1 %, 10  $\mu\text{L}$  de SF<sub>EI</sub> préalablement centrifugé, soit 560  $\mu\text{L}$  d'aliquotes. Après aspiration, les cartouches sont rincées par 200  $\mu\text{L}$  d'acide formique à 2 %. Ceci permet d'éliminer au maximum le plasma et de limiter les effets de matrice.

La phase de reprise est un mélange de solvants organiques et d'ammoniaque. Les solvants vont dissocier les analytes des liaisons apolaires avec le support. L'ammoniaque va corriger le pH afin de modifier la charge des molécules retenues : celles-ci vont se déprotoner et devenir neutres ou chargées négativement. Cela aura pour effet de les dissocier des fonctions sulfonates présentes sur la plaque.

Cette phase d'élution est constituée d'un mélange acétonitrile/méthanol/ammoniaque (30/20/4). Deux fois 50 µL sont utilisés et récupérés sur une plaque. Enfin, une dernière étape d'acidification des échantillons et d'ajout d'eau afin de diminuer la force éluante de notre phase d'injection est réalisée par ajout de 25 µL d'acide formique 8%. Le mélange final est de 125 µL : 50 µL + 50 µL de phase d'élution + 25 µL d'eau / acide formique. 5 µL sont injectés dans le système chromatographique.

Cette SPE nous permet de concentrer nos échantillons (300 µL vers 125 µL) et d'obtenir un mélange très propre comparé à une précipitation ou une extraction en phase liquide. Ceci permet de limiter l'effet matrice. La validation de méthode inclut une partie évaluant les rendements d'extraction et l'effet matrice. Nous développerons donc ces points par la suite.

## B. Validation de la méthode de dosage

Le développement terminé, les étapes de la méthode sont optimisées.

### 1. Linéarité

Trois gammes de huit ou dix points de gammes sont analysées. Les concentrations moyennes rétro calculées sont présentées en Figure 26. Les critères de validation sont acceptables selon les recommandations.

Molécule	Concentrations moyennes ng/ml (biais %), (n=3)										R <sup>2</sup> a
	SF1 (0.1)	SF2 (0.25)	SF3 (1/4/25)	SF4 (2.5/10/62.5)	SF5 (10/40/250)	SF6 (25/100/625)	SF7 (50/200/1250)	SF8 (100/400/2500)	SF9 (150/600/3750)	SF10 (200/800/5000)	
Afatinib	-	-	4.0 (0.42)	8.9 (-10.67)	39.8 (-0.42)	107.9 (7.85)	194.9 (-2.57)	392 (2.00)	637.2 (6.19)	775.5 (-3.06)	0.997
Axitinib	-	-	1 (0.67)	2.3 (-9.07)	9.9 (-13.0)	26.9 (7.49)	51.8 (3.55)	99.6 (-0.37)	157.8 (5.22)	189.3 (-5.38)	0.996
Bosutinib	-	-	4.2 (4.75)	8.8 (-12.17)	36.8 (-8.07)	105.9 (-8.07)	199.2 (-0.4)	404.4 (1.1)	614.6 (2.44)	785.9 (-1.77)	0.999
Crizotinib	-	-	4.0 (-0.75)	9.5 (-4.70)	39.6 (-0.95)	108.9 (8.88)	203.7 (1.86)	393.8 (-1.04)	636.9 (6.15)	759.9 (-5.01)	0.995
Dabrafenib	-	-	25.8 (3.23)	58.1 (-7.08)	245.1 (-1.97)	670.2 (7.23)	1239.8 (-0.8)	2377.2 (-4.91)	3931.9 (4.85)	4913.6 (-1.73)	0.998
Dasatinib	0.1 (0.00)	0.223 (-10.67)	0.983 (-1.67)	2.06 (-5.87)	9.35 (-0.47)	27.727 (10.91)	50.497 (0.99)	97.567 (-2.43)	158.09 (5.39)	193.15 (-3.43)	0.997
Erlotinib	-	-	27 (8.11)	56.9 (-8.95)	232.7 (-6.91)	637.4 (1.98)	1221.0 (-2.32)	2464.4 (-1.42)	3960.5 (5.61)	4862.8 (-2.74)	0.997
Gefitinib	-	-	4.3 (6.75)	9.1 (-9.37)	40.0 (0.12)	102.4 (2.35)	194.4 (-2.79)	394.7 (-1.33)	626.1 (4.35)	783.9 (-2.01)	0.998
Imatinib	-	-	25.6 (2.25)	58.2 (-6.90)	252.4 (0.96)	700.3 (12.05)	1264.2 (1.13)	2476.2 (-0.95)	3922.1 (4.59)	4821.2 (-3.58)	0.997
Lapatinib	-	-	26.9 (7.55)	69.1 (10.54)	268.8 (7.50)	681.2 (8.99)	1217.0 (-2.64)	2364.8 (-5.41)	3848.9 (2.64)	4993.0 (-0.14)	0.999
Nilotinib	-	-	25.3 (1.15)	58.1 (-7.08)	242.3 (-3.08)	677.3 (8.37)	1293.2 (3.45)	2543.7 (1.75)	3924.2 (4.65)	4698.4 (-6.03)	0.995
Ponatinib	-	-	1.03 (3.33)	2.03 (-7.07)	9.9 (-1.43)	27.2 (8.65)	51.3 (2.68)	99.2 (-0.8)	156.4 (4.27)	192.7 (-3.65)	0.998
Regorafenib	-	-	25.3 (1.16)	58.5 (-6.36)	248.3 (-0.7)	668.8 (-7.00)	1285.1 (2.80)	2533.1 (1.32)	3918.3 (4.49)	4755.4 (-4.89)	0.997
Regorafenib M2	-	-	25.5 (2.17)	69.3 (10.94)	269.1 (7.63)	677.0 (8.32)	1287.9 (3.04)	2567.0 (2.68)	3949.0 (5.31)	4754.8 (-4.90)	0.996
Regorafenib M5	-	-	22.5 (-10.19)	69.8 (11.72)	270.4 (8.17)	659.3 (5.49)	1237.3 (-1.02)	2459.5 (-1.62)	3990.4 (6.41)	5042.4 (0.85)	0.998
Ruxolitinib	-	-	4.2 (4.08)	9.8 (-2.00)	40 (-0.1)	108 (7.96)	196 (-1.99)	386.8 (-3.3)	622.9 (3.82)	790.5 (-1.19)	0.999
Sorafenib	-	-	25.7 (2.61)	58.5 (-6.33)	256.3 (2.52)	698.3 (11.73)	1278.9 (2.31)	2472.0 (-1.12)	3853.0 (2.75)	4819.9 (-3.60)	0.998
Sunitinib	-	-	4.0 (0.42)	8.9 (-10.67)	39.8 (-0.42)	107.9 (7.85)	194.9 (-2.57)	392.0 (-2.00)	637.2 (6.19)	775.5 (-3.06)	0.997
Vandetanib	-	-	1.0 (0.67)	2.3 (-10.00)	10.8 (8.30)	28.7 (14.84)	49.1 (-1.90)	94.7 (-5.27)	160.4 (-6.94)	194.9 (-2.53)	0.996

Figure 26: concentrations retro-calculées moyennes des ITK à partir des gammes de calibration, biais (%) et coefficients de détermination (R<sup>2</sup>a)

## 2. Fidélité et Justesse

Les résultats des essais de fidélité et de justesse sont présentés au Tableau 17. Ceux-ci peuvent être considérés comme valides pour toutes nos molécules selon les critères des normes de validation.

Molécule	Concentration théorique (ng/mL)	Répétabilité		Reproductibilité		Biais moyen (%)
		Concentration observée (moyenne ± SD) (n=5)	CV (ANOVA) (%) (n=15)	Concentration observée (moyenne ± SD) (n=15)	CV (ANOVA) (%) (n=15)	
Afatinib	4	4.16± 0.24	5.8	3.79± 0.35	10.39	-5.25
	12.1	11.85± 0.39	7.47	11.19± 0.99	9.36	-7.52
	162.5	145.02± 3.75	5.75	139.46± 8.49	6.22	-14.18
	650	649.67± 47.77	6.51	621.81± 59.24	10.49	4.34
Axitinib	1	1.04± 0.07	9.54	0.95± 0.35	14.61	4.93
	3	3.06± 0.26	8.44	2.92± 0.27	9.44	-2.51
	40	38.37± 0.70	5.78	37.29± 2.16	5.79	-6.77
	160	161.86± 8.33	6.30	159.66 ± 9.70	6.30	-0.21
Bosutinib	4	3.09± 0.15	10.01	3.83± 0.33	3.96	-5.70
	12.1	11.75± 0.67	7.06	10.64± 1.23	12.89	-12.07
	162.5	153.01± 5.76	6.17	142.95± 11.26	8.46	-12.03
	650	639.55± 48.09	6.04	643.95± 69.37	12.16	-0.93
Crizotinib	4	3.83± 0.33	5.89	3.83± 0.5	13.17	-9.21
	12.1	11.23± 0.52	7.68	10.81± 0.89	8.17	-10.63
	162.5	142.56± 7.32	8.32	142.76± 10.40	7.12	-12.15
	650	609.08± 26.96	14.25	621.83± 44.72	7.65	-4.33
Dabrafenib	25	25.43± 0.7	8.95	23.58± 1.74	8.54	-5.67
	75	71.20± 2.90	6.61	70.48± 5.86	9.02	-6.03
	1000	894.72± 33.41	6.18	899.75± 64.41	7.37	-10.03
	4000	3995.33± 388.39	3.02	3992± 337.6	8.26	-0.20
Dasatinib	0.1	0.12± 0.02	17.68	0.11± 0.02	18.96	5.33
	1	0.98± 0.11	8.22	0.94± 0.07	10.26	-6
	40	35.70± 1.32	6.78	35.95± 2.35	6.44	-5.89
	160	154.92± 7.79	4.95	159.05± 7.9	4.97	-10.13
Erlotinib	25	25.97± 1.04	3.80	24.66 ± 1.31	5.79	-1.38
	75	69.81± 3.04	5.61	66.11± 4.50	7.23	-11.86
	1000	931.22± 17.76	5.26	881.81± 56.15	6.76	-11.82
	4000	4178.77± 194.90	4.97	3975± 274.92	7.55	-0.62
Gefitinib	4	3.90± 0.19	5.12	3.73± 0.37	11.20	-8.14
	12.1	11.05± 0.60	9.61	11.26± 1.43	13.70	-6.90
	162.5	141.12± 2.38	7.63	142.41± 14.25	10.81	-12.37
	650	572.35± 26.69	4.55	621.75± 45.02	8.07	-4.35
Imatinib	25	23.83± 1.07	4.75	22.84± 1.75	8.55	-8.66
	75	72.15± 2.8	6.75	71.12± 4.55	6.25	-5.17
	1000	938.86± 31.12	5.89	917.1± 53.81	5.86	-8.29
	4000	3988.73± 204.46	4.96	3956.44± 226.58	6.01	-1.09
Lapatinib	25	24.11± 2	14.07	24.72± 3.30	13.05	-1.12
	75	66.55± 13.32	12.05	75.15± 11.18	14.86	0.19
	1000	870.99± 25.85	9.19	1009.57± 137.29	14.98	0.96
	4000	3956.20± 171.8	7.2	4041± 428.53	11.69	1.02
Nilotinib	25	22.27± 0.55	3.09	22.11± 0.84	4.02	-11.57
	75	65.28± 1.45	6.02	65.56± 4.76	7.69	-12.59
	1000	888.69± 23.31	6.83	902.61± 79.37	9.46	-9.74
	4000	3662.40± 182.37	5.12	3909.45± 276.67	7.72	-2.26
Ponatinib	1	1.05± 0.03	5.26	0.96± 0.08	10.26	-3.80
	3	2.92± 0.14	5.51	2.8± 0.21	7.79	-6.69
	40	37.79± 0.90	7.26	36.11± 2.42	7.13	-9.73
	160	161.39± 7.93	2.95	157.87 ± 11.14	7.66	-1.33
Regorafenib	25	24.14± 1.12	3.35	23.06± 1.41	6.94	-7.77
	75	69.79± 3.75	6.62	68.47± 4.89	7.33	-8.70
	1000	918.66± 30.70	6.94	907.3± 58.90	6.30	-9.27
	4000	3729.06± 165.84	4.96	3842.66± 228.00	6.28	-3.93
Regorafenib M2	25	22.13± 0.6	4.64	22.54± 1.02	4.45	-11.21
	75	61.68± 3.97	6.50	64.26± 4.34	6.86	-14.33
	1000	826.46± 41.49	6.43	876.80± 66.50	8.00	-12.32
	4000	3488.43± 182.58	4.33	3791.47± 304.12	9.09	-5.21
Regorafenib M5	25	28.09± 1.99	11.07	23.61± 4.1	19.35	-5.58
	75	68.39± 6.47	11.31	63.67± 7.60	14.11	-12.17
	1000	847.36± 34.14	6.42	889.11± 65.43	7.70	-11.09
	4000	3789.51± 283.69	7.16	3941.80± 333.25	8.92	-1.45
Ruxolitinib	4	3.68± 0.16	4.66	3.69± 0.17	4.71	-9.05
	12.1	10.67± 0.49	6.44	11.02± 0.7	6.37	-9.06
	162.5	135.84± 3.36	5.65	141.43± 9.13	6.75	-12.97
	650	583.06± 13.33	4.98	619.46± 47.2	8.45	-4.7
Sorafenib	25	22.32± 0.75	7.04	22.73± 1.56	6.81	-9.07
	75	75.09± 4.1	7.58	73.59± 5.44	7.58	-1.88
	1000	1000.05± 35.14	7.74	962.44± 72.81	7.74	-3.76
	4000	4074.9± 223.51	5.79	3972.96± 251.67	6.54	-0.68
Sunitinib	1	0.97± 0.04	4.03	0.89± 0.13	17.43	-10.94
	3	3.09± 0.15	7.53	2.95± 0.29	10.77	-1.66
	75	39.48± 1.1	6.4	38.11± 2.53	6.73	-4.72
	160	155.37± 8.51	5.87	156.74± 9.61	6.23	-2.04
Vandetanib	1	0.84± 0.09	11.01	0.85± 0.09	10.86	-15.27
	3	2.65± 0.23	13.10	2.69± 0.35	12.91	-10.24
	75	35.55± 2.43	8.83	34.47± 2.93	8.36	-13.84
	160	145.76± 7.06	7.12	143.42± 10.98	7.86	-10.36

Tableau 17: répétabilité, reproductibilité et biais pour les 19 molécules ITK. Les coefficients de variation (CV) sont évalués par analyse des variances (ANOVA).

### 3. Limites de quantification et de détection

Les limites de quantification basse de nos molécules ont bien des critères de répétabilité, reproductibilité et biais inférieur à 20%. Nous ajoutons deux points de gamme pour le dasatinib : 0,1 ng/ml et 0,25 ng/ml adaptées

Nous n'avons pu descendre aussi bas en quantification avec les autres molécules, notamment celles présentes dans le groupe C des concentrations basses (sunitinib, axitinib, ponatinib et vandetanib). Au regard des publications de pharmacocinétiques, il n'y a aucun intérêt clinique à atteindre des concentrations aussi infimes. C'est pourquoi seul le dasatinib est validé jusqu'à 0,1 ng/ml dans notre méthode.

### 4. Coefficient d'extraction et spécificité

	QC1			QC2			QC3			Moyennes		
	Effet Matrice	Rendement Extraction	Efficacité processus	Effet Matrice	Rendement Extraction	Efficacité processus	Effet Matrice	Rendement Extraction	Efficacité processus	Effet Matrice	Rendement Extraction	Efficacité processus
	Absolu (%)	Absolu (%)	Relatif (%)	Absolu (%)	Absolu (%)	Relatif (%)	Absolu (%)	Absolu (%)	Relatif (%)	Absolu (%)	Absolu (%)	Relatif (%)
Afatinib	-4.21	-0.7	0.01	-12.41	8.82	-3.46	-12.52	9.7	-11.45	6.9	-5.93	-2.66
Axitinib	18.7	-27.21	24.56	5.34	-41.30	-14.41	-7.06	-35.60	0.31	5.66	-34.70	3.49
Bosutinib	-12.74	-23.28	-13.74	-12.15	-13.77	-1.69	-3.83	-5.89	-13.53	-9.57	-14.31	-0.63
Crizotinib	-16.62	-11.08	-23.81	-9.11	4.50	-1.06	-11.17	14.99	-4.82	-12.3	2.80	-9.19
Dabrafenib	4.47	-81.07	-28.19	-5.29	-74.36	-12.50	-8.73	-70.45	7.75	-3.18	-75.3	-10.98
Dasatinib	-10.50	-19.74	-1.75	5.49	-21.95	26.92	1.35	-23.85	14.35	-1.22	-21.84	13.17
Erlotinib	0.92	-17.38	-2.18	-0.60	-15.94	3.87	-2.28	-6.99	14.70	-0.65	-13.44	5.46
Gefitinib	16.40	-2.95	-6.82	-4.36	21.25	-14.75	-11.20	35.83	1.56	0.28	18.04	-6.67
Imatinib	-4.21	-11.17	1.97	-5.84	-7.56	1.22	-1.81	1.36	3.02	-3.96	-5.79	2.07
Lapatinib	5.77	-81.58	26.34	-4.77	-78.38	5.63	3.68	-74.96	15.55	1.56	-78.31	15.84
Nilotinib	-2.86	-72.19	15.14	-1.89	-74.44	-3.65	-1.91	-70.57	9.93	-2.22	-72.40	7.14
Ponatinib	-5.50	-36.91	-14.29	-4.50	-34.68	-2.00	4.82	-34.31	13.00	-1.73	-35.30	-1.10
Regorafenib	15.91	-78.19	32.99	-6.04	-78.66	2.83	-5.77	-75.12	4.05	1.37	-77.32	13.29
Regorafenib M2	2.11	-79.70	33.69	-0.47	-72.29	41.36	-3.11	-66.45	44.71	-0.49	-72.81	39.92
Regorafenib M5	-0.77	-76.61	44.44	4.89	76.98	23.64	7.00	-76.09	13.79	3.71	-76.56	27.29
Ruxolitinib	-1.22	-75.34	57.39	-0.25	-75.29	26.30	-0.08	-71.58	26.43	-0.52	-74.07	36.70
Sorafenib	-10.43	-87.69	8.66	4.20	-84.32	29.92	-7.75	-74.45	15.33	-4.66	-82.15	17.97
Sunitinib	-12.94	-10.05	-8.47	-10.19	-3.07	5.28	-10.59	6.50	9.75	-11.24	-2.20	2.19
Vandetanib	19.51	25.69	0.01	-3.22	32.86	-5.05	-5.46	39.35	-12.50	3.61	32.63	-5.85
Afatinib EI	-7.1	10.78		-12.1	12.05		-14.30	14.86		-11.17	12.56	
Axitinib EI	-5.38	-28.25		-12.55	-28.24		-5.39	-36.54		-7.77	-31.01	
Bosutinib EI	11.26	-13.34		19.42	-8.13		12.12	-10.49		14.27	-10.65	
Crizotinib EI	-11.16	1.44		-14.31	9.19		-14.77	25.83		-13.41	12.15	
Dabrafenib EI	-8.60	-70.53		-1.72	-71.85		-7.94	-72.86		-6.09	-71.74	
Dasatinib EI	3.53	-30.45		-7.26	-30.02		-1.76	-30.87		-1.83	-30.44	
Erlotinib EI	-0.85	-14		-5.97	-14.57		-2.45	-18.69		-3.09	-15.75	
Gefitinib EI	-2.72	4.97		-1.46	37.24		-5.1	25.34		-3.09	22.51	
Imatinib EI	-7.04	-10.03		-11.12	-3.56		-2.18	-1.36		-6.78	-4.98	
Ponatinib EI	-1.48	-32.76		-4.98	-33.04		-4.53	-36.06		-3.66	-33.95	
Nilotinib EI	-3.02	-75.71		-2.01	-73.45		-7.32	-71.65		-4.12	-73.60	
Regorafenib EI	-12.30	-82.10		-15.64	-76.86		-4.94	-76.25		-10.96	-78.40	
Ruxolitinib EI	-6.88	-40.1		-3.64	-39.66		-5.30	-37.62		-0.52	-39.13	
Sorafenib EI	-10.32	-40.10		-1.66	-38.38		-4.12	-37.62		-5.37	-38.70	
Sunitinib EI	-10.80	-7.28		-12.31	-6.20		-10.42	-3.93		-11.17	-5.80	

Tableau 18: effet matrice, rendement d'extraction et efficacité du processus (relatif car corrigé par l'étalon interne) des 19 molécules, pour les trois niveaux de contrôle QCA, QCB et QCC. (n=3).

Le rendement d'extraction et l'effet matrice sont évalués par comparaison des aires obtenues des analytes dans différentes conditions. Pour le rendement d'extraction, comparaison des aires entre un blanc matrice dopé puis extrait avec un blanc matrice extrait puis dopé à la même concentration. Pour l'effet matrice, comparaison d'un blanc matrice extrait puis dopé à un blanc pur dopé. Les résultats sont présentés au Tableau 18.

Nous constatons que l'effet matrice reste dans des normes acceptables pour toutes nos molécules, c'est-à-dire  $\pm 20\%$ . Grâce à l'utilisation de la SPE, nous éliminons un maximum de composés organiques susceptibles d'interagir avec les analytes dans la source. Lors du processus d'extraction, nous ne réalisons qu'un seul rinçage de la matrice. Nous aurions pu augmenter ce nombre de rinçages en cas d'effet matrice important.

D'autre part, les rendements d'extraction sont parfois très faibles. C'est particulièrement le cas pour les molécules les plus lipophiles : dabrafenib, sorafenib-like (sorafenib, regorafenib et ses métabolites). C'est aussi le cas pour des molécules de polarité intermédiaires: le lapatinib, le nilotinib et le ruxolitinib. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer le faible rendement d'extraction de ces molécules, parmi lesquelles des défauts d'affinité pour la SPE choisie, ou une saturation des cartouches. Ces rendements d'extraction concordent avec la bibliographie.

Nous pourrions essayer de réduire le volume de plasma à extraire pour diminuer la saturation des cartouches, quitte à perdre un peu de signal notamment au niveau des LLOQ (actuellement 300 mL). Nous pourrions de même acidifier un peu plus le plasma, afin d'ioniser au maximum les molécules à extraire, et ainsi augmenter leur affinité pour les fonctions  $\text{SO}_3^-$  de la SPE MCX.

Cependant, les molécules ayant les rendements d'extraction très faibles sont suffisamment détectées, et ce même pour les limites basses de quantification. De plus, ces rendements d'extraction sont stables sur l'ensemble de la gamme de concentration et l'efficacité du processus, corrigé par étalonnage interne, est stable pour toutes les molécules sur l'ensemble de la gamme étudiée.

Par conséquent, nous avons choisi de garder ce processus d'extraction.

## 5. Sélectivité et contamination

Lors de l'analyse de 6 blancs matrice extraits, aucune molécule n'est détectée par le spectromètre de masse aux temps de rétention de chacune des molécules ni étalon interne. De plus, lors du passage d'un blanc après un point de gamme haut, l'aire du blanc est inférieure à 20% de la LLOQ pour chaque molécule, et inférieure à 5% pour les étalons internes.

Comme présenté en annexe 13, aucune molécule n'est détectée par le spectromètre de masse lors d'injection d'un blanc matrice. La méthode est donc sélective, et n'entraîne pas de « carry-over ».

## VI. Discussion

L'objectif de ce travail était de développer et valider des outils analytiques permettant de réaliser un suivi thérapeutique pharmacologique des inhibiteurs de tyrosines kinases, ainsi que permettant de réaliser des études cliniques de définition de seuils pharmacodynamiques / pharmacocinétiques. Ces outils analytiques doivent permettre un dosage quantitatif dans le plasma de la plupart des inhibiteurs de tyrosine-kinases disponibles à la pharmacopée. Ces traitements anticancéreux sont de plus en plus prescrits.

De nombreuses classes pharmacologiques font appel au suivi thérapeutique pharmacologique afin d'améliorer le bénéfice clinique qu'elles apportent et diminuer le risque qu'elles génèrent. C'est le cas par exemple des antiépileptiques, des antipsychotiques, des immunosuppresseurs ou encore des antirétroviraux. Cet outil n'est possible que lorsqu'il existe une relation bien définie entre concentration plasmatique et activité, ou effets indésirables. Jusqu'avant les inhibiteurs de tyrosine-kinases, il était proposé pour guider le traitement de quelques molécules anticancéreuses bien définies, comme le 5 fluoro-uracile, le méthotrexate, les taxanes ou le busulfan. Concernant les autres anti-cancéreux non ciblés, peu d'études ont pu démontrer un intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique dans la prise en charge du patient.

Les inhibiteurs de tyrosine-kinases, arrivés plus récemment, présentent de nombreuses caractéristiques indiquant qu'un suivi pourra améliorer les bénéfices que les malades tireront de ces traitements. En effet, il existe une relation entre concentration plasmatique et activité de ces médicaments. De plus, utilisés par voie orale à dose fixe, ils sont sensibles aux variations pharmacocinétiques interindividuelles et intraindividuelles. Ces variations sont générées par : une prise alimentaire concomitante pouvant modifier leur absorption, un transport dépendant des protéines plasmatiques, une métabolisation enzymatique CYP dépendante pouvant être induite ou inhibée par d'autres traitements et une élimination dépendante des clairances tissulaires. En outre ce sont des traitements chroniques, l'adhérence est un facteur clé dans la réussite au traitement. Tous ces paramètres vont influencer les concentrations plasmatiques, positivement ou négativement. En cas de sous-dosage, une perte d'efficacité des traitements est à redouter, avec une sélection des clones tumoraux résistants aux thérapeutiques. En cas de surdosage, il existe un risque d'augmenter les effets indésirables des médicaments. Cela peut avoir des conséquences tragiques pour certains ITK, par exemple des risques thromboemboliques avec le ponatinib, ou des risques de cytopénies avec le ruxolitinib. Grâce à un simple contrôle des concentrations plasmatiques sanguines, le suivi thérapeutique pharmacologique permettra d'une part de prédire la bonne réponse du patient au traitement, mais également de prévenir certains effets indésirables graves. L'outil développé permettra de réaliser ce contrôle des concentrations plasmatiques.

Par ailleurs, plusieurs molécules étudiées au cours de ce mémoire n'ont pas pu ou n'ont pas encore démontré avec certitude la corrélation entre concentrations plasmatiques, effets pharmacologiques et effets indésirables. C'est le cas des ITK les plus récents. Il pourrait être alors intéressant de réaliser une ou plusieurs études de relation dose / activité, puis dans un second temps des études de définitions de seuils d'efficacité, en utilisant la méthode analytique développée ici.

Afin de disposer d'une telle méthode analytique, nous nous sommes orientés vers la chromatographie liquide ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem. La chromatographie ultra haute pression apporte un bénéfice en termes de séparation et de temps d'analyse totale comparé à la chromatographie haute pression. La spectrométrie de masse apporte une sensibilité et une spécificité très bonne en comparaison

aux autres méthodes de détection (UV, fluorescence). Ces outils sont également utilisés dans les autres publications de la littérature, et sont conformes avec les pratiques du laboratoire.

Parmi la vingtaine de molécules ITK disponibles sur le marché, le dosage se focalise sur les 17 ayant des concentrations plasmatiques compatibles avec une analyse multi-résiduelle ne dépassant pas les 5 mg/L. Ceci exclut donc des molécules intéressantes à doser telles que le vemurafenib ou le pazopanib. Malgré tout, l'intérêt du dosage de ces deux molécules a pu être démontré lors de précédentes études de STP, et il est donc nécessaire de les doser avec une autre technique.

Afin de définir les gammes de concentrations, il a été nécessaire de s'appuyer sur des études de STP, telles que décrites précédemment, ainsi que sur des études de pharmacocinétique de phase I et II. Les études de pharmacocinétique ont pour but d'étudier le devenir du médicament chez un petit groupe de patients. Ceux-ci sont recrutés afin de correspondre aux critères d'inclusion de l'étude : âge, poids, comorbidités, etc. De nombreux patients issus de populations particulières en sont exclus. Cela conduit à un biais dit de sélection. Il n'est pas possible de savoir *a priori* comment évoluent les concentrations de certains ITK dans des conditions physiologiques particulières : patients âgés ou très jeunes, insuffisants rénaux / hépatiques, patients dénutris ou en surpoids, ou même patients à l'état général altéré du fait de leur pathologie cancéreuse. Cependant, l'étendue des gammes de concentrations est très large et peut donc compenser le biais de sélection, en essayant de maintenir dans la mesure du possible une LLOQ 5 fois plus basse que la  $C_{min}$  des études de pharmacocinétiques. L'objectif initial était de quantifier toutes ces molécules en incluant les points de gamme  $SF_{G1}$  et  $SF_{G2}$ . Cependant, la LLOQ de certaines molécules variait de plus de 20 %, notamment pour le vandetanib, pour lequel il n'y a pas dans cette méthode d'étalon interne. Il a fallu relever les seuils de LLOQ des molécules, tout en conservant  $SF_{G1}$  et  $SF_{G2}$  pour le dasatinib. Ces deux points de gammes sont cliniquement pertinents uniquement pour cette molécule.

Certaines molécules à doser ont des concentrations plasmatiques résiduelles inférieures à 10 ng/ml. C'est le cas du ponatinib, du crizotinib, de l'axitinib, du sunitinib et du dasatinib. Pour ce dernier, l'expérience apportée par l'étude Optim Dasa montre que de nombreux

patients ont une  $C_{\min} < 1$  ng/ml. Afin de détecter ces concentrations très basses, les paramètres de la source ESI ont été optimisés pour atteindre la sensibilité suffisante. La tension de capillaire, la température de la source, des gaz et le débit de  $N_2$  sont adaptés afin d'obtenir un signal intense et stable.

De plus, le triple quadripôle a été paramétré afin de caractériser chaque molécule et étalon interne par un ion parent et un ion fils. Pour affiner l'analyse, une transition de confirmation est ajoutée uniquement pour les molécules à quantifier. Ceci permet une détection univoque des analytes. Les paramètres optimaux d'énergie de collision et de tension de cône ont été recherchés. Les temps de scan (ou Dwell time) ont été ajustés. Malgré quelques transitions communes, il n'y a pas d'interférences entre les molécules coéluées.

L'outil chromatographique a été optimisé manuellement. Certes, l'approche de type Quality by Design aurait probablement guidé vers une séparation peut-être meilleure, avec moins d'étapes expérimentales. Cependant, le temps d'analyse obtenu est relativement court. Toutes les molécules ne sont pas forcément totalement séparées, mais la spectrométrie de masse permet d'identifier spécifiquement les composés coélués. De plus, les phases mobiles sont relativement peu toxiques et couramment utilisées. Un additif à la phase mobile A qui est un acide faible, l'acide acétique a été utilisé. Celui-ci permet d'ioniser certaines molécules en les maintenant à pH acide. Ceci contribue à diminuer leurs temps de rétention et permet de les séparer de celles plus retenues sur la colonne. L'utilisation d'un tampon aurait probablement pu favoriser l'équilibre du système chromatographique, en absorbant mieux les variations de pH. C'est d'autant plus vrai dans la mesure où l'appareil sur lequel ce dosage sera réalisé est utilisé aussi pour d'autres analyses, avec d'autres phases mobiles. Un cycle de rinçage est donc nécessaire avant toute utilisation de l'appareil pour garantir l'équilibre du système. De plus, seule une étude *a posteriori* de la robustesse de la méthode nous indiquera comment notre système évoluera dans le temps. L'outil chromatographique est aussi dépendant du milieu dans lequel seront injectées les molécules.

L'étape d'extraction est une étape clé dans le développement de la méthode. Elle permet de passer d'une matrice complexe biologique riche en molécules endogènes et exogènes, à une phase de reprise purifiée contenant notamment les molécules d'intérêt. Lors de la phase

d'extraction, certaines molécules ont un rendement assez faible (autour de 20% pour les sorafenib-like notamment). Des analyses complémentaires auraient pu être réalisées afin de déterminer l'origine de ce faible rendement. Plusieurs hypothèses ont été évoquées. La cartouche pourrait être saturée, c'est-à-dire atteindre son potentiel rétentif maximal. Elle fixerait alors préférentiellement les molécules mieux retenues au détriment de celles qui le sont moins bien. La limite du pouvoir rétentif de la micro-colonne MCX serait atteinte et les molécules entreraient alors en compétition pour s'y greffer. Autre hypothèse, le pouvoir éluant des phases de reprise pourrait être insuffisant. Cela entraînerait un rendement d'extraction faible pour les molécules moins bien entraînées. Le pouvoir d'élution de la phase de reprise utilisée pourrait être évalué en comparaison à d'autres phases, nous permettant d'infirmer ou de confirmer cette seconde hypothèse. Cependant, conformément aux recommandations des annales de toxicologie analytiques de 2004 concernant les procédures d'extraction, la méthode peut être ainsi validée car les rendements d'extraction sont stables sur toute l'étendue de la gamme. Par conséquent, il n'a pas été réalisé d'investigations complémentaires.

De plus, l'effet matrice est très limité grâce à ce procédé d'extraction, ce qui est remarquable sachant que la source ESI est particulièrement sensible à la composition de la matrice. Cette méthode de SPE sur plaque MCX a donc été retenue. D'autre part, la phase de reprise est fortement éluante (25 µL d'eau, 100 µL de solvants organiques). Ceci peut perturber le système chromatographique. Afin de compenser cela, la première partie du gradient de concentration est un palier « aqueux » (88 % d'eau). Il permet de concentrer les analytes en tête de colonne et d'affiner les pics chromatographiques. Cette méthode d'extraction est fonctionnelle et validée.

La validation de la méthode a été effectuée selon les recommandations internationales, qui incluent une étude de la justesse de l'analyse ainsi que de la robustesse *a posteriori*. L'étude de la justesse devrait idéalement être réalisée par « Cross-validation » inter-laboratoires. En effet, seule l'externalisation des contrôles qualité externes (CQE), c'est-à-dire la comparaison aux valeurs obtenues dans les autres laboratoires, peut garantir la justesse des points de gammes et de contrôles. Cependant, actuellement il n'existe pas d'autre laboratoire en France ou en Europe pouvant doser toutes ces molécules régulièrement. Cette « Cross-Validation »

n'est donc à ce jour pas réalisable. Afin de réduire au maximum les risques d'erreur de justesse, nous appliquons des mesures rigoureuses. Nos  $SM_G$  et  $SM_{QC}$  sont différentes, fabriquées à des jours différents et vérifiées. De plus, la teneur des poudres dont elles sont issues est garantie par les fabricants.

La robustesse de la méthode sera évaluée *a posteriori*, après plusieurs utilisations par plusieurs opérateurs différents dans un premier temps et en conditions réelles au quotidien. Cette étude seule peut garantir le bon fonctionnement de la méthode de dosage notamment sur le long terme. Cependant, la validation analytique selon la méthodologie appliquée est suffisante aujourd'hui afin de pouvoir rendre des résultats d'analyse fiables.

Pour toutes ces raisons, les choix analytiques présentés dans ce mémoire ont été faits, et la méthode validée en conséquence.

## **VII. Conclusion et perspectives**

Une méthode de dosage analytique de 17 inhibiteurs de tyrosine-kinases et 2 métabolites actifs du regorafenib dans le plasma a été mise en place au cours de ce travail. L'outil d'analyse choisi est l'extraction en phase solide, la séparation par UHPLC et la détection par la spectrométrie de masse en tandem sur source ESI.

Cette méthode de dosage permettra d'une part d'effectuer du suivi thérapeutique pharmacologique au CHU de Bordeaux. Les prescripteurs pourront être ainsi guidés dans leurs choix thérapeutiques ainsi que dans la prise en charge du patient. D'autre part, il sera possible de réaliser des études de relation pharmacocinétique / pharmacodynamiques ainsi que de définitions de seuils. Le suivi thérapeutique pharmacologique a apporté la preuve de son utilité dans le suivi des premiers inhibiteurs de tyrosine-kinases. Il faut maintenant approfondir, étendre ce suivi aux molécules les plus récentes et démontrer dans le cadre d'études cliniques son intérêt dans la prise en charge thérapeutique des patients. Ces seuils pourraient faire l'objet à terme de recommandations par les sociétés savantes, appliquées au quotidien par les praticiens. De nouvelles méthodes pourraient alors être développées pour faciliter ce suivi au quotidien.

Le laboratoire travaille actuellement sur le prélèvement « Dry Blood Spot », ou buvard. L'intérêt est non plus de réaliser une prise de sang veineux au patient, mais de prélever une goutte de sang, au doigt, et de laisser sécher cette goutte sur un papier buvard. Ce papier peut être envoyé par le médecin généraliste du patient par courrier postal, emballé correctement, au laboratoire pour analyse. La méthode pourrait un jour être adaptée à l'utilisation des papiers buvards.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- 
- <sup>1</sup> "Les Cancers En France - Institut National Du Cancer - Edition 2013," n.d.
- <sup>2</sup> Bruce A. Chabner and Thomas G. Roberts, "Chemotherapy and the War on Cancer," *Nature Reviews Cancer* 5, no. 1 (January 2005): 65–72, doi:10.1038/nrc1529.
- <sup>3</sup> "Dossier Du CNHIM - Revue D'évaluation Sur Le Médicament. 2001, XXII, 1-2," n.d.
- <sup>4</sup> H. Schmidli et al., "Population Pharmacokinetics of Imatinib Mesylate in Patients with Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukaemia: Results of a Phase III Study," *British Journal of Clinical Pharmacology* 60, no. 1 (July 2005): 35–44, doi:10.1111/j.1365-2125.2005.02372.x.
- <sup>5</sup> David Marin et al., "Adherence Is the Critical Factor for Achieving Molecular Responses in Patients with Chronic Myeloid Leukemia Who Achieve Complete Cytogenetic Responses on Imatinib," *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, no. 14 (May 10, 2010): 2381–88, doi:10.1200/JCO.2009.26.3087.
- <sup>6</sup> P. C. Nowell, "The Minute Chromosome (Ph1) in Chronic Granulocytic Leukemia," *Blut* 8 (April 1962): 65–66.
- <sup>7</sup> Michael W. N. Deininger, John M. Goldman, and Junia V. Melo, "The Molecular Biology of Chronic Myeloid Leukemia," *Blood* 96, no. 10 (November 15, 2000): 3343–56.
- <sup>8</sup> John M. Goldman and Junia V. Melo, "Chronic Myeloid Leukemia — Advances in Biology and New Approaches to Treatment," *New England Journal of Medicine* 349, no. 15 (October 9, 2003): 1451–64, doi:10.1056/NEJMra020777.
- <sup>9</sup> Thomas O'Hare, Christopher A. Eide, and Michael W. N. Deininger, "Bcr-abl Kinase Domain Mutations, Drug Resistance, and the Road to a Cure for Chronic Myeloid Leukemia," *Blood* 110, no. 7 (October 1, 2007): 2242–49, doi:10.1182/blood-2007-03-066936.
- <sup>10</sup> Hagop Kantarjian et al., "Dasatinib versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia," *The New England Journal of Medicine* 362, no. 24 (June 17, 2010): 2260–70, doi:10.1056/NEJMoa1002315.
- <sup>11</sup> Xiaoning Wang et al., "Differential Effects of Dosing Regimen on the Safety and Efficacy of Dasatinib: Retrospective Exposure–response Analysis of a Phase III Study," *Clinical Pharmacology : Advances and Applications* 5 (June 10, 2013): 85–97, doi:10.2147/CPAA.S42796.
- <sup>12</sup> Mirna Golemovic et al., "AMN107, a Novel Aminopyrimidine Inhibitor of Bcr-abl, Has in Vitro Activity against Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia," *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11, no. 13 (July 1, 2005): 107, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2601.
- <sup>13</sup> Giuseppe Saglio et al., "Nilotinib versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia," *The New England Journal of Medicine* 362, no. 24 (June 17, 2010): 2251–59, doi:10.1056/NEJMoa0912614.
- <sup>14</sup> James Signorovitch et al., "Major Molecular Response during the First Year of Dasatinib, Imatinib or Nilotinib Treatment for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: A Network Meta-Analysis," *Cancer Treatment Reviews* 40, no. 2 (March 2014): 285–92, doi:10.1016/j.ctrv.2013.09.004.
- <sup>15</sup> J. E. Cortes et al., "A Phase 2 Trial of Ponatinib in Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias," *The New England Journal of Medicine* 369, no. 19 (November 7, 2013): 1783–96, doi:10.1056/NEJMoa1306494.
- <sup>16</sup> A. Ullrich et al., "Human Epidermal Growth Factor Receptor cDNA Sequence and Aberrant Expression of the Amplified Gene in A431 Epidermoid Carcinoma Cells," *Nature* 309, no. 5967 (June 31, 1984): 418–25.
- <sup>17</sup> D. Graus-Porta, "ErbB-2, the Preferred Heterodimerization Partner of All ErbB Receptors, Is a Mediator of Lateral Signaling," *The EMBO Journal* 16, no. 7 (April 1, 1997): 1647–55, doi:10.1093/emboj/16.7.1647.
- <sup>18</sup> Sreenath V. Sharma et al., "Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer," *Nature Reviews Cancer* 7, no. 3 (March 2007): 169–81, doi:10.1038/nrc2088.

- 
- <sup>19</sup> S. W. Morris et al., "Fusion of a Kinase Gene, ALK, to a Nucleolar Protein Gene, NPM, in Non-Hodgkin's Lymphoma," *Science (New York, N.Y.)* 267, no. 5196 (January 20, 1995): 316–17.
- <sup>20</sup> Manabu Soda et al., "Identification of the Transforming EML4–ALK Fusion Gene in Non-Small-Cell Lung Cancer," *Nature* 448, no. 7153 (August 2, 2007): 561–66, doi:10.1038/nature05945.
- <sup>21</sup> Tony S. Mok et al., "Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma," *The New England Journal of Medicine* 361, no. 10 (September 3, 2009): 947–57, doi:10.1056/NEJMoa0810699.
- <sup>22</sup> Edward S. Kim et al., "Gefitinib versus Docetaxel in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer (INTEREST): A Randomised Phase III Trial," *Lancet (London, England)* 372, no. 9652 (November 22, 2008): 1809–18, doi:10.1016/S0140-6736(08)61758-4.
- <sup>23</sup> Rafael Rosell et al., "Erlotinib versus Standard Chemotherapy as First-Line Treatment for European Patients with Advanced EGFR Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer (EURTAC): A Multicentre, Open-Label, Randomised Phase 3 Trial," *The Lancet. Oncology* 13, no. 3 (March 2012): 239–46, doi:10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
- <sup>24</sup> Lecia V. Sequist et al., "Phase III Study of Afatinib or Cisplatin plus Pemetrexed in Patients with Metastatic Lung Adenocarcinoma with EGFR Mutations," *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, no. 27 (September 20, 2013): 3327–34, doi:10.1200/JCO.2012.44.2806.
- <sup>25</sup> Jean-Charles Soria et al., "Afatinib versus Erlotinib as Second-Line Treatment of Patients with Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Lung (LUX-Lung 8): An Open-Label Randomised Controlled Phase 3 Trial," *The Lancet. Oncology* 16, no. 8 (August 2015): 897–907, doi:10.1016/S1470-2045(15)00006-6.
- <sup>26</sup> Kenichi Suda et al., "EGFR T790M Mutation: A Double Role in Lung Cancer Cell Survival?," *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 4, no. 1 (January 2009): 1–4, doi:10.1097/JTO.0b013e3181913c9f.
- <sup>27</sup> Yuankai Shi et al., "Icotinib versus Gefitinib in Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (ICOGEN): A Randomised, Double-Blind Phase 3 Non-Inferiority Trial," *The Lancet. Oncology* 14, no. 10 (September 2013): 953–61, doi:10.1016/S1470-2045(13)70355-3.
- <sup>28</sup> Robert J. Motzer et al., "Prognostic Factors for Survival in Previously Treated Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma," *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22, no. 3 (February 1, 2004): 454–63, doi:10.1200/JCO.2004.06.132.
- <sup>29</sup> Ahmed O. Kaseb et al., "Vascular Endothelial Growth Factor in the Management of Hepatocellular Carcinoma: A Review of Literature," *Cancer* 115, no. 21 (November 1, 2009): 4895–4906, doi:10.1002/cncr.24537.
- <sup>30</sup> J. C. Lee et al., "Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Colorectal Cancer Patients," *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 36, no. 6 (April 2000): 748–53.
- <sup>31</sup> J. Folkman, "Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications," *The New England Journal of Medicine* 285, no. 21 (November 18, 1971): 1182–86, doi:10.1056/NEJM197111182852108.
- <sup>32</sup> J. Folkman et al., "Isolation of a Tumor Factor Responsible for Angiogenesis," *The Journal of Experimental Medicine* 133, no. 2 (February 1, 1971): 275–88.
- <sup>33</sup> D. R. Senger et al., "Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites Fluid," *Science* 219, no. 4587 (February 25, 1983): 983–85, doi:10.1126/science.6823562.
- <sup>34</sup> Daniel J. Hicklin and Lee M. Ellis, "Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis," *Journal of Clinical Oncology* 23, no. 5 (February 10, 2005): 1011–27, doi:10.1200/JCO.2005.06.081.
- <sup>35</sup> J G Herman et al., "Silencing of the VHL Tumor-Suppressor Gene by DNA Methylation in Renal Carcinoma.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, no. 21 (October 11, 1994): 9700–9704.
- <sup>36</sup> Robert J. Motzer and Ronald M. Bukowski, "Targeted Therapy for Metastatic Renal Cell Carcinoma," *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, no. 35 (December 10, 2006): 5601–8, doi:10.1200/JCO.2006.08.5415.

- 
- <sup>37</sup> Bernard Escudier et al., "Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma," *The New England Journal of Medicine* 356, no. 2 (January 11, 2007): 125–34, doi:10.1056/NEJMoa060655.
- <sup>38</sup> Axel Hauschild et al., "Results of a Phase III, Randomized, Placebo-Controlled Study of Sorafenib in Combination with Carboplatin and Paclitaxel as Second-Line Treatment in Patients with Unresectable Stage III or Stage IV Melanoma," *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, no. 17 (June 10, 2009): 2823–30, doi:10.1200/JCO.2007.15.7636.
- <sup>39</sup> Robert J. Motzer et al., "Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma," *The New England Journal of Medicine* 356, no. 2 (January 11, 2007): 115–24, doi:10.1056/NEJMoa065044.
- <sup>40</sup> Cora N. Sternberg et al., "A Randomised, Double-Blind Phase III Study of Pazopanib in Patients with Advanced And/or Metastatic Renal Cell Carcinoma: Final Overall Survival Results and Safety Update," *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 49, no. 6 (April 2013): 1287–96, doi:10.1016/j.ejca.2012.12.010.
- <sup>41</sup> Megan J Robinson and Melanie H Cobb, "Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways," *Current Opinion in Cell Biology* 9, no. 2 (April 1997): 180–86, doi:10.1016/S0955-0674(97)80061-0.
- <sup>42</sup> Helen Davies et al., "Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer," *Nature* 417, no. 6892 (June 27, 2002): 949–54, doi:10.1038/nature00766.
- <sup>43</sup> Paul B. Chapman et al., "Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation," *The New England Journal of Medicine* 364, no. 26 (June 30, 2011): 2507–16, doi:10.1056/NEJMoa1103782.
- <sup>44</sup> Srdan Verstovsek et al., "A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis," *The New England Journal of Medicine* 366, no. 9 (March 1, 2012): 799–807, doi:10.1056/NEJMoa1110557.
- <sup>45</sup> D. J. Slamon et al., "Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene," *Science (New York, N.Y.)* 235, no. 4785 (January 9, 1987): 177–82.
- <sup>46</sup> David Cameron et al., "A Phase III Randomized Comparison of Lapatinib plus Capecitabine versus Capecitabine Alone in Women with Advanced Breast Cancer That Has Progressed on Trastuzumab: Updated Efficacy and Biomarker Analyses," *Breast Cancer Research and Treatment* 112, no. 3 (December 2008): 533–43, doi:10.1007/s10549-007-9885-0.
- <sup>47</sup> Kimberly L. Blackwell et al., "Randomized Study of Lapatinib Alone or in Combination with Trastuzumab in Women with ErbB2-Positive, Trastuzumab-Refractory Metastatic Breast Cancer," *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, no. 7 (March 1, 2010): 1124–30, doi:10.1200/JCO.2008.21.4437.
- <sup>48</sup> J H Beumer, "Without Therapeutic Drug Monitoring, There Is No Personalized Cancer Care," *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 93, no. 3 (March 1, 2013): 228–30, doi:10.1038/clpt.2012.243.
- <sup>49</sup> Stephane Picard et al., "Trough Imatinib Plasma Levels Are Associated with Both Cytogenetic and Molecular Responses to Standard-Dose Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia," *Blood* 109, no. 8 (April 15, 2007): 3496–99, doi:10.1182/blood-2006-07-036012.
- <sup>50</sup> Richard A. Larson et al., "Imatinib Pharmacokinetics and Its Correlation with Response and Safety in Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia: A Subanalysis of the IRIS Study," *Blood* 111, no. 8 (April 15, 2008): 4022–28, doi:10.1182/blood-2007-10-116475.
- <sup>51</sup> George D. Demetri et al., "Imatinib Plasma Levels Are Correlated with Clinical Benefit in Patients with Unresectable/metastatic Gastrointestinal Stromal Tumors," *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, no. 19 (July 1, 2009): 3141–47, doi:10.1200/JCO.2008.20.4818.
- <sup>52</sup> Deng Q, Mitsiades N, Negri J, et al., "Dasatinib (BMS-354825): A Multitargeted Kinase Inhibitor with Activity against Multiple Myeloma.," *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2005, 106:Abstract 1571 edition.
- <sup>53</sup> Shah NP, Nicoll JM, Bleickardt E, et al., "Potent Transient Inhibition of BCR-ABL by Dasatinib Leads to Complete Cytogenetic Remissions in Patients with Chronic Myeloid Leukemia: Implications for Patient Management and Drug Development," *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2006, 2006;108:Abstract 2166. edition.

- 
- <sup>54</sup> Wang et al., "Differential Effects of Dosing Regimen on the Safety and Efficacy of Dasatinib."
- <sup>55</sup> Rousselot P, Mollica L, Etienne G, et al., "Pharmacologic Monitoring of Dasatinib as First Line Therapy in Newly Diagnosed Chronic Phase Chronic Myelogenous Leukemia (CP-CML) Identifies Patients at Higher Risk of Pleural Effusion: A Sub-Analysis of the OPTIM-Dasatinib Trial.," *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2012, 120:Abstract 3770 edition.
- <sup>56</sup> Richard A. Larson et al., "Population Pharmacokinetic and Exposure-Response Analysis of Nilotinib in Patients with Newly Diagnosed Ph+ Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase," *European Journal of Clinical Pharmacology* 68, no. 5 (December 30, 2011): 723–33, doi:10.1007/s00228-011-1200-7.
- <sup>57</sup> Francis J. Giles et al., "Nilotinib Population Pharmacokinetics and Exposure-Response Analysis in Patients with Imatinib-Resistant or -Intolerant Chronic Myeloid Leukemia," *European Journal of Clinical Pharmacology* 69, no. 4 (October 5, 2012): 813–23, doi:10.1007/s00228-012-1385-4.
- <sup>58</sup> Poe-Hirr Hsyu et al., "Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationship of Bosutinib in Patients with Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 71, no. 1 (January 2013): 209–18, doi:10.1007/s00280-012-1998-4.
- <sup>59</sup> Yuan-Yuan Zhao et al., "The Relationship between Drug Exposure and Clinical Outcomes of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Gefitinib," *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 28, no. 3 (September 2011): 697–702, doi:10.1007/s12032-010-9541-0.
- <sup>60</sup> Denis Soulieres et al., "Multicenter Phase II Study of Erlotinib, an Oral Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients with Recurrent or Metastatic Squamous Cell Cancer of the Head and Neck," *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22, no. 1 (January 1, 2004): 77–85, doi:10.1200/JCO.2004.06.075.
- <sup>61</sup> Marcello Tiseo et al., "Correlation between Erlotinib Pharmacokinetics, Cutaneous Toxicity and Clinical Outcomes in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)," *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 83, no. 2 (February 2014): 265–71, doi:10.1016/j.lungcan.2013.12.001.
- <sup>62</sup> M. Hidalgo et al., "Phase I and Pharmacologic Study of OSI-774, an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Malignancies," *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 19, no. 13 (July 1, 2001): 3267–79.
- <sup>63</sup> Shinji Yamazaki, "Translational Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling from Nonclinical to Clinical Development: A Case Study of Anticancer Drug, Crizotinib," *The AAPS Journal* 15, no. 2 (April 2013): 354–66, doi:10.1208/s12248-012-9436-4.
- <sup>64</sup> Brian I. Rini et al., "Five-Year Survival in Patients with Cytokine-Refractory Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Axitinib," *Clinical Genitourinary Cancer* 11, no. 2 (June 2013): 107–14, doi:10.1016/j.clgc.2012.12.004.
- <sup>65</sup> Brian I. Rini et al., "Diastolic Blood Pressure as a Biomarker of Axitinib Efficacy in Solid Tumors," *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 17, no. 11 (June 1, 2011): 3841–49, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2806.
- <sup>66</sup> Brian I. Rini et al., "Axitinib in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis," *Journal of Clinical Pharmacology* 53, no. 5 (May 2013): 491–504, doi:10.1002/jcph.73.
- <sup>67</sup> B. I. Rini et al., "Axitinib Dose Titration: Analyses of Exposure, Blood Pressure and Clinical Response from a Randomized Phase II Study in Metastatic Renal Cell Carcinoma," *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 26, no. 7 (July 2015): 1372–77, doi:10.1093/annonc/mdv103.
- <sup>68</sup> B. Blanchet et al., "Validation of an HPLC-UV Method for Sorafenib Determination in Human Plasma and Application to Cancer Patients in Routine Clinical Practice," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49, no. 4 (May 1, 2009): 1109–14, doi:10.1016/j.jpba.2009.02.008.
- <sup>69</sup> Masahide Fukudo et al., "Exposure-Toxicity Relationship of Sorafenib in Japanese Patients with Renal Cell Carcinoma and Hepatocellular Carcinoma," *Clinical Pharmacokinetics* 53, no. 2 (February 2014): 185–96, doi:10.1007/s40262-013-0108-z.

- 
- <sup>70</sup> Brett E. Houk et al., "Relationship between Exposure to Sunitinib and Efficacy and Tolerability Endpoints in Patients with Cancer: Results of a Pharmacokinetic/pharmacodynamic Meta-Analysis," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 66, no. 2 (July 2010): 357–71, doi:10.1007/s00280-009-1170-y.
- <sup>71</sup> Sandrine Faivre et al., "Safety, Pharmacokinetic, and Antitumor Activity of SU11248, a Novel Oral Multitarget Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients with Cancer," *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, no. 1 (January 1, 2006): 25–35, doi:10.1200/JCO.2005.02.2194.
- <sup>72</sup> Tinya J. Abrams et al., "SU11248 Inhibits KIT and Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta in Preclinical Models of Human Small Cell Lung Cancer," *Molecular Cancer Therapeutics* 2, no. 5 (May 2003): 471–78.
- <sup>73</sup> Dirk B. Mendel et al., "In Vivo Antitumor Activity of SU11248, a Novel Tyrosine Kinase Inhibitor Targeting Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor Receptors: Determination of a Pharmacokinetic/pharmacodynamic Relationship," *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 9, no. 1 (January 2003): 327–37.
- <sup>74</sup> Diane-Charlotte Imbs et al., "Pharmacokinetics of Pazopanib Administered in Combination with Bevacizumab," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 73, no. 6 (June 2014): 1189–96, doi:10.1007/s00280-014-2455-3.
- <sup>75</sup> Djoeko de Wit et al., "Therapeutic Drug Monitoring to Individualize the Dosing of Pazopanib: A Pharmacokinetic Feasibility Study," *Therapeutic Drug Monitoring* 37, no. 3 (June 2015): 331–38, doi:10.1097/FTD.0000000000000141.
- <sup>76</sup> Klaus Mross et al., "A Phase I Dose-Escalation Study of Regorafenib (BAY 73-4506), an Inhibitor of Oncogenic, Angiogenic, and Stromal Kinases, in Patients with Advanced Solid Tumors," *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18, no. 9 (May 1, 2012): 2658–67, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1900.
- <sup>77</sup> Keith T. Flaherty et al., "Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma," *The New England Journal of Medicine* 363, no. 9 (August 26, 2010): 809–19, doi:10.1056/NEJMoa1002011.
- <sup>78</sup> Gerald S. Falchook et al., "Dose Selection, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of BRAF Inhibitor Dabrafenib (GSK2118436)," *Clinical Cancer Research* 20, no. 17 (September 1, 2014): 4449–58, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0887.
- <sup>79</sup> Francesca Carlomagno et al., "ZD6474, an Orally Available Inhibitor of KDR Tyrosine Kinase Activity, Efficiently Blocks Oncogenic RET Kinases," *Cancer Research* 62, no. 24 (December 15, 2002): 7284–90.
- <sup>80</sup> S. N. Holden et al., "Clinical Evaluation of ZD6474, an Orally Active Inhibitor of VEGF and EGF Receptor Signaling, in Patients with Solid, Malignant Tumors," *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 16, no. 8 (August 2005): 1391–97, doi:10.1093/annonc/mdi247.
- <sup>81</sup> Jack G. Shi et al., "The Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety of Orally Dosed INCB018424 Phosphate in Healthy Volunteers," *Journal of Clinical Pharmacology* 51, no. 12 (December 2011): 01, doi:10.1177/0091270010389469.
- <sup>82</sup> Jack G. Shi et al., "The Effect of CYP3A4 Inhibition or Induction on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Orally Administered Ruxolitinib (INCB018424 Phosphate) in Healthy Volunteers," *The Journal of Clinical Pharmacology* 52, no. 6 (June 1, 2012): 809–18, doi:10.1177/0091270011405663.
- <sup>83</sup> Matthias Freiwald et al., "Population Pharmacokinetics of Afatinib, an Irreversible ErbB Family Blocker, in Patients with Various Solid Tumors," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 73, no. 4 (April 2014): 759–70, doi:10.1007/s00280-014-2403-2.
- <sup>84</sup> Yu Sunakawa et al., "Regorafenib in Japanese Patients with Solid Tumors: Phase I Study of Safety, Efficacy, and Pharmacokinetics," *Investigational New Drugs* 32, no. 1 (April 4, 2013): 104–12, doi:10.1007/s10637-013-9953-8.
- <sup>85</sup> Rolf W. Sparidans et al., "Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Assay for the Light Sensitive Tyrosine Kinase Inhibitor Axitinib in Human Plasma," *Journal of Chromatography. B,*

---

*Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877, no. 32 (December 15, 2009): 4090–96, doi:10.1016/j.jchromb.2009.10.024.

<sup>86</sup> Peter de Bruijn et al., “Bioanalytical Method for the Quantification of Sunitinib and Its N-Desethyl Metabolite SU12662 in Human Plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography/tandem Triple-Quadrupole Mass Spectrometry,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, no. 4 (March 11, 2010): 934–41, doi:10.1016/j.jpba.2009.10.020.

<sup>87</sup> Shou-Xia Xiang et al., “Fast Quantitative Analysis of Four Tyrosine Kinase Inhibitors in Different Human Plasma Samples Using Three-Way Calibration- Assisted Liquid Chromatography with Diode Array Detection,” *Journal of Separation Science*, May 28, 2015, doi:10.1002/jssc.201500391.

<sup>88</sup> Sparidans et al., “Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Assay for the Light Sensitive Tyrosine Kinase Inhibitor Axitinib in Human Plasma.”

<sup>89</sup> Michael S. Roberts et al., “Determination of Crizotinib in Human and Mouse Plasma by Liquid Chromatography Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS),” *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 960 (June 1, 2014): 151–57, doi:10.1016/j.jchromb.2014.04.035.

<sup>90</sup> Rolf W. Sparidans et al., “Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometric Assay for the Mutated BRAF Inhibitor Dabrafenib in Mouse Plasma,” *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 925 (April 15, 2013): 124–28, doi:10.1016/j.jchromb.2013.02.025.

<sup>91</sup> Michael T. Furlong et al., “A Validated LC-MS/MS Assay for the Simultaneous Determination of the Anti-Leukemic Agent Dasatinib and Two Pharmacologically Active Metabolites in Human Plasma: Application to a Clinical Pharmacokinetic Study,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 58 (January 25, 2012): 130–35, doi:10.1016/j.jpba.2011.09.008.

<sup>92</sup> Takuya Ishida, Takafumi Naito, and Junichi Kawakami, “Simultaneous Determination of Erlotinib and Its Isomeric Major Metabolites in Human Plasma Using Isocratic Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Its Clinical Application,” *Biomedical Chromatography: BMC* 29, no. 5 (May 2015): 643–46, doi:10.1002/bmc.3357.

<sup>93</sup> Ling-Zhi Wang et al., “Rapid Determination of Gefitinib and Its Main Metabolite, O-Desmethyl Gefitinib in Human Plasma Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry,” *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879, no. 22 (July 15, 2011): 2155–61, doi:10.1016/j.jchromb.2011.05.056.

<sup>94</sup> Karine Titier et al., “Quantification of Imatinib in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry,” *Therapeutic Drug Monitoring* 27, no. 5 (October 2005): 634–40.

<sup>95</sup> Jacek Musijowski, Monika Filist, and Piotr J. Rudzki, “Sensitive Single Quadrupole LC/MS Method for Determination of Lapatinib in Human Plasma,” *Acta Poloniae Pharmaceutica* 71, no. 6 (December 2014): 1029–36.

<sup>96</sup> Misato Yuki et al., “High-Performance Liquid Chromatographic Assay for the Determination of Nilotinib in Human Plasma,” *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 34, no. 7 (2011): 1126–28.

<sup>97</sup> Frank-Thorsten Hafner, Daniel Werner, and Michael Kaiser, “Determination of Regorafenib (BAY 73-4506) and Its Major Human Metabolites BAY 75-7495 (M-2) and BAY 81-8752 (M-5) in Human Plasma by Stable-Isotope Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry,” *Bioanalysis* 6, no. 14 (2014): 1923–37, doi:10.4155/bio.14.52.

<sup>98</sup> Sridhar Veeraraghavan et al., “Simultaneous Quantification of Ruxolitinib and Nilotinib in Rat Plasma by LC-MS/MS: Application to a Pharmacokinetic Study,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 94 (June 2014): 125–31, doi:10.1016/j.jpba.2014.01.040.

<sup>99</sup> Lie Li et al., “Quantitation of Sorafenib and Its Active Metabolite Sorafenib N-Oxide in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry,” *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 878, no. 29 (November 1, 2010): 3033–38, doi:10.1016/j.jchromb.2010.08.049.

<sup>100</sup> Peter de Bruijn et al., “Bioanalytical Method for the Quantification of Sunitinib and Its N-Desethyl Metabolite SU12662 in Human Plasma by Ultra Performance Liquid Chromatography/tandem Triple-

---

Quadrupole Mass Spectrometry," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, no. 4 (March 11, 2010): 934–41, doi:10.1016/j.jpba.2009.10.020.

<sup>101</sup> Feng Bai et al., "Determination of Vandetanib in Human Plasma and Cerebrospinal Fluid by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS)," *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879, no. 25 (September 1, 2011): 2561–66, doi:10.1016/j.jchromb.2011.07.012.

<sup>102</sup> Irina Andriamanana et al., "Simultaneous Analysis of Anticancer Agents Bortezomib, Imatinib, Nilotinib, Dasatinib, Erlotinib, Lapatinib, Sorafenib, Sunitinib and Vandetanib in Human Plasma Using LC/MS/MS," *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 926 (May 1, 2013): 83–91, doi:10.1016/j.jchromb.2013.01.037.

<sup>103</sup> Nielka P. van Erp et al., "A Validated Assay for the Simultaneous Quantification of Six Tyrosine Kinase Inhibitors and Two Active Metabolites in Human Serum Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry," *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 937 (October 15, 2013): 33–43, doi:10.1016/j.jchromb.2013.08.013.

<sup>104</sup> N. a. G. Lankheet et al., "Method Development and Validation for the Quantification of Dasatinib, Erlotinib, Gefitinib, Imatinib, Lapatinib, Nilotinib, Sorafenib and Sunitinib in Human Plasma by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry," *Biomedical Chromatography: BMC* 27, no. 4 (April 2013): 466–76, doi:10.1002/bmc.2814.

<sup>105</sup> Stéphane Bouchet et al., "Simultaneous Determination of Nine Tyrosine Kinase Inhibitors by 96-Well Solid-Phase Extraction and Ultra Performance LC/MS-MS," *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 412, no. 11–12 (May 12, 2011): 1060–67, doi:10.1016/j.cca.2011.02.023.

<sup>106</sup> Thomas M. Annesley, "Ion Suppression in Mass Spectrometry," *Clinical Chemistry* 49, no. 7 (July 1, 2003): 1041–44, doi:10.1373/49.7.1041.

<sup>107</sup> Paul J. Taylor, "Matrix Effects: The Achilles Heel of Quantitative High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry," *Clinical Biochemistry* 38, no. 4 (April 2005): 328–34, doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007.

<sup>108</sup> Emilie Petit-Jean et al., "Erlotinib: Another Candidate for the Therapeutic Drug Monitoring of Targeted Therapy of Cancer? A Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Systematic Review of Literature," *Therapeutic Drug Monitoring* 37, no. 1 (February 2015): 2–21, doi:10.1097/FTD.0000000000000097.

<sup>109</sup> Daniele Ouellet et al., "Population Pharmacokinetics of Dabrafenib, a BRAF Inhibitor: Effect of Dose, Time, Covariates, and Relationship with Its Metabolites," *The Journal of Clinical Pharmacology* 54, no. 6 (June 1, 2014): 696–706, doi:10.1002/jcph.263.

<sup>110</sup> Stéphane Bouchet et al., "Therapeutic Drug Monitoring of Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia: Experience from 1216 Patients at a Centralized Laboratory," *Fundamental & Clinical Pharmacology* 27, no. 6 (December 2013): 690–97, doi:10.1111/fcp.12007.

<sup>111</sup> Matteo Simonelli et al., "Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Lapatinib in Combination with Sorafenib in Patients with Advanced Refractory Solid Tumors," *European Journal of Cancer* 49, no. 5 (March 2013): 989–98, doi:10.1016/j.ejca.2012.10.016.

<sup>112</sup> Larson et al., "Population Pharmacokinetic and Exposure-Response Analysis of Nilotinib in Patients with Newly Diagnosed Ph+ Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase."

<sup>113</sup> D. Strumberg et al., "Regorafenib (BAY 73-4506) in Advanced Colorectal Cancer: A Phase I Study," *British Journal of Cancer* 106, no. 11 (May 22, 2012): 1722–27, doi:10.1038/bjc.2012.153.

<sup>114</sup> Simonelli et al., "Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Lapatinib in Combination with Sorafenib in Patients with Advanced Refractory Solid Tumors."

<sup>115</sup> Sven Wind et al., "Pharmacokinetics of Afatinib, a Selective Irreversible ErbB Family Blocker, in Patients with Advanced Solid Tumours," *Clinical Pharmacokinetics* 52, no. 12 (December 2013): 1101–9, doi:10.1007/s40262-013-0091-4.

<sup>116</sup> Hsyu et al., "Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationship of Bosutinib in Patients with Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia."

- 
- <sup>117</sup> Huiping Xu et al., "Evaluation of Crizotinib Absolute Bioavailability, the Bioequivalence of Three Oral Formulations, and the Effect of Food on Crizotinib Pharmacokinetics in Healthy Subjects," *Journal of Clinical Pharmacology* 55, no. 1 (January 2015): 104–13, doi:10.1002/jcph.356.
- <sup>118</sup> Masatomo Miura et al., "A Limited Sampling Strategy for Estimation of the Area under the Plasma Concentration-Time Curve of Gefitinib," *Therapeutic Drug Monitoring* 36, no. 1 (February 2014): 24–29, doi:10.1097/FTD.0b013e31829dabbc.
- <sup>119</sup> Shi et al., "The Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety of Orally Dosed INCB018424 Phosphate in Healthy Volunteers."
- <sup>120</sup> Michael A. Tortorici et al., "Pharmacokinetics of Single-Agent Axitinib across Multiple Solid Tumor Types," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 74, no. 6 (December 2014): 1279–89, doi:10.1007/s00280-014-2606-6.
- <sup>121</sup> Narayana I. Narasimhan et al., "Evaluation of Pharmacokinetics and Safety of Ponatinib in Subjects with Chronic Hepatic Impairment and Matched Healthy Subjects," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 74, no. 2 (June 17, 2014): 341–48, doi:10.1007/s00280-014-2511-z.
- <sup>122</sup> Houk et al., "Relationship between Exposure to Sunitinib and Efficacy and Tolerability Endpoints in Patients with Cancer."
- <sup>123</sup> Paul Martin et al., "Pharmacokinetics of Vandetanib: Three Phase I Studies in Healthy Subjects," *Clinical Therapeutics* 34, no. 1 (January 2012): 221–37, doi:10.1016/j.clinthera.2011.11.011.
- <sup>124</sup> Bouchet et al., "Simultaneous Determination of Nine Tyrosine Kinase Inhibitors by 96-Well Solid-Phase Extraction and Ultra Performance LC/MS-MS."
- <sup>125</sup> Richard King et al., "Mechanistic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11, no. 11 (November 2000): 942–50, doi:10.1016/S1044-0305(00)00163-X.
- <sup>126</sup> Ibid.
- <sup>127</sup> Paul Kebarle and Udo H. Verkerk, "Electrospray: From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase, What We Know Now," *Mass Spectrometry Reviews* 28, no. 6 (December 2009): 898–917, doi:10.1002/mas.20247.
- <sup>128</sup> Alexander H. Schmidt and Imre Molnár, "Using an Innovative Quality-by-Design Approach for Development of a Stability Indicating UHPLC Method for Ebastine in the API and Pharmaceutical Formulations," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 78–79 (May 5, 2013): 65–74, doi:10.1016/j.jpba.2013.01.032.
- <sup>129</sup> Taylor, "Matrix Effects."
- <sup>130</sup> "FDA Guidelines on Analytical Method Development. July 2015," n.d.
- <sup>131</sup> "EMA Guideline on Bioanalytical Method Validation. Feb 2012," n.d.
- <sup>132</sup> Deborah L. Buhrman, Piper I. Price, and Patrick J. Rudewiczcor, "Quantitation of SR 27417 in Human Plasma Using Electrospray Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: A Study of Ion Suppression," *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 7, no. 11 (November 1996): 1099–1105, doi:10.1016/S1044-0305(96)00072-4.

## **Table des annexes**

MAY 28, 2001

# TIME

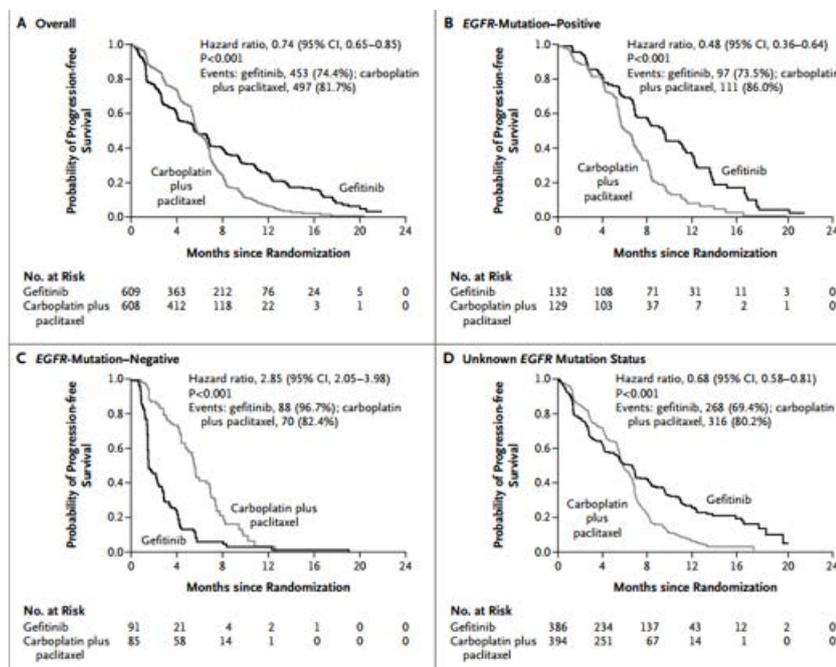
THERE IS NEW AMMUNITION  
IN THE WAR AGAINST  
**CANCER.**  
THESE ARE THE BULLETS.

Revolutionary new pills like **GLIVEC** combat cancer by targeting only the diseased cells. Is this the breakthrough we've been waiting for?

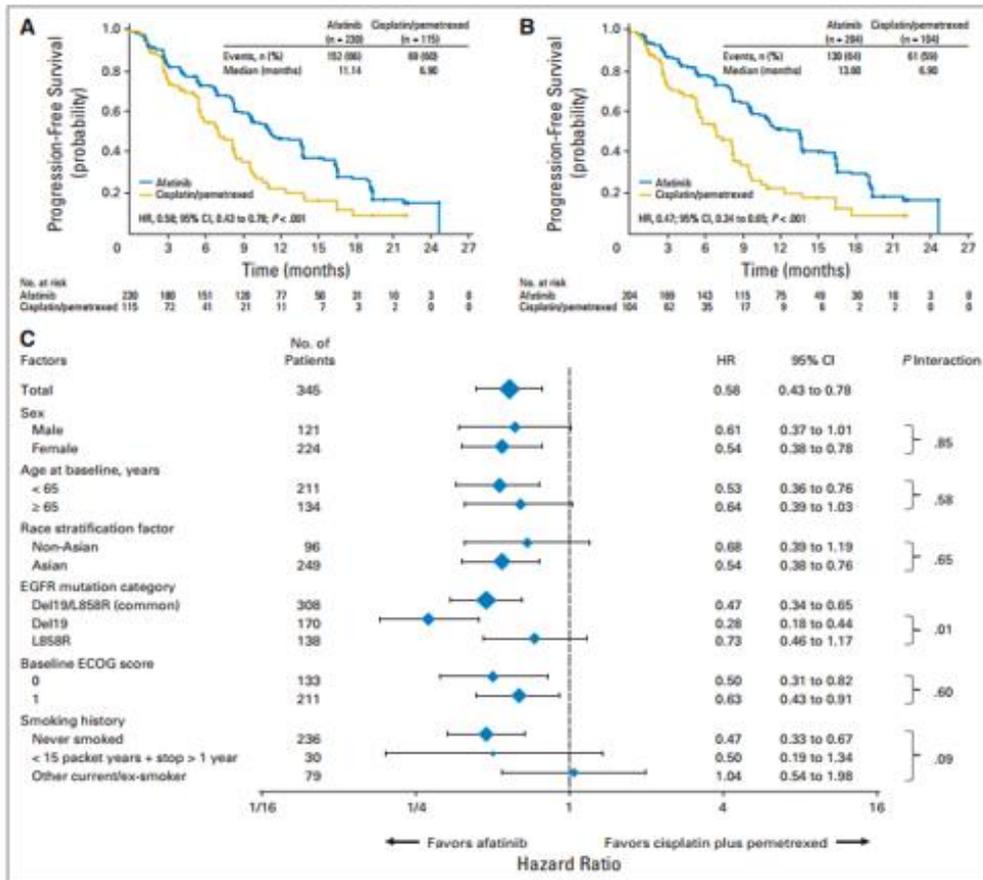


www.time.com AOL Keyword: TIME

Annexe 1: "Une" du Time Magazine du 28 Mai 2001



Annexe 2: courbes de Kaplan Meier de survie sans progression en fonction des bras de l'étude, d'après Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary MOK et ALL NEJM 2009



**Fig 2.** Primary analysis. (A) Progression-free survival (PFS) by independent review for all randomly assigned patients. At the time of data cutoff for primary analysis of PFS, 45 patients (20%) in the afatinib arm and three patients (3%) in the chemotherapy arm were known to be alive and progression free. (B) PFS by independent review in patients with common mutations (del19/L858R; n = 308). (C) Forest plot of subgroups of patients showing PFS by independent review. HR, hazard ratio; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group.

Annexe 3: courbes de Kaplan Meier d'afatinib contre chimiothérapie classique et groupes de stratifications, d'après LUX-LUNG3, NEJM.

<i>Molécules</i>	<i>Nomenclature IUPAC</i>
<i>Afatinib</i>	(E)-N-[4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-7-[(3S)-oxolan-3-yl]oxyquinazolin-6-yl]-4-(dimethylamino)but-2-enamide
<i>Axitinib</i>	N-methyl-2-[[3-[(E)-2-pyridin-2-ylethenyl]-1H-indazol-6-yl]sulfanyl]benzamide
<i>Bosutinib</i>	4-(2,4-dichloro-5-methoxyanilino)-6-methoxy-7-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)propoxy]quinoline-3-carbonitrile
<i>Crizotinib</i>	3-[(1R)-1-(2,6-dichloro-3-fluorophenyl)ethoxy]-5-(1-piperidin-4-ylpyrazol-4-yl)pyridin-2-amine
<i>Dabrafenib</i>	N-[3-[5-(2-aminopyrimidin-4-yl)-2-tert-butyl-1,3-thiazol-4-yl]-2-fluorophenyl]-2,6-difluorobenzenesulfonamide
<i>Dasatinib</i>	N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-2-methylpyrimidin-4-yl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide
<i>Erlotinib</i>	N-(3-ethynylphenyl)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-amine
<i>Gefitinib</i>	N-(3-chloro-4-fluorophenyl)-7-methoxy-6-(3-morpholin-4-ylpropoxy)quinazolin-4-amine
<i>Imatinib</i>	N-(4-methyl-3-[[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]phenyl)-4-[[4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzamide
<i>Lapatinib</i>	N-[3-chloro-4-[(3-fluorophenyl)methoxy]phenyl]-6-[5-[(2-methylsulfonyl)ethylamino)methyl]furan-2-yl]quinazolin-4-amine
<i>Nilotinib</i>	4-methyl-N-[3-(4-methylimidazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]-3-[[4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-yl]amino]benzamide
<i>Ponatinib</i>	3-(2-imidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methyl-N-[4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide
<i>Regorafenib</i>	4-[4-[[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoylamino]-3-fluorophenoxy]-N-methylpyridine-2-carboxamide
<i>Regorafenib M2</i>	4-[4-[[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoyl]amino]-3-fluorophenoxy]-2-(methylcarbamoyl)pyridin-1-ium-1-olate
<i>Regorafenib M5</i>	4-[4-[[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoylamino]-3-fluorophenoxy]-1-oxidopyridin-1-ium-2-carboxamide
<i>Ruxolitinib</i>	(3R)-3-cyclopentyl-3-[4-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)pyrazol-1-yl]propanenitrile
<i>Sorafenib</i>	4-[4-[[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoylamino]phenoxy]-N-methylpyridine-2-carboxamide
<i>Sunitinib</i>	N-[2-(diethylamino)ethyl]-5-[(Z)-(5-fluoro-2-oxo-1H-indol-3-ylidene)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxamide
<i>Vandetanib</i>	N-(4-bromo-2-fluorophenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl)methoxy]quinazolin-4-amine

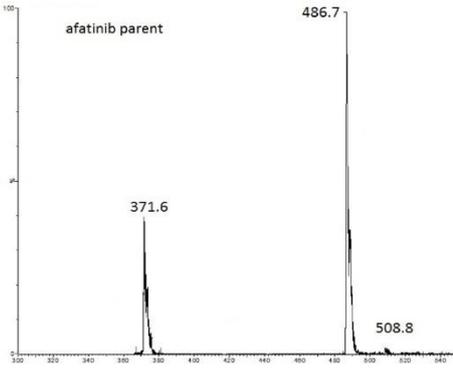
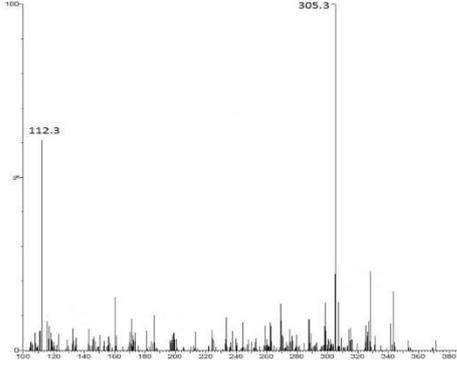
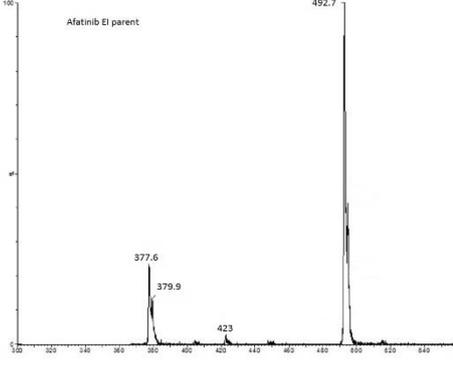
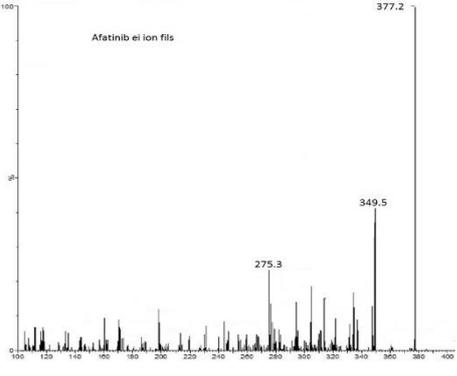
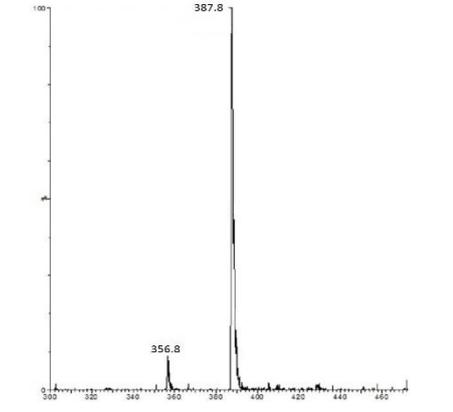
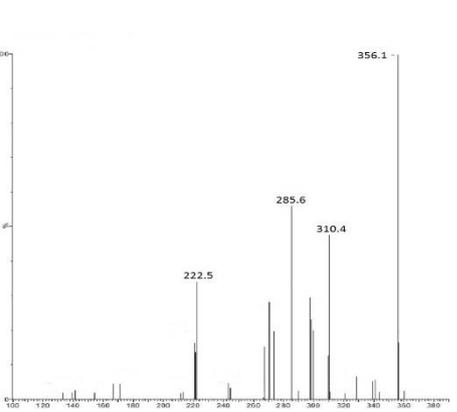
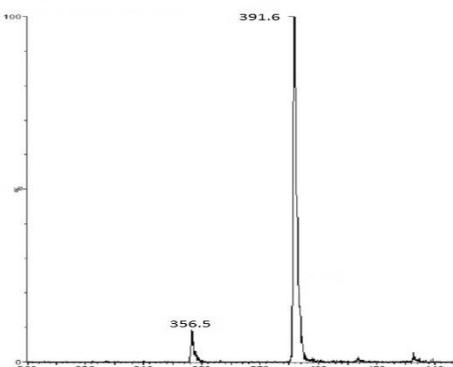
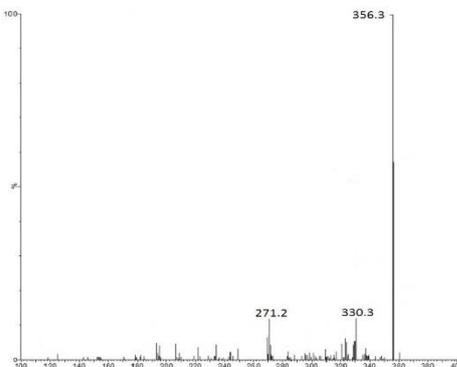
*Annexe 4: nomenclature IUPAC des ITK.*

	Condition A		Condition B		Pourcentage de variation des moyennes du signal brut entre A et B : 100*(Sa-Sb)/Sa	
	QCA (n=3) Aire (CV %)	QCC (n=3) Aire (CV %)	QCA (n=3) Aire (CV %)	QCC (n=3) Aire (CV %)	QCA (%)	QCC (%)
Afatinib	1819,00 (10,03)	21373,33 (10,01)	2124,16 (8,41)	24132,86 (5,83)	16,77	12,91
Axitinib	177,67 (29,83)	2894,33 (3,93)	240,67 (27,73)	3131,33 (2,85)	35,45	8,18
Bosutinib	12623,00 (3,73)	112914,67 (2,21)	15581,59 (3,57)	124438,95 (1,70)	23,43	10,21
Crizotinib	3203,00 (5,38)	35313,00 (3,32)	3654,83 (2,27)	38400,60 (5,71)	14,12	8,74
Dabrafenib	1943,00(3,80)	29380,00 (2,17)	2720,90 (4,80)	37101,25 (1,27)	40,03	26,28
Dasatinib	544,00 (14,01)	8668,33 (5,93)	617,76 (8,92)	9625,71 (4,41)	13,55	11,04
Erlotinib	63408,33 (1,56)	651924,67 (6,90)	74861,07 (0,87)	725398,96 (3,14)	18,06	11,27
Gefitinib	3505,33 (13,53)	23924,00 (2,57)	3717,54 (15,76)	26531,23 (6,21)	6,05	10,90
Imatinib	39710,33 (2,09)	319591,00 (5,54)	40264,64 (3,05)	330813,52 (2,76)	1,39	3,5
Lapatinib	14097,33 (4,03)	119000,67 (0,95)	14771,72 (5,56)	124525,83 (0,93)	4,78	4,64
Nilotinib	81816,00 (2,50)	1114838,33 (9,88)	82570,14 (2,85)	1102909,29 (3,55)	0,92	-1,07
Ponatinib	6855,33 (3,90)	78911,67 (4,25)	7092,91 (3,52)	87346,74 (2,84)	3,46	10,7
Ruxolitinib	69328,00 (1,81)	641928,67 (2,59)	82752,50 (0,90)	948094,71 (2,39)	19,36	47,69
Regorafenib	1279,67 (17,61)	12486,33 (8,02)	1866,87 (4,28)	14222,54 (1,93)	45,88	13,9
Regorafenib M2	2961,67 (3,06)	24575,00 (4,56)	3435,65 (3,46)	28329,30 (1,70)	16,00	15,27
Regorafenib M5	384,33 (6,85)	5552,00 (5,95)	521,00 (8,20)	6773,68 (2,71)	35,56	22,00
Sorafenib	4651,33 (3,61)	25004,44 (12,51)	4895,53 (4,46)	26592,08 (3,82)	5,96	6,34
Sunitinib O1	2369,67 (12,47)	34670,67 (8,02)	3532,86 (9,60)	42831,79 (5,86)	49,05	23,53
Sunitinib O2	2884,67 (5,24)	35754,33 (3,11)	3496,33 (7,29)	39482,75 (4,41)	21,20	10,42
Vandetanib	2593,67 (16,24)	22168,33 (8,48)	2662,16 (16,04)	22812,16 (10,59)	2,64	2,90

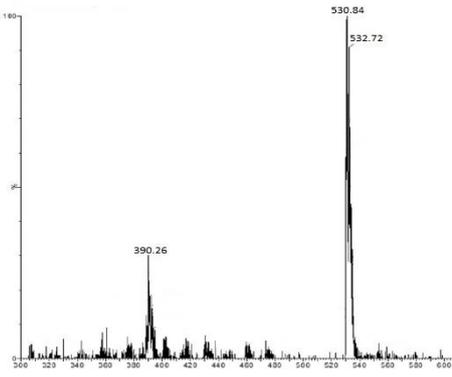
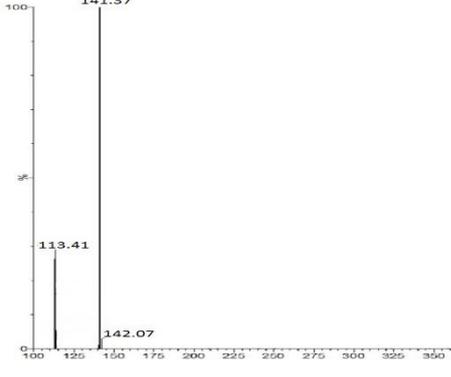
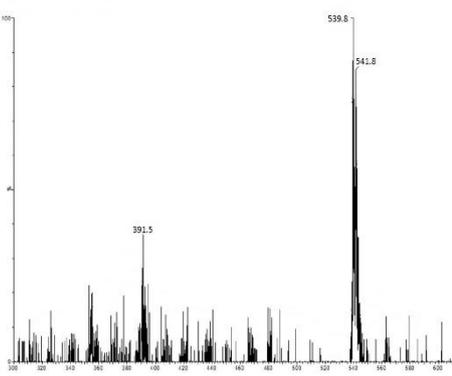
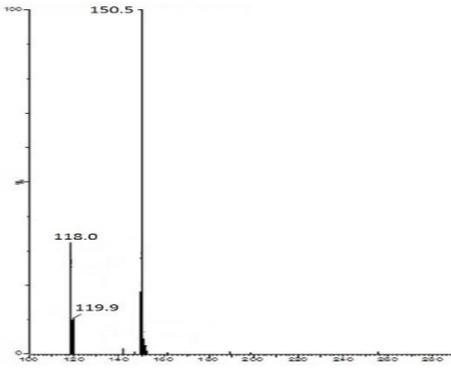
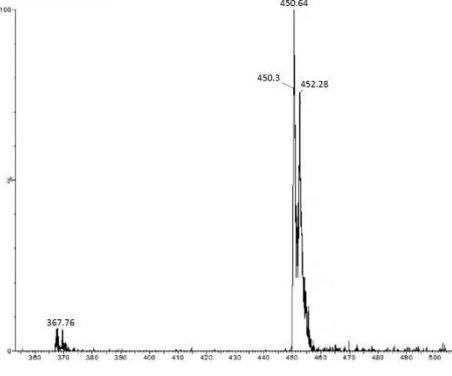
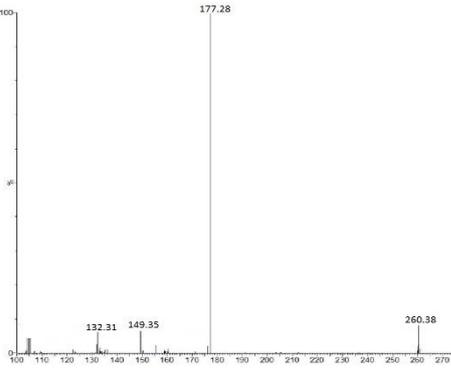
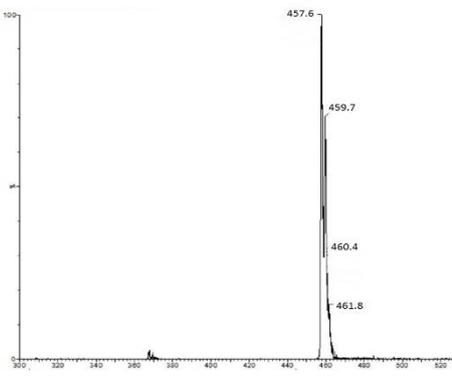
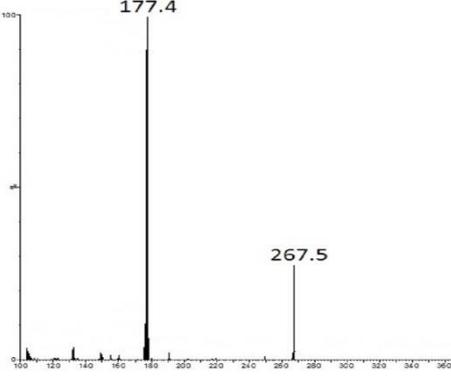
Annexe 5: réponse moyenne et variation (n=3) des aires brutes pour chacune des molécules en fonction des conditions pour deux points de contrôle (QCA et QCC). Pourcentage d'augmentation de la réponse entre condition A et condition B.

Molécules	0,5 kV		1 kV		2 kV		3 kV		3,5 kV	
	QCA Aire (CV%)	QCC Aire (CV%)								
Afatinib	3383 (1,13)	59835 (1,56)	4278 (8,26)	49096 (5,42)	1279 (0,97)	36436 (0,52)	1942 (4,99)	31774 (3,36)	1733 (3,44)	33938 (5,56)
Axitinib	484 (7,93)	14395 (4,06)	1281 (9,1)	14856 (4,97)	1223 (4,39)	15313 (2,75)	930 (2,36)	15036 (1,38)	1291 (3,98)	13928 (5,04)
Bosutinib	15145 (2,6)	158689 (1,9)	4586 (1,22)	118168 (0,7)	4196 (12,41)	75387 (6,68)	2762 (10,59)	64905 (8,84)	2724 (14,39)	61182 (15,4)
Crizotinib	4782 (4,31)	58909 (2,7)	3710 (3,68)	48772 (2,09)	2863 (6,9)	33884 (4,81)	2024 (2,7)	27106 (3,42)	1699 (7,36)	28967 (4,62)
Dabrafenib	4621 (3,36)	53777 (4,33)	6231 (1,67)	83463 (2,54)	3851 (8,75)	89122 (10,55)	5244 (5,04)	97206 (9,79)	4957 (7,88)	103732 (7,76)
Dasatinib	486 (7,65)	11925 (3,91)	860 (4,14)	11285 (4,98)	938 (2,51)	10052 (1,72)	705 (1,91)	11451 (1,9)	695 (27)	10329 (15,19)
Erlotinib	40382 (2,98)	478737 (2,28)	32167 (2,35)	543483 (1,77)	33982 (0,59)	573090 (0,46)	25137 (2,23)	561096 (1,64)	34955 (1,41)	547991 (1,86)
Gefitinib	2157 (1,89)	26813 (1,19)	1001 (1,47)	17847 (2,27)	857 (1,3)	13063 (1,3)	507 (2,46)	10057 (2,99)	574 (16,17)	12812 (11,02)
Imatinib	39104 (2,81)	489794 (1,58)	18067 (4,5)	408739 (3)	16123 (1,16)	333947 (1,09)	10821 (6,08)	319193 (3,57)	15194 (1,94)	261197 (1,59)
Lapatinib	12416 (6,79)	153672 (8,07)	5719 (4,66)	154555 (5,56)	5447 (2,95)	142781 (2,11)	10215 (3,61)	117342 (3,39)	5654 (2,02)	108636 (1,99)
Nilotinib	48026 (0,85)	1146199 (1,63)	69521 (5,06)	1379572 (2,57)	61870 (2,74)	1402910 (2,42)	81438 (2,95)	1200781 (2,38)	53837 (2,29)	11438167 (1,44)
Ponatinib	2292 (6,51)	31599 (11,6)	5366 (1,63)	71875 (1,09)	6496 (1,04)	66506 (0,96)	2536 (4,69)	53768 (2,73)	3835 (2,36)	50434 (1,61)
Ruxolitinib	28837 (3,14)	610791 (5,38)	60212 (9,81)	685792 (5,29)	36323 (5,21)	697040 (5,78)	58834 (9,86)	663092 (4,97)	58417 (4,71)	645216 (4,74)
Regorafenib	1661 (10,94)	31599 (11,6)	4530 (2,9)	46019 (2,04)	5456 (5,99)	75385 (9,58)	4336 (27,41)	116392 (17,93)	6810 (3,71)	134422 (4,79)
Regorafenib M2	6126 (14,98)	86663 (8,3)	6376 (0,87)	105197 (0,5)	6563 (2,98)	136219 (2,24)	6717 (8,02)	135948 (4,81)	11144 (6,27)	135970 (3,97)
Regorafenib M5	1834 (9,23)	38589 (5,45)	3030 (5,68)	46727 (3,79)	57063 (4,81)	3801 (7,65)	3598 (4,75)	56589 (5,61)	3310 (5,27)	56126 (6,21)
Sorafenib	1383 (10,52)	24225 (15,12)	2290 (9,21)	32863 (15,09)	59730 (8,94)	59730 (21,92)	3766 (13,35)	97745 (15,77)	8216 (15,77)	118901 (14,57)
Sunitinib O1	9639 (3,25)	131516 (2,92)	7033 (1,93)	101747 (2,04)	5388 (4,25)	76352 (4,51)	5883 (8,42)	64030 (5,62)	2302 (6,67)	60782 (4,41)
Sunitinib O2	5171 (1,88)	70065 (3,61)	4011 (0,92)	53511 (0,8)	1816 (4,89)	41726 (3,14)	1300 (7,04)	33874 (5,34)	2474 (1,36)	31610 (2,65)
Vandetanib	3516 (1,02)	42439 (1,24)	1975 (2,41)	31715 (2,59)	20959 (1,55)	20959 (2,73)	571 (4,74)	16583 (4,74)	1815 (12,53)	20317 (13,15)

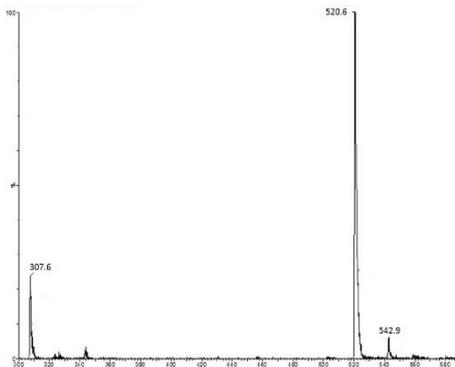
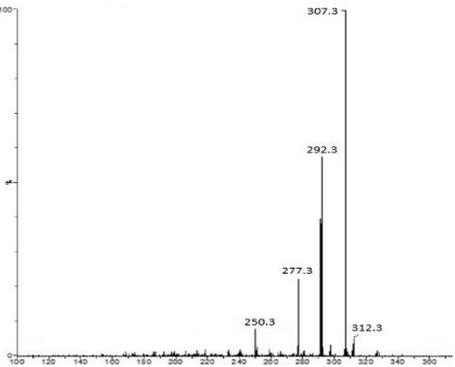
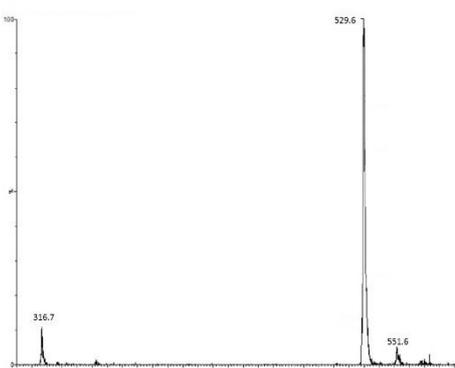
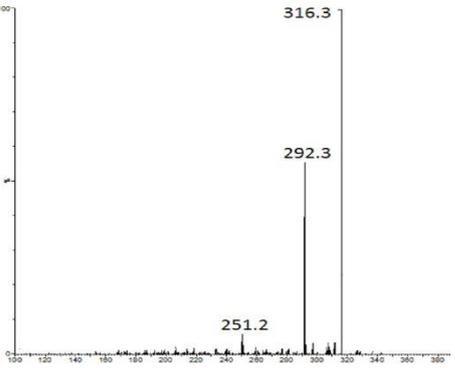
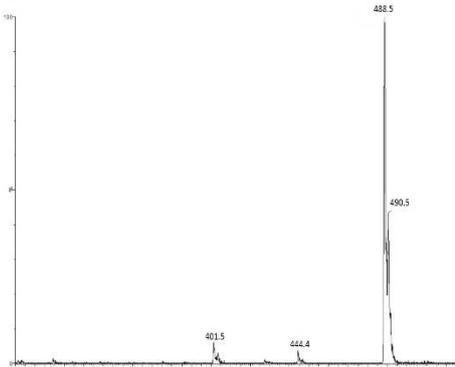
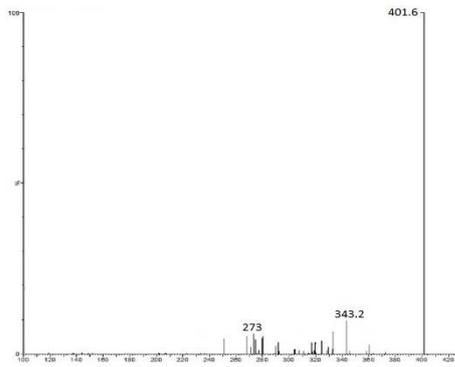
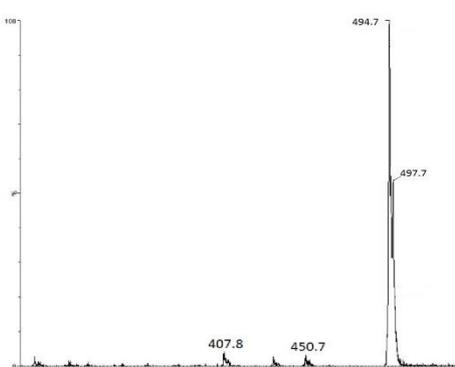
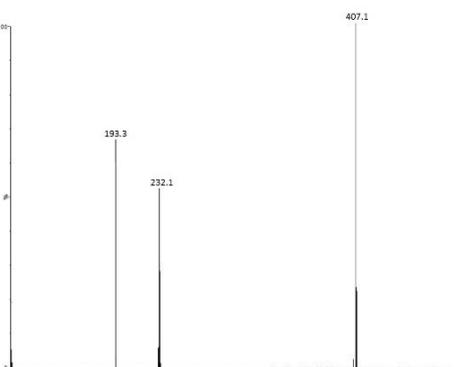
Annexe 6: aires brutes moyennes (n=5) et coefficients de variation (%) de chaque molécule ITK en fonction des paramètres de la source ESI.

MOLECULE	Ion(s) parent(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>	Ion(s) fils(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>
<i>Afatinib</i>	 <p>afatinib parent</p> <p>371.6, 486.7, 508.8</p>	 <p>Afatinib : ions fils</p> <p>112.3, 305.3</p>
<i>Afatinib EI</i>	 <p>Afatinib EI parent</p> <p>377.6, 379.9, 423, 492.7</p>	 <p>Afatinib ei ion fils</p> <p>275.3, 349.5, 377.2</p>
<i>Axitinib</i>	 <p>356.8, 387.8</p>	 <p>222.5, 285.6, 310.4, 356.1</p>
<i>Axitinib EI</i>	 <p>356.5, 391.6</p>	 <p>271.2, 330.3, 356.3</p>

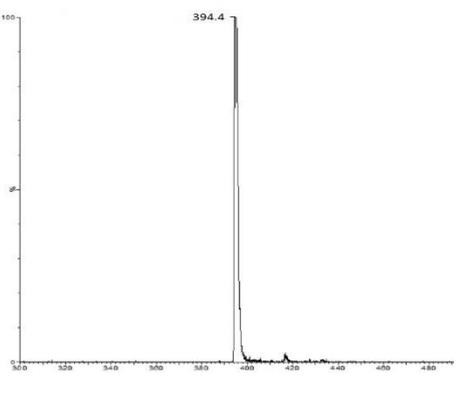
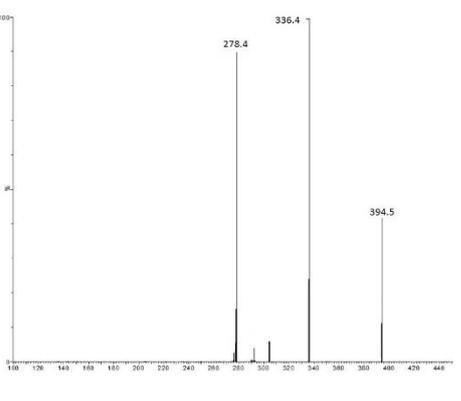
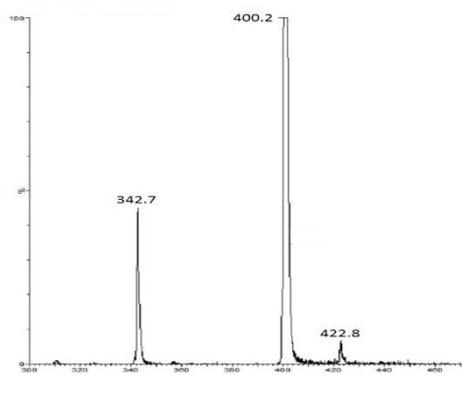
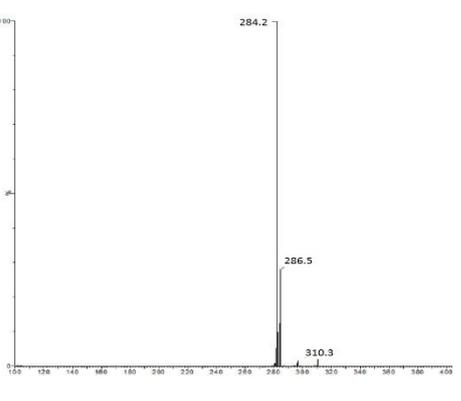
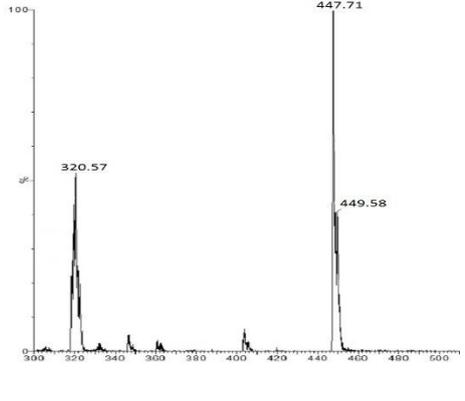
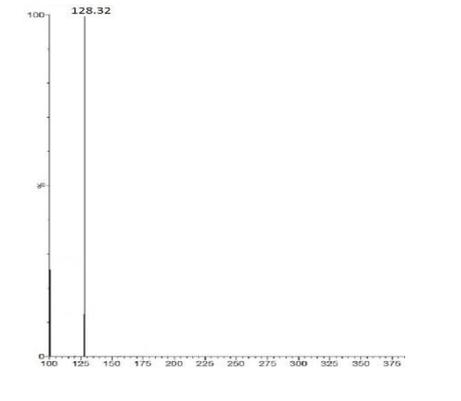
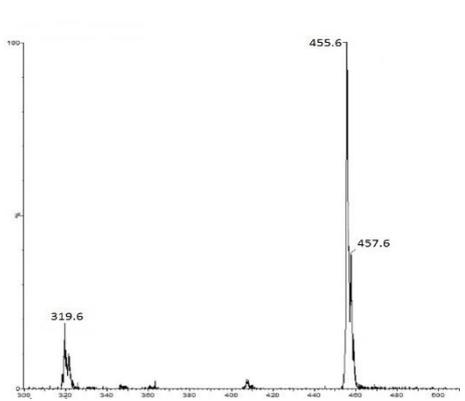
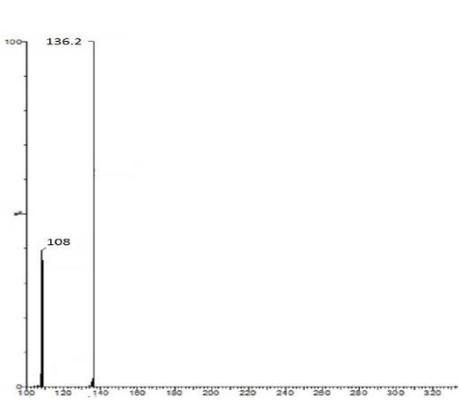
Annexe 7: spectre de masse des ions parents et fils des ITK et leurs étalons internes.

MOLECULE	Ion(s) parent(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>	Ion(s) fils(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>
<i>Bosutinib</i>	 <p>Mass spectrum of Bosutinib parent ion. The x-axis represents m/z from 200 to 600, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 530.84. Other significant peaks are labeled at m/z 390.26 and 532.72.</p>	 <p>Mass spectrum of Bosutinib daughter ion. The x-axis represents m/z from 100 to 350, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 141.37. Other significant peaks are labeled at m/z 113.41 and 142.07.</p>
<i>Bosutinib EI</i>	 <p>Mass spectrum of Bosutinib EI parent ion. The x-axis represents m/z from 200 to 600, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 539.8. Other significant peaks are labeled at m/z 391.5 and 541.8.</p>	 <p>Mass spectrum of Bosutinib EI daughter ion. The x-axis represents m/z from 100 to 280, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 150.5. Other significant peaks are labeled at m/z 118.0 and 119.9.</p>
<i>Crizotinib</i>	 <p>Mass spectrum of Crizotinib parent ion. The x-axis represents m/z from 360 to 500, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 450.64. Other significant peaks are labeled at m/z 367.76, 450.3, 452.28, and 461.8.</p>	 <p>Mass spectrum of Crizotinib daughter ion. The x-axis represents m/z from 100 to 270, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 177.28. Other significant peaks are labeled at m/z 132.31, 149.35, and 260.38.</p>
<i>Crizotinib EI</i>	 <p>Mass spectrum of Crizotinib EI parent ion. The x-axis represents m/z from 360 to 500, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 457.6. Other significant peaks are labeled at m/z 459.7, 460.4, and 461.8.</p>	 <p>Mass spectrum of Crizotinib EI daughter ion. The x-axis represents m/z from 100 to 360, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 177.4. Other significant peaks are labeled at m/z 267.5.</p>

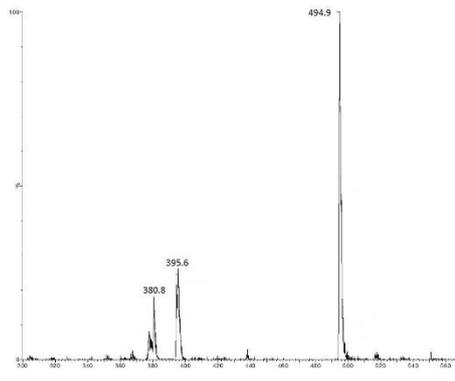
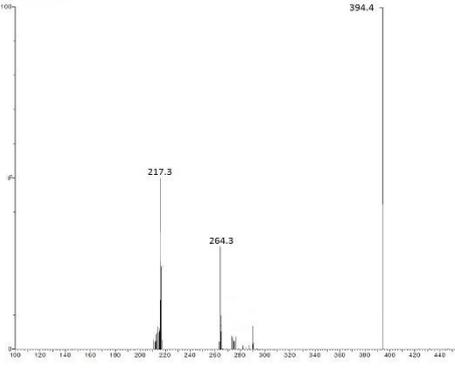
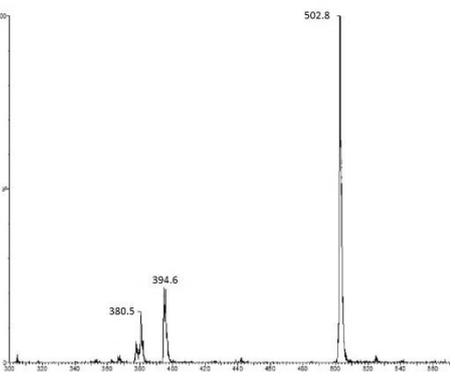
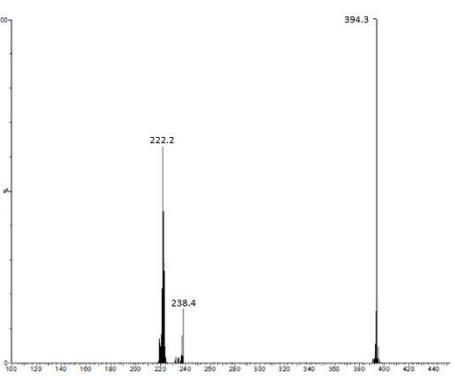
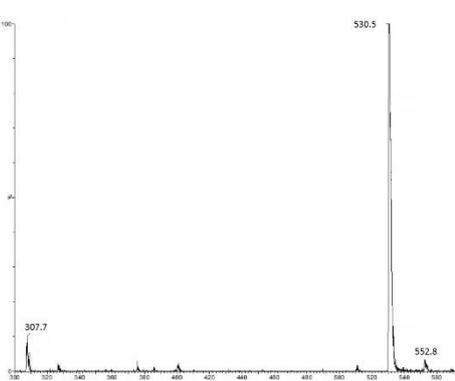
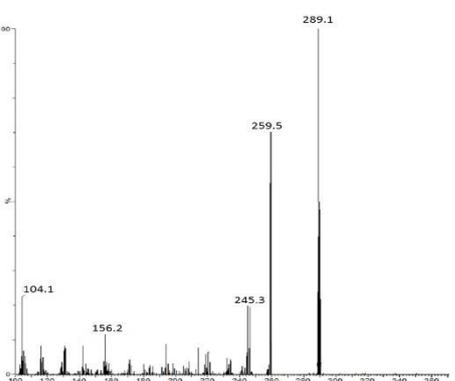
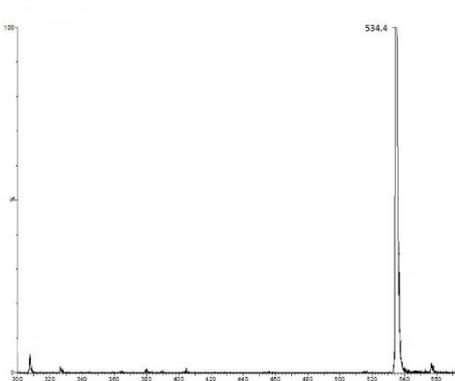
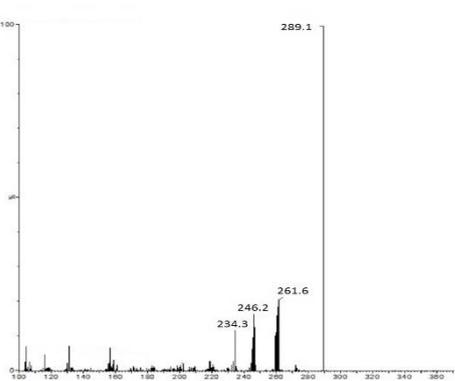
Annexe 7: spectre de masse des ions parents et fils des ITK et leurs étalons internes.

MOLECULE	Ion(s) parent(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>	Ion(s) fils(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>
<i>Dabrafenib</i>	 <p>Mass spectrum of Dabrafenib parent ion. The x-axis represents m/z from 100 to 600, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 520.6. Other significant peaks are labeled at m/z 307.6 and 542.9.</p>	 <p>Mass spectrum of Dabrafenib daughter ions. The x-axis represents m/z from 100 to 380, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 307.3. Other significant peaks are labeled at m/z 250.3, 277.3, 292.3, and 312.3.</p>
<i>Dabrafenib EI</i>	 <p>Mass spectrum of Dabrafenib EI parent ion. The x-axis represents m/z from 100 to 600, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 529.6. Other significant peaks are labeled at m/z 316.7 and 551.6.</p>	 <p>Mass spectrum of Dabrafenib EI daughter ions. The x-axis represents m/z from 100 to 380, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 316.3. Other significant peaks are labeled at m/z 251.2 and 292.3.</p>
<i>Dasatinib</i>	 <p>Mass spectrum of Dasatinib parent ion. The x-axis represents m/z from 100 to 600, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 488.5. Other significant peaks are labeled at m/z 401.5, 466.4, and 490.5.</p>	 <p>Mass spectrum of Dasatinib daughter ions. The x-axis represents m/z from 100 to 450, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 401.6. Other significant peaks are labeled at m/z 275 and 343.2.</p>
<i>Dasatinib EI</i>	 <p>Mass spectrum of Dasatinib EI parent ion. The x-axis represents m/z from 100 to 600, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 494.7. Other significant peaks are labeled at m/z 407.8, 450.7, and 497.7.</p>	 <p>Mass spectrum of Dasatinib EI daughter ions. The x-axis represents m/z from 100 to 450, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 407.1. Other significant peaks are labeled at m/z 193.3 and 232.1.</p>

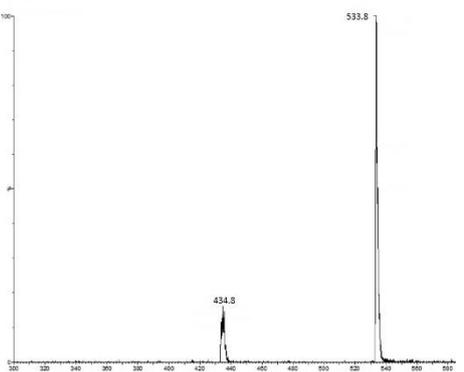
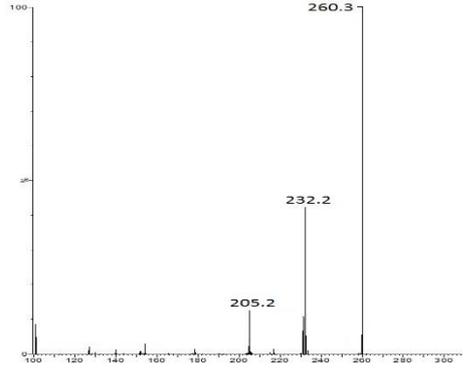
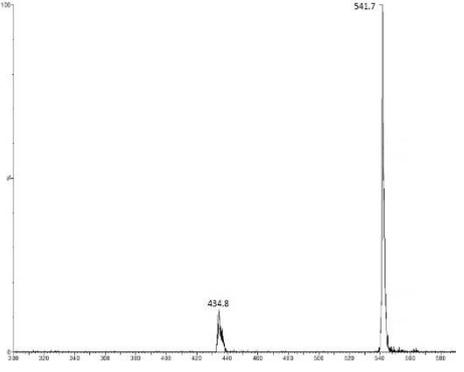
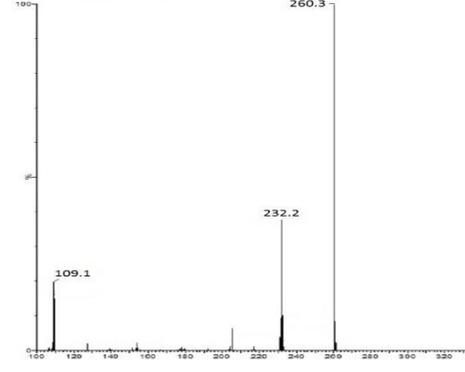
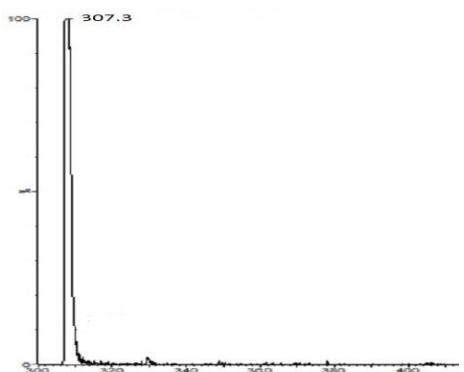
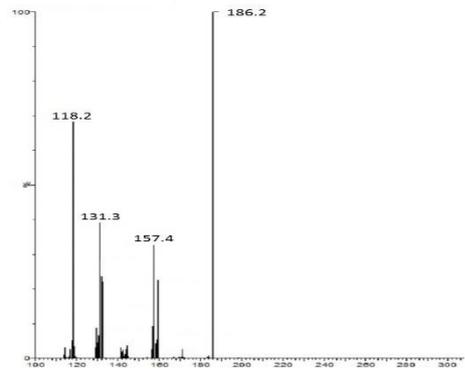
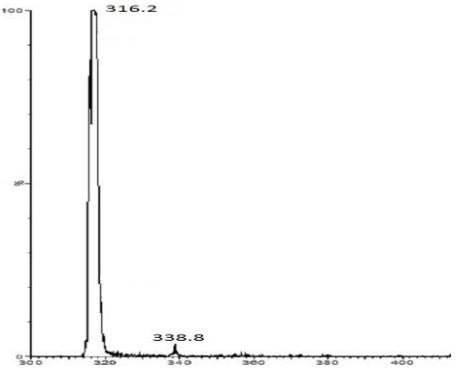
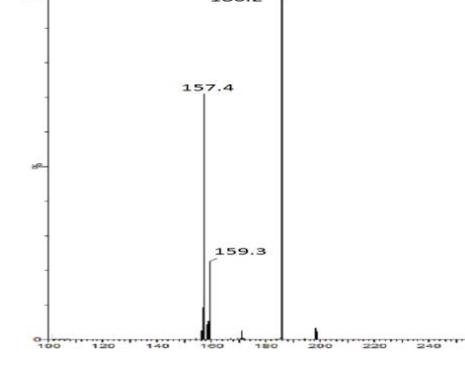
Annexe 7: spectre de masse des ions parents et fils des ITK et leurs étalons internes.

MOLECULE	Ion(s) parent(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>	Ion(s) fils(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>
Erlotinib	 <p>Mass spectrum of Erlotinib parent ion. The x-axis represents m/z from 320 to 480, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. A single prominent peak is observed at m/z 394.4.</p>	 <p>Mass spectrum of Erlotinib daughter ions. The x-axis represents m/z from 100 to 440, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. Three peaks are labeled: 178.4, 336.4, and 394.5.</p>
Erlotinib EI	 <p>Mass spectrum of Erlotinib EI parent ion. The x-axis represents m/z from 300 to 450, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. Three peaks are labeled: 342.7, 400.2, and 422.8.</p>	 <p>Mass spectrum of Erlotinib EI daughter ions. The x-axis represents m/z from 100 to 400, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. Three peaks are labeled: 284.2, 286.5, and 310.3.</p>
Gefitinib	 <p>Mass spectrum of Gefitinib parent ion. The x-axis represents m/z from 300 to 500, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. Three peaks are labeled: 320.57, 447.71, and 449.58.</p>	 <p>Mass spectrum of Gefitinib daughter ions. The x-axis represents m/z from 100 to 375, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. A single prominent peak is observed at m/z 128.32.</p>
Gefitinib EI	 <p>Mass spectrum of Gefitinib EI parent ion. The x-axis represents m/z from 300 to 500, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. Three peaks are labeled: 319.6, 455.6, and 457.6.</p>	 <p>Mass spectrum of Gefitinib EI daughter ions. The x-axis represents m/z from 100 to 320, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. Two peaks are labeled: 108 and 136.2.</p>

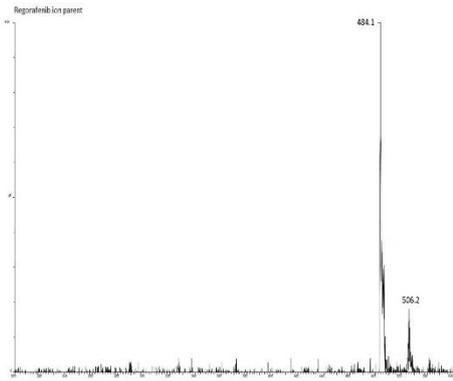
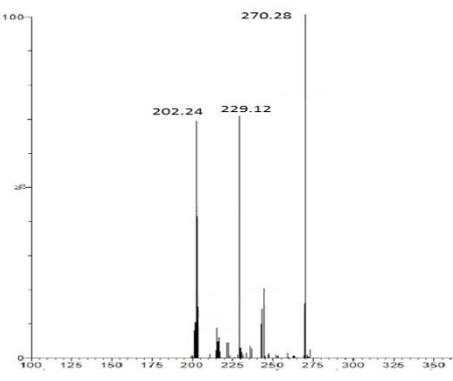
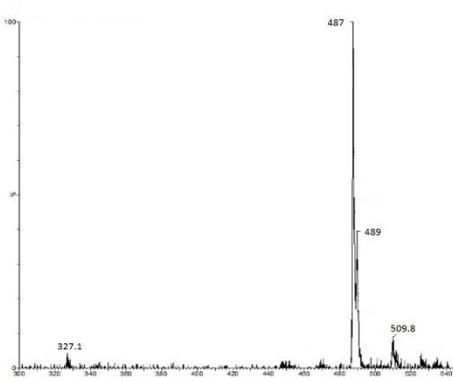
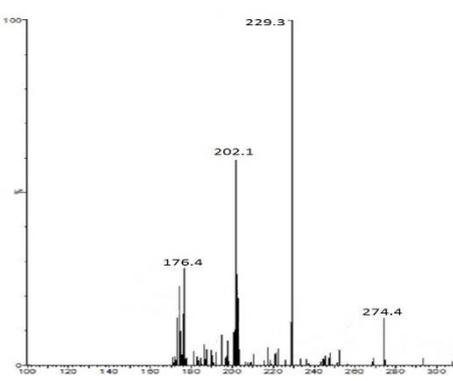
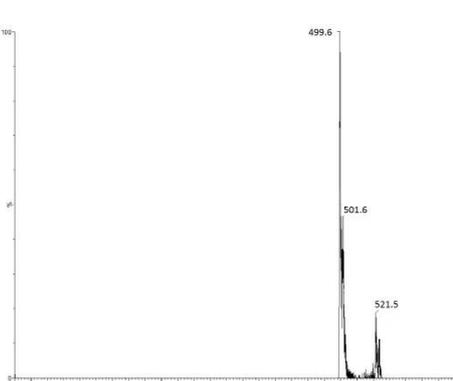
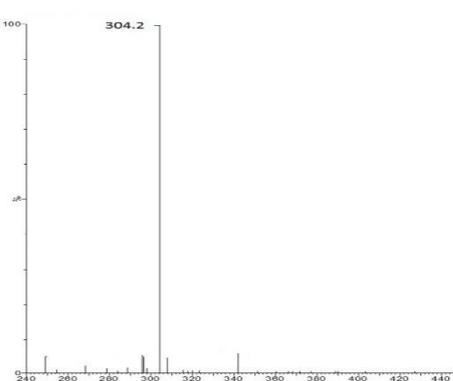
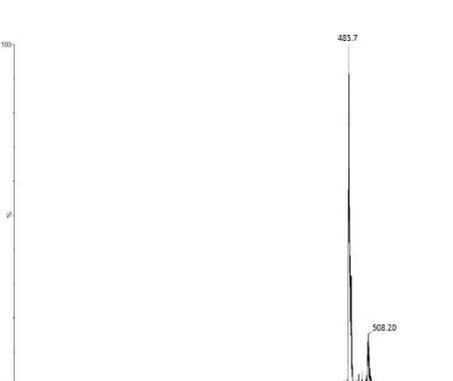
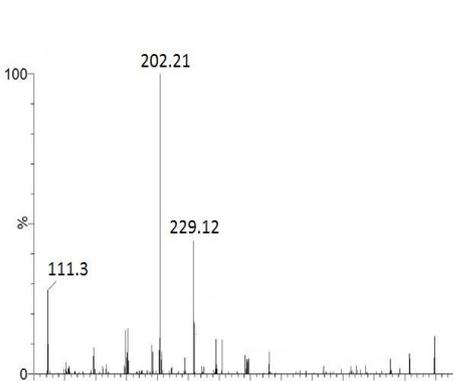
Annexe 7: spectre de masse des ions parents et fils des ITK et leurs étalons internes.

MOLECULE	Ion(s) parent(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>	Ion(s) fils(s) principal <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>
<i>Imatinib</i>	 <p>Mass spectrum of Imatinib parent ion. The x-axis represents m/z from 300 to 550, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 494.9. Other significant peaks are labeled at m/z 380.8 and 395.6.</p>	 <p>Mass spectrum of Imatinib daughter ion. The x-axis represents m/z from 100 to 440, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 394.4. Other significant peaks are labeled at m/z 217.3 and 264.3.</p>
<i>Imatinib EI</i>	 <p>Mass spectrum of Imatinib EI parent ion. The x-axis represents m/z from 300 to 550, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 502.8. Other significant peaks are labeled at m/z 380.5 and 394.6.</p>	 <p>Mass spectrum of Imatinib EI daughter ion. The x-axis represents m/z from 100 to 440, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 394.3. Other significant peaks are labeled at m/z 222.2 and 238.4.</p>
<i>Nilotinib</i>	 <p>Mass spectrum of Nilotinib parent ion. The x-axis represents m/z from 300 to 550, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 530.5. Other significant peaks are labeled at m/z 307.7 and 552.8.</p>	 <p>Mass spectrum of Nilotinib daughter ion. The x-axis represents m/z from 100 to 380, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 289.1. Other significant peaks are labeled at m/z 104.1, 156.2, 245.3, and 259.5.</p>
<i>Nilotinib EI</i>	 <p>Mass spectrum of Nilotinib EI parent ion. The x-axis represents m/z from 300 to 550, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 534.4.</p>	 <p>Mass spectrum of Nilotinib EI daughter ion. The x-axis represents m/z from 100 to 380, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 289.1. Other significant peaks are labeled at m/z 234.3, 246.2, and 261.6.</p>

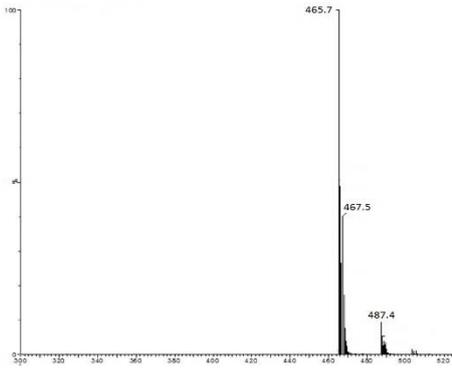
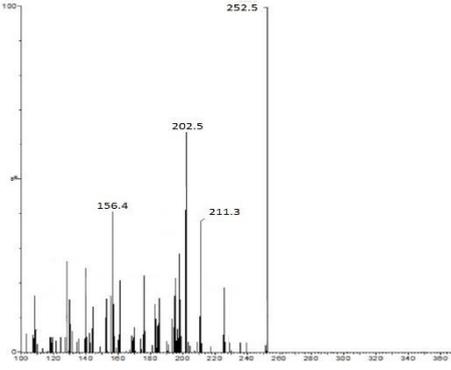
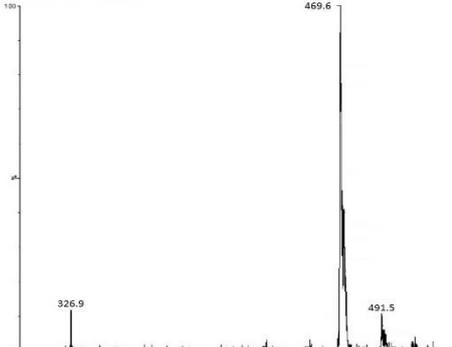
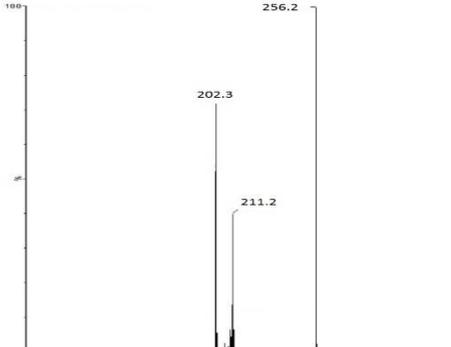
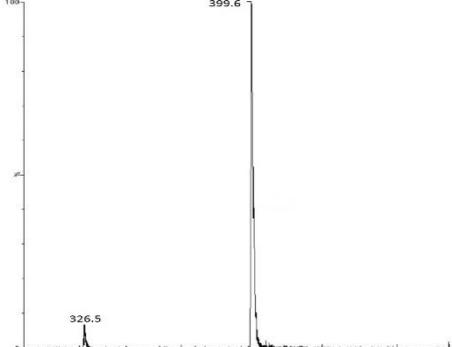
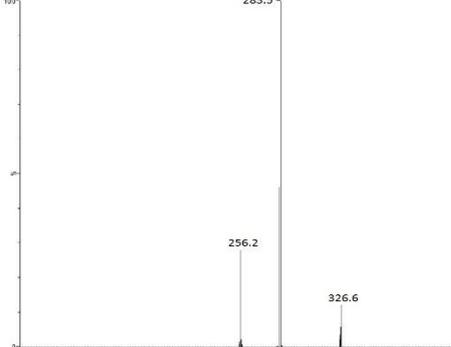
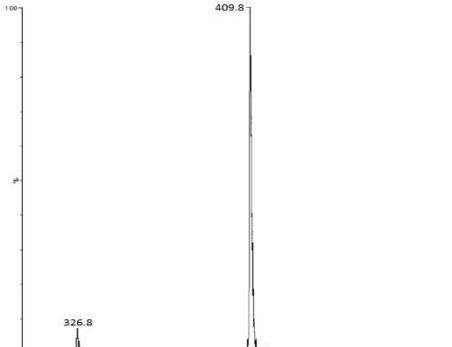
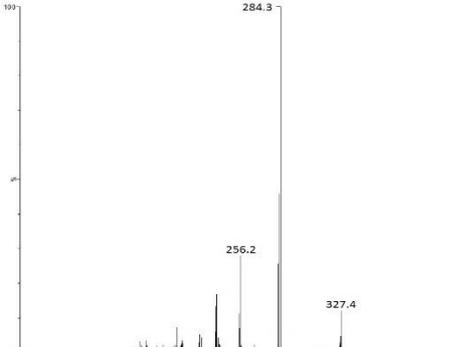
Annexe 7: spectre de masse des ions parents et fils des ITK et leurs étalons internes.

MOLECULE	Ion(s) parent(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>	Ion(s) fils(s) principal <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>
Ponatinib	 <p>Mass spectrum of Ponatinib showing parent ions at m/z 434.8 and 533.8. The x-axis ranges from 100 to 600 m/z, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100.</p>	 <p>Mass spectrum of Ponatinib showing major daughter ions at m/z 205.2, 232.2, and 260.3. The x-axis ranges from 100 to 300 m/z, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100.</p>
Ponatinib EI	 <p>Mass spectrum of Ponatinib EI showing parent ions at m/z 434.8 and 541.7. The x-axis ranges from 100 to 600 m/z, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100.</p>	 <p>Mass spectrum of Ponatinib EI showing major daughter ions at m/z 109.1, 232.2, and 260.3. The x-axis ranges from 100 to 300 m/z, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100.</p>
Ruxolitinib	 <p>Mass spectrum of Ruxolitinib showing parent ions at m/z 307.3 and 316.2. The x-axis ranges from 100 to 450 m/z, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100.</p>	 <p>Mass spectrum of Ruxolitinib showing major daughter ions at m/z 118.2, 131.3, 157.4, and 186.2. The x-axis ranges from 100 to 300 m/z, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100.</p>
Ruxolitinib EI	 <p>Mass spectrum of Ruxolitinib EI showing parent ions at m/z 316.2 and 338.8. The x-axis ranges from 100 to 450 m/z, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100.</p>	 <p>Mass spectrum of Ruxolitinib EI showing major daughter ions at m/z 157.4, 159.3, and 186.2. The x-axis ranges from 100 to 250 m/z, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100.</p>

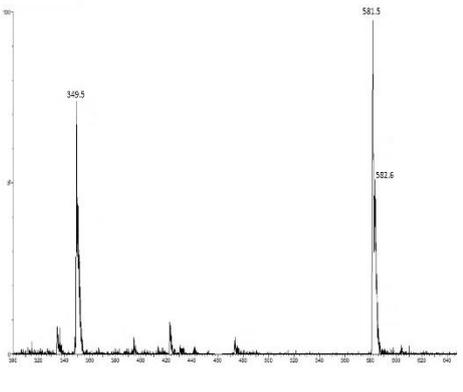
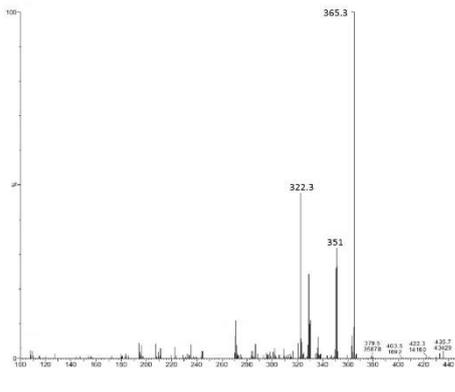
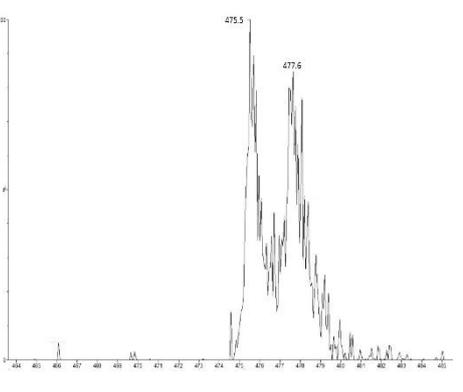
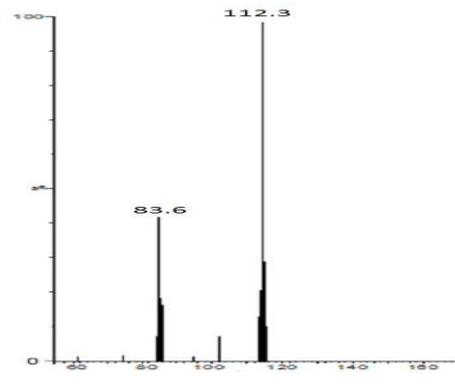
Annexe 7: spectre de masse des ions parents et fils des ITK et leurs étalons internes.

MOLECULE	Ion(s) parent(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>	Ion(s) fils(s) principal <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>
Regorafenib	 <p>Regorafenib ion parent</p> <p>484.1</p> <p>566.2</p>	 <p>202.24</p> <p>229.12</p> <p>270.28</p>
Regorafenib EI	 <p>327.1</p> <p>487</p> <p>489</p> <p>509.8</p>	 <p>176.4</p> <p>202.1</p> <p>229.3</p> <p>274.4</p>
Regorafenib M2	 <p>499.6</p> <p>501.6</p> <p>521.5</p>	 <p>304.2</p>
Regorafenib M5	 <p>485.7</p> <p>508.10</p>	 <p>111.3</p> <p>202.21</p> <p>229.12</p>

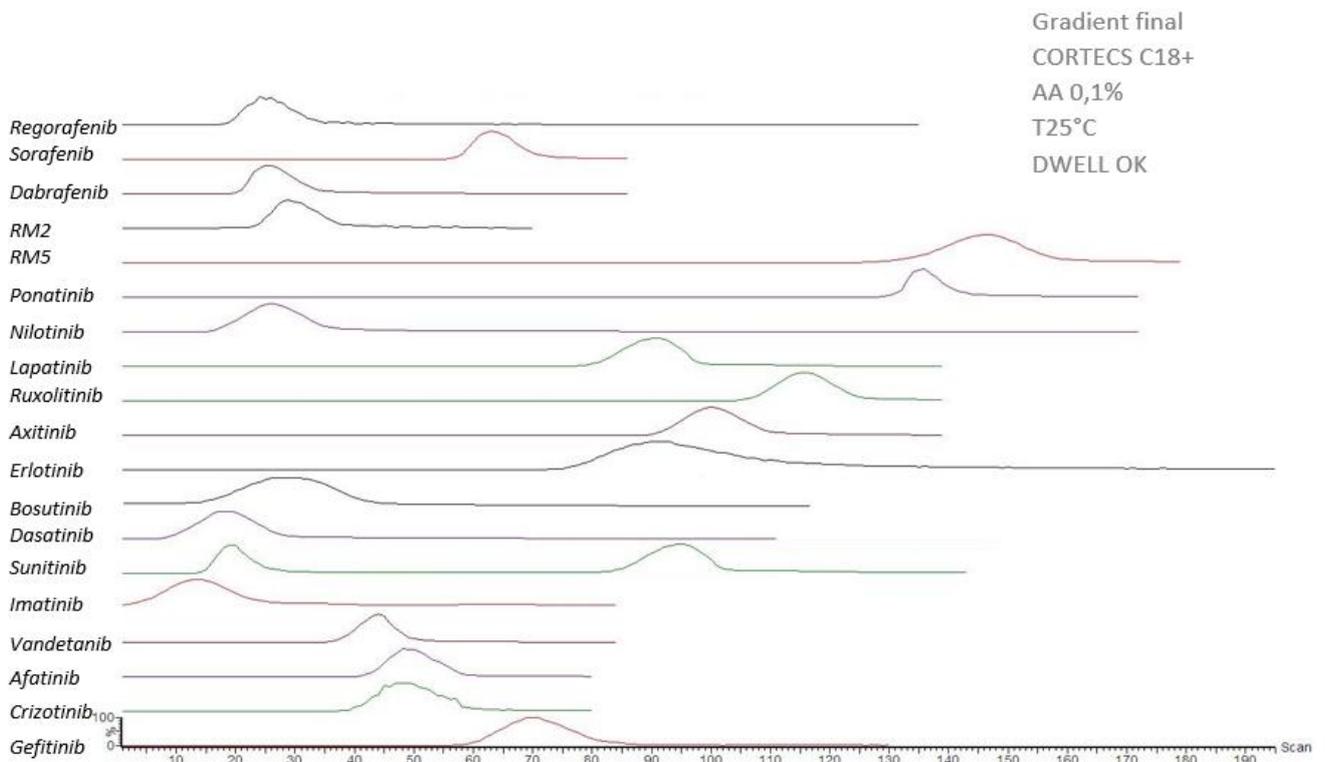
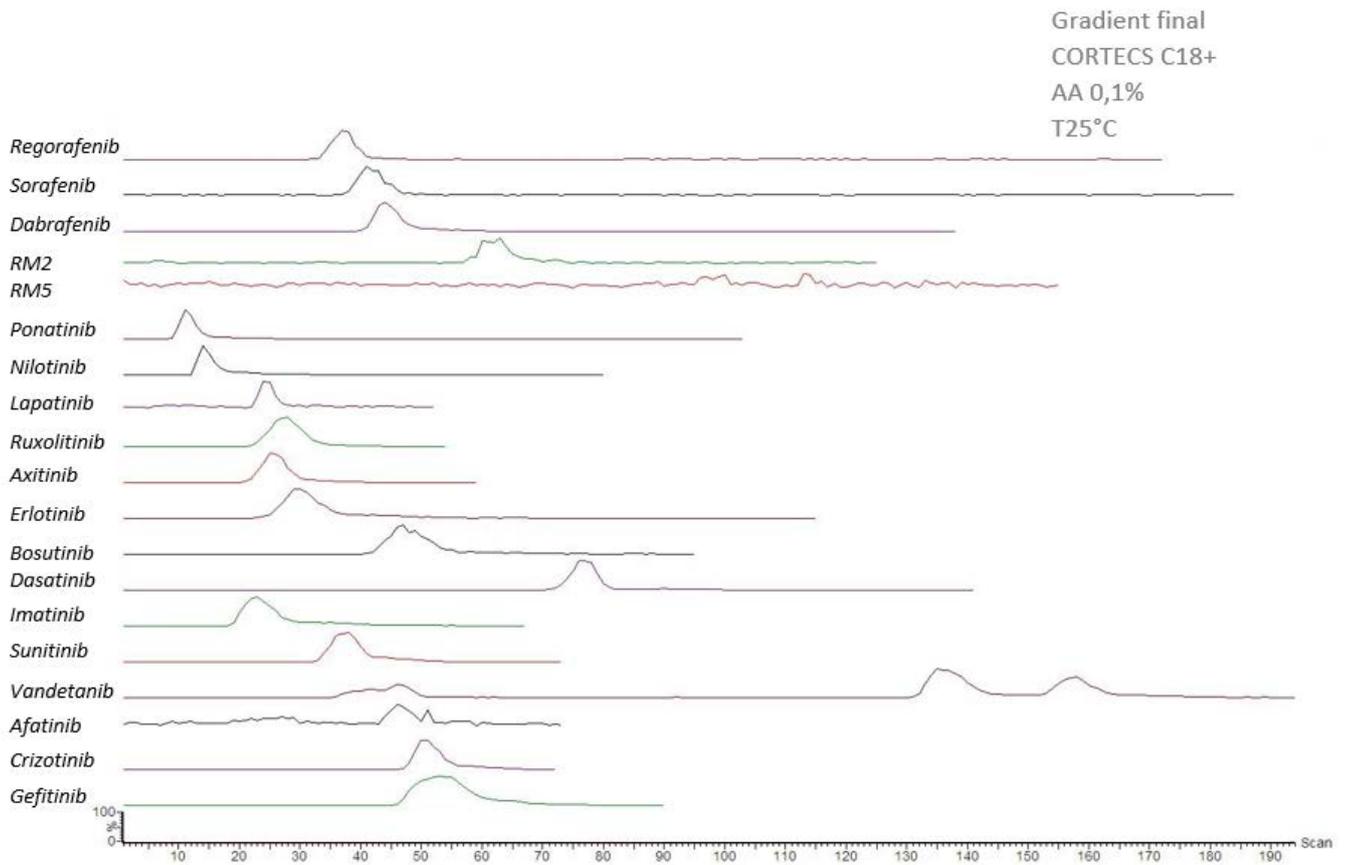
Annexe 7: spectre de masse des ions parents et fils des ITK et leurs étalons internes.

MOLECULE	Ion(s) parent(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>	Ion(s) fils(s) principal <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>
<i>Sorafenib</i>	 <p>Mass spectrum of Sorafenib showing parent ions at m/z 465.7, 467.5, and 487.4.</p>	 <p>Mass spectrum of Sorafenib showing major daughter ions at m/z 156.4, 202.5, 211.3, and 252.5.</p>
<i>Sorafenib EI</i>	 <p>Mass spectrum of Sorafenib EI showing parent ions at m/z 326.9 and 469.6.</p>	 <p>Mass spectrum of Sorafenib EI showing major daughter ions at m/z 202.3, 211.2, and 256.2.</p>
<i>Sunitinib</i>	 <p>Mass spectrum of Sunitinib showing parent ions at m/z 326.5 and 399.6.</p>	 <p>Mass spectrum of Sunitinib showing major daughter ions at m/z 256.2, 283.5, and 326.6.</p>
<i>Sunitinib EI</i>	 <p>Mass spectrum of Sunitinib EI showing parent ions at m/z 326.8 and 409.8.</p>	 <p>Mass spectrum of Sunitinib EI showing major daughter ions at m/z 256.2, 284.3, and 327.4.</p>

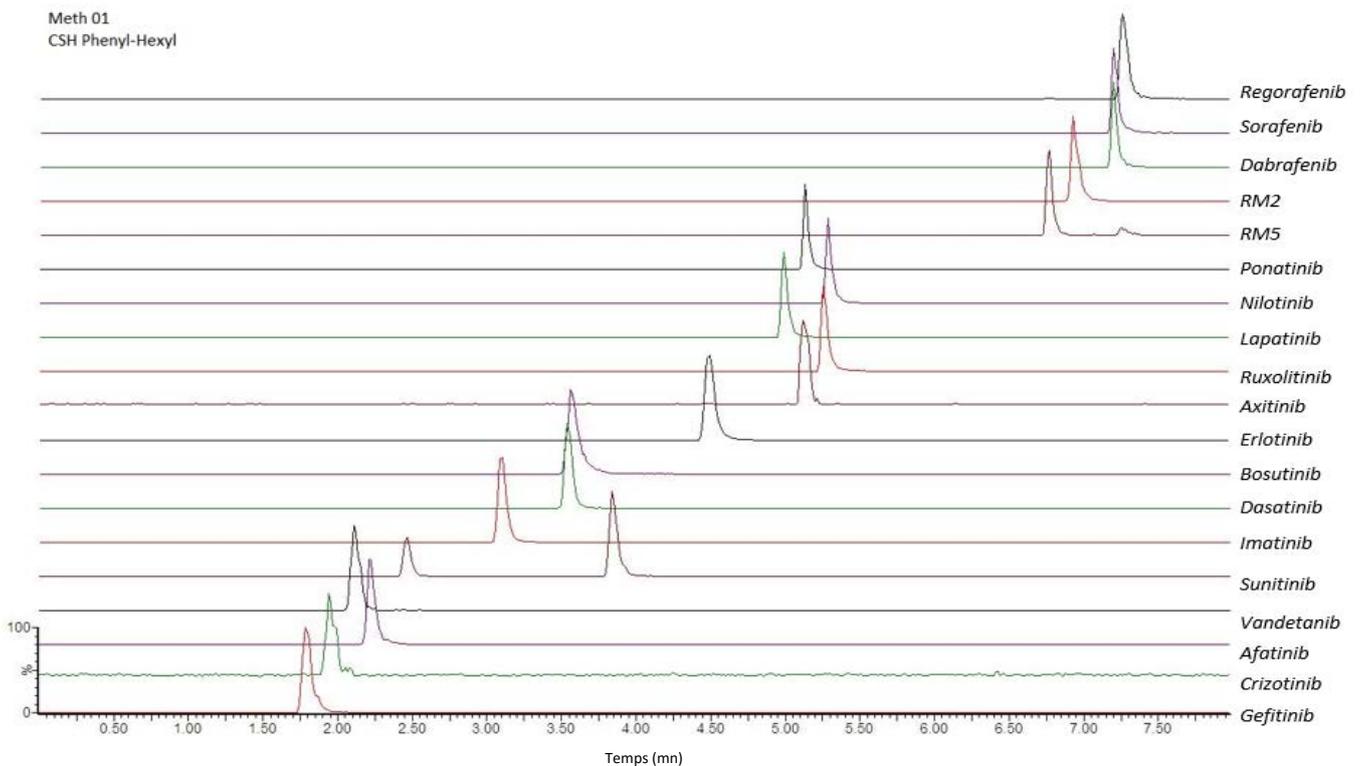
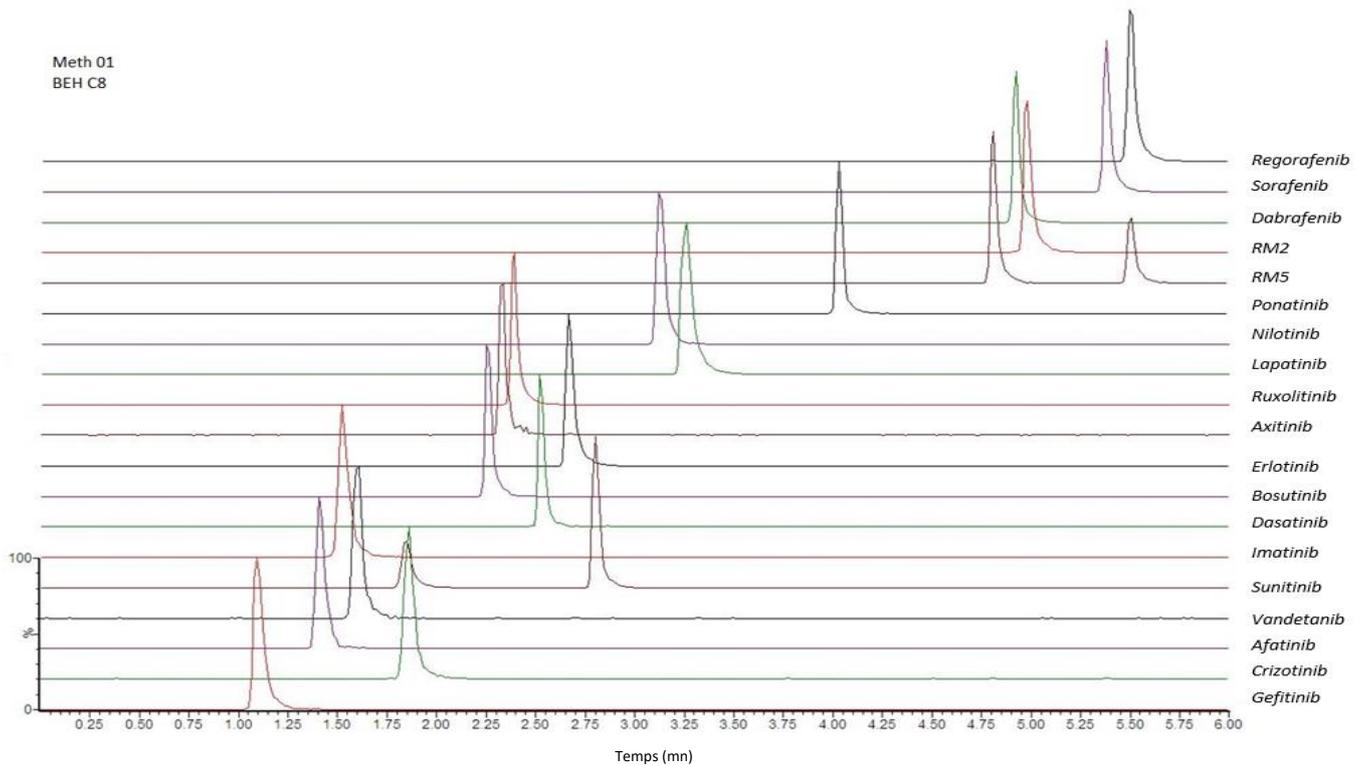
Annexe 7: spectre de masse des ions parents et fils des ITK et leurs étalons internes.

MOLECULE	Ion(s) parent(s) <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>	Ion(s) fils(s) principal <i>Intensité en fonction du spectre m/z</i>
<p style="text-align: center;"><i>Lapatinib</i></p>	 <p>Mass spectrum of Lapatinib parent ions. The x-axis represents m/z from 320 to 640, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. Two major peaks are observed: one at m/z 349.5 and a base peak at m/z 581.5. A smaller peak is visible at m/z 552.6.</p>	 <p>Mass spectrum of Lapatinib daughter ions. The x-axis represents m/z from 100 to 440, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 365.3. Other significant peaks are at m/z 322.3 and 351. Smaller peaks are labeled at m/z 379.5, 403.1, 425.1, and 436.5.</p>
<p style="text-align: center;"><i>Vandetanib</i></p>	 <p>Mass spectrum of Vandetanib parent ions. The x-axis represents m/z from 364 to 484, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. Two major peaks are observed: one at m/z 475.5 and another at m/z 477.6.</p>	 <p>Mass spectrum of Vandetanib daughter ions. The x-axis represents m/z from 60 to 180, and the y-axis represents relative intensity from 0 to 100. The base peak is at m/z 112.3. Another significant peak is at m/z 83.6.</p>

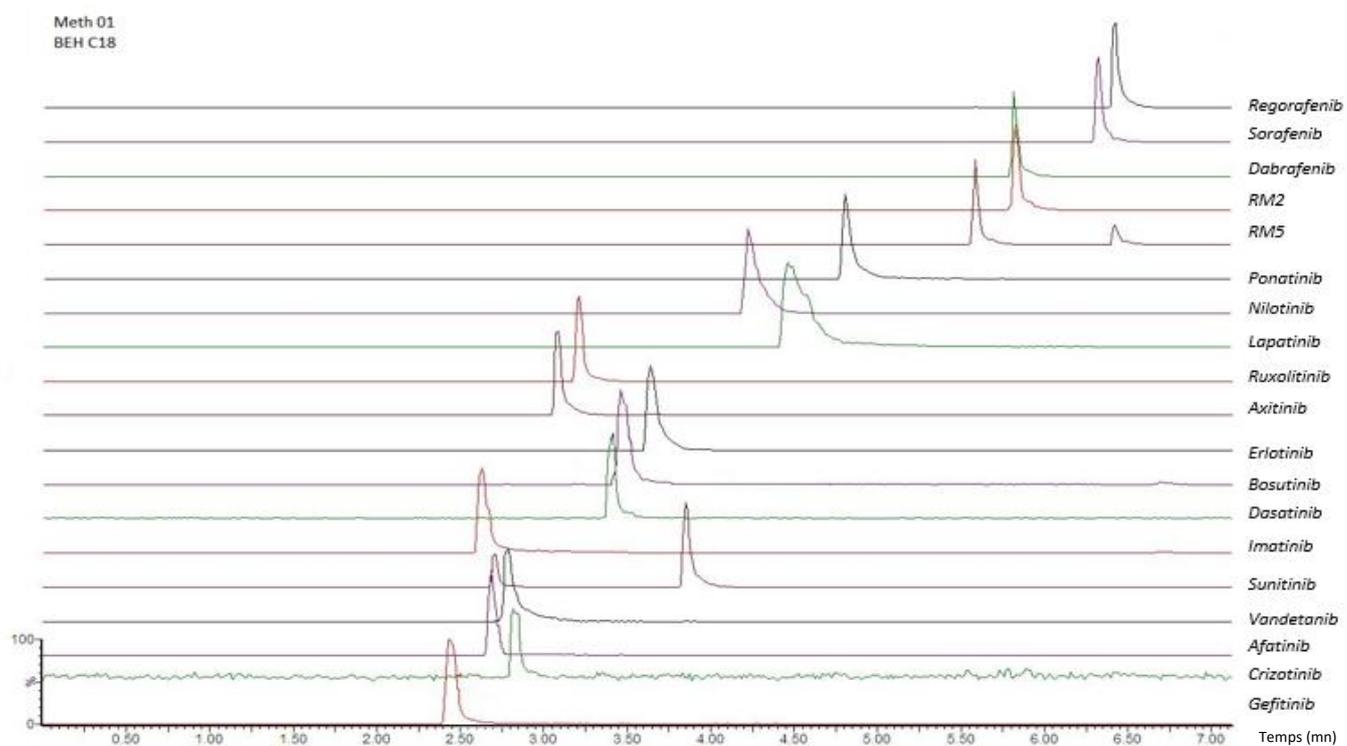
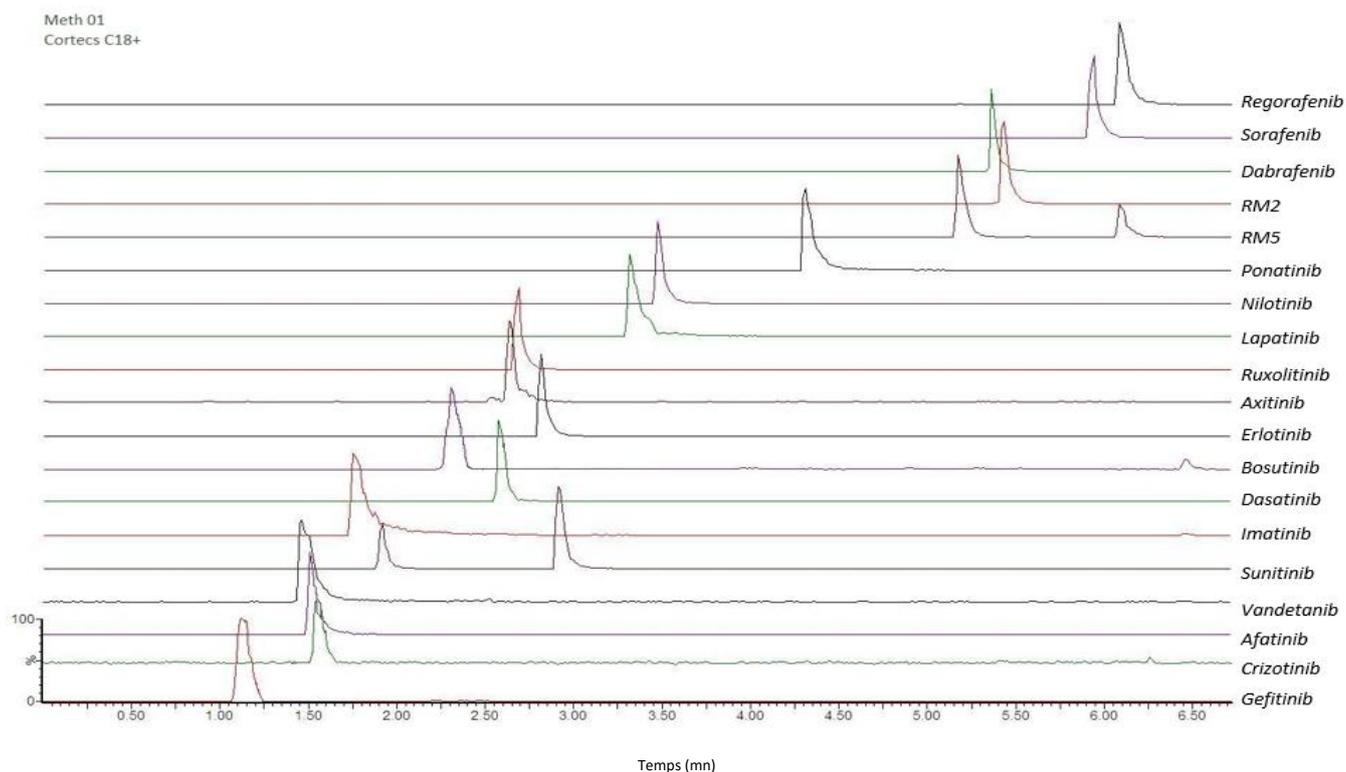
Annexe 7: spectre de masse des ions parents et fils des ITK et leurs étalons internes.



Annexe 8: chromatogramme des 19 canaux (1 par ITK) avant et après optimisation des temps de balayage. Gradient méthode finale, AA 0,1%, colonne CORTECS C18+, T=25°C. Injection d'un point de LLOQ. Intensité en fonction du nombre de scan.



Annexe 9: chromatogramme des 19 canaux MRM (1 par ITK) après injection d'une solution de QC<sub>c</sub>. Essais de colonnes BEH C18, BEH C8, CORTECS C18+ et CSH Phenyl-hexyl. T=25°C.



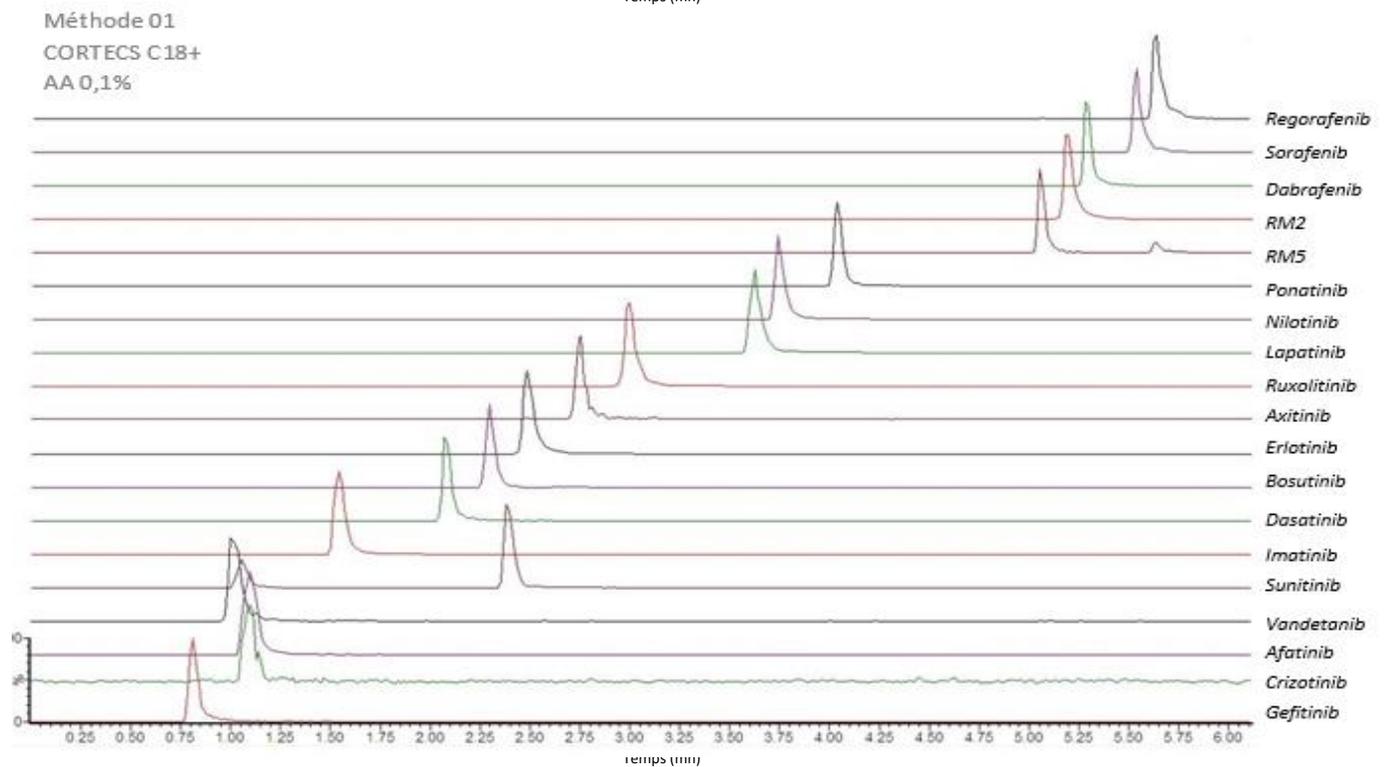
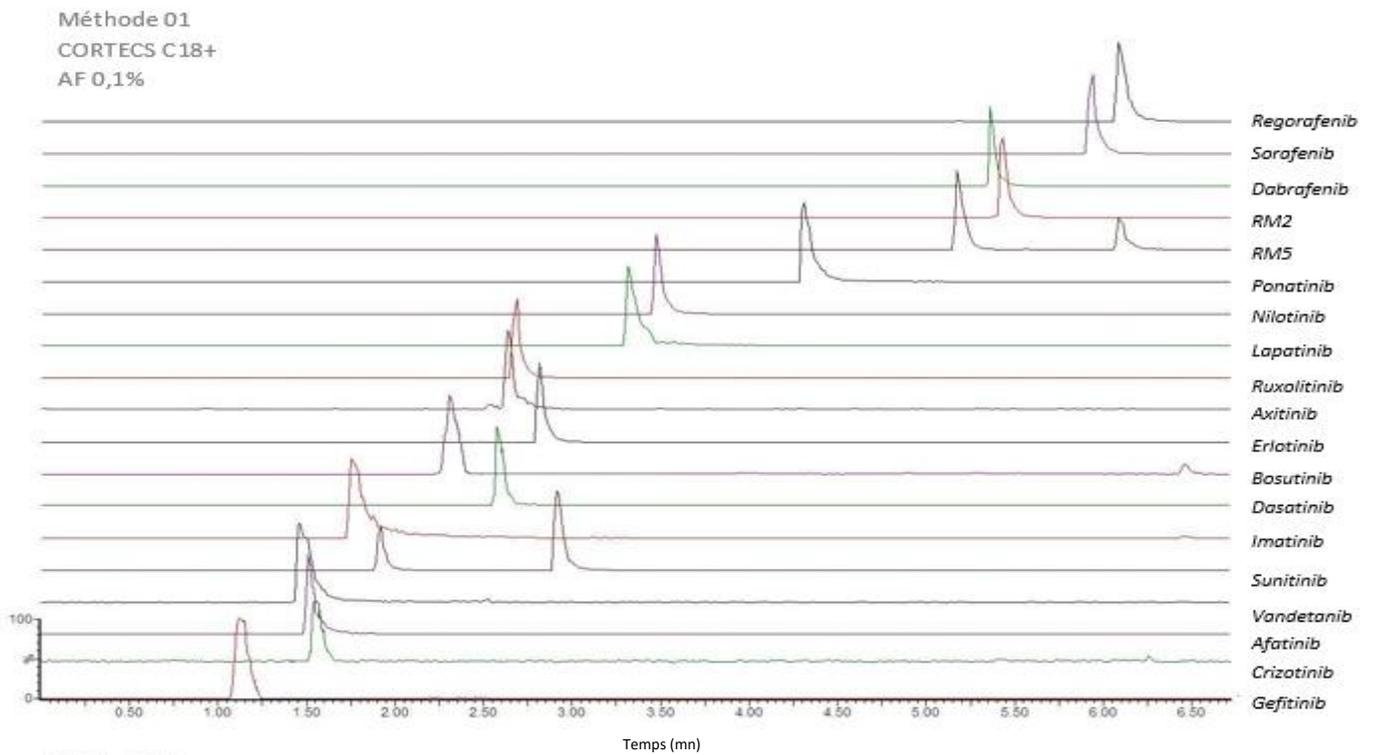
Annexe 9: chromatogramme des 19 canaux MRM (1 par ITK) après injection d'une solution de QCc.  
Essais de colonnes BEH C18, BEH C8, CORTECS C18+ et CSH Phenyl-hexyl. T=25°C.

Molécules	<b>Temps de rétention (mn) en fonction du pourcentage d'acétonitrile (% ACN)</b>							
	15 % ACN	20 % ACN	25 % ACN	30 % ACN	35 % ACN	40 % ACN	45 % ACN	50 % ACN
Afatinib		6,29	2,6	1,41				
Axitinib			6,15	2,73	1,54	1,07	0,84	
Bosutinib			8,33	3,43	1,76	1,11		
Crizotinib		7,12	2	1,55				
Dabrafenib						5,46	3,02	1,93
Dasatinib		5,98	2,46	1,32	0,91			
Erlotinib			5,51	2,79	1,69	1,21	0,94	
Gefitinib		4,27		1,25				
Imatinib		5,47		1,11	0,8			
Lapatinib					8,87	4,14	2,33	1,51
Nilotinib					5,37	2,76	1,67	1,19
Ponatinib				9,22	3,33	1,63	1,03	0,78
Regorafenib							5,39	3
Regorafenib M2					9,51	4,45	2,47	1,56
Regorafenib M5					7,09	3,44	1,96	1,3
Ruxolitinib		7,43	3,37	1,85	1,23	0,93	0,77	
Sorafenib						9,36	4,59	2,6
Sunitinib 01		1,55	0,88	0,67				
Vandetanib		5,45	2,5	1,44				
Sunitinib 02				1,56	1,01			

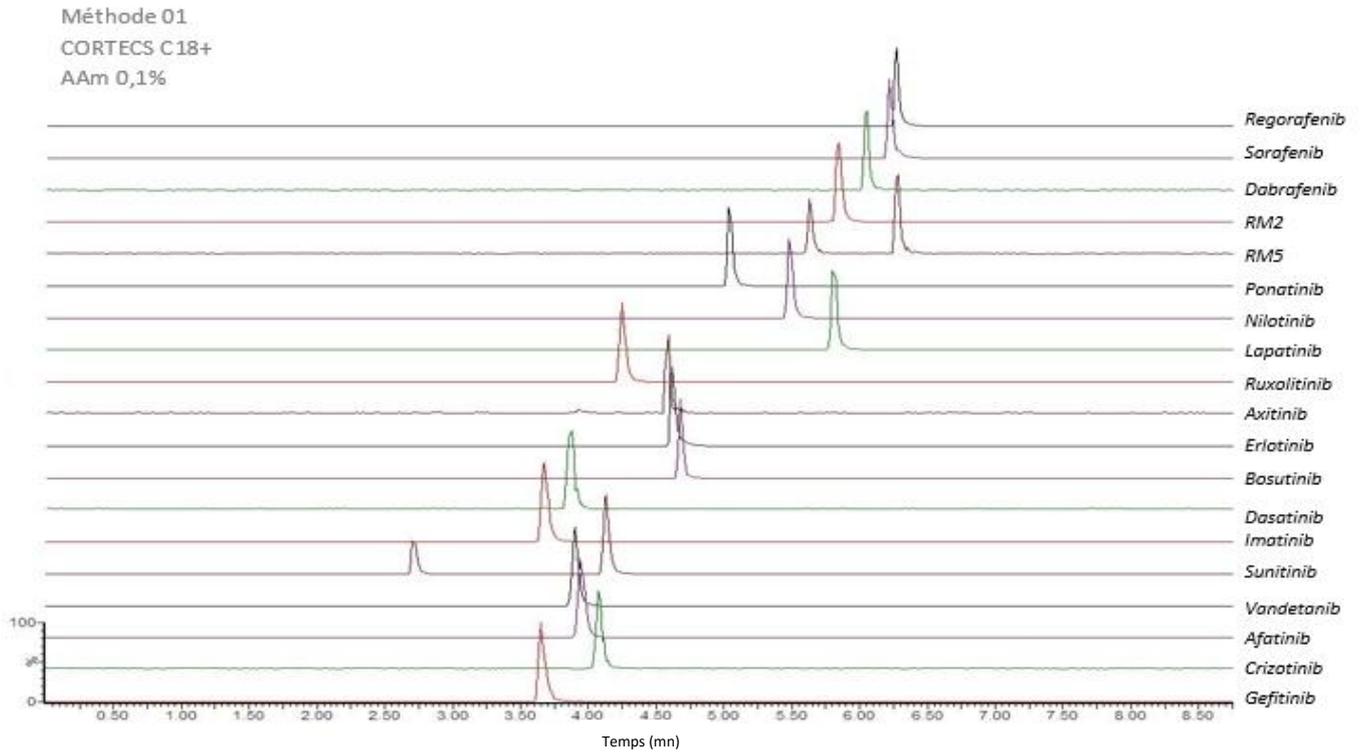
Annexe 10: temps de rétention des 19 molécules ITK obtenus en mode isocratique, en fonction du pourcentage d'acétonitrile. Phase A : eau + 0,1% d'AF, phase B : ACN + 10% de A. T=25°C.

Molécules	<b>Facteurs de rétention k en fonction du pourcentage d'acétonitrile (% ACN)</b>							
	15 % ACN	20 % ACN	25 % ACN	30 % ACN	35 % ACN	40 % ACN	45 % ACN	50 % ACN
Afatinib		18	7	3				
Axitinib			17	7	4	2	2	
Bosutinib			24	9	4	2		
Crizotinib		20	5	4				
Dabrafenib						15	8	5
Dasatinib		17	6	3	2			
Erlotinib			16	7	4	3	2	
Gefitinib		12		3				
Imatinib		15		2	1			
Lapatinib					26	11	6	4
Nilotinib					15	7	4	3
Ponatinib				27	9	4	2	1
Regorafenib							15	8
Regorafenib M2					28	12	6	4
Regorafenib M5					20	9	5	3
Ruxolitinib		21	9	5	3	2	1	
Sorafenib						27	13	7
Sunitinib 01		4	2	1				
Vandetanib		15	7	3				
Sunitinib 02				4	2			

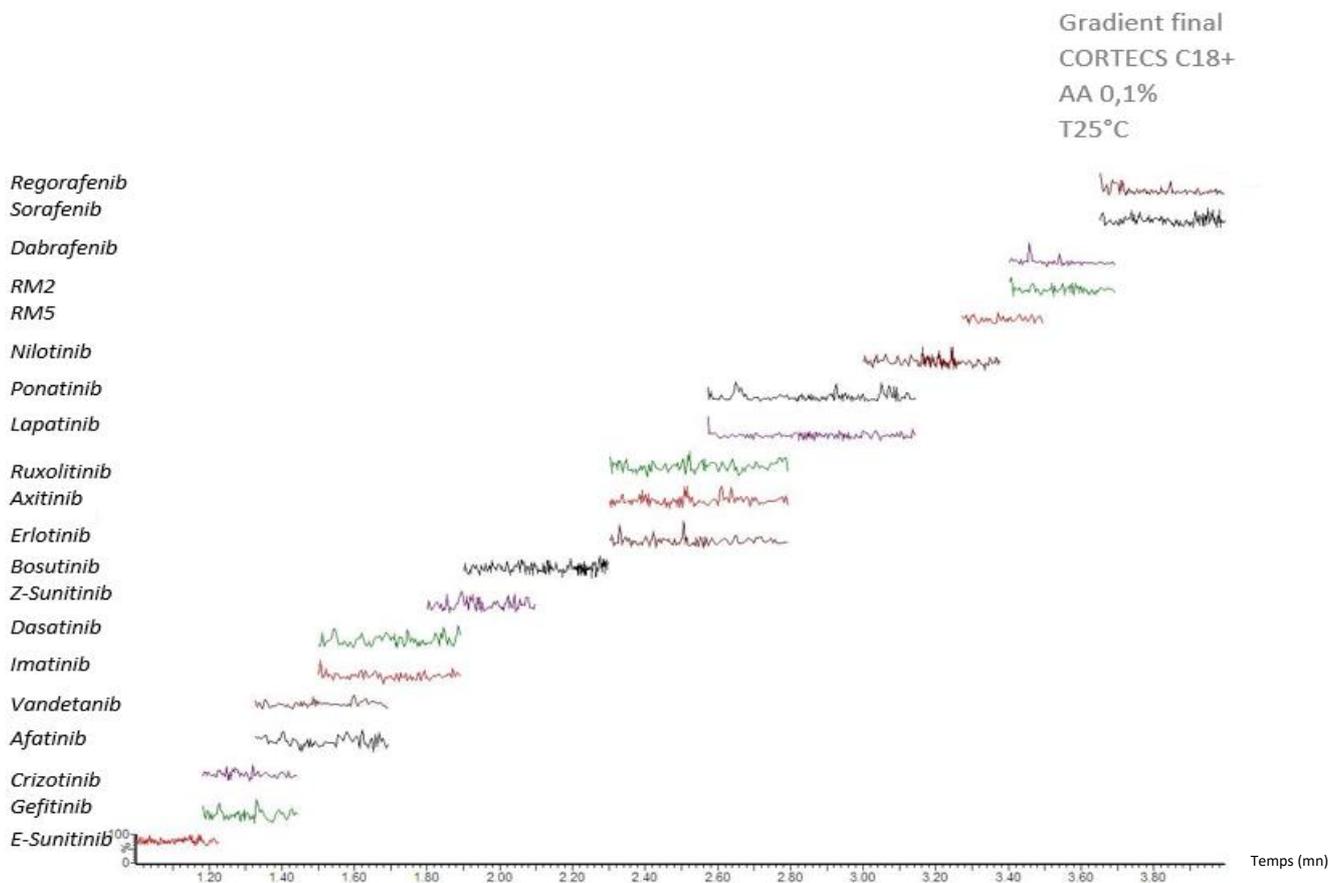
Annexe 11 : facteurs de rétention des 19 molécules ITK obtenus en mode isocratique, en fonction du pourcentage d'acétonitrile. Phase A : eau + 0,1% d'AF, phase B : ACN + 10% de A. 25°C.



Annexe 12: chromatogramme des 19 canaux MRM (1 par ITK) en fonction des phases mobiles. Colonne CORTECS C18+, gradient méthode 01, T=25°C.



Annexe 12: chromatogramme des 19 canaux MRM (1 par ITK) en fonction des phases mobiles. Colonne CORTECS C18+, gradient méthode 01, T=25°C.



Annexe 13: chromatogramme des 19 canaux MRM (1 par ITK) après injection d'un blanc matrice extrait. Gradient final; CORTECS C18+; AA 0,1%; T=25°C.

---

## Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique des inhibiteurs de tyrosine kinases et mise en place d'une technique de dosage.

**Résumé :** Depuis 15 ans, une nouvelle classe pharmacologique anticancéreuse est apparue : les inhibiteurs de tyrosine-kinases (ITK). Ces médicaments sont indiqués dans de nombreux cancers. Il a été démontré un intérêt clinique, dans la prise en charge des patients traités par ces molécules, de réaliser un suivi thérapeutique pharmacologique au cours duquel un dosage des concentrations sanguines, confronté à des concentrations seuils, peut guider la clinique, assurer une efficacité du traitement tout en limitant les effets indésirables. L'objectif de ce travail est de développer des outils d'analyse permettant une quantification plasmatique des ITK. Les outils choisis sont l'extraction en phase solide (SPE) la séparation par chromatographie liquide ultra haute performance (UPLC) et la détection par spectrométrie de masse (SM). La validation de la méthode se fait selon les recommandations internationales et inclut des étapes de linéarité, de fidélité, de justesse, l'évaluation des limites de quantification et de détection, la recherche des rendements d'extraction, d'effet matrice et enfin de sélectivité. La méthode validée permettra dans un premier temps de réaliser un suivi thérapeutique pharmacologique afin de guider les cliniciens, dans un second temps de réaliser des études de pharmacocinétique et enfin de réaliser des études cliniques de définition de seuils thérapeutique.

---

## Benefits of therapeutic drug monitoring applied to tyrosine kinases inhibitors and setting up of an analytical tool.

**Abstract:** Since 15 years, new anticancer drugs has been discovered: the tyrosine kinase inhibitors. These anti-cancer drugs are indicated for the treatment of several cancer. Therapeutic drug monitoring, which is defined as the measurement of drugs in biological sample, can improve efficacy and reduce side effects of these drugs. The main goal of this work is to develop new analysis tools to quantify TKI in plasma. Tools chosen were solid phase extraction, ultra high pressure liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. Following the international guidelines, the method validation included linearity, accuracy, precision, selectivity, assessment of limit of quantification, limit of detection, extraction recovery and matrix effect. This assay can be used to help physicians thanks to therapeutic drug monitoring, perform pharmacokinetics studies, and research therapeutic threshold.

---

**DISCIPLINE administrative :** Pharmacie

---

**MOTS-CLES :** Inhibiteurs de tyrosine kinases – Suivi thérapeutique pharmacologique – Oncologie – Pharmacie – Imatinib – Leucémie Myéloïde Chronique – Chromatographie Liquide – Extraction Phase Solide – Spectrométrie de Masse

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :**

Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Pellegrin  
Place Amélie Raba Léon  
33000 Bordeaux

**Directeur de thèse :** Stéphane Bouchet