

TABLE DES MATIERES

Remerciements au Jury	8
Remerciements	9
Table des matières	13
Listes des abréviations	17
Liste des figures	19
Introduction	20
I. Généralités sur les cellules souches	21
A. Qu'est-ce qu'une cellule souche ?.....	21
1. Définition d'une cellule souche.....	21
2. Classification des cellules souches.....	21
B. Caractérisation des cellules souches hématopoïétiques	22
II. La greffe de cellules souches hématopoïétiques	24
A. Principes de la greffe de cellules souches hématopoïétiques	24
B. Les différents types de greffes	24
1. La greffe autologue	24
2. La greffe allogénique	25
C. Les grandes étapes de la greffe de moelle osseuse.....	27
1. Origine et prélèvement du greffon	27
i. La moelle osseuse.....	27
ii. Le sang périphérique	28
iii. Le sang de cordon	29
2. Le conditionnement à la greffe.....	29
i. Le conditionnement myéloablatif.....	29
ii. Le conditionnement non myéloablatif.....	30
iii. Exemples de protocoles de conditionnement	31
3. La greffe de moelle osseuse et le suivi post-greffe	32

i.	Administration du greffon	32
ii.	Les mesures et traitements associés	32
iii.	Surveillance et examens post-greffe	33
4.	Les enjeux et les complications de la greffe	34
i.	Rejet et non prise de greffe	34
ii.	La maladie du greffon contre l'hôte	35
iii.	L'effet du greffon contre la leucémie	36
iv.	Les rechutes et les cancers secondaires	36
III.	Conditionnement par busulfan dans les greffes de moelle osseuse	37
A.	Caractérisation du busulfan	37
1.	Mécanisme d'action	37
2.	Indications	38
3.	Pharmacocinétique	38
i.	Absorption	38
ii.	Distribution.....	39
iii.	Métabolisation	39
iv.	Élimination	39
v.	Variabilité pharmacocinétique du busulfan.....	39
4.	Toxicités	40
i.	Toxicité hépatique	40
ii.	Toxicité neurologique	42
iii.	Toxicité pulmonaire	42
iv.	Toxicité sur l'appareil uro-génital	43
v.	Autres toxicités.....	43
B.	Protocoles de conditionnement par busulfan	44
1.	Notions de cible thérapeutique	44
i.	Définition d'une zone thérapeutique	44

ii. Les paramètres PK/PD	45
iii. Le suivi thérapeutique et l'adaptation posologique.....	46
2. Adaptation de la stratégie PK/PD au busulfan	46
i. Les données bibliographiques actuelles	47
ii. L'utilisation de l'adaptation posologique.....	48
iii. Choix de la cible.....	48
3. Les protocoles mis en place	49
i. Le protocole standard	49
ii. Le protocole Time-sequenced	50
IV. Application au ciblage posologique du busulfan haute-dose	52
A. Matériels et méthodes.....	52
1. Stratégie globale	52
2. De la perfusion de busulfan à l'analyse des concentrations.....	53
i. Choix de la dose et administration	53
ii. Prélèvements et acheminement	53
iii. Dosage LC MS/MS	54
3. Des concentrations à l'estimation des paramètres PK	54
4. Des paramètres PK à la dose personnalisée	56
B. Exemple d'adaptation posologique	58
1. Cas clinique	58
2. Stratégie d'exposition.....	58
3. Détails des calculs	59
4. Écarts à la cible	61
5. Devenir de la greffe.....	62
C. Les résultats du ciblage posologique.....	62
1. Le protocole standard	62
2. Le protocole time sequenced	64

3. Discussion des résultats.....	65
Conclusions	67
Glossaire	68
bibliographie.....	70

LISTES DES ABBREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ATC	Anatomical therapeutic chemical classification
AUC	Area under the curve (surface sous la courbe)
AUC _j	AUC journalière
AUC _{tot}	AUC totale
BU	Busulfan
Cl	Clairance
CNT	Cellule nucléé totale
CS	Cellule Souche
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CSL	Cellule souche lymphoïde
CSM	Cellule souche myéloïde
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GST	Glutathion S transférase
GVH	Graf vs host / Greffon contre l'hôte
GVHD	Graf vs host disease / maladie du greffon contre l'hôte
GVL	Graft vs leukemia / Greffon contre leucémie
HLA	Human leukocyte antigen / Antigène leucocytaire humain
HSV1	Herpès simplex de type 1
IPC	Institut Paoli Calmettes
IV	Voie intraveineuse
J0	Jour zéro
LAM	Leucémie aigüe myéloïde
MO	Moelle osseuse
MVO	Maladie veino-occlusive
NFS	Numération de formule sanguine
PK/PD	Pharmacocinétique/pharmacodynamie

RCP	Réunion de concertation disciplinaire
RIC	Conditionnement d'intensité réduite
SI	Système immunitaire
SOS	Syndrome d'obstruction sinusoïdale
T-seq	Time-sequenced
Vd	Volume de distribution
VO	Voie orale

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Principales étapes de l'hématopoïèse. (4)	22
Figure 2. Différents types de conditionnement, du moins au plus myéloablatif. (31)(32)	31
Figure 3. Surveillance et soins post greffe de moelle osseuse.	34
Figure 4. Structure chimique du busulfan.	37
Figure 5. Schéma explicatif de la zone thérapeutique d'un médicament.....	44
Figure 6. Profil cinétique d'un médicament et paramètres PK.	45
Figure 7. Schéma explicatif du protocole standard.	50
Figure 8. Schéma explicatif du protocole standard.	51
Figure 9. Schéma explicatif du ciblage posologique.....	52
Figure 10. Spécialité BULSIVEX®	53
Figure 11. Visualisation des fichiers « cinétique » et « administration » sur KineticPro®	55
Figure 12. Résultats de l'estimation des paramètres PK avec KineticPro®	56
Figure 13. Matrice Excel pour l'estimation à J-14 du protocole Time-sequenced.	57
Figure 14. Matrice Excel appliquée à J-14 pour le cas clinique.....	60
Figure 15. Vue d'ensemble du ciblage posologique au cours du conditionnement.	61
Figure 16. Répartition des écarts à la cible (en %) par patient pour le protocole standard	63
Figure 17. Répartition des écarts à la cible (en %) par patient pour le protocole T-seq	64

INTRODUCTION

La greffe de cellules souches hématopoïétiques, appelée également greffe de moelle osseuse, est une thérapie cellulaire qui consiste en la transplantation de cellules souches à potentiel hématopoïétique chez un patient. A l'heure actuelle, cette greffe constitue un des seuls traitements curatifs pour certaines hémopathies malignes lorsque les médicaments ne sont plus efficaces car elle permet de reconstruire entièrement une moelle osseuse pathologique.

Le conditionnement de la greffe est une étape préliminaire majeure qui conditionne le succès de la greffe de moelle osseuse. Ce conditionnement repose sur la mise en aplasie au préalable du patient. Cette aplasie, en affectant la réponse immune du patient, maximise les chances de succès de la greffe, notamment en évitant un éventuel rejet en cas de donneur allogénique. L'aplasie peut s'obtenir par l'administration de chimiothérapies cytotoxiques haute-dose, tel que le busulfan. La zone thérapeutique de cette molécule est très étroite et il convient de trouver le bon équilibre entre sa toxicité et son efficacité. Une fenêtre cible thérapeutique d'exposition (AUC_{tot}) a été identifiée comme optimale et des protocoles stricts d'administration permettent de rester dans cette zone thérapeutique. Néanmoins, la grande variabilité intra et inter individuelle dans la pharmacocinétique du busulfan impose un suivi thérapeutique strict doublé d'une adaptation posologique du busulfan au cours du temps de manière à rester dans la cible thérapeutique.

L'objectif de cette thèse est de présenter une application à l'adaptation de la posologie du busulfan pour ajuster le patient dans la fenêtre d'exposition cible. Ce travail a été réalisé grâce au laboratoire de toxicocinétique et de pharmacocinétique de la Timone et est en collaboration avec l'institut Paoli Calmette.

Dans un premier temps, une caractérisation des cellules souches est donnée. Dans une seconde partie, certains points sont détaillés sur la greffe de moelle osseuse (principe, type de greffe, différentes étapes, enjeux et complications). Par la suite, une plus grande attention est portée sur les conditionnements par busulfan. Cette partie apporte un grand nombre d'informations sur cette molécule, ainsi que les données bibliographiques actuelles sur les conditionnements par busulfan. En dernier lieu seront préciser les méthodes et les résultats du ciblage posologique du busulfan appliqués à deux protocoles particuliers.

I. Généralités sur les cellules souches

A. Qu'est-ce qu'une cellule souche ?

1. Définition d'une cellule souche

Les cellules souches (CS) sont des cellules indifférenciées et non spécialisées qui se définissent par deux caractéristiques principales :

- L'autorenouvellement : les cellules souches se renouvellent pendant de longues périodes par division cellulaire. Cette division cellulaire est dite « asymétrique » puisque la CS mère se divise en une CS fille identique et une CS fille prête à s'engager dans une voie de différenciation. Ce phénomène permet de conserver un pool initial de cellules souches dans l'organisme.
- La différenciation : dans certaines conditions physiologiques, physiopathologiques ou expérimentales, les cellules souches sont capables de s'engager dans une voie de spécialisation et ainsi de se différencier en cellules spécialisées.

Les cellules souches sont distinguées entre elles selon leur potentiel de différenciation, c'est-à-dire le nombre de types cellulaires différents qu'elles sont capables de produire (totipotente, pluripotente, multipotente et unipotente) et selon leur origine (embryonnaire, fœtale, amniotique ou adulte).

Ces cellules sont localisées dans des microenvironnements particuliers appelés « niches » qui permettent leur maintien et leur protection. (1)(2)

2. Classification des cellules souches

Il existe plusieurs types de cellules souches qui sont classées en fonction de leur capacité de différenciation (1)(3) :

- *Les cellules souches totipotentes* : elles sont capables de se différencier en n'importe quelle cellule spécialisée et de ce fait, de créer un organisme entier. Seules les cellules provenant de l'œuf fécondé sont des CS totipotentes.
- *Les cellules souches pluripotentes* : elles sont à l'origine de l'ensemble des tissus issus des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) hors annexes embryonnaires.

- *Les cellules souches multipotentes* : ces cellules ont un potentiel de différenciation plus réduit que celui des CS pluripotentes car elles sont engagées dans une voie de différenciation d'un tissu précis. Néanmoins, elles vont être capable de donner naissance à plusieurs types cellulaires différents. C'est le cas notamment des cellules souches hématopoïétiques.
- *Les cellules souches unipotentes* : ces cellules ne peuvent engendrer qu'un seul type cellulaire.

B. Caractérisation des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules souches multipotentes à potentiel hématopoïétique. C'est-à-dire que ces cellules vont donner naissance à tous les éléments figurés du sang. L'ensemble des cascades de différenciation et de renouvellement des cellules sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques s'appelle l'hématopoïèse.

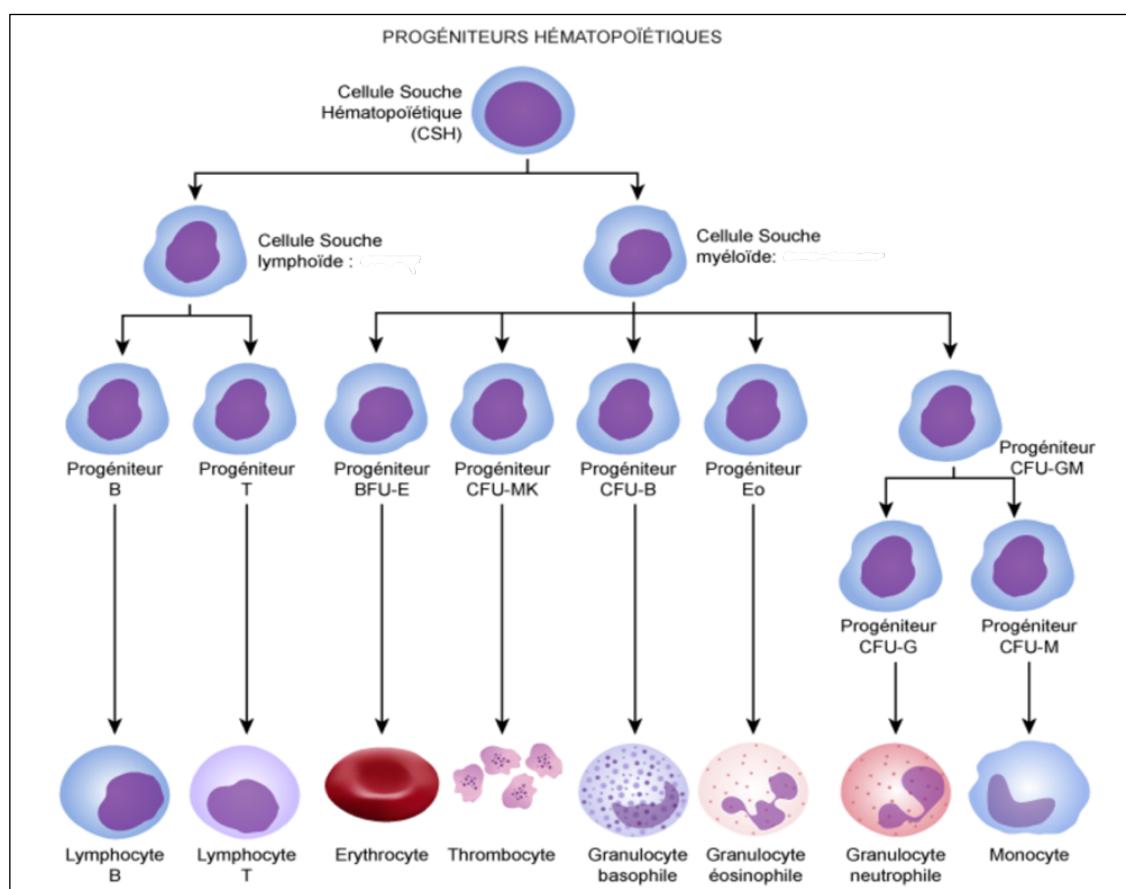


Figure 1. Principales étapes de l'hématopoïèse. (4)

La cellule souche hématopoïétique va se différencier en deux types de cellules progénitrices différentes : la cellule souche lymphoïde (CSL) ou la cellule souche myéloïde (CSM). Ces dernières sont des précurseurs de deux lignées sanguines bien distinctes. On distingue la lignée myéloïde qui comprend les globules rouges, les plaquettes, les polynucléaires ainsi que les monocytes et la lignée lymphoïde qui concerne les lymphocytes B et T. (Cf. figure 1) (4)

Afin de maintenir une quantité stable de cellules souches hématopoïétiques, lors de chaque division cellulaire, il y a formation d'une cellule souche fille identique à la CSH mère et d'une cellule souche fille différenciée (CSL ou CSM). Ce phénomène s'appelle la division asymétrique, c'est ce qui leur confère cette propriété d'autorenouvellement. (1)(3)(5)

L'hématopoïèse débute dès la période embryonnaire dans le foie, la rate et la moelle osseuse (MO). A l'âge adulte, le siège de l'hématopoïèse est uniquement la moelle osseuse (plus précisément la MO rouge).

Les cellules souches hématopoïétiques sont en quiescence et dès l'apparition de signaux (les facteurs de croissance hématopoïétique), elles prolifèrent et s'engagent dans un processus de différenciation de l'une des deux lignées. La capacité d'autorenouvellement des progéniteurs diminue avec leur maturation. Les cellules sanguines matures représentent 99% des cellules de la moelle osseuse rouge et ce sont majoritairement ces cellules matures qui passent dans la circulation sanguine. (6)(7)(8)(9)(10)

La production médullaire quotidienne des cellules sanguines matures peut atteindre en moyenne 25.10^{10} pour les érythrocytes, 25.10^9 pour les plaquettes et 20.10^9 pour les leucocytes. Cette production massive est indispensable car elle compense les pertes physiologiques journalières du système hématopoïétique dues à la durée de vie limitée des différentes cellules sanguines. L'hématopoïèse est finement régulée afin de maintenir l'homéostasie du tissu sanguin et également pour subvenir aux besoins de l'individu. (5)(11)

II. La greffe de cellules souches hématopoïétiques

A. Principes de la greffe de cellules souches hématopoïétiques

Anciennement appelée « greffe de moelle osseuse », la greffe de cellules souches hématopoïétiques est une thérapie cellulaire. Plus précisément il s'agit de la transplantation chez un individu de cellules souches hématopoïétiques sélectionnées et modifiées pour obtenir un effet thérapeutique. Ce type de greffe est majoritairement utilisé dans le traitement des hémopathies malignes (Lymphome, myélome, leucémies) et des troubles hémopathiques (Aplasie médullaire, myélodysplasie). Dans certains cas, cette thérapeutique est également utilisée pour traiter des tumeurs solides. (12)

Les cellules souches hématopoïétiques sont administrées par voie périphérique, migrent vers la moelle osseuse où elles vont participer à la reconstitution hématologique du patient.

Ainsi, la greffe de CSH à deux buts principaux :

- Restaurer la moelle osseuse du patient après des traitements anti-cancéreux myéloablatifs.
- Remplacer une moelle osseuse pathologique.

Il existe deux types de greffe de cellules souches hématopoïétiques, en fonction de la nature du donneur : les greffes autologues et les greffes allogéniques. (6)(12)(13)(14)(15)

B. Les différents types de greffes

1. La greffe autologue

On parle de greffe autologue ou d'autogreffe lorsque que le patient est son propre donneur de cellules souches hématopoïétiques. Le but principal de ce type de greffe est la reconstitution du système hématologique du patient à la suite de l'administration de chimiothérapies cytotoxiques (toxiques pour la cellule) intensives à haute dose.

Ces agents cytotoxiques ont une myélotoxicité majeure à l'origine de risques infectieux et hémorragiques et ils sont extrêmement aplasiants. Ainsi, afin de pallier cette forte morbi-mortalité et lorsque les mesures de prophylaxie ne sont pas suffisantes (facteurs de croissance, perfusion sanguine, etc) une greffe autologue de CS hématopoïétique peut être réalisée à la suite de ce type de chimiothérapie.

Cette thérapie cellulaire est donc un traitement de consolidation qui va considérablement diminuer le temps théorique d'aplasie du patient, ainsi que l'apparition de tous les risques qui en découlent. En résumé, il s'agit de compenser un effet iatrogénique médicamenteux majeur.

Trois grandes étapes définissent ce type de greffe :

- Prélèvement des CSH du patient et cryoconservation.
- Administration de la chimiothérapie haute dose qui va détruire tous les éléments d'origine tumorale mais qui va donc entraîner une aplasie médullaire.
- Réinjection des CSH saines (chimiothérapie-free) afin de restaurer l'ensemble des cellules sanguines à un niveau physiologique.

Ainsi, la greffe autologue, en tant que support thérapeutique, est indiquée dans des cancers agressifs, récidivants ou résistants aux traitements habituels. (3)(12)(16)

En France, sur l'année 2020, 2971 greffes autologues ont été réalisées, dont 110 par l'institut Paoli Calmettes (IPC). Dans plus de 90% des cas, ces greffes entrent dans la stratégie thérapeutique de la prise en charge des hémopathies malignes (60,9% des myélomes, 35,3% des lymphomes et <1% de leucémies aigues). (17)

2. La greffe allogénique

Le terme allogénique désigne les greffes pour lesquelles le donneur de cellules souches est différent du receveur. Il convient de distinguer différents types de donneurs :

- Les donneurs du cercle familial du patient. On parle alors de greffe allogénique apparentée.
- Les donneurs hors cadre familial. On parle alors de greffe allogénique non apparentée. Soit il s'agit d'une connaissance du patient, soit le donneur est inscrit sur un registre national de « donneur volontaire de moelle osseuse ».

La greffe allogénique repose sur un principe de compatibilité immunologique. En effet, les cellules expriment à leur surface des molécules « HLA » (Human Leukocyte Antigen). C'est ce typage HLA qui détermine l'identité des cellules de chaque individu. Bien qu'elles soient indifférenciées, les CS hématopoïétiques possèdent également ces molécules à leur surface. Le système HLA est responsable de la reconnaissance du « soi » et du « non soi » et de ce fait du déclenchement de la réponse immunitaire (Les lymphocytes détruisent tout ce qui est étranger à l'organisme).

Ainsi, pour assurer le succès d'une greffe allogénique, il est important de réaliser une étude d'histocompatibilité entre le receveur et le donneur. Ce test permet de vérifier que les molécules HLA exprimées par chacun sont suffisamment semblables pour éviter que les molécules HLA du donneur soient reconnues comme étrangères par les lymphocytes du receveur (situation de rejet du greffon) ou inversement (effet Graft Vs Host = le greffon attaque l'hôte). (12)(18)

Tout comme pour la greffe autologue, cette thérapie cellulaire permet de reconstituer hématologiquement un patient à la suite de son exposition à des traitements hautement cytotoxiques. Néanmoins, la greffe allogénique bénéficie d'indications et d'avantages supplémentaires par rapport à la greffe autologue.

Tout d'abord, le fait d'apporter des cellules souches hématopoïétiques d'un donneur extérieur, permet de remplacer une moelle osseuse pathologique par une moelle osseuse totalement saine et fonctionnelle. C'est pour cela que la greffe allogénique de CSH constitue à l'heure actuelle le seul traitement capable de guérir certaines maladies hématologiques, telle que les myélodysplasies.

De plus, la greffe allogénique possède des propriétés immunologiques puisque le greffon apporte des cellules immunocompétentes telles que les lymphocytes T ou les cellules NK qui ont une activité anti-tumorale sur les cellules tumorales résiduelles du donneur : C'est l'effet « greffe contre leucémie » (GVL). De ce fait, la greffe allogénique de CSH justifie d'autant plus son indication dans les hémopathies malignes. (3)(12)(19)

En France, sur l'année 2020, 1878 greffes allogéniques ont été réalisées, dont 117 par l'IPC. Dans plus de 90% des cas, ces greffes représentent la stratégie thérapeutique de référence pour la prise en charge des hémopathies malignes (leucémie aiguë myéloïde et leucémie aiguë lymphoïde dans plus de 50% des cas). Ce type de greffe est moins réalisé du fait de sa complexité : difficulté à trouver des donneurs et des receveurs compatibles et complications associées. (17)

C. Les grandes étapes de la greffe de moelle osseuse

Dans cette partie, les étapes principales de la greffe de cellules souches hématopoïétiques sont détaillées. Du prélèvement du greffon chez le donneur jusqu'à la greffe de moelle osseuse en elle-même. La place du conditionnement au cours du processus de greffe est précisée.

1. Origine et prélèvement du greffon

Il existe trois sources différentes de cellules souches hématopoïétiques : la moelle osseuse, le sang périphérique et le sang de cordon ombilical. On qualifie de greffon, les cellules souches hématopoïétiques prélevées, traitées, conservées et qui seront greffées par la suite. (14)

i. *La moelle osseuse*

La moelle osseuse est la première source de CSH à avoir été utilisée historiquement. Néanmoins depuis quelques années cette voie de prélèvement est de moins en moins employée. En 2019, pour les greffes autologues l'utilisation de la MO comme source de CSH est négligeable (0,1%), pour les greffes allogéniques elle ne représente que 23% des greffes. Une des raisons principales est le caractère invasif de la procédure de récolte. (17)

En effet, le prélèvement est pratiqué au bloc opératoire, sous anesthésie générale pendant 1h à 2h. La ponction se fait au niveau des crêtes iliaques postérieures (le sternum et le tibia sont aussi envisageables) du donneur. Plusieurs aspirations de 5 à 10 ml sont réalisées à l'aide d'un trocart au niveau de cette zone.

Simultanément, une numération des cellules nucléées totales (CNT) du prélèvement est faite afin d'apprécier quantitativement et qualitativement sa composition, ce qui permet de fixer le volume final de MO nécessaire. De manière générale, un volume compris entre 400 et 1200 ml est requis pour avoir un bon greffon (c'est-à-dire $2 \text{ à } 3 \times 10^8 \text{ CNT/kg}$). La seule contrainte médicale et réglementaire existante est celle du volume prélevable, il ne faut pas dépasser 20 ml de MO par kg. Le volume final de moelle osseuse obtenu est conservé dans une poche de solution saline isotonique contenant des anticoagulants. Habituellement, le jour du prélèvement coïncide avec le jour de greffe afin de ne pas avoir à congeler le greffon et de ce fait d'altérer sa qualité. (3)(12)(20)(21)

ii. Le sang périphérique

Cette voie de prélèvement des cellules souches hématopoïétiques est actuellement la plus employée. Elle représente 99,9% des sources utilisées pour les greffes autologues et 72,9% pour les greffes allogéniques. (17)

A l'état physiologique, les progéniteurs hématopoïétiques ne sont présents qu'en très faible quantité dans la circulation sanguine. De ce fait, il n'est pas possible de récolter suffisamment de CSH par prélèvement sanguin pour obtenir un greffon satisfaisant. (14)

Une phase de mobilisation est donc nécessaire. En effet, sous l'action de facteurs de croissance hématopoïétique granulocytaire (G-CSF), l'autorenouvellement des CSH est fortement stimulé et leur nombre augmente de manière significative. Ainsi, afin de ne pas saturer la moelle osseuse, les CSH vont quitter les niches hématopoïétiques et être relarguées dans la circulation sanguine périphérique. L'utilisation de ces facteurs de croissance est donc un traitement de première intention dans la mobilisation des CSH pour les greffes de moelle osseuse.

De manière générale, le patient ou le donneur reçoivent les G-CSF par voie sous cutanée pendant quatre à cinq jours à la dose de 10 µg/kg par jour. (22)

A la fin de cette phase de mobilisation les CSH vont être récoltées par cytaphérèse, c'est la phase de recueil. La cytaphérèse est une technique de séparation des différents composants du sang en fonction de leurs tailles, de leurs poids ainsi que de leurs propriétés physico-chimiques. Concrètement, le sang du donneur ou du patient est prélevé et filtré simultanément afin de ne conserver que les éléments d'intérêt (ici les CSH) et ce qui n'est pas retenu est immédiatement réinjecté à ce dernier. Un volume de 200 ml de sang concentré en CSH est prélevé. Cet échantillon est ensuite évalué afin de déterminer sa qualité, sa composition et pour confirmer son utilisation lors d'une greffe.

L'objectif de volume de recueil retenu par la Société Francophone de la Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) est d'au moins $3 \text{ à } 4 \times 10^6 \text{ CD34+}/\text{kg}$. (CD34+ est un marqueur d'identification des CSH). Néanmoins, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de consensus sur le seuil maximal de CSH à injecter. Si le nombre de progéniteurs hématopoïétiques contenus dans l'échantillon n'est pas suffisant, un deuxième prélèvement est programmé, généralement le lendemain. Après la récolte et les tests, l'échantillon de CSH est cryoconservé jusqu'à son utilisation. (12)(20)(21)(23)(24)(25)

iii. Le sang de cordon

Le sang placentaire est la dernière source de cellules souches hématopoïétiques existante et il représente 23% des greffes allogéniques. A l'heure actuelle, pour des raisons éthiques, il n'y a pas d'indication dans les greffes autologues. (17)(20)

Le prélèvement du sang de cordon est facilement réalisable et sans risque pour la mère et le nouveau-né. En effet, la ponction est faite, après accouchement, une fois le cordon ombilical clampé. Bien que les CSH soient en proportion importante dans le sang placentaire, seulement un faible volume de sang (80-150ml) peut être prélevé. Ainsi, très souvent il n'est pas possible d'utiliser cette source pour les greffes de moelle osseuse d'un adulte (cela constituerait un apport en CSH insuffisant pour garantir le succès de la transplantation).

L'avantage principal de cette source de CSH est l'immaturité immunologique des cellules de l'échantillon, ce qui permet d'envisager de sélectionner un donneur et un receveur qui ont une disparité HLA plus importante que pour la MO et le sang périphérique. (21)

2. Le conditionnement à la greffe

Le conditionnement est une étape déterminante de la greffe de moelle osseuse. Il désigne le traitement réalisé avant l'administration du greffon de CSH qui va permettre l'immunosuppression temporaire du système immunitaire du receveur. Son objectif principal est de favoriser la prise du greffon en détruisant la moelle osseuse du receveur afin de réduire significativement le risque de rejet de la nouvelle MO.

i. Le conditionnement myéloablatif

On parle de conditionnement myéloablatif ou standard. Il s'agit d'un traitement qui va détruire les cellules souches hématopoïétiques du patient malade afin que la nouvelle moelle osseuse (du donneur ou du patient lui-même) puisse la remplacer complètement. Ce conditionnement est utilisé dans les deux types de greffes de moelle osseuse, mais reste majoritairement pratiqué pour les greffes autologues.

Classiquement, une chimiothérapie cytotoxique haute dose, combinant plusieurs molécules, est administrée au patient pendant plusieurs jours avec éventuellement une radiothérapie associée (irradiation corporelle du patient). Cette chimiothérapie est myélotoxique et donc de ce fait immunosuppressive.

En plus de cette immunosuppression nécessaire pour la prise de la greffe, une action anti-tumorale est obtenue puisque les doses maximales utilisées permettent de détruire le système hématopoïétique ainsi que ses clones malins (la chimiothérapie va dépasser le seuil de résistance des cellules tumorales). Cet effet anti-tumoral est notamment nécessaire pour les greffes autologues puisque les CSH injectées sont celles du patient lui-même et il n'y aura donc pas d'effet GvL « Graft vs Leukemia » : l'objectif final est donc qu'il n'y ait plus de cellules résiduelles tumorales lors de la greffe de moelle osseuse. (26)

Dans les greffes autologues, le conditionnement est réalisé après le prélèvement des cellules souches hématopoïétiques du patient. De ce fait, le conditionnement myéloablatif a l'avantage de participer également au traitement de la pathologie initiale. La greffe de moelle osseuse vient consolider ce traitement pour éviter que le patient ne passe un temps trop long en aplasie. On parle ainsi de stratégie d'intensification.

Néanmoins, de telles doses de chimiothérapie augmentent fortement le risque d'apparition de complications : aplasie profonde, risque infectieux très élevé avec la destruction du système immunitaire (SI), complications rénales pour l'élimination des cytotoxiques, infertilité, etc.

Ainsi, ce type de conditionnement est essentiellement recommandé pour les jeunes patients ou ceux avec peu de comorbidités. (3)(27)(28)(29)(30)

ii. Le conditionnement non myéloablatif

On parle de conditionnement non myéloablatif ou à intensité réduite (RIC), c'est-à-dire avec des doses de chimiothérapies réduites et adaptées. L'apparition de ce type de conditionnement découle de l'évaluation du bénéfice risque entre une dose très élevée capable de détruire le système hématopoïétique ainsi que les cellules tumorales et une toxicité trop importante, voire mortelle pour le patient.

Le but principal du conditionnement atténué est la recherche de l'effet immunosupresseur pour favoriser la prise de la greffe et éviter le rejet du greffon. De ce fait, pour ces conditionnements, un immunosupresseur puissant est associé à des doses plus ou moins myéloablatives de chimiothérapie. De plus, dans les greffes allogéniques, la découverte de l'effet GvL « Graft vs Leukemia » permet d'accéder à un effet anti-tumoral par le greffon lui-même, entraînant la possibilité de diminuer les doses de chimiothérapie.

Dans la pratique, un équilibre est créé entre les deux systèmes hématopoïétiques pour qu'ils puissent « coexister ». On parle de chimérisme mixte. Le système immunitaire du receveur va être réduit pour prévenir le rejet de la greffe et pendant ce temps, les CSH apportées vont

pouvoir détruire les cellules tumorales de l'hôte et reconstruire progressivement le système hématopoïétique.

Ce type de conditionnement entraîne toujours un risque infectieux majeur mais moins de toxicité de grade III ou IV. La morbi-mortalité à court terme est réduite avec ce conditionnement et permet donc d'ouvrir l'accès à la greffe de moelle osseuse à des patients plus âgés (supérieurs à 50 ans) ou avec plus de comorbidités. (27)(28)(29)(30)(31)(32)

iii. Exemples de protocoles de conditionnement

Il existe de nombreux protocoles différents de conditionnement, dont le choix est déterminé par la pathologie du patient, son âge, son état de santé général et le type de donneur. Le protocole et les doses utilisées sont discutés en réunion de concertation disciplinaire (RCP) par l'ensemble de l'équipe médicale.

De manière générale ce sont des anti-cancéreux associés (Busulfan, Melphalan, Fludarabine) entre eux avec une irradiation corporelle plus ou moins intense (cf. figure 2)

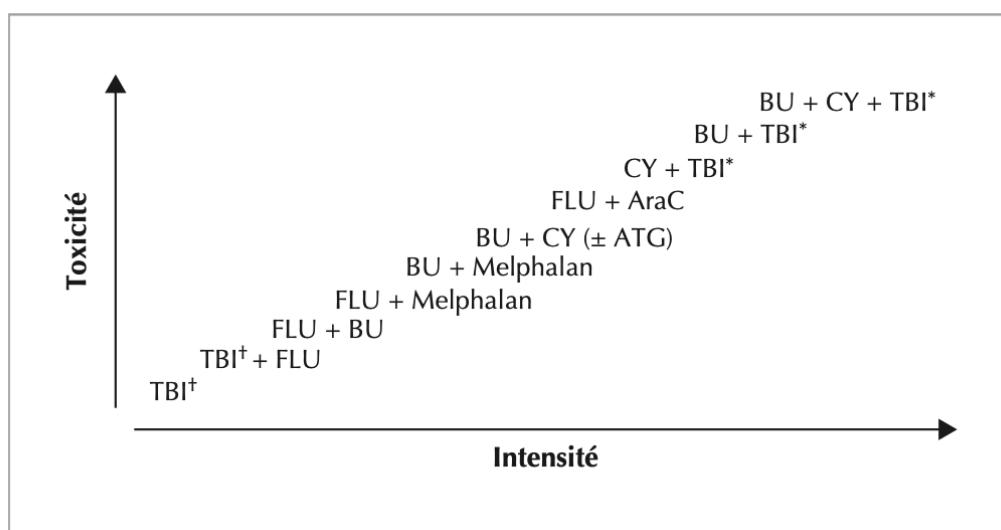


Figure 2. Différents types de conditionnement, du moins au plus myéloablatif. (31)(32)

TBI = Total Body irradiation, FLU = Fludarabine, BU = Busulfan, CY = Cyclophosphamide, AraC = Aracytine, ATG = Anti-thymoglobuline.

L'association des molécules et leurs dosages dépendent de l'effet recherché. Pour un conditionnement myéloablatif plusieurs anticancéreux haute-dose seront administrés avec une radiothérapie (Par exemple : irradiation (TBI) + Busulfan + Cyclophosphamide). Pour une greffe allogénique avec un conditionnement à intensité réduite, on obtiendra l'effet immunosuppresseur avec seulement l'irradiation corporelle et en rajoutant ou non une chimiothérapie (exemple : TBI + Fludarabine).

Dans chacun des conditionnements, le système immunitaire du patient est compromis, de ce fait, le risque infectieux est élevé et le patient doit être placé dans une chambre stérile et des mesures préventives sont prises.

3. La greffe de moelle osseuse et le suivi post-greffe

i. Administration du greffon

La greffe de moelle osseuse en elle-même est assez simple, puisqu'il s'agit uniquement d'une perfusion sanguine d'environ une heure. Le greffon est transféré au patient par voie intraveineuse, via un cathéter inséré généralement au niveau thorax. Les cellules souches greffées vont migrer et recoloniser la moelle osseuse. (33)

S'il s'agit d'une allogreffe, généralement le prélèvement datera de moins de 24h et ne nécessite pas de mesures particulières. S'il s'agit d'une autogreffe, il est nécessaire de décongeler les cellules souches qui auront été cryconservées avant le conditionnement du patient. (30)

ii. Les mesures et traitements associés

Après le conditionnement et dans l'intervalle de temps de prise de la greffe, le patient est en aplasie chimio-induite et ne possède pas de système immunitaire compétent, il est par conséquent très fragile. Il se trouve donc dans une unité spécialisée des greffes, dans une chambre protégée ou stérile, sans contact avec l'extérieur. Cet isolement dure quelques semaines et pendant cet intervalle il va recevoir des traitements pour prévenir les complications.

Par exemple, la prise en charge de la thrombopénie passe par un support transfusionnel de plaquettes irradiées car le risque hémorragique est élevé et de mauvais pronostic (Hémorragie cérébrale, hémorragie rétinienne, etc.) D'autres recommandations sont établies pour les globules rouges ou le plasma. Un seuil transfusionnel de 80g/l est retenu pour les risques liés à l'anémie. (6)(30)

De plus, étant donné la neutropénie profonde, il y a un fort risque infectieux (bactérien, fongique et viral), de ce fait une prophylaxie médicamenteuse est mise en place. Chaque traitement établi résulte des recommandations générales pour la greffe de moelle osseuse et est également personnalisé en fonction du bilan pré greffe du patient. Voici quelques exemples de prophylaxie : (34)

- Prophylaxie antibactérienne : les patients greffés ont un haut risque de développer une infection à pneumocoques. L'amoxicilline et l'oracilline sont majoritairement prescrites jusqu'à la réalisation de la vaccination complète.
- Prophylaxie antifongique : Les infections fongiques invasives ont une incidence d'environ 8%. Les patients avec un faible risque de développement reçoivent une prophylaxie primaire de fluconazole (6 à 8 mg/kg/j par voie orale (VO)) pendant la durée de l'aplasie.
- Prophylaxie antivirale : Les patients testés positifs à HSV1 ont un risque infectieux herpétique fort et doivent recevoir dès le début du conditionnement un traitement antiviral jusqu'à la sortie d'aplasie (Aciclovir 5mg/kg toutes les 8h en VO ou par voie intraveineuse (IV)).

Dans les greffes allogéniques, le risque de rejet du greffon étant élevé, le patient doit suivre un protocole de traitement immunosupresseur dès le début de la greffe. De plus, une prophylaxie par immunosupresseur permet de réduire l'incidence de la maladie du greffon contre l'hôte (30 à 50% des cas de greffe). (30) Néanmoins l'utilisation de ces médicaments entraîne de nombreux effets indésirables et surtout augmente la vulnérabilité du corps aux infections et au développement ultérieur de cancers. De ce fait ce traitement est étroitement contrôlé et adapté régulièrement au cours de la vie du patient. De manière générale le patient doit venir très régulièrement à l'hôpital pour réaliser des suivis des concentrations plasmatiques de son traitement immunosupresseur. A chaque valeur anormale, un ajustement est effectué par l'équipe médicale. (19)

iii. Surveillance et examens post-greffe

Il est établi que l'hospitalisation du patient en unité de greffe prend fin dès lors que celui-ci a retrouvé des taux sanguins physiologiques et stables de globules rouges, de globules blancs, de plaquettes etc. Cette fin d'hospitalisation et le retour au domicile du patient est discutée et votée par l'ensemble de l'équipe médicale en RCP.

Ensuite, un suivi médical strict démarre, ayant pour but de surveiller l'état de santé du patient, la survenue de complications post-greffe et de prélever des échantillons biologiques pour effectuer des bilans. Le tableau suivant (figure 3) détaille les grandes lignes du parcours de soin après la greffe de CSH. (30)(35)

Suivi post greffe précoce (Avant J+100)	<p>Suivi régulier, 1 à 2 fois par semaine.</p> <p>Évaluation état général du patient (toux, fièvre, diarrhée, nutrition, etc.) → rechercher des signes d'infections ou maladie GvH.</p> <p>Numération sanguine → taux de GB, GR, Pq et besoins transfusionnels</p> <p>Marqueurs biologiques du fonctionnement des organes → bilan hépatique, ionogramme.</p> <p>Dosage des traitements immunosuppresseurs pour adaptation.</p> <p>Soutien psychologique.</p> <p>Évaluation de la prise de greffe.</p>
Bilan à J100	<p>Bilan complet de l'état général du patient (bilan sanguin, échographie cardiaque, suivi psychologique, explorations respiratoires, etc)</p> <p>Évaluation de la maladie initiale.</p>
Suivi post greffe tardif (Après J+100)	<p>Suivi régulier dont la fréquence est déterminée avec l'équipe médicale pendant la première année. Tous les 6 mois pendant 2 ans. Pendant 10 ans visite annuelle et ensuite bisannuelle.</p> <p>Examen de l'état général du patient. Bilan sanguin (ionogramme, NFS, hormones, etc.). Évaluation de la prise de greffe et de l'apparition de la maladie GvH chronique. Consultation médicale spécialisée en fonction de la situation (gynécologique, ophtalmique, dermatologique, endocrinologique, etc.)</p>

Figure 3. Surveillance et soins post greffe de moelle osseuse.

Tous ces examens médicaux sont adaptés au patient, selon ses besoins, son état de santé et la construction de son immunité au cours du temps.

4. Les enjeux et les complications de la greffe

Cette partie n'abordera pas les complications strictement liées au conditionnement (maladie veino-occlusive, hépatotoxicité, défaillance multiviscérale, etc) qui seront détaillés plus tard au cours de la thèse dans la partie sur le busulfan.

i. *Rejet et non prise de greffe*

La non prise de la greffe est généralement due à un rejet, mais peut être aussi le résultat d'une inhibition toxique ou virale de l'hématopoïèse du greffon. Des recherches sont immédiatement entreprises pour comprendre et déterminer l'origine de l'apparition de cette complication et pour agir sans délai.

Le rejet de la greffe est dû à la présence, après le conditionnement, de lymphocytes T résiduels de l'hôte capables de s'activer, de réagir contre le greffon et de détruire les cellules souches hématopoïétiques greffées.

C'est une complication rare (<5%) des greffes allogéniques mais qui est favorisée par plusieurs facteurs :

- Une disparité HLA entre le donneur et le receveur
- Un conditionnement d'intensité réduite
- Un greffon pauvre en cellules T

Lors d'une situation à risque de rejet, la première action préventive est de choisir un greffon provenant du sang périphérique car il est plus riche, et la deuxième action est d'opter pour un conditionnement d'avantage myéloablatif et immunosuppresseur.

Cette complication peut apparaître précocement, dans les quelques heures qui suivent la greffe, mais également quelques jours plus tard lors d'une détérioration lente du greffon. (6)(19)

ii. La maladie du greffon contre l'hôte

La maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) résulte d'une réaction entre les antigènes du receveur et les lymphocytes T matures et compétents du greffon.

Au niveau physiopathologique, la GVHD se déroule en plusieurs étapes. La première phase résulte du conditionnement qui crée des lésions tissulaires de l'épithélium et de l'endothélium aboutissant à la sécrétion de cytokines de l'inflammation. Le conditionnement initie donc la réaction GVH. Son incidence et son intensité sont d'autant plus grandes que le conditionnement est myéloablatif. La deuxième phase est l'activation des lymphocytes T du donneur par présentation des antigènes puis leur prolifération. La dernière phase est la destruction et les atteintes tissulaires par les effecteurs (lymphocytes T et cellules NK). Ces atteintes se manifestent au niveau cutané, muqueux, digestif, hépatique, etc.

On distingue la GHVD aigue qui survient dans les cent premiers jours post-greffe (avec un pic d'apparition entre la 2^e et la 4^e semaine post-greffe) et la GVHD chronique qui apparaît après cette période. Une forme chronique n'est pas forcément précédée d'une forme aigüe.

Certains facteurs favorisent son apparition et surtout sa gravité :

- Le type de greffon (moelle osseuse et sang périphérique)
- La disparité HLA entre le donneur et le receveur
- L'intensité du conditionnement

- L'âge du receveur

La maladie du greffon contre l'hôte est la première cause de mortalité des greffes allogéniques. Un traitement curatif est possible pour les complications de grade I ou II. Néanmoins, le taux de mortalité de la GVHD de grade III ou IV atteint 90%. (6)(19)

iii. L'effet du greffon contre la leucémie

L'effet greffon contre leucémie (GVL) est étroitement lié à la maladie du greffon contre l'hôte puisque les mécanismes sont sensiblement identiques. Les lymphocytes T et les cellules NK du greffon sont les effecteurs de l'effet GVL et les cibles sont les protéines de surface des cellules tumorales résiduelles. Cet effet anti tumoral est très recherché dans les greffes de moelle osseuse en contexte de prise en charge des hémopathies malignes.

iv. Les rechutes et les cancers secondaires

Les rechutes surviennent généralement dans les deux ans qui suivent la greffe. Après cette période, elles deviennent rares et sont quasiment inexistantes après 5 ans. Dans la grande majorité des cas, la rechute apparaît sur les cellules de l'hôte, suggérant la persistance de quelques cellules tumorales malgré le conditionnement et une surveillance accrue. Ces rechutes sont favorisées par l'absence de l'effet greffon contre leucémie, l'avancée de la maladie et la faible intensité de la chimiothérapie.

Le traitement des rechutes est différent selon le délai d'apparition. De manière générale plusieurs doses de chimiothérapies sont administrées au patient avec des résultats plutôt satisfaisants. Lors de rechutes tardives, des tentatives de deuxième greffe de moelle osseuse ont été réalisées. Néanmoins, malgré certains succès, les résultats sont décevants. (19)

Dans certains cas, des cancers secondaires (thyroïdes, seins, sarcome, etc.) apparaissent quelques années plus tard, qui sont induits par les radiations et l'utilisation de certaines chimiothérapies (agent alkylant). Elles ont une incidence de 5% dans les greffes autologues notamment. Il convient également de considérer la possibilité que l'apport de cellules indifférenciées telles que les cellules souches hématopoïétiques peut aboutir à une multiplication anarchique et donc à la formation de cancers. (6)(16)

III. Conditionnement par busulfan dans les greffes de moelle osseuse

A. Caractérisation du busulfan

Le busulfan (Bu) est une molécule appartenant à la famille des antinéoplasiques et des immunosuppresseurs selon la classification ATC. C'est un anticancéreux couramment utilisé dans les conditionnements des greffes de cellules souches hématopoïétiques.

1. Mécanisme d'action

Le busulfan est un agent alkylant bifonctionnel. Sa structure est composée de deux groupements méthanesulfonates opposés rattachés par une chaîne hydrogénocarbonée. (Figure 4) En milieu aqueux, le busulfan est hydrolysé et libère deux ions carbonium très réactifs capables d'alkyler l'ADN (acide désoxyribonucléique). Ces alkylations entraînent des lésions sur l'ADN ce qui engendre un effet cytotoxique : la cellule entre en apoptose et meurt.

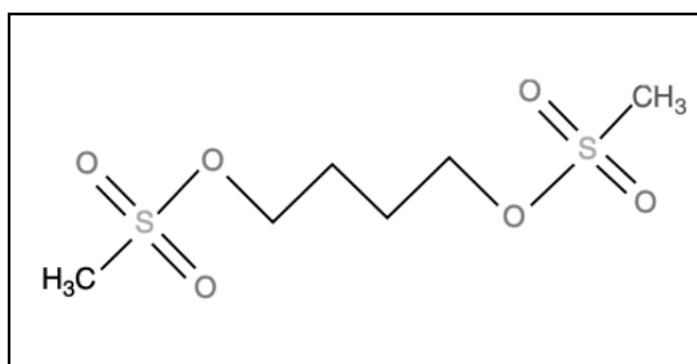


Figure 4. Structure chimique du busulfan.

Cet effet cytotoxique est intéressant dans la prise en charge des cancers puisque les cellules cancéreuses prolifèrent plus rapidement et avec moins de correction d'erreur de l'ADN. De ce fait, elles sont plus sensibles aux alkylations. Le Bu permet donc de détruire les cellules cancéreuses et de stopper leur expansion.

De plus, cette molécule possède une action immunosuppressive puisque l'effet cytotoxique agit sur les cellules hématopoïétiques (donc les cellules immunitaires). A fortes doses, cela touche toutes les cellules de la lignée hématopoïétique. On dit que le busulfan est myéloablatif. Alors qu'à faibles doses, il semble que le busulfan ait une action plus spécifique sur la lignée granulocytaire. (36)(37)(38)

2. Indications

Le busulfan possède une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans les conditionnements des greffes allogéniques et autologues de cellules souches hématopoïétiques grâce à ses propriétés myéloablatives et antinéoplasiques. Par ailleurs, son action anticancéreuse justifie d'autant plus son recours dans les greffes autologues pour le traitement des hémopathies malignes car il n'y a pas d'effet Graft vs leukemia.

Le Busulfan est utilisé dans les deux types de conditionnements (myéloablatif et d'intensité réduite). Selon le conditionnement, c'est uniquement la dose administrée et la fréquence qui vont varier. (39)

Actuellement, trois indications existent dans lesquelles le busulfan est toujours associé à une autre molécule pour obtenir un degré d'immunosuppression optimal : (37)

- En association avec du cyclophosphamide (agent alkylant) comme conditionnement à une greffe de CSH chez l'adulte.
- Après l'administration de Fludarabine (antimétabolite) comme conditionnement à une greffe de CSH chez l'adulte éligible à un conditionnement d'intensité réduite.
- Suivi par du cyclophosphamide ou du melphalan (agent alkylant) comme conditionnement dans les greffes de CSH chez le nouveau-né, l'enfant et l'adolescent.

3. Pharmacocinétique

i. Absorption

Le busulfan possède deux voies d'administration ayant une AMM (voie orale et intraveineuse) qui influencent directement la biodisponibilité de la molécule.

La biodisponibilité orale du busulfan se situe autour de 70% en moyenne mais est soumise à une importante variabilité intra-individuelle. Cette variabilité est d'autant plus marquée chez les enfants (22% à 120%) que dans les populations adultes (47% à 103%). (40)(41) Les causes de variabilités sont liées à la forme galénique (comprimé, comprimé écrasé, mis en suspension) et les modalités de prise (pendant un repas, à jeun, mixé dans de la nourriture, horaire de prise). La concentration plasmatique maximale (C_{max}) est atteinte entre 1h30 et 2h30 après la prise de la molécule. En revanche, par voie intraveineuse, la biodisponibilité du busulfan est immédiate et complète. Cette voie permet de réduire la variabilité intra individuelle.

Pour ces deux voies d'administration, il existe également une variabilité inter-individuelle importante. Elle est de 25% pour la voie intraveineuse, mais peut atteindre jusqu'à 50% pour la voie orale. (38)(39)(42)(43)

ii. Distribution

Le busulfan à un volume de distribution (Vd) de $0,64 \pm 0,12 \text{ l/kg}$ chez l'adulte et de $0,56 \pm 0,1 \text{ l/kg}$ chez l'enfant. Le pourcentage de liaisons irréversibles et réversibles aux protéines plasmatiques est respectivement de 32% et de 7%.

Administré à haute dose, le busulfan passe dans le liquide céphalorachidien ce qui explique ses propriétés myéloablatives. (39)(40)(42)

iii. Métabolisation

Le busulfan est métabolisé par une réaction de conjugaison avec du glutathion. Cette réaction enzymatique est catalysée par la Glutathion S Transférase (GST) au niveau du foie. Il existe trois formes différentes de cette enzyme : GSTA1, GSTM1 et GSTP1. C'est majoritairement l'isoforme GSTA1 qui est responsable de la métabolisation du busulfan.

Le complexe formé par le glutathion et le busulfan va se dissocier en deux métabolites : le γ -glutamyldehydroalanyl glycine et en tetrahydrothiophene (THT). Puis, le THT est oxydé par les cytochromes P450 et se transforme en trois métabolites : le 3-hydroxsulpholane, le tétrahydrothiophène 1-oxyde et le sulpholane. Ces derniers sont retrouvés dans les urines des patients traités à hautes doses de busulfan. (38)(39)(42)

iv. Élimination

Le busulfan a une demi-vie d'élimination moyenne comprise entre 2,3 et 2,8 heures par voie orale et comprise entre 2,8 et 3,9 heures par voie intraveineuse. Chez un sujet adulte, la clairance (Cl) se situe entre 2,4 à 2,6 ml/min/kg et 2,25 à 2,74 ml/min/kg respectivement pour la voie orale et la voie intraveineuse. (39)(42) Chez l'enfant, la clairance est augmentée et peut être deux à quatre fois supérieure. (38)(44) Une faible quantité (environ 1%) de Bu est éliminée sous forme inchangée dans les urines. La part éliminée dans les selles est négligeable.

v. Variabilité pharmacocinétique du busulfan

Plusieurs facteurs sont responsables de la variabilité pharmacocinétique du busulfan. Tout d'abord, l'âge du patient impacte directement l'exposition systémique au Bu. En effet, les jeunes enfants (< 5 ans) ont une clairance plus élevée qui s'explique par un ratio taille du foie /

surface corporelle plus élevé. Aussi, il semble que les enfants ont une augmentation de l'expression des GST et/ou de leur activité. Ces deux observations confirment l'importance de l'adaptation posologique pour cette catégorie de patient. (38)

De plus, le polymorphisme génétique affectant les GST et les transporteurs membranaires influence directement la PK du busulfan. Les mutations de l'isoforme GSTA1 sont les plus délétères puisqu'elle est majoritaire dans la métabolisation du busulfan. Certains polymorphismes tel que GSTA2 sont associés à une augmentation des risques et des complications de la greffe. (45)(46)

Pour l'estimation des concentrations en Busulfan, il est important de considérer les co-médications du patient. Plusieurs molécules ont été identifiées comme modulatrices du métabolisme du busulfan (métronidazole, itraconazole, phénytoïne). Ainsi l'administration de ces molécules avec du busulfan peut aboutir à une altération des concentrations. Par exemple, la présence de méthronidazole augmente fortement l'exposition systémique au busulfan ce qui entraîne de graves effets indésirables. Cependant, les mécanismes de ces interactions ne sont pas clairement identifiés. (38)(47)(48)

4. Toxicités

Comme toute chimiothérapie, le busulfan possède des effets indésirables marqués. Du fait de son mécanisme d'action, le busulfan est également cytotoxique pour les cellules saines de l'organisme et particulièrement pour celles qui se divisent fréquemment : cellules du tractus gastro-intestinal, cellules de la moelle osseuse, cellules des gonades, etc.

A fortes doses, le busulfan est myéloablatif, mais dans le conditionnement à la greffe de cellules souches hématopoïétiques, cet effet est considéré comme thérapeutique car indispensable pour le succès de la greffe.

Les toxicités principales observées après administration de busulfan lors des conditionnements pour les greffes de cellules souches sont les suivantes : hépatotoxicité, neurotoxicité, toxicité pulmonaire et toxicité urinaire. Les décès toxiques sont fréquents (30% à l'IPC) ce qui appuie l'importance d'une adaptation posologique pour trouver l'équilibre entre effets indésirables et effets thérapeutiques.

i. Toxicité hépatique

La toxicité la plus fréquente lors de l'administration de busulfan haute-dose dans le cadre d'un protocole de conditionnement est l'hépatotoxicité (15% des cas). (39) Dans certains cas, cette

hépatotoxicité se traduit par la maladie veino-occlusive (MVO) également appelé syndrome d’obstruction sinusoïdale (SOS).

La physiopathologique de la MVO se caractérise par une atteinte des cellules endothéliales sinusoïdales et des hépatocytes, au niveau de la zone centro-lobulaire du lobule hépatique, avec fibrose et occlusion. Cette congestion entraîne une hypertension portale, une nécrose ischémique et une insuffisance hépatocellulaire. (41)(49)

Une des hypothèses avancées pour expliquer cette sensibilité accrue au busulfan, est un déficit en glutathion des cellules endothéliales sinusoïdales et des hépatocytes, entraînant une métabolisation moins efficace du Bu. De plus, il semble que la forme orale du busulfan soit associée à une plus forte hépatotoxicité que la forme intraveineuse. Sur une étude de 100 patients, 33% de ceux ayant reçu la forme orale développent une MVO contre 8% de ceux ayant reçu pour la forme IV. Cela s’explique par l’absorption gastro-intestinale de la molécule et par l’effet de premier passage hépatique. (50)

Au niveau clinique et physiologique plusieurs symptômes sont caractéristiques :

- Hépatomégalie douloureuse (douleur dans l’hypochondre droit)
- Ictère
- Ascite
- Prise de poids ($>2\%$) due à une rétention hydrosodée
- Augmentation des taux de bilirubine et des transaminases

Bien que la méthode de référence pour le diagnostic de la maladie veino-occlusive soit la biopsie hépatique, elle n’est que peu réalisée en raison de l’état fragile du patient greffé (immunodépression). De ce fait, le diagnostic du SOS repose sur l’association de plusieurs des symptômes précédents, dans les 30 jours suivant la greffe de moelle osseuse. De rares cas tardifs (entre 30 et 60 jours) ont été recensés. Une échographie peut être réalisée afin d’éarter ou de confirmer ce diagnostic. (49)(51)(52)

L’incidence de la maladie veino-occlusive est en diminution significative depuis quelques années, et se situe entre 20-50% chez les patients adultes développant une hépatotoxicité. (52)

Cette diminution s’explique notamment par une meilleure adaptation des doses des cytotoxiques dans les conditionnements des greffes de moelle osseuse. Néanmoins le pronostic des formes graves (majoritairement une forte hyperbilirubinémie $>34 \mu\text{mol/l}$) demeure mauvais. La mortalité à 100 jours des formes graves est de 98% contre 2% pour les formes mineures. Le décès survient généralement dans un contexte de défaillance multiviscérale. (53)

Chez les patients pédiatriques, la probabilité d'apparition d'un syndrome occlusif sinusoïdale est comprise entre 5-40%, avec également une issue fatale possible. (38)(41)(54)

ii. Toxicité neurologique

La neurotoxicité est une complication caractéristique des traitements par busulfan haute-dose lors des conditionnements de greffe de moelle osseuse. De nombreux cas de crises convulsives ont été rapportés à la suite d'une exposition au busulfan. (39)(55)

Cette toxicité neurologique se traduit principalement par des crises tonico-cloniques de courte durée. Elle apparaît en moyenne dans 7% (intervalle de 2 à 10%) des cas chez les enfants et dans 10% des cas chez les adultes. (38)(41)(52) Il semble également que les crises d'épilepsie soit corrélées avec l'âge des patients puisque les personnes âgées sont plus susceptibles de développer une neurotoxicité. De plus, plusieurs études ont montré que les convulsions apparaissent après plusieurs jours d'exposition au busulfan, laissant penser que la neurotoxicité est due à une accumulation du busulfan après passage de la barrière hématoencéphalique. La neurotoxicité est d'autant plus forte, que les doses de busulfan sont élevées. (41)(56)(57)

A l'heure actuelle, une prophylaxie efficace est mise en place pour prévenir l'apparition de cet effet indésirable. Initialement, le patient était mis sous phénytoïne, mais depuis quelques années ce sont les benzodiazépines (clonazepam, lorazepam) qui sont préférées car elles n'interfèrent pas dans le métabolisme du busulfan. (56)(57)(58)(59)

iii. Toxicité pulmonaire

Depuis les années 1960, le busulfan a été identifié comme agent responsable de lésions pulmonaires. (60) En effet, l'administration de busulfan haute-dose entraîne, généralement tardivement (>3 mois), l'apparition d'une toxicité pulmonaire chez le patient. (39)(42) Elle se manifeste par une toux non productive, une dyspnée et une hypoxie. Dans quelques cas, cette toxicité s'aggrave en un syndrome de pneumopathie interstitielle avec hémorragie alvéolaire diffuse. (52) Cette fibrose pulmonaire est rare (incidence comprise entre 2,5 à 8,3%) mais de mauvais pronostic car la survie médiane après le diagnostic est de trois mois. (61)

La toxicité pulmonaire par busulfan lors d'un conditionnement de greffe de moelle osseuse peut être aggravée si elle est associée à une radiothérapie ou à d'autres agents cytotoxiques. Étant donné que les symptômes ne sont pas spécifiques, des examens doivent être réalisés pour confirmer le diagnostic. Le scanner thoracique permet de mettre en évidence des infiltrats opaques diffus. On parle communément de « Bulsufan lung » (le poumon du busulfan).

Finalement, la biopsie pulmonaire permet véritablement de confirmer le diagnostic. (62)(63)(64)

iv. Toxicité sur l'appareil uro-génital

L'utilisation de busulfan dans un conditionnement de greffe de moelle osseuse est identifiée comme un facteur de risque majeur dans l'apparition de cystites hémorragiques.

La clinique de ces complications urinaires va d'une simple hématurie associée à une dysurie jusqu'à de forts saignements avec obstruction urinaire pouvant mener à l'insuffisance rénale pour les cas les plus sévères. L'incidence des cas les plus graves est de 5%. (65)(66)

L'apparition des cystites hémorragiques est précoce puisqu'elles peuvent se manifester dans les premières 48h du traitement par busulfan hautes-doses. Lorsqu'elles apparaissent plus tardivement, elles sont d'origine virale et la prise de busulfan est un facteur aggravant. (67)(68)

Aussi, il est possible de qualifier le busulfan de reprotoxique car il altère certaines fonctions hormonales, principalement chez le sexe féminin. A hautes doses, une insuffisance ovarienne apparaît chez l'adulte avec aménorrhée et symptômes ménopausiques. Chez les enfants, cette insuffisance ovarienne est plus forte et persiste, pouvant retarder fortement l'apparition de la puberté et des retards de croissance. Près de 70% des jeunes filles sont touchées par un dysfonctionnement gonadique. (38)(69)(70)

v. Autres toxicités

Le busulfan engendre également d'autres toxicités avec une incidence moindre ou un pronostic vital moins engagé pour le patient. Comme toutes les chimiothérapies, la prise (VO ou IV) de Bu entraîne l'apparition de symptômes digestifs (nausées, vomissements, diarrhées, mucites/stomatites) pouvant être handicapant pour le patient.

Également, plusieurs cas de pharmacovigilance rapportent des manifestations cardiaques anormales après un conditionnement avec busulfan : tachycardie, fibrillation auriculaire, arythmie, péricardite. (39)(42)(62) Ces cas sont rares mais à prendre en compte lors de l'examen pré-greffe du patient pour déterminer s'il est un bon candidat pour un conditionnement par busulfan.

B. Protocoles de conditionnement par busulfan

Afin d'établir un protocole d'administration du busulfan pour le conditionnement à la greffe de cellules souches hématopoïétiques il convient d'avoir étudié chaque paramètre pharmacocinétique du busulfan et ses toxicités. Ainsi, il est possible de déterminer la cible thérapeutique, c'est-à-dire la dose optimale efficace à administrer et sa fréquence.

1. Notions de cible thérapeutique

i. *Définition d'une zone thérapeutique*

La zone thérapeutique d'un médicament est définie comme la concentration plasmatique de ce médicament pour laquelle il y a 70% de chance d'obtenir une réponse thérapeutique et moins de 10% de chance d'apparition des toxicités.

Précisément, cette zone thérapeutique se situe au-dessus de la concentration minimale efficace (zone de non-efficacité) et en dessous de la concentration maximale pour ne pas atteindre d'effets indésirables graves (zone de toxicité). (Cf. figure 5) Dans cet intervalle thérapeutique il est possible d'observer des effets indésirables mais ceux-ci sont considérés comme acceptables.

Pour résumer, cette zone est une balance entre le bénéfice qui est de soigner le patient et le risque de lui provoquer des effets indésirables graves. (71)(72)

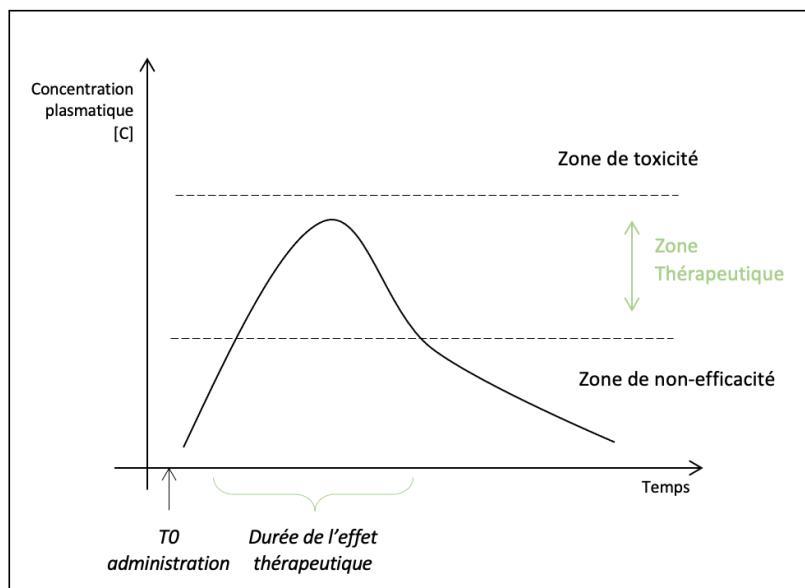


Figure 5. Schéma explicatif de la zone thérapeutique d'un médicament

C'est la pharmacocinétique et la pharmacodynamie (PK/PD) qui permettent d'établir cette zone thérapeutique, en étudiant plusieurs paramètres.

ii. Les paramètres PK/PD

Les paramètres d'imprégnation du médicament sont la concentration maximale plasmatique (C_{max}) atteinte après administration de la molécule et l'aire sous la courbe (AUC). Le T_{max} est le temps pour lequel la C_{max} est atteinte. L'AUC représente l'exposition du patient au médicament car cela traduit l'évolution des concentrations du médicament au cours du temps. Ce paramètre est très précis et plus représentatif de la réalité, il est donc utilisé très fréquemment.

Le temps de demi-vie d'élimination ($T_{1/2}$) est un indicateur du temps de rémanence du médicament dans l'organisme. Il s'agit du temps pour lequel 50% du médicament a été éliminé par l'organisme. La clairance est le paramètre principal de l'élimination et elle est directement à l'exposition du patient. En effet, la dose est égale à la clairance multipliée par l'exposition. La figure 6 place les différents paramètres sur un profil cinétique.

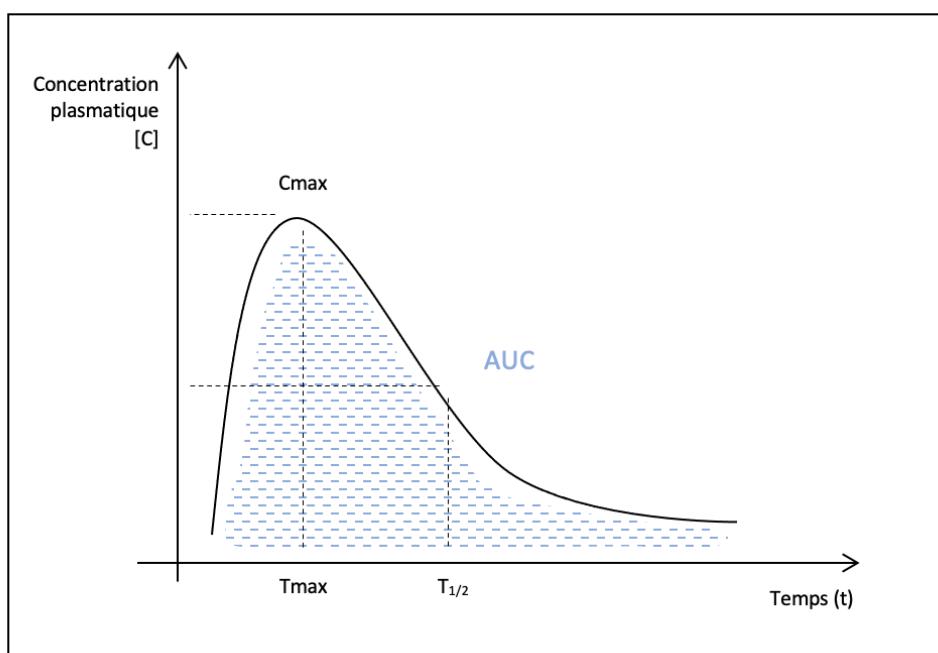


Figure 6. Profil cinétique d'un médicament et paramètres PK.

L'ensemble de ces facteurs permet d'établir un profil pharmacocinétique du médicament et d'en déterminer la meilleure posologie (dose et fréquence d'administration) possible. Ensuite il s'agit de relier tous ces paramètres à la réponse de l'organisme au médicament (effets indésirables, effets thérapeutiques). (71)(72)

Lors du développement d'un médicament, l'étude des paramètres PK/PD est aujourd'hui obligatoire et c'est l'ensemble de ces connaissances qui permet d'obtenir une autorisation de mise sur le marché pour un médicament, dans un contexte donné. Aujourd'hui des outils de modélisation et de simulation sont largement employés pour déterminer les doses optimales des nouveaux médicaments. Pour des molécules plus anciennes comme le Busulfan développé dans les années 60, l'identification des schémas posologiques se faisait de façon très empirique.

iii. Le suivi thérapeutique et l'adaptation posologique

Le suivi thérapeutique a pour objectif d'identifier, à partir de la mesure de concentrations sanguines ou plasmatiques d'un médicament, une posologie optimale efficace. En pratique, il faut s'assurer que les paramètres d'exposition identifiés (C_{\min} , C_{\max} , AUC) se trouvent bien dans la zone thérapeutique. Par exemple, si la concentration est supérieure à C_{\max} il y a un risque d'apparition d'effets indésirables ou inversement, si la concentration est inférieure à C_{\min} il y a un risque d'inefficacité.

L'adaptation posologique fait partie intégrante du suivi thérapeutique puisqu'elle va engendrer une action corrective dès lors que l'on sort de la zone thérapeutique du médicament. Par exemple, si les concentrations plasmatiques sont dans la zone de non-efficacité, il s'agit d'augmenter la dose de médicament et/ou d'augmenter sa fréquence d'administration.

Ce suivi thérapeutique est d'autant plus indiqué pour un médicament à marge thérapeutique étroite présentant une forte variabilité pharmacocinétique puisqu'il est plus difficile de rester dans la zone des concentrations efficaces. Plusieurs facteurs peuvent être responsables des variations des concentrations (état physiologique du patient, les interactions médicamenteuses, les pathologies ou encore la variabilité intra-individuelle) sont donc à considérer lors de l'adaptation posologique. (71)(73)

2. Adaptation de la stratégie PK/PD au busulfan

Le busulfan est une molécule cytotoxique ayant une zone thérapeutique étroite. La particularité dans son utilisation pour les conditionnements de greffe de moelle osseuse est la recherche de la toxicité pour avoir l'effet thérapeutique (aplasie). Au cours des dernières années, de nombreuses études ont cherché à caractériser le plus précisément possible cet intervalle thérapeutique afin de mettre en place des protocoles de conditionnement médicalement plus sûrs.

Pour chacune de ces études, le paramètre retenu pour évaluer l'exposition au busulfan est la valeur de l'AUC journalière (AUC_j) après administration du Bu et l'AUC totale (AUC_{tot}) qui correspond à l'exposition totale au busulfan durant le conditionnement ainsi que la répartition de la dose totale de busulfan sur un certain nombre d'administrations pré-greffe.

i. Les données bibliographiques actuelles

Tout d'abord, un consensus est établi quant au choix de la voie d'administration du busulfan lors d'un conditionnement pour la greffe de cellules souches hématopoïétiques. La voie intraveineuse est préférée car elle permet d'éliminer la part de variabilité de la biodisponibilité de la molécule après administration.

En effet, avec la voie orale, il n'est pas possible de prévoir avec précision le pourcentage d'exposition de l'organisme au busulfan ce qui peut engendrer une sous-exposition au médicament (échec thérapeutique) ou alors une surexposition avec des toxicités graves. La voie intraveineuse assure, quant à elle, une biodisponibilité moyenne de 100%, qui est obtenue immédiatement. Les équipes médicales peuvent donc être certaines de la dose que reçoit réellement le patient. (74)(75)(76)

De plus, afin d'obtenir une immunosuppression suffisante lors d'une greffe de moelle osseuse, les différentes études expérimentales décrivent une cible thérapeutique optimale correspondant à une exposition totale au busulfan d'au moins $14\ 000\ \mu M \cdot min^{-1}$. Les recherches effectuées montrent, que dès lors que l'exposition au busulfan se situe en dessous de cette AUC_{tot} de $14\ 000\ \mu M \cdot min^{-1}$, il y a une augmentation du risque d'échec de la prise de greffe ou de rechute après la greffe de moelle osseuse. (75)(76)(77)(78)

D'autres études démontrent une borne supérieure à partir de laquelle la balance bénéfice risque est négative car les toxicités subies par le patient sont trop importantes. Dès lors que l' AUC_{tot} du conditionnement dépasse $24\ 000\ \mu Mol \cdot min^{-1}$, il y a une forte augmentation de l'incidence de la neurotoxicité et également de la maladie veino-occlusive, qui est un effet indésirable très souvent fatal pour le patient. (41)(75)(76)(79)(80)(81). Il semble également, que l'apparition de la maladie aigüe du greffon contre l'hôte soit corrélée à une exposition trop forte au busulfan. (76)(78) Pour la maladie chronique du greffon contre l'hôte, les résultats diffèrent, mais il semblerait plus intuitif que son occurrence augmente avec une exposition élevée. (82)(83)

L'identification de ses bornes permet de caractériser le conditionnement d'intensité réduite (RIC) comme étant un conditionnement avec une AUC_{tot} maximale de $16\ 000\ \mu M \cdot min^{-1}$. Par

ailleurs, le conditionnement myéloablatif se caractérise lui, par une AUC_{tot} comprise entre 20 000 et 24 000 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. (83)

Ainsi, dans la plupart des cas, la cible thérapeutique du Bu se situe entre 16 000 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ et 24 000 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$, selon le type de conditionnement choisi. (41) Cette exposition totale (AUC_{tot}) du conditionnement est découpé en plusieurs expositions journalières (AUC_j) après administration de doses de busulfan car il n'est pas envisageable d'envoyer une grande dose unique de busulfan pour atteindre la cible sans déclencher des complications mortelles. A titre d'illustration, cela correspond à une AUC_j de 4000 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ pour un conditionnement RIC (16 000 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$) sur quatre jours. En pratique, le patient reçoit une dose de busulfan chaque jour pour atteindre l'AUC_j cible. (84)(85)

ii. L'utilisation de l'adaptation posologique

Au début de l'utilisation des conditionnements de greffe de moelle osseuse au busulfan, le patient recevait une dose fixe de Bu chaque jour jusqu'à la fin du protocole. Le choix de cette dose est le résultat de l'administration d'une dose test de busulfan (32mg/m² en moyenne) et de l'étude des paramètres pharmacocinétiques (AUC, C_{max}, T_{max}) qui en résultent. (73) En fonction de ces paramètres PK, l'équipe médicale choisit la dose optimale pour rentrer dans la cible thérapeutique. Néanmoins, cette stratégie « de dose fixe » présente des limites, puisque le patient ne possède pas les mêmes paramètres PK au cours du conditionnement, et il est possible de quitter la zone thérapeutique très rapidement.

Au cours des années, il a été démontré que l'application du suivi thérapeutique et de l'adaptation posologique du busulfan dans le conditionnement est corrélée avec de meilleurs résultats pour la greffe. (73) En effet, la modification de la dose au cours du conditionnement permet de rester dans la zone thérapeutique et de ce fait d'éviter certains effets indésirables ou un échappement thérapeutique. (83)(86)

iii. Choix de la cible

De ce fait, en tenant compte des données bibliographiques actuelles sur le busulfan. Deux types de protocole de conditionnement au busulfan ont été élaborés par les équipes de l'institut Paoli Calmettes en collaboration avec le laboratoire de toxicocinétique et pharmacocinétique de l'hôpital de la Timone.

Tout d'abord un protocole d'intensité réduite avec une cible thérapeutique AUC_{tot} = 16 000 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ et un protocole plus myéloablatif avec une cible AUC_{tot} = 20 000 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. Ces deux

cibles thérapeutiques peuvent être atteintes avec plusieurs administrations IV de busulfan avant la greffe. En pratique, quatre à six injections sont réalisées. Ce choix dépend de la durée du conditionnement (c'est-à-dire le nombre de jours avant la greffe).

Par ailleurs, au cours du protocole, au moins un suivi thérapeutique suivi d'une adaptation posologique sont recommandés pour rester dans la cible. Ainsi, s'il y a seulement quatre injections de busulfan, une seule adaptation posologique est réalisée. En revanche, s'il y a six perfusions, deux adaptations posologiques seront effectuées. La personnalisation du protocole est indispensable pour augmenter les chances de réussite de la greffe.

Enfin, la dose initiale de busulfan est choisie par l'équipe médicale de l'IPC, en fonction de la dose test et des recommandations actuelles des autorités de santé.

3. Les protocoles mis en place

i. Le protocole standard

Le protocole standard est un protocole qui se déroule sur six jours. Le jour zéro (J0) étant le jour de la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Lors de ce conditionnement quatre perfusions de busulfan de trois heures sont administrées au patient (J-6, J-4, J-3, J-2).

La première dose de busulfan, injectée à J-6, est une dose standard statuée en RCP par l'équipe médicale du patient. Après administration de cette dose, une analyse pharmacocinétique est réalisée afin de déterminer l'évolution des paramètres PK (Cl , $T_{1/2}$, Vd) et des paramètres d'exposition (AUC, C_{max}). A partir de ces différentes valeurs, il est possible de recalculer une dose adaptée, permettant de respecter la cible initialement désignée. Cette nouvelle dose personnalisée est administrée au patient à J-4, J-3 et J-2. (Cf. figure 7)

La cible thérapeutique pour le protocole standard ($AUC_{tot} = 16\ 000 \mu M \cdot min^{-1}$ ou $AUC_{tot} = 20\ 000 \mu M \cdot min^{-1}$) est déterminée par le type de conditionnement adopté (myéloablatif ou d'intensité réduite). Généralement le choix du conditionnement dépend de l'état général du patient, de ses comorbidités, de son âge et de sa pathologie. Cette AUC_{tot} est divisée en AUC_j égales réparties par jour d'injection. (Cf figure 7).

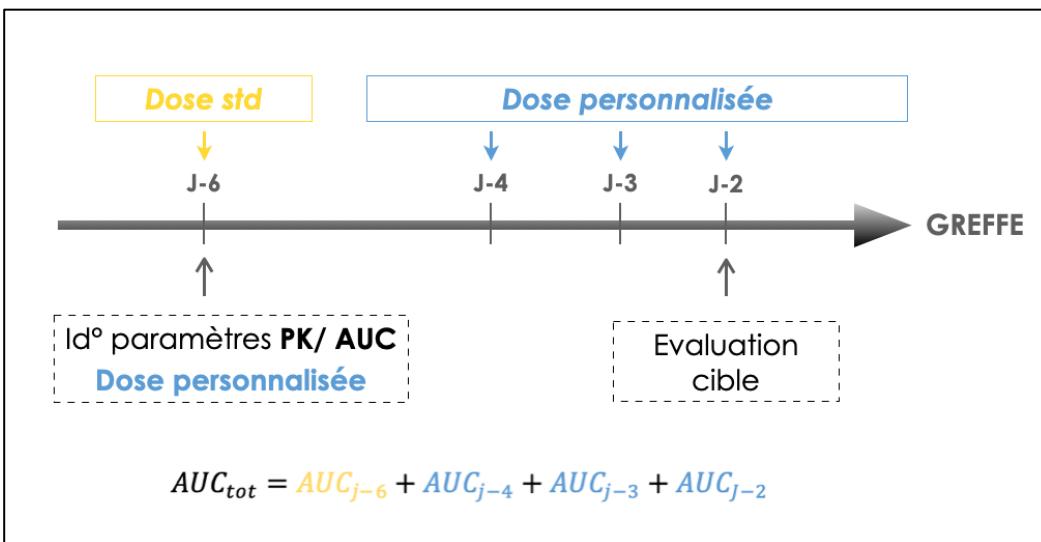


Figure 7. Schéma explicatif du protocole standard.

A la fin du conditionnement, une nouvelle analyse des paramètres pharmacocinétiques est réalisée afin de contrôler l'exposition globale finale (AUC_{tot} réelle) et d'évaluer des potentiels écarts avec la cible initiale (AUC_{tot} théorique). Par exemple, si AUC_{tot} réelle est significativement trop inférieure à AUC_{tot} théorique, le patient n'est pas suffisamment en immunosuppression pour garantir la prise de la greffe. Dans ce cas, il faut considérer l'ajout d'une nouvelle perfusion de busulfan.

ii. Le protocole Time-sequenced

Le protocole Time-sequenced (T-seq) est un protocole qui se déroule sur vingt-et-un jour. Le jour zéro (J0) étant le jour de la greffe. Lors de ce conditionnement six perfusions de busulfan de trois heures sont administrées au patient (J-21, J-14, J-7, J-6, J-5, J-4).

Les deux premières doses de busulfan, injectées à J-21 et J-14, sont identiques et standardisées. À J-14, après l'administration de la deuxième dose standard, une évaluation pharmacocinétique est réalisée afin de déterminer l'évolution des paramètres PK individuels du patient (C_1 , $T_{1/2}$, V_d) et son exposition (AUC , C_{max}). A partir de ces différentes valeurs, une première dose personnalisée est calculée pour rentrer dans la cible initiale à atteindre. Cette 1^{ère} dose personnalisée est injectée à J-7 et J-6.

Après l'administration de cette première dose personnalisée à J-6, un suivi thérapeutique est effectué, de nouveau, aboutissant à une deuxième adaptation posologique du busulfan. Cette deuxième dose personnalisée est perfusée au patient à J-5 et à J-4.

A la fin du conditionnement, après la dernière administration à J-4, une nouvelle analyse des paramètres pharmacocinétiques est réalisée afin de contrôler l'exposition globale finale (AUC_{tot} réelle) et d'évaluer des potentiels écarts avec la cible initiale (AUC_{tot} théorique).

Le détail des différentes perfusions et des doses associées est explicité sur la figure 8.

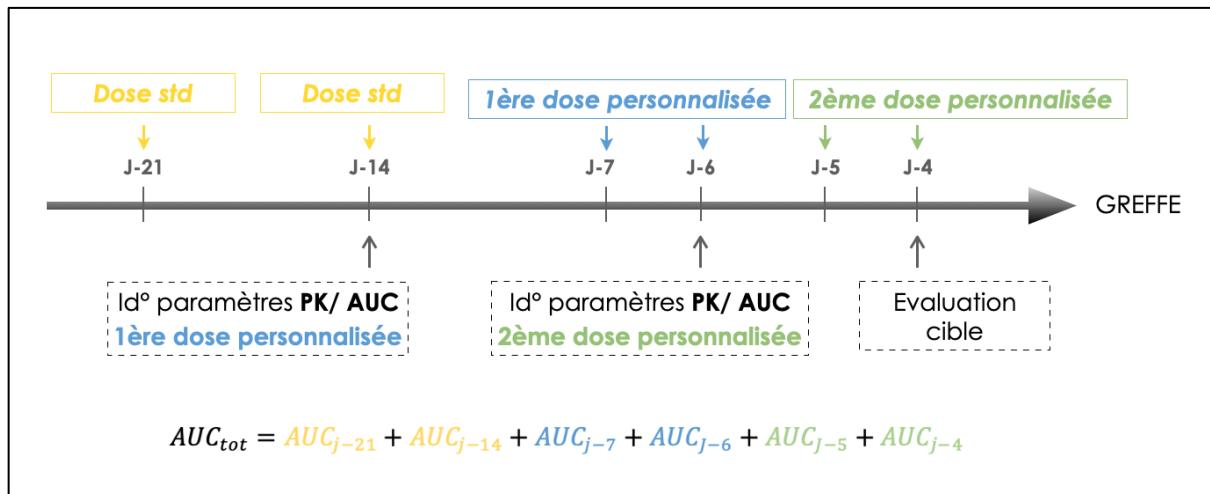


Figure 8. Schéma explicatif du protocole standard.

Tout comme le protocole standard, la cible thérapeutique du protocole Time-sequenced est déterminée par le type de conditionnement qui est adopté par l'équipe médicale. Soit c'est un conditionnement myéloablatif avec une $AUC_{tot} = 20\ 000\ \mu M \cdot min^{-1}$, soit c'est un conditionnement d'intensité réduite avec $AUC_{tot} = 16\ 000\ \mu M \cdot min^{-1}$. Le choix du conditionnement résulte de la considération de l'état général du patient, de ses comorbidités, de son âge et de sa pathologie.

IV. Application au ciblage posologique du busulfan haute-dose

A. Matériels et méthodes

1. Stratégie globale

Les paramètres pharmacocinétiques individuels du patient sont calculés à partir du profil cinétique du busulfan. Cette cinétique est obtenue par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) avec l'analyse de la concentration plasmatique en busulfan de quatre prélèvements sanguins (T0, T3h15, T9h et T12h). Le T0 correspond au début de la perfusion de Busulfan. Ces valeurs de concentration sont rapportées dans le logiciel KineticPro®, qui à l'aide d'une matrice de population et d'un estimateur bayésien, détermine la clairance, le volume de distribution et l'AUC journalière du patient. Par la suite, à l'aide d'une matrice Excel, une extrapolation de l'AUC totale est effectuée et comparée avec la cible initialement choisie. Si des écarts sont détectés, une nouvelle dose est recalculée afin de respecter l'AUC cible fixée en début de protocole. Lors d'une recommandation d'augmentation de dose, une sécurité est mise en place, ne permettant pas d'augmenter la dose de plus de 25%. En fin de procédure, le résultat de la dose personnalisée est envoyé aux équipes médicales qui choisissent ou non de suivre les recommandations pour la prochaine perfusion. (Cf figure 9)

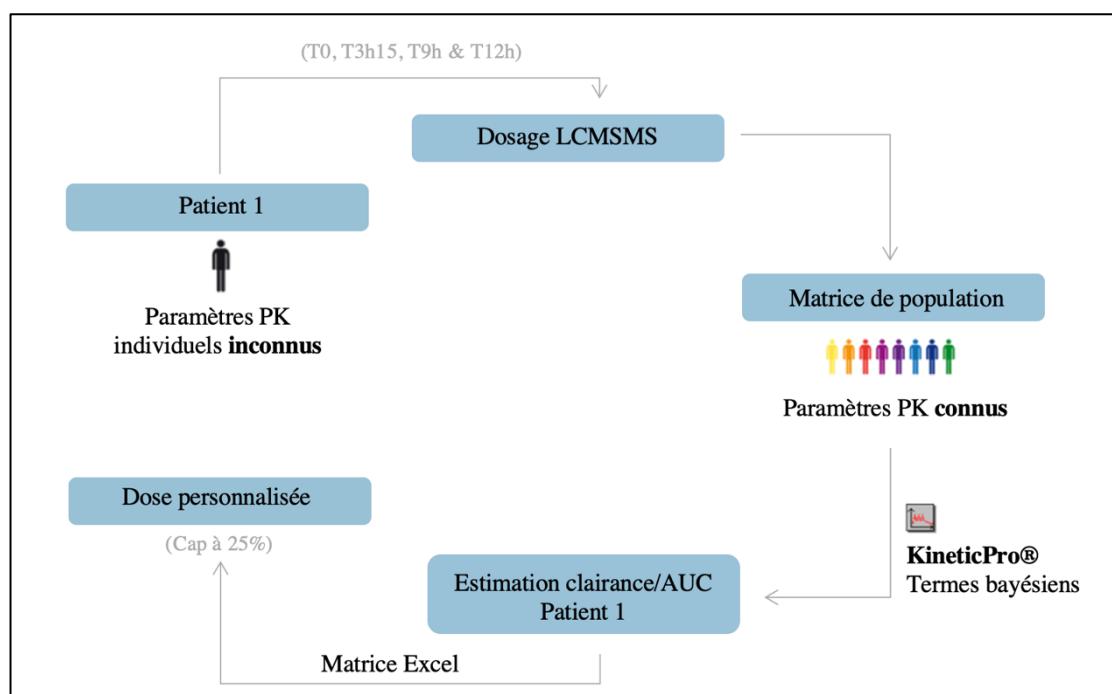


Figure 9. Schéma explicatif du ciblage posologique

2. De la perfusion de busulfan à l'analyse des concentrations

i. Choix de la dose et administration

Le busulfan utilisé pour le protocole de conditionnement provient de la spécialité BULSIVEX®, du laboratoire PIERRE FABRE MEDICAMENT, qui est une solution à diluer pour perfusion. (Cf figure 10) Le busulfan est en concentration de 6mg/ml dissous dans deux solvants : le polyéthylène glycol (67% vol/vol) et le dimethylacetamide (33% vol/vol).



Figure 10. Spécialité BULSIVEX®

Les patients adultes reçoivent initialement une dose test standard de $32\text{mg}/\text{m}^2$ pour estimer l'AUC journalière qui en résulte. (73)(81)(87) Selon la valeur d'AUC_j obtenue et la valeur de l'AUC_j théorique ciblée une dose de busulfan est choisie. Le patient reçoit alors une perfusion de Busulfan durant trois heures.

ii. Prélèvements et acheminement

Afin d'estimer les paramètres pharmacocinétiques individuels du patient, plusieurs prélèvements sanguins doivent être réalisés. Tout d'abord, le patient est prélevé avant l'administration de la perfusion, puis à la fin de la perfusion (T3h15) et à deux autres temps supplémentaires (T9h et T12h). L'administration du busulfan nécessite donc un suivi infirmier pour pouvoir effectuer ces prises de sang.

Les prélèvements sont exécutés sur le lieu d'hospitalisation du patient, c'est-à-dire l'IPC. En revanche l'analyse sanguine se déroule au laboratoire de pharmacocinétique et de toxicologie de la Timone. De ce fait, un transporteur est chargé d'amener le plus rapidement les prélèvements sur le lieu d'expérimentation. Dès leur arrivée, les échantillons sont analysés.

iii. Dosage LC MS/MS

Le dosage LC-MS/MS signifie chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem. C'est une technique analytique hautement performante qui associe deux procédés différents : le pouvoir de séparation en phase liquide de la chromatographie et l'analyse de masse très sensible de la spectrométrie de masse.

Dans la pratique, un échantillon d'intérêt est entraîné après extraction, à travers une phase dite stationnaire (colonne LC), par une phase mobile. Les interactions entre les analytes contenus dans l'échantillon et les deux phases affectent la vitesse de migration des constituants ce qui entraîne une séparation des différents éléments de l'échantillon.

Après élution de la colonne LC, l'ensemble de l'échantillon est dirigé vers le spectromètre de masse. Une fois dans cette partie, par l'intermédiaire d'une source d'ionisation, chaque analyte du prélèvement sanguin est nébulisé et ionisé, créant ainsi un ensemble de particules chargées. Ces particules chargées vont migrer à travers une série d'analyseurs de masse (quadripôles) qui vont appliquer des champs électromagnétiques. Cette étape permet de quantifier les composés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) avec une sensibilité et une sélectivité accrue et donc de les identifier précisément.

L'utilisation de la LC-MS/MS est répandue depuis plusieurs années pour entreprendre l'analyse des concentrations de médicament lors de suivis thérapeutiques, en raison de sa sensibilité, sa précision et sa spécificité permettant la quantification de molécules y compris chez des patients lourdement polymédiqués. Plusieurs études ont mis au point des protocoles efficaces permettant de détecter la présence de Bu dans un échantillon dès 2,5 ng/ml et de le quantifier dès 20 ng/ml. Grâce à cette précision, la LCMSMS est une technique de choix pour suivre l'évolution des concentrations en busulfan chez un patient au cours d'un conditionnement de greffe de cellules souches hématopoïétiques. (88)(89)(90)(91)

3. Des concentrations à l'estimation des paramètres PK

Après l'obtention des différentes valeurs de concentrations il est alors possible d'identifier les paramètres pharmacocinétiques du patient via le logiciel KineticPro®. C'est un logiciel-métier, qui est spécialisé dans l'étude du profil cinétique et l'identification des paramètres pharmacocinétiques d'une molécule et d'un patient donné.

En premier lieu, il est nécessaire de saisir les données suivantes dans un fichier dit « cinétique » : les temps exacts des prélèvements (h) et les concentrations associées (ng/ml). (Cf figure 11.A)

Puis le reste des informations dans un fichier dit « administration » : la voie d'administration, la dose administrée (mg) et la durée exacte de la perfusion (h). (Cf figure 11.B) La précision admise est de deux chiffres après la virgule.

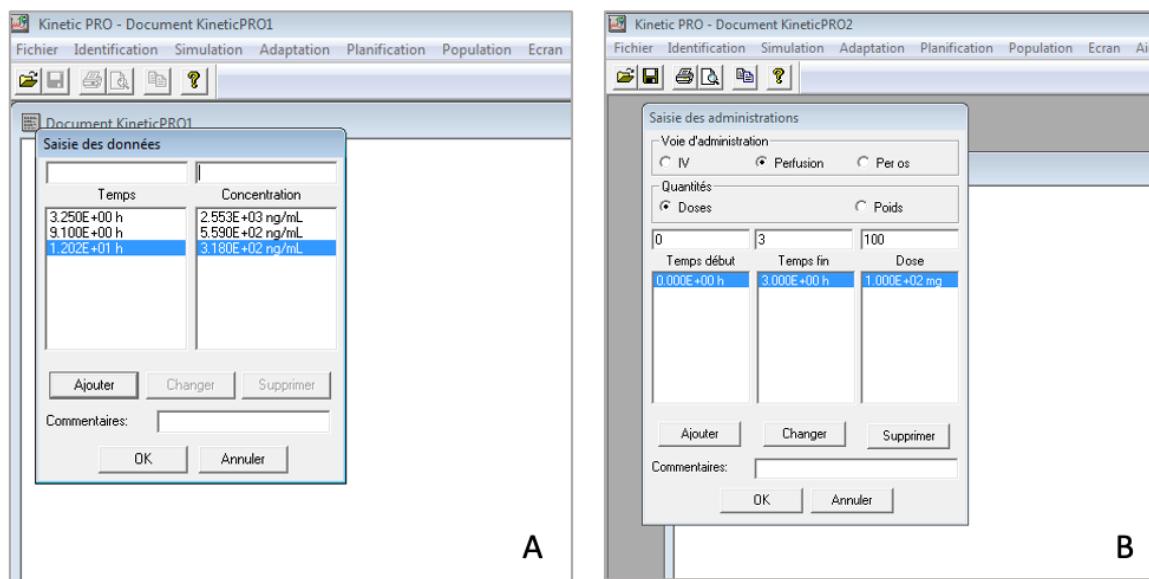


Figure 11. Visualisation des fichiers « cinétique » et « administration » sur KineticPro®

Le busulfan est décrit par un modèle PK monocompartimental. Il est nécessaire d'identifier les coefficients de son équation ($y = Ae^{-at}$). Néanmoins, en raison du faible nombre de prélèvements (T0h, T3h15, T9h et T12h) l'identification se fait par l'intermédiaire d'une stratégie bayésienne.

La stratégie bayésienne est une méthode de détermination qui repose sur une matrice de population. Cette population est composée de nombreux patients ayant reçu plusieurs doses de busulfan et pour lesquels un suivi des concentrations et des paramètres PK a été réalisé. Cela constitue une base de données solide pour estimer les valeurs des paramètres PK et d'exposition du patient en fonction de l'endroit où il se situe dans cette matrice de population. L'estimateur Bayésien arrive ainsi à identifier les paramètres individuels d'un nouveau patient sur la base de l'information individuelle (les concentrations plasmatiques mesurées) et de l'information apportée par la population, en postulant que le nouveau patient ne présente pas un profil trop éloigné de la population de référence. La précision de l'estimation des paramètres et le critère

de fit (écart entre la simulation et les points réellement observés) permettent de contrôler ce point.

Par la suite, dans le menu « identification » du logiciel, il faut paramétriser les conditions suivantes : le type d'identification, la voie d'administration, les critères d'optimisations et sélectionner « terme bayésien ». Ensuite il suffit d'initialiser l'identification en sélectionnant les deux fichiers remplis précédemment. Un profil cinétique est obtenu, ainsi qu'un fichier avec tous les paramètres pharmacocinétiques (Cf figure 12).

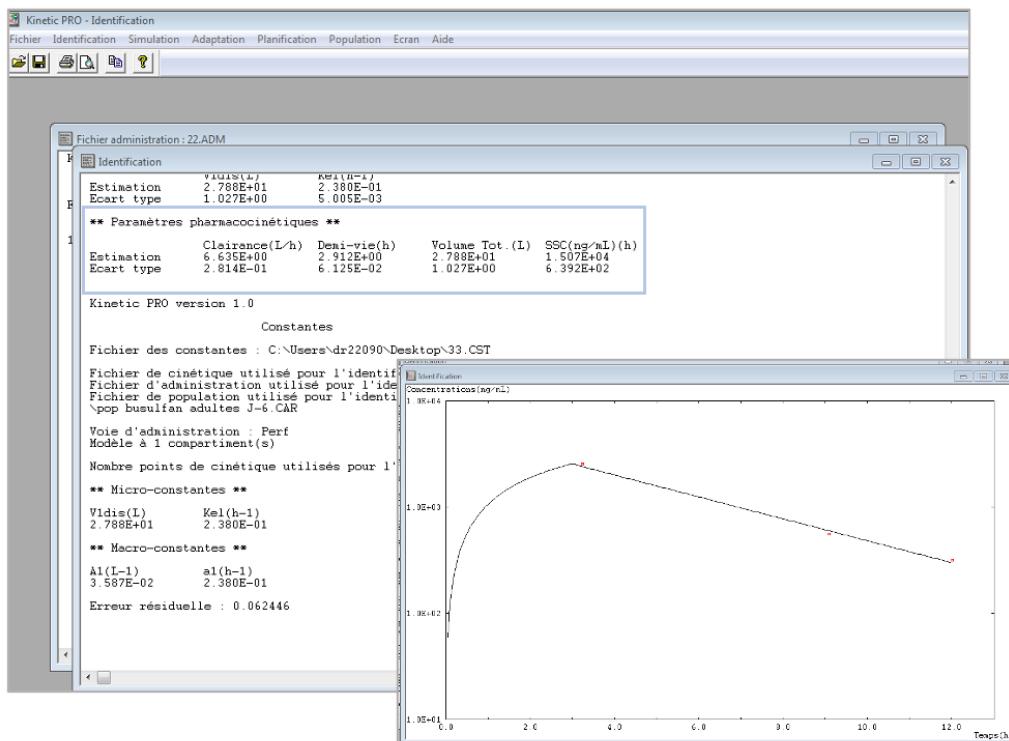


Figure 12. Résultats de l'estimation des paramètres PK avec KineticPro®

Les valeurs à relever sont la clairance (Cl), le temps de demi-vie ($t_{1/2}$), le volume de distribution (Vd) et l'aire sous la courbe journalière (AUC_j). Il est important de vérifier les écarts-type de ces valeurs, car s'ils sont trop importants (supérieur à 20%) cela signifie que l'estimation est faite avec une mauvaise précision et que le modèle n'est pas fiable. Ces résultats sont visibles dans l'encadré bleu de la figure 12.

4. Des paramètres PK à la dose personnalisée

Avec les résultats précédents, il est possible de faire une estimation de l'AUC totale grâce à une matrice Excel. Cette matrice a été conçue pour automatiser les calculs d'estimation de la cible.

Ce fichier Excel est divisé en six parties distinctes (Cf figure 13) :

- Partie 1 : Informations sur le patient
- Partie 2 : Informations sur le conditionnement
- Partie 3 : Valeurs des concentrations en busulfan
- Partie 4 : Résultats obtenus par KineticPro®
- Partie 5 : Calculs d'estimation de la cible
- Partie 6 : Dose personnalisée recommandée

Prélèvement à J-14				PARTIE 1 <i>Informations sur le patient</i>	
Nom/Prénom :	[redacted]	N° Bon :	[redacted]		
Date de naissance :	[redacted]	Poids :	[redacted] kg		
Date et heure d'administration J-14	[redacted]	AUCt cible	[redacted] $\mu\text{M} \cdot \text{min}$	PARTIE 2 <i>Informations sur le CDT</i>	
Durée de perfusion	[redacted] h				
Posologie administrée à J-14	[redacted] mg				
Prélèvements			Concentrations	PARTIE 3 <i>Informations sur les prélèvements</i>	
Date et heure	Intervalle de tps	Intervalle de tps réel	ng/ml		
[redacted]	T0		[redacted]		
[redacted]	T3h15		[redacted]		
[redacted]	T9h		[redacted]		
[redacted]	T12h		[redacted]		
Clairement	[redacted] L/h		AUC _{0-24h BX} : [redacted] ng x h/L	PARTIE 4 <i>Paramètres Pk obtenus par KineticPro</i>	
Vd	[redacted] L				
AUC théorique J-14	[redacted] $\mu\text{M} \cdot \text{min}$	Ecart	[redacted] $\mu\text{M} \cdot \text{min}$	PARTIE 5 <i>Estimation de l'exposition du patient</i>	
AUC réelle J-14	[redacted] $\mu\text{M} \cdot \text{min}$	Ecart (%)	[redacted] $\mu\text{M} \cdot \text{min}$		
AUC réelle J-21	[redacted] $\mu\text{M} \cdot \text{min}$				
AUC globale cible restante	[redacted] $\mu\text{M} \cdot \text{min}$	AUC cible	[redacted] $\mu\text{M} \cdot \text{min}$	PARTIE 6 <i>Rendu du résultat</i>	
Posologie journalière recommandée pour J-7 et J-6					
[redacted]	mg pour une AUC cible à [redacted] $\mu\text{M} \cdot \text{min}$				
Ne pas dépasser la dose maximale de [redacted] mg					

Figure 13. Matrice Excel pour l'estimation à J-14 du protocole Time-sequenced.

Cette matrice est employée à chaque fois qu'un suivi thérapeutique est effectué avec l'objectif de réaliser un ciblage posologique. Ainsi, elle est utilisée deux fois au cours du protocole Time-sequenced (à J-14 et à J-6) et une fois pour le protocole standard (à J-6).

Les zones vertes représentent les zones à remplir avec des informations qui sont initialement fournies ou après dosage LCMS/MS. Les zones bleues sont les données obtenues après simulation avec le logiciel KineticPro®. Les zones jaunes correspondent à des calculs automatiques fait à partir des données pharmacocinétiques.

Ce fichier permet d'avoir une vue d'ensemble de l'adaptation posologique pour un jour donné. Pour des raisons de sécurité, un « capage » automatique à +25% est paramétré dans le calcul des doses : il n'est pas possible de proposer une augmentation de posologie supérieure à 25% de la dose précédente. Il n'y a en revanche pas de limite sur les réductions de posologie.

B. Exemple d'adaptation posologique

1. Cas clinique

Monsieur TH, âgé de 62 ans est atteint d'une leucémie aigüe myéloïde (LAM). La LAM est une hémopathie maligne qui touche la lignée myéloïde des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. A l'heure actuelle, une chimiothérapie intensive suivie d'une allogreffe de CSH est le seul traitement curatif existant pour la leucémie aigüe myéloïde.

Dans cette optique, le patient va bénéficier d'une greffe allogénique de CSH. Le conditionnement choisi est un conditionnement d'intensité réduite étant donné l'âge du patient (>50 ans), c'est-à-dire avec une exposition cible correspondant à $AUC_{tot} = 16\ 000 \mu M \cdot min^{-1}$. Aussi, le type de conditionnement adopté est le protocole T-seq afin d'obtenir une mise en aplasie lente et profonde. Une des molécules utilisées pour le protocole est le busulfan. Un suivi thérapeutique avec ciblage posologique est entrepris.

2. Stratégie d'exposition

Afin de faciliter le suivi thérapeutique, l' AUC_{tot} est découpée en plusieurs AUC_j obtenues après chaque administration de busulfan. L' AUC_{tot} cible étant de $16\ 000 \mu M \cdot min^{-1}$ et le protocole T-seq comportant six injections, l'exposition cible journalière (AUC_j) est de $2667 \mu M \cdot min^{-1}$ (AUC_{tot} divisée par 6). La valeur de la dose de busulfan perfusée au patient pendant les six jours du protocole (J-21, J-14, J-7, J-6, J-5, J-4) est choisie en fonction de cette exposition

journalière. Ainsi, la dose standard de 162 mg est retenue et sera administrée pour les deux premières perfusions.

Après chacune de ces deux perfusions des prélèvements sanguins sont fait pour pouvoir déterminer les paramètres PK du patient et les AUC_j réelles. Les AUC_j réelles de J-21 et J-14 sont cumulées et soustraîtes à l' AUC_{tot} cible pour déterminer l'exposition au busulfan restante. La valeur obtenue représente la nouvelle cible à atteindre en quatre injections. Elle est donc divisée par quatre et une dose personnalisée est fixée pour répondre à cette nouvelle cible. Cette première dose personnalisée sera administrée à J-7 et J-6.

Le même raisonnement est une nouvelle fois entrepris afin de déterminer la deuxième dose personnalisée à administrer au patient à J-5 et J-4.

3. Détails des calculs

Après une perfusion de trois heures de 162 mg de busulfan à J-21, l' AUC_j réelle à J-21 est de $3695 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$, soit 39% de plus que l' AUC_j théorique de $2667 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. Pour J-14, une surexposition de 41% est observée (AUC_j réelle = $3768 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$).

Il est donc indispensable d'adapter la dose de Busulfan donnée au patient, puisqu'en deux perfusions, l'exposition cible de $16\ 000 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ est déjà consommée de presque de moitié et il reste encore quatre perfusions à administrer au patient. Cette adaptation posologique est indispensable pour éviter l'apparition de toxicités fatales.

De ce fait, la nouvelle exposition cible totale est l' AUC_{tot} initiale moins l' AUC cumulée obtenue à J-21 et J-14 ($16\ 000 - 7463 = 8537 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$). Pour déterminer la nouvelle AUC_j à atteindre, il suffit de diviser cette valeur par le nombre d'injections restantes (soit $8537 \div 4 = 2134 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$). Cette nouvelle exposition journalière à atteindre permet de déduire la posologie à appliquer pour les prochaines perfusions par un simple produit en croix. La première dose personnalisée adaptée est de 92mg, et elle sera donnée au patient à J-7 et J-6. (Cf figure 14)

Date et heure d'administration J-14	02/10/2019 02:00	AUCt cible	16 000	μM.min	PARTIE 2 Informations sur le CDT
Durée de perfusion	3	h			
Posologie administrée à J-14	162	mg			
Prélèvements					
Date et heure	Intervalle de tps	Intervalle de tps réel	Congntrations	ng/ml	PARTIE 3 Informations sur les prélèvements
02/10/2019 02:00	T0	0	0	0	
02/10/2019 05:15	T3h15	3,25	2553		
02/10/2019 11:06	T9h	9,1	559		
02/10/2019 14:01	T12h	12,02	318		
Clairance	6,63	L/h	AUC _{0-24h} BX :	1,53E+04	ng x h/L
Vd	27,9	L			PARTIE 4 Paramètres Pk obtenus par KineticPro
AUC théorique J-14	2667	μM.min	Ecart	1101,47	μM.min
AUC réelle J-14	3768	μM.min	Ecart (%)	41,3	μM.min
AUC réelle J-21	3694	μM.min			PARTIE 5 Estimation de l'exposition du patient
AUC globale cible restante	8537,53	μM.min	AUC cible	2134,4	μM.min
Posologie journalière recommandée pour J-7 et J-6					
	91,75	mg pour une AUC cible à	2134	μM.min	PARTIE 6 Rendu du résultat
		Ne pas dépasser la dose maximale de	202	mg	

Figure 14. Matrice Excel appliquée à J-14 pour le cas clinique

Par ailleurs, après approbation de l'équipe médicale de l'IPC, le patient reçoit une dose de 92mg à J-7 et J-6. Les prélèvements sanguins ne sont réalisés qu'au J-7 car l'intervalle de temps est trop court entre le J-6 et le J-5 pour pouvoir faire les prélèvements, l'acheminement, les dosages et l'adaptation posologique. Pour faire le ciblage posologique, on considère donc que les résultats sont sensiblement identiques entre ces deux jours (J-7 et J-6).

Ainsi, la cible d'exposition AUC_j à J-7 est mesurée à une valeur de $2326 \mu M \cdot min^{-1}$. Soit 9% supérieur à la cible théorique fixée (AUC_j théorique = $2134 \mu M \cdot min^{-1}$). Cette surexposition est bien mieux que celle observée après J-21 et J-14. Néanmoins, il est nécessaire d'adapter la posologie pour les deux prochaines perfusion (J-5 et J-4) pour garder l'objectif initial d'une AUC cible totale de $16\ 000 \mu M \cdot min^{-1}$.

De ce fait, on recalcule la nouvelle cible totale théorique restante en soustrayant à l' AUC_{tot} cible initiale, les AUC_{tot} cumulées à J-21 et J-14 et l' AUC_{tot} cumulée à J-7 et J-6 ($16\ 000 - 7463 - 2 \times 2326 = 3885$). Cette valeur obtenue est divisée par le nombre d'injections restantes pour raisonner en cible journalière ($3885 \div 2 = 1942,5 \mu M \cdot min^{-1}$). Enfin par un produit en croix, on

détermine la deuxième dose personnalisée qui respecte cette nouvelle AUC_j à atteindre. Cette dose de 77mg est administrée au patient au J-5 et J-4.

A la fin du protocole de conditionnement, des prélèvements sont effectués à J-4 après administration du busulfan, pour vérifier l'AUC_j réelle obtenue par rapport à l'AUC_j théorique ($1942,5 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$). Les résultats de J-5, bien que non mesurés, sont considérés comme identiques à ceux du J-4. Ainsi, une surexposition de 19% est observée (AUC_j réelle = $2318 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$).

4. Écarts à la cible

A la fin du conditionnement, il est nécessaire de tester l'efficacité du modèle de ciblage posologique en cumulant toutes les AUC_j réelles obtenues au cours du protocole Time-sequenced : $7463 + 2 \times 2326 + 2 \times 2318 = 16\ 751 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. Cette valeur calculée n'est que 5% supérieure à l'exposition cible initiale de $16\ 000 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. Ce faible écart n'aurait pas pu être obtenu sans l'intervention du ciblage posologique, puisque dès les premiers jours le patient se retrouve en surexposition de 40%, laissant présager de graves effets indésirables avant même le début de la greffe de moelle osseuse. La figure 15 récapitule l'ensemble des résultats sur le protocole de conditionnement.

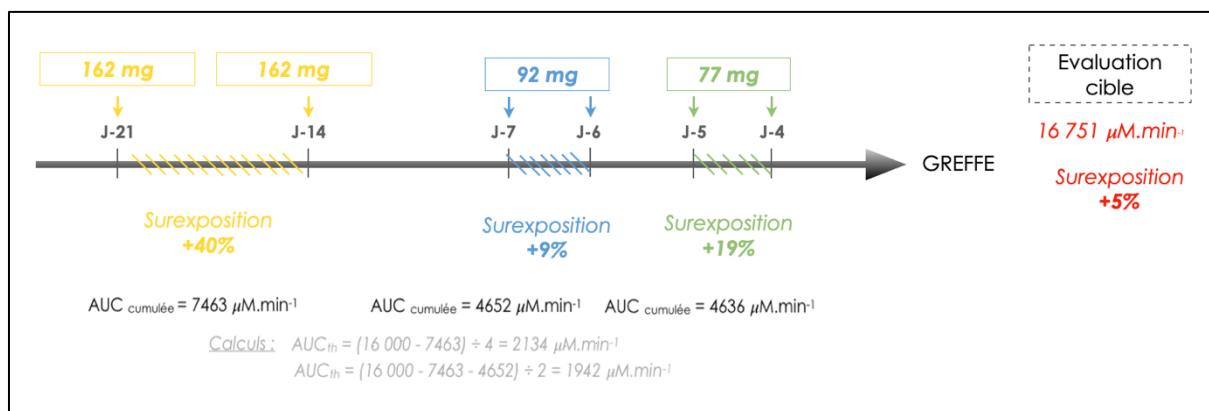


Figure 15. Vue d'ensemble du ciblage posologique au cours du conditionnement.

Avec une dose de 162 mg, le patient se retrouve en surexposition de 40%, ce qui entraîne une diminution de posologie à 92mg pour les deux perfusions suivantes. Après l'administration de ces nouvelles doses, le patient est sureposé à 9%. Une adaptation de posologie est également faite pour les deux dernières injections pour une dose de 77mg. On remarque qu'afin de pouvoir

atteindre l'exposition cible initiale, il est nécessaire de diminuer de plus de 50% la posologie du busulfan au cours du conditionnement.

Il faut bien considérer que les surexpositions de 9% et de 19% sont considérées par rapport aux nouvelles AUC_j cibles théoriques calculées (respectivement $2134 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ et $1942 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$) au cours du protocole et non par rapport à la cible théorique journalière initiale décrite avant le début du conditionnement ($2667 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$). C'est pour cela, que malgré une surexposition forte tout le long du protocole, la cible finale obtenue ($AUC_{\text{tot}} = 16\ 751 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$) n'a un écart que de 5% avec l'exposition cible fixée en début de traitement ($AUC_{\text{tot}} = 16\ 000 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$).

5. Devenir de la greffe

Étant donné le faible écart à l'exposition cible, la greffe de cellules souches hématopoïétiques a pu être réalisée. Par la suite, la prise de la greffe s'est faite dans un intervalle de temps correct et le patient n'a pas développé de maladie du greffon contre l'hôte de haut grade.

Néanmoins, le patient est décédé plusieurs semaines après, des suites d'infections virales et bactériennes opportunistes. En effet, le système immunitaire n'était pas encore tout à fait compétent pour lutter contre ces infections. Les supports médicamenteux n'ont pas suffi à aider le patient à passer cette période d'aplasie, ce qui peut poser la question de la pertinence des AUC cibles déterminées empiriquement.

C. Les résultats du ciblage posologique

1. Le protocole standard

Pour le protocole standard, une trentaine de patients ont bénéficié du suivi thérapeutique pour le busulfan. Néanmoins lors de l'analyse des résultats, seulement dix-sept ont pu être conservés. En effet, certains dosages ne sont jamais arrivés jusqu'au laboratoire pour effectuer les dosages ou bien pour cause de rupture dans la chaîne du froid du transport des échantillons aboutissant à une analyse fausse.

Afin d'évaluer l'efficacité du modèle, deux valeurs différentes sont comparées :

- Le pourcentage d'écart à la cible en début de protocole. Par exemple entre $AUC_{j,7}$ théorique et $AUC_{j,7}$ réelle.

- Le pourcentage d'écart à la cible en début fin de protocole (entre AUC_{tot} théorique et AUC_{tot} réelle)

En effet, il s'agit de comparer l'écart à la cible en début de protocole, avant l'intervention du ciblage posologique et à la fin du conditionnement pour déterminer si l'adaptation posologique du busulfan est efficiente. Afin d'uniformiser les résultats, les écarts ont été mis en valeur absolue pour une représentation graphique plus optimale. La figure 16 est une représentation graphique de ces résultats sur l'ensemble des patients.

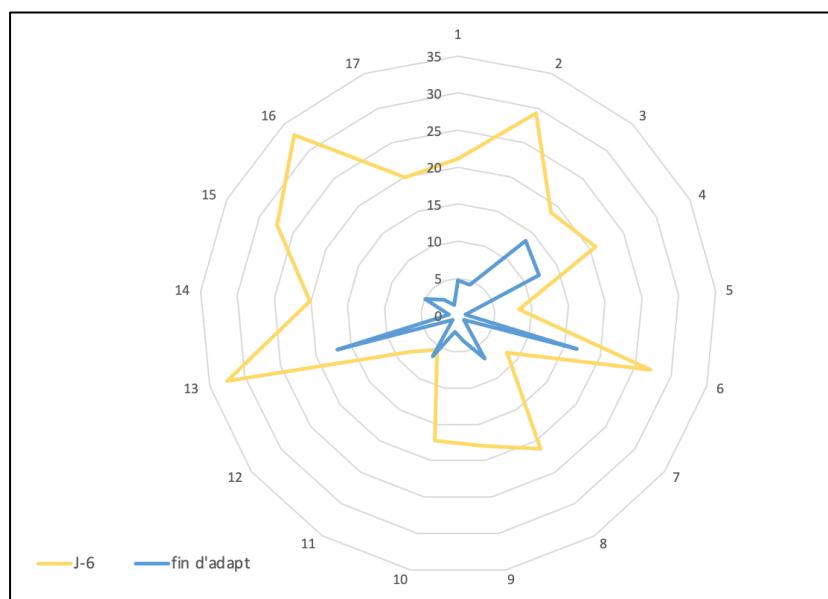


Figure 16. Répartition des écarts à la cible (en %) par patient pour le protocole standard

On observe distinctement une différence entre les deux stades de conditionnement. Le tracé jaune qui représente le début d'adaptation, est bien plus éloigné du centre, que le tracé bleu qui représente la fin du conditionnement.

Au niveau arithmétique, avant adaptation posologique, les écarts à la cible sont en moyenne de $19 \pm 8\%$. A la fin du protocole de conditionnement, la moyenne des écarts à la cible est de $6 \pm 4\%$. La différence n'est pas significative mais une tendance se dessine nettement laissant penser que le modèle permet effectivement un ajustement à la cible. En effet, l'adaptation posologique a permis de réduire les écarts extrêmes de $[-26\% ; 33\%]$ à $[-14\% ; 22\%]$.

2. Le protocole time sequenced

Pour le protocole Time-sequenced, seulement une quinzaine de patients ont été recrutés. Néanmoins, pour les mêmes problèmes énoncés dans la partie précédente (manque d'échantillons et rupture dans la chaîne du froid) seulement un nombre limité de patients ont été conservés pour l'évaluation des résultats ($n=8$).

De même que précédemment, ce sont les écarts en pourcentage à la cible en début de protocole (entre $AUC_{cumulée à J-14}$ théorique et $AUC_{cumulée à J-14}$ réelle) et en fin de protocole (entre AUC_{tot} théorique et AUC_{tot} réelle) qui sont comparés. Pour le T-seq, le début de protocole correspond au J-14 car aucune analyse PK n'est réalisée avant. La cible correspond donc à l'addition de l' AUC_j à J-21 et à J-14. Ces écarts ont été mis en valeur absolue pour une représentation graphique plus optimale. La figure 17 est une représentation graphique de ces résultats.

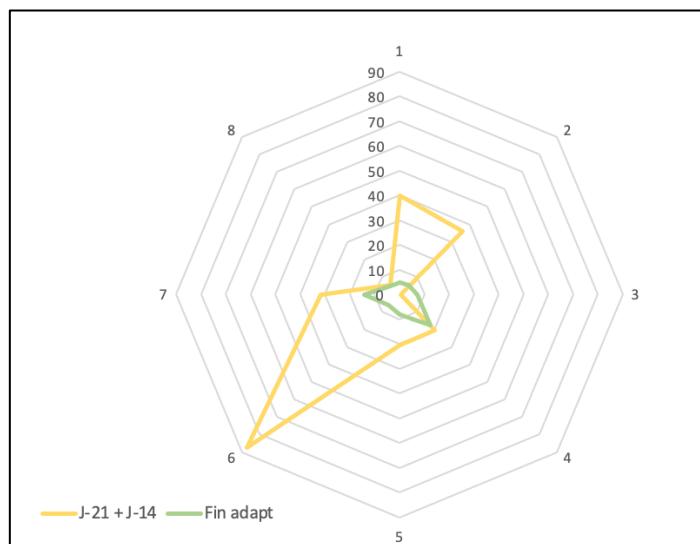


Figure 17. Répartition des écarts à la cible (en %) par patient pour le protocole T-seq

Visuellement, on observe une forte différence entre les deux stades de conditionnement. Le tracé jaune représente le début d'adaptation. Il est bien plus éloigné du centre que le tracé vert, qui représente la fin du conditionnement.

En détail, sans adaptation posologique du busulfan, l'écart à la cible moyen est de $30 \pm 27\%$. Après intervention de la pharmacocinétique et du ciblage posologique, les écarts à la cible passent à une moyenne de $8 \pm 5\%$. La différence n'est pas significative, néanmoins une tendance se détache. L'intervention du ciblage posologique permet d'approcher la cible plus efficacement. Effectivement, cela a permis de réduire les écarts extrêmes à la cible de [-32% ; 87%] à [-14% ; 18%]

3. Discussion des résultats

Pour les deux protocoles étudiés, et particulièrement pour le Time-sequenced, le nombre de patients est trop faible pour pouvoir réaliser une véritable analyse statistique. Il est donc indispensable d'augmenter l'effectif pour les deux conditionnements. A l'heure actuelle, l'IPC relance l'utilisation de ces protocoles, après presque deux ans de pause, ce qui permettra de relancer les recherches.

De plus, il est nécessaire d'agir sur la gestion des échantillons et la logistique de transport. Effectivement, un trop grand nombre de prélèvements ne sont pas réalisés en cours de protocole ou sont perdus, entraînant une impossibilité de faire un suivi thérapeutique et donc une adaptation posologique. Aussi, la rupture de la chaîne du froid est un point important sur lequel il faut agir. Dès lors que les échantillons sanguins ne sont pas conservés entre -2°C et -6°C, il y a une altération de ceux-ci, aboutissant à une diminution de la concentration sanguine en busulfan et laissant donc penser à une sous-exposition du patient. Ces résultats peuvent mener à une mauvaise adaptation posologique avec des conséquences graves pour le patient.

A l'échelle des protocoles, pour le Time-sequenced notamment, il semble approprié d'ajouter une analyse PK suivie d'un ciblage posologique au J-21. En effet, on se rend compte que pour certains patients la surexposition est considérable et aurait pu être évitée au J-14, si une adaptation posologique avait été prévue pour ce jour-là. Il n'est pas nécessairement indispensable que les doses administrées à J-21 et à J-14 soient identiques. Pour un patient, la surexposition était telle (+80%) que les dernières perfusions de busulfan n'ont même pas été administrées.

Au niveau clinique, le protocole T-seq montre une mortalité de 30%, malgré un écart à la cible satisfaisant en fin de conditionnement (moyenne = 8%). Cette observation suggère qu'il est nécessaire de considérer, en plus du respect de la valeur de la cible (AUC_{tot}), la première exposition au Busulfan. Pour quelques patients, dès le début du protocole plus de 50% de la cible est déjà atteinte. Cependant, les protocoles sont constitués de manière à permettre une progression lente et régulière dans l'atteinte de la cible. Pour le T-seq, chaque perfusion de busulfan augmente d'environ 17% l'achèvement de la cible (100% divisé par 6 injections). Pour illustrer ce propos, un patient démarre le protocole de conditionnement avec une surexposition de 36% à J-14 mais termine néanmoins avec un écart à la cible de moins de 5%. Ce patient décède à la suite de la greffe d'une GVHD de grade IV. La situation est identique pour un autre patient qui fait un décrochage à 70% dès le début et qui finit avec un écart de moins de 5%. Ces observations sont en corrélation avec les données bibliographiques de la partie III.B.2.i.

Inversement, une sous exposition initiale entraîne un retard de prise dans la greffe irréversible. Il semblerait donc que la dose initiale administrée en mg/m², en occasionnant des écarts à la cible, même si ceux-ci sont atténués par la suite grâce à notre stratégie d'adaptation de dose, a un effet délétère sur l'issue clinique des patients. Pour le protocole standard, les résultats sont très satisfaisants. La clinique n'a pas encore été détaillée par l'institut Paoli Calmette et les analyses finales sont encore en cours.

Finalement, le choix de la cible nécessite probablement un choix plus éclairé et moins empirique. Bien que l'âge du patient et ses comorbidités soient des critères appropriés et fonctionnels, peut-être qu'une étude pharmacogénétique serait envisageable pour déterminer la capacité du patient à métaboliser le busulfan. En effet, certains patients qui étaient des candidats idéaux pour une conditionnement myéloablatif ($AUC_{tot} = 20\ 000\ \mu M \cdot min^{-1}$) avec une atteinte à la cible régulière et précise ont développé une toxicité hépatique et sont décédés d'une toxicité imputable au busulfan, la maladie veino-occlusive.

Sur ces seuls résultats, il semble plus pertinent d'opter pour un protocole standard qui entraîne une variabilité d'exposition plus contrôlable par les cliniciens et pharmaciens et qui donne de meilleurs résultats sur la greffe en elle-même. Néanmoins, le protocole parfait n'est pas encore identifié et l'utilisation du suivi thérapeutique et le ciblage posologique sont indispensables pour continuer à limiter l'impact de la variabilité pharmacocinétique du busulfan. Une étude poussée incluant tous les paramètres disponibles pour un patient (biologiques, génétiques, génotypiques, démographiques) permettrait par exemple de développer un outil d'aide à la détermination de la première dose, en lieu et place du mg/m² actuellement utilisé. Cela limiterait les écarts à la cible au J-21 ou au J-6 qui, on l'a vu, semblent délétères, même si globalement les corrections postérieures permettent de respecter les AUC cible.

CONCLUSIONS

La greffe de cellules souches hématopoïétiques est une thérapie cellulaire utilisée depuis de nombreuses années. Elle représente aujourd’hui une thérapie majeure dans la prise en charge de certaines hémopathies malignes ainsi que pour des pathologies immunitaires. Son utilisation est en constante augmentation et ses résultats sont de plus en plus concluants.

La mise en place d’un conditionnement efficace permettant la mise en aplasie du patient est un préalable décisif pour le résultat de la greffe. Le type de conditionnement et les molécules myéloablatives administrées dépendent des caractéristiques du patient, de sa pathologie et de son état de santé général. En outre, des protocoles stricts d’administration des molécules, basés sur les connaissances pharmaceutiques existantes, sont mis en place par l’équipe médicale pour assurer la sécurité du patient tout le long du conditionnement.

Néanmoins, l’administration de chimiothérapies cytotoxiques d’index thérapeutique étroit, tel que le busulfan, nécessite la personnalisation de ces protocoles d’administration. L’utilisation du suivi thérapeutique permet de limiter l’impact de la variabilité pharmacocinétique du busulfan à travers une stratégie d’adaptation des posologies. Ainsi, le patient est maintenu dans une fenêtre thérapeutique d’exposition optimale permettant de prévenir l’apparition de toxicités et surtout d’assurer le succès de la greffe.

L’émergence du ciblage posologique dans les conditionnements, permet de diminuer considérablement les complications de la greffe de moelle osseuse. Ainsi, cela donne une perspective thérapeutique pour des populations initialement écartées de cette thérapie cellulaire, car présentant des comorbidités importantes.

Ainsi, la mise en place du ciblage posologique est un enjeu important pour la réussite des greffes de cellules souches hématopoïétiques et il est nécessaire de continuer les recherches pour mettre en place des protocoles optimaux pour chaque molécule administrée lors du conditionnement, dans le cadre du développement d’une médecine de précision en oncologie.

GLOSSAIRE

Antinéoplasique : C'est un médicament destiné à bloquer la prolifération des cellules cancéreuses. Le néoplasme désigne une tumeur.

Aplasie médullaire : Trouble des cellules souches hématopoïétiques aboutissant à une perte des précurseurs des lignées sanguines et donc une diminution de certaines cellules : globules rouges, plaquettes, leucocytes, etc. Très souvent cette aplasie est d'origine iatrogène (exemple : chimiothérapie).

Biodisponibilité : Fraction de la dose d'une substance ou d'un médicament, qui après administration, passe dans la circulation systémique sous forme inchangée.

Chromatographie : Technique analytique physico-chimique qui permet de séparer les différents constituants d'un mélange. Il peut être en phase liquide ou gazeuse.

Clairance : Capacité globale d'un organisme à éliminer une molécule. Elle correspond au volume de plasma totalement épuré de principe actif en un intervalle de temps donné

Cytaphérèse : Prélèvement sanguin au cours duquel le donneur est relié à une machine qui extrait simultanément les cellules souches hématopoïétiques de son sang. Les cellules obtenues constituent le greffon de moelle osseuse.

Cytotoxique : Propriété d'un agent chimique ou biologique à être toxique pour les cellules pouvant aller jusqu'à leur destruction.

Dysurie : difficulté à la miction.

Échappement thérapeutique : ralentissement de l'effet thérapeutique d'un médicament après une période d'utilisation.

Effet GvH : On parle également de maladie du greffon contre l'hôte. Dans une greffe allogénique, c'est lorsque les cellules immunitaires compétentes du greffon (les lymphocytes T) vont attaquer les cellules du receveur.

Effet GvL : C'est le même principe que l'effet GvH, mais dans ce cas particulier, les cellules immunitaires du greffon attaquent le cancer. C'est un effet thérapeutique recherché dans les greffes allogéniques.

Hématopoïèse : Processus physiologique de production de l'ensemble des cellules sanguines.

Hémopathie maligne : Cancer des tissus hématopoïétiques (c'est-à-dire des cellules sanguines et/ou de leurs précurseurs)

Hématurie : Présence de sang dans les urines.

Iatrogénie médicamenteuse : Ensemble des effets indésirables provoqués par la prise d'un ou plusieurs médicaments.

Intervalle thérapeutique : Intervalle de concentrations pour lequel un médicament est efficace et sans toxicité.

Myélotoxique : Propriété d'un agent chimique ou biologique à être toxique pour la moelle osseuse.

Pancytopénie : diminution simultanée des taux des érythrocytes, des leucocytes et des plaquettes. Cet état révèle une atteinte de la moelle osseuse.

Pharmacocinétique : Étude du devenir du médicament après administration, au cours du temps, dans l'organisme.

Pharmacodynamie : Étude des effets biochimiques, physiologiques et moléculaires d'un médicament sur l'organisme. Cet effet dépend de sa dose.

Prophylaxie médicamenteuse : traitements médicaux ayant pour but d'empêcher l'apparition, l'aggravation et la propagation d'une maladie.

Spectrométrie de masse : Technique d'analyse qui repose sur l'ionisation et la fragmentation des molécules afin d'identifier des molécules et de caractériser leur structure chimique.

Stratégie bayésienne : Stratégie déductive probabiliste qui se base sur l'observation d'éléments connus pour prévoir des résultats.

Thérapie cellulaire : Greffe de cellules afin de restaurer la fonction et l'intégrité d'un tissu ou un organe. L'objectif est de soigner sur le long terme.

BIBLIOGRAPHIE

1. Tachdjian G. Prolifération – Différenciation. In: Toute l'UE 2 - La cellule et les tissus [Internet]. Elsevier Masson SAS. 2018 [cité 11 avr 2021]. Disponible sur: <https://www-clinicalkey-com.lama.univ-amu.fr/student/content/book/3-s2.0-B9782294757068000196#hl0000197>
2. Azzouna A, Chouchane H. Cellules souches animales et humaines [Internet]. Développement durable et autres questions d'actualité. Educagri éditions; 2011 [cité 11 avr 2021]. Disponible sur: <https://www-cairn-info.lama.univ-amu.fr/developpement-durable-et-autres-questions-d-actual--9782844448415-page-307.htm>
3. Mauzon M. Les cellules souches hématopoïétiques : définition, origines et principales utilisations thérapeutiques [Internet] [Thèse]. UHP - Université Henri Poincaré; 2011 [cité 11 avr 2021]. p. non renseigné. Disponible sur: <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01738828>
4. Pitte M. Physiologie de l'hématopoïèse - Cours IFSI - Etudiant infirmier [Internet]. Soins-Infirmiers.com. 2019 [cité 22 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.soins-infirmiers.com/ifsie/ue-2.2-cycles-de-la-vie-et-grandes-fonctions/physiologie-hematopoiese>
5. Ifrah N. Chapitre 1 - Introduction à l'hématologie. In: Hématologie, 3ème édition [Internet]. Elsevier Masson; 2018 [cité 11 avr 2021]. Disponible sur: <https://www-clinicalkey-com.lama.univ-amu.fr/student/content/book/3-s2.0-B978229475108000011#hl0000466>
6. Ifrah N. UE 7 Biothérapies et thérapies ciblées - Hématologie. In: Hématologie [Internet]. Elsevier Masson SAS. 2018 [cité 11 avr 2021]. Disponible sur: <https://www-clinicalkey-com.lama.univ-amu.fr/student/content/book/3-s2.0-B9782294751080000187#hl0000415>
7. Robb. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cité 11 avr 2021]. Disponible sur: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/leucocytes-et-leur-pathologie/23-hematopoiese-cellules-souches-hematopoietiques-facteurs-de-croissance>
8. Robb L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. Oncogene. 15 oct 2007;26(47):6715-23.
9. Boisset J-C, Robin C. Origine endothéliale des cellules souches hématopoïétiques - La preuve en image. médecine/sciences. 1 oct 2011;27(10):875-81.
10. Coulombel L, Vainchenker W. Les cellules souches hématopoïétiques. MS Médecine Sci Rev Pap ISSN 0767-0974 1995 Vol 11 N° 1 P13-6 [Internet]. 1995 [cité 10 août 2021]; Disponible sur: <https://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/2155>
11. Pocock G. Chapitre 25 - Les propriétés du sang. In: Physiologie humaine et physiopathologie [Internet]. Elsevier Masson; 2019 [cité 6 oct 2021]. Disponible sur: <https://www-clinicalkey-com.lama.univ-amu.fr/student/content/book/3-s2.0-B9782294758195000254>

12. Château A-L. Étude des facteurs influençant l'efficacité de collecte au cours des actes de cytaphérèse utilisés pour le recueil des cellules souches hématopoïétiques [Internet]. 2017 [cité 17 avr 2021]. Disponible sur: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01621260>
13. IPC. Immunothérapie et thérapie cellulaire et génique [Internet]. Institut Paoli-Calmettes. [cité 15 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.institutpaolicalmettes.fr/votre-parcours-therapeutique/traitements-medicaux-specifiques/immunotherapy/>
14. Hertl M. Transplantation de cellules-souches hématopoïétiques [Internet]. Édition professionnelle du Manuel MSD. 2020 [cité 11 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/immunologie-troubles-allergiques/transplantation/transplantation-de-cellules-souches-h%C3%A9matopo%C3%AF%C3%A9tiques>
15. Ascher J, Jouet J-P. Aspects médicaux de la greffe de moelle osseuse. Hors Collect. 2004;39-64.
16. Costello R, Venton G, Colle J, Labiad Y, Pouillin P. Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. In: EMC - Hématologie [Internet]. 2015^e éd. Elsevier Masson; 2016 [cité 6 oct 2021]. Disponible sur: <https://www-clinicalkey-com.lama.univ-amu.fr/student/content/emc/51-s2.0-S1155198415679638>
17. Agence nationale de la Biomedecine. Activité nationale de greffe de CSH [Internet]. [cité 26 oct 2021]. Disponible sur: <https://rams.agence-biomedecine.fr/activite-nationale-de-greffede-csh-0>
18. Autogreffe-carnet_information_et_de_suivi_des_patients_et_de_leurs_proches.pdf [Internet]. [cité 10 oct 2021]. Disponible sur: https://www.sanofi.fr/-/media/Project/One-Sanofi-Web/Sites/Europe/Sanofi-FR/nous-connaître/domaines-thérapeutiques/Autogreffe-carnet_information_et_de_suivi_des_patients_et_de_leurs_proches.pdf
19. Vernant J-P, Dhédin N. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : réalisation et complications. In: EMC - Hématologie [Internet]. 2010^e éd. Elsevier Masson; 2010 [cité 6 oct 2021]. Disponible sur: <https://www-clinicalkey-com.lama.univ-amu.fr/student/content/emc/51-s2.0-S1155198410512895>
20. Hequet O. Les différentes modalités de prélèvement des cellules souches hématopoïétiques. Transfus Clin Biol. avr 2011;18(2):230-4.
21. Le Berre C. Le prélèvement de cellules souches hématopoïétiques. Transfus Clin Biol. 1 juin 2005;12(2):160-2.
22. Filgrastim : substance active à effet thérapeutique [Internet]. VIDAL. 2013 [cité 11 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/filgrastim-1493.html>
23. Jouault H, Beaujean F. Cellules souches périphériques: une nouvelle approche des greffes de moelle osseuse. Rev Fr Lab. 1 déc 1998;1998(308):49-53.

24. Brignier A, Ader V, Bellegarde K, Giraud C, Guerout-Verite M-A, Hamzy F, et al. Modalités de mobilisation des cellules souches hématopoïétiques autologues et objectifs cellulaires en cellules CD34+ : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). Bull Cancer (Paris). 1 janv 2020;107(1, Supplement):S44-51.
25. Bougar S, Benseffaj N, Ouadghiri S, Essakalli M. La cytaphérèse : indications, sélection médicale, mobilisation, modalités et incidents de prélèvement. Expérience du centre hospitalier de Rabat. Transfus Clin Biol. 1 sept 2015;22(4):218.
26. Immunothérapie du cancer par minigreffe de cellules souches hématopoïétiques [Internet]. Revue Medicale Suisse. [cité 4 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2005/revue-medicale-suisse-30/immunotherapie-du-cancer-par-minigreffe-de-cellules-souches-hematopoietiques>
27. SFGMTC G de. Le Conditionnement [Internet]. Greffe de Moelle .com. [cité 25 oct 2021]. Disponible sur: <http://greffedemoelle.com/le-conditionnement/>
28. Damge M. Comparaison de deux types de conditionnement préalable à l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, basés sur l'utilisation du Busulfan, chez des patients âgés atteints d'une hémopathie maligne de haut risque – Quel est l'impact de l'utilisation du Busulfan à dose adaptée à sa pharmacocinétique sur le devenir de ces patients ? 2019.
29. InfoCancer - ARCAKY - GINECO –Traitements - Greffes - Les greffes de moelle osseuse - Les allogreffes [Internet]. 2020 [cité 26 oct 2021]. Disponible sur: <http://www.arcagy.org/infocancer/traitement-du-cancer/greffes/les-greffes-de-moelle-osseuse/les-allogreffes.html/>
30. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, éditeurs. The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies [Internet]. 7th éd. Cham (CH): Springer; 2019 [cité 5 nov 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553942/>
31. Paillard C. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques avec conditionnement à intensité réduite: indications et développement actuel en hématologie-oncologie pédiatrique. Bull Cancer (Paris). 1 mai 2011;98(5):541-8.
32. Dhédin N, Vernant J-P. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : réalisation et complications. EMC - Hématologie. janv 2010;5(2):1-19.
33. coziolm. Greffe de cellules souches [Internet]. Société de leucémie et de lymphome du canada. 2016 [cité 4 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.sllcanada.org/traitemet/types-de-traitement/greffe-de-cellules-souches>
34. Lewalle P, Pochon C, Michallet M, Turlure P, Brissot E, Paillard C, et al. Prophylaxie des infections post-allogreffe : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). Bull Cancer (Paris). janv 2019;106(1):S23-34.
35. Carnet national de suivi post greffe [Internet]. Société francophone de la greffe de moelle osseuse et de thérapie cellulaire. 2011 [cité 5 nov 2021]. Disponible sur:

<https://www.sfgm-tc.com/harmonisation-des-pratiques/49-organisation-de-la-greffe/147-carnet-national-de-suivi-post-greffe>

36. Bonnet-Bertholle V. Etude de la variabilité pharmacocinétique du busulfan et évaluation clinique de l'adaptation bayésienne des posologies dans le conditionnement de greffe de moelle osseuse en pédiatrie. 2006.
37. Substances Busulfan - VIDAL [Internet]. eVidal. 2021 [cité 7 nov 2021]. Disponible sur: <https://evidal-vidal-fr.lama.univ-amu.fr/substance/details/5548/busulfan.html>
38. ten Brink MH, Zwaveling J, Swen JJ, Bredius RGM, Lankester AC, Guchelaar HJ. Personalized busulfan and treosulfan conditioning for pediatric stem cell transplantation: the role of pharmacogenetics and pharmacokinetics. *Drug Discov Today*. 1 oct 2014;19(10):1572-86.
39. BUSULFAN ACCORD 6 mg/ml sol diluer p perf - VIDAL [Internet]. eVidal. 2021 [cité 7 nov 2021]. Disponible sur: https://evidal-vidal-fr.lama.univ-amu.fr/medicament/busulfan_accord_6_mg_ml_sol_diluer_p_perf-190678.html
40. Hassan M, Ljungman P, Bolme P, Ringden O, Syručková Z, Békassy A, et al. Busulfan Bioavailability. *Blood*. 1 oct 1994;84(7):2144-50.
41. Ciurea SO, Andersson BS. Busulfan in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. mai 2009;15(5):523-36.
42. MYLERAN 2 mg cp pelliculé - VIDAL [Internet]. eVidal. 2021 [cité 15 nov 2021]. Disponible sur: https://evidal-vidal-fr.lama.univ-amu.fr/medicament/myleran_2_mg_cp_pellic-11404-pharmacocinetique.html
43. Schuler US, Ehrsam M, Schneider A, Schmidt H, Deeg J, Ehninger G. Pharmacokinetics of intravenous busulfan and evaluation of the bioavailability of the oral formulation in conditioning for haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. août 1998;22(3):241-4.
44. Hassan M, Berg G, Bekassy AN, Aschan J, Ehrsson H, Ljungman P, et al. Pharmacokinetics of high-dose busulphan in relation to age and chronopharmacology. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1991;28(2):130-4.
45. Abbasi N, Vadnais B, Knutson JA, Blough DK, Kelly EJ, O'Donnell PV, et al. Pharmacogenetics of intravenous and oral busulfan in hematopoietic cell transplant recipients. *J Clin Pharmacol*. oct 2011;51(10):1429-38.
46. Krivoy N, Zuckerman T, Elkin H, Froymovich L, Rowe JM, Efrati E. Pharmacokinetic and pharmacogenetic analysis of oral busulfan in stem cell transplantation: prediction of poor drug metabolism to prevent drug toxicity. *Curr Drug Saf*. juill 2012;7(3):211-7.
47. Nilsson C, Aschan J, Hentschke P, Ringdén O, Ljungman P, Hassan M. The effect of metronidazole on busulfan pharmacokinetics in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. mars 2003;31(6):429-35.

48. Buggia I, Zecca M, Alessandrino EP, Locatelli F, Rosti G, Bosi A, et al. Itraconazole can increase systemic exposure to busulfan in patients given bone marrow transplantation. GITMO (Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo). *Anticancer Res.* août 1996;16(4A):2083-8.
49. Kuhnowski F, Camps S, Terris B, Sogni P. Syndrome d'obstruction sinusoïdale (maladie veino-occlusive). *Réanimation.* nov 2007;16(7-8):626-31.
50. Kashyap A, Wingard J, Cagnoni P, Jones R, Tarantolo S, Hu W, et al. Intravenous versus oral busulfan as part of a busulfan/cyclophosphamide preparative regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Decreased incidence of hepatic venoocclusive disease (HVOD), HVOD-related mortality, and overall 100-day mortality. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1 sept 2002;8(9):493-500.
51. Busulfan. In: LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012 [cité 22 nov 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548886/>
52. Patel R, Tadi P. Busulfan. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [cité 15 nov 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555986/>
53. McDonald GB, Hinds MS, Fisher LD, Schoch HG, Wolford JL, Banaji M, et al. Veno-occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Ann Intern Med.* 15 févr 1993;118(4):255-67.
54. Carreras E, Rosinol L. Veno-Occlusive Disease of the Liver after High-Dose Cytoreductive Therapy with Busulfan and Melphalan for Autologous Blood Stem Cell Transplantation in Multiple Myeloma Patient. *Biol Blood Marrow Transplant.* 12 janv 2007;13(12):1448-54.
55. Wang Z, Zhao M, Gao S. Epileptic Seizures After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Neurol.* 16 juill 2021;12:675756.
56. Vassal G, Deroussent A, Hartmann O, Challine D, Benhamou E, Valteau-Couanet D, et al. Dose-dependent neurotoxicity of high-dose busulfan in children: a clinical and pharmacological study. *Cancer Res.* 1 oct 1990;50(19):6203-7.
57. Kobayashi R, Watanabe N, Iguchi A, Cho Y, Yoshida M, Arioka H, et al. Electroencephalogram abnormality and high-dose busulfan in conditioning regimens for stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* févr 1998;21(3):217-20.
58. Eberly AL, Anderson GD, Bubalo JS, McCune JS. Optimal prevention of seizures induced by high-dose busulfan. *Pharmacotherapy.* déc 2008;28(12):1502-10.
59. Chan KW, Mullen CA, Worth LL, Choroszy M, Koontz S, Tran H, et al. Lorazepam for seizure prophylaxis during high-dose busulfan administration. *Bone Marrow Transplant.* juin 2002;29(12):963-5.

60. Vergnon JM, Boucheron S, Riffat J, Guy C, Blanc P, Emonot A. Pneumopathies interstitielles au busulfan. Rev Médecine Interne. sept 1988;9(4):377-83.
61. Matijasic N, Bonevski A, Tokic Pivac V, Pavic I. Busulfan-Induced Lung Injury in Pediatric Oncology Patients-Review of the Literature with an Illustrative Case. Pediatr Allergy Immunol Pulmonol. 1 sept 2019;32(3):86-91.
62. Ulrickson M, Aldridge J, Kim HT, Hochberg EP, Hammerman P, Dube C, et al. Busulfan and Cyclophosphamide (Bu/Cy) as a Preparative Regimen for Autologous Stem Cell Transplantation in Patients with Non-Hodgkin Lymphoma: A Single-Institution Experience. Biol Blood Marrow Transplant. 1 nov 2009;15(11):1447-54.
63. Crilley P, Topolsky D, Styler MJ, Bernstein E, Resnick K, Mullaney R, et al. Extramedullary toxicity of a conditioning regimen containing busulphan, cyclophosphamide and etoposide in 84 patients undergoing autologous and allogenic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. mars 1995;15(3):361-5.
64. de Tersant MD. Complication endothéliale pulmonaire après Chimiothérapie Haute Dose comportant du Busulfan. :48.
65. Yaghobi R, Ramzi M, Dehghani S. The role of different risk factors in clinical presentation of hemorrhagic cystitis in hematopoietic stem cell transplant recipients. Transplant Proc. sept 2009;41(7):2900-2.
66. Seber A, Shu XO, Defor T, Sencer S, Ramsay N. Risk factors for severe hemorrhagic cystitis following BMT. Bone Marrow Transplant. janv 1999;23(1):35-40.
67. Tsuboi K, Kishi K, Ohmachi K, Yasuda Y, Shimizu T, Inoue H, et al. Multivariate analysis of risk factors for hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. nov 2003;32(9):903-7.
68. Hassan Z, Remberger M, Svenberg P, Elbander M, Omazic B, Mattsson J, et al. Hemorrhagic cystitis: a retrospective single-center survey. Clin Transplant. oct 2007;21(5):659-67.
69. Sanders JE. Endocrine complications of high-dose therapy with stem cell transplantation. Pediatr Transplant. juin 2004;8 Suppl 5:39-50.
70. Bakker B, Oostdijk W, Bresters D, Walenkamp MJE, Vossen JM, Wit JM. Disturbances of growth and endocrine function after busulphan-based conditioning for haematopoietic stem cell transplantation during infancy and childhood. Bone Marrow Transplant. mai 2004;33(10):1049-56.
71. Faure S. Bases fondamentales en pharmacologie - science du médicament [Internet]. Elsevier Masson; 2014 [cité 29 nov 2021]. Disponible sur: <https://www-clinicalkey-com.lama.univ-amu.fr/student/content/toc/3-s2.0-C20130127523>
72. Ciccolini J, Fanciullino R. DFGSP3 - UE7 - Pharmacocinétique, toxicologie, iatrogénie et pharmacogénétique. 2017.

73. Palmer J, McCune JS, Perales M-A, Marks D, Bubalo J, Mohty M, et al. Personalizing Busulfan-Based Conditioning: Considerations from the American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines Committee. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1 nov 2016;22(11):1915-25.
74. Kebriaei P, Madden T, Kazerooni R, Wang X, Thall PF, Ledesma C, et al. Intravenous busulfan plus melphalan is a highly effective, well-tolerated preparative regimen for autologous stem cell transplantation in patients with advanced lymphoid malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* mars 2011;17(3):412-20.
75. Andersson BS, Madden T, Tran HT, Hu WW, Blume KG, Chow DS-L, et al. Acute safety and pharmacokinetics of intravenous busulfan when used with oral busulfan and cyclophosphamide as pretransplantation conditioning therapy: A phase I study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1 oct 2000;6(5, Part A):548-54.
76. Andersson BS, Thall PF, Madden T, Couriel D, Wang X, Tran HT, et al. Busulfan systemic exposure relative to regimen-related toxicity and acute graft-versus-host disease: defining a therapeutic window for i.v. BuCy2 in chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2002;8(9):477-85.
77. Slattery JT, Clift RA, Buckner CD, Radich J, Storer B, Bensinger WI, et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood.* 15 avr 1997;89(8):3055-60.
78. Andersson BS, Thall PF, Valdez BC, Milton DR, Al-Atrash G, Chen J, et al. Fludarabine with pharmacokinetically guided IV busulfan is superior to fixed-dose delivery in pretransplant conditioning of AML/MDS patients. *Bone Marrow Transplant.* avr 2017;52(4):580-7.
79. Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, Jerkunica I, Davidson TG, Gilmore CE, et al. Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant.* févr 1996;17(2):225-30.
80. Vassal G, Deroussent A, Hartmann O, Challine D, Benhamou E, Valteau-Couanet D, et al. Dose-dependent neurotoxicity of high-dose busulfan in children: a clinical and pharmacological study. *Cancer Res.* 1 oct 1990;50(19):6203-7.
81. Esteves I, Santos FPS, Ribeiro AAF, Seber A, Sugawara EK, Sobrinho JJ do N, et al. Targeted-dose of busulfan: Higher risk of sinusoidal obstructive syndrome observed with systemic exposure dose above $5000 \mu\text{Mol}\cdot\text{min}$. A historically controlled clinical trial. *Hematol Oncol.* déc 2020;38(5):773-81.
82. Russell JA, Kangarloo SB, Williamson T, Chaudhry MA, Savoie ML, Turner AR, et al. Establishing a target exposure for once-daily intravenous busulfan given with fludarabine and thymoglobulin before allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* sept 2013;19(9):1381-6.
83. Alatrash G, Kidwell KM, Thall PF, Di Stasi A, Chen J, Zope M, et al. Reduced intensity vs. myeloablative conditioning with fludarabine and PK-guided busulfan in allogeneic

- stem cell transplantation for patients with AML/MDS. *Bone Marrow Transplant.* août 2019;54(8):1245-53.
84. Nieto Y, Thall P, Valdez B, Andersson B, Popat U, Anderlini P, et al. High-dose infusional gemcitabine combined with busulfan and melphalan with autologous stem-cell transplantation in patients with refractory lymphoid malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* nov 2012;18(11):1677-86.
 85. Nieto Y, Valdez BC, Pingali SR, Bassett R, Delgado R, Nguyen J, et al. High-dose gemcitabine, busulfan, and melphalan for autologous stem-cell transplant in patients with relapsed or refractory myeloma: a phase 2 trial and matched-pair comparison with melphalan. *Lancet Haematol.* juin 2017;4(6):e283-92.
 86. Grochow LB. Busulfan disposition: the role of therapeutic monitoring in bone marrow transplantation induction regimens. *Semin Oncol.* août 1993;20(4 Suppl 4):18-25; quiz 26.
 87. Nguyen L, Fuller D, Lennon S, Leger F, Puozzo C. I.V. busulfan in pediatrics: a novel dosing to improve safety/efficacy for hematopoietic progenitor cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant.* mai 2004;33(10):979-87.
 88. El-Serafi I, Terelius Y, Twelkmeyer B, Hagbjörk A-L, Hassan Z, Hassan M. Gas chromatographic-mass spectrometry method for the detection of busulphan and its metabolites in plasma and urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 15 janv 2013;913-914:98-105.
 89. Moon SY, Lim MK, Hong S, Jeon Y, Han M, Song SH, et al. Quantification of human plasma-busulfan concentration by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann Lab Med.* janv 2014;34(1):7-14.
 90. Nadella TR, Suryadevara V, Lankapalli SR, Mandava VBR, Bandarupalli D. LC-MS/MS method development for quantification of busulfan in human plasma and its application in pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal.* 20 févr 2016;120:168-74.
 91. Lee EJ, Park N, Lee SH, Lee W, Kim HS, Chun S, et al. A Simple and Accurate Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Therapeutic Drug Monitoring of Busulfan in Plasma. *Ann Clin Lab Sci.* mars 2019;49(2):212-7.