

Université de Lausanne et Université de Genève
Ecole Romande de Pharmacie

Département d'anesthésiologie, de pharmacologie et de soins intensifs de chirurgie
Service de Pharmacie
Hôpitaux Universitaires de Genève

DOSAGE SANGUIN D'IMMUNOSUPPRESSEURS :

MISE AU POINT D'UNE METHODE D'ANALYSE

PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées en Pharmacie Hospitalière

Nicolas ANSERMOT

Genève, janvier 2004

Supervision

Dr Marc FATHI, Toxicologie Clinique, Laboratoire Central de Chimie Clinique,
Hôpitaux Universitaires de Genève.

Pr Jean-Luc VEUTHEY, Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique, Section
de Pharmacie, Université de Genève.

Remerciements

Je souhaiterais remercier vivement le Docteur Marc Fathi, chimiste responsable du Laboratoire de Toxicologie Clinique des HUG, pour son accueil, son encadrement, sa grande disponibilité ainsi que pour ses nombreux conseils aussi bien pratiques que scientifiques tout au long de ce projet.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Jean-Luc Veuthey du Laboratoire de Chimie Analytique Pharmaceutique de l'Université de Genève qui a supervisé chaleureusement et efficacement ce travail, ainsi qu'au Docteur Serge Rudaz pour son encadrement et son excellente aide scientifique dans le développement et la validation de la méthode analytique.

Je remercie également le Professeur Denis Hochstrasser, médecin chef du Laboratoire Central de Chimie Clinique des HUG, pour m'avoir fait confiance et permis de réaliser ce travail au sein de son laboratoire. Je remercie aussi tous les collaborateurs du Laboratoire de Toxicologie Clinique des HUG qui de près ou de loin m'ont permis d'avancer dans ce projet et en particulier Mlle Fabienne Jeanneret pour son aide précieuse dans l'utilisation du spectromètre de masse.

Je tiens également à remercier le Docteur Pascal Bonnabry, pharmacien chef de la pharmacie des HUG, pour son encadrement, son soutien et ses conseils toujours pertinents tout au long de ma formation au sein de sa pharmacie. J'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes collègues de la pharmacie des HUG pour la formation qu'ils ont su m'apporter, sans oublier mes collègues du DESS pour leur soutien ainsi que pour les moments de détente partagés.

Je remercie finalement mes chers parents, ma famille, mes amis et plus particulièrement mon amie Sandrine, pour leur présence ainsi que leur soutien tout au long de ces trois années de DESS.

Résumé

Le monitoring thérapeutique des immunosuppresseurs est un outil essentiel dans la prise en charge des patients après transplantation d'organes. Différents types de méthodes sont disponibles pour le dosage sanguin de ces médicaments, aussi bien selon des techniques immunologiques que chromatographiques (LC-UV, LC-MS ou LC-MS/MS). En raison de leur facilité d'emploi, les immunoessais sont largement utilisés pour le dosage de la ciclosporine et du tacrolimus (technique EMIT utilisée aux HUG). Ces techniques sont cependant très coûteuses et ne permettent pas de doser simultanément plusieurs molécules. Elles manquent surtout de spécificité en raison de réactions croisées avec certains métabolites inactifs (pour la ciclosporine et le tacrolimus), pouvant conduire chez certains types de patients (choléstase par exemple) à des surestimations des taux cliniquement significatives. Les consensus internationaux recommandent l'utilisation d'une méthode spécifique (comme la chromatographie) pour le dosage de ces médicaments. Aucun immunoessai n'est actuellement disponible pour le dosage du sirolimus, qui était initialement réalisé aux HUG par LC-MS avec une préparation de l'échantillon par extraction liquide-liquide off-line, et de son analogue l'everolimus, qui devrait être mis sur le marché prochainement et pour lequel aucune méthode de dosage n'était disponible aux HUG.

En réponse aux besoins du Laboratoire Central de Chimie Clinique (LCCC) de pouvoir disposer (1) d'une méthode spécifique et moins coûteuse pour le dosage de la ciclosporine et du tacrolimus, (2) d'une méthode comportant une préparation de l'échantillon plus rapide pour le sirolimus et (3) d'une nouvelle méthode pour l'everolimus, nous avons développé et validé une méthode spécifique par LC-MS permettant de doser simultanément ces quatre médicaments dans le sang complet. Le système de préparation de l'échantillon développé, qui consistait en une précipitation des protéines suivie d'une extraction on-line en phase solide selon un système de commutation de colonnes, était rapide et permettait d'automatiser le processus afin de le rendre compatible avec la quantité importante d'échantillons analysés chaque jour au laboratoire.

Des échantillons sanguins provenant de patients transplantés ont ensuite été analysés à l'aide de la méthode développée. La comparaison des résultats avec ceux obtenus à partir de la technique EMIT utilisée en routine a mis en évidence une surestimation par l'immunoessai des taux réels en molécule active s'élevant en moyenne à 23% pour la ciclosporine (n=38) et à 30% pour le tacrolimus (n=41). Ces écarts confirment les observations effectuées par d'autres auteurs et illustrent la nécessité de doser ces médicaments à l'aide d'une méthode spécifique.

La méthode développée est actuellement utilisée en routine avec satisfaction pour le dosage du sirolimus, ce qui devrait aussi se faire prochainement avec l'analyse de la ciclosporine et du tacrolimus, après évaluation clinique de l'impact sur l'interprétation des résultats, avec notamment une adaptation des marges thérapeutiques. Cette méthode pourrait également servir d'outil à d'éventuelles études pharmacocinétiques futures et être exportée vers d'autres laboratoires cliniques.

TABLE DES MATIÈRES

1. Pharmacologie des immunosuppresseurs	1
1.1. Introduction	1
1.2. Mode d'action et effets	2
1.2.1. Inhibiteurs de la calcineurine	2
1.2.2. Inhibiteurs de la mTOR	3
1.2.3. Antimétabolites	4
1.2.4. Corticostéroïdes	5
1.2.5. Anticorps polyclonaux et monoclonaux	6
1.3. Pharmacocinétique	6
1.3.1. Ciclosporine	6
1.3.2. Tacrolimus	8
1.3.3. Sirolimus	10
1.3.4. Everolimus	12
1.3.5. Mycophénolate mofétil	13
1.3.6. Azathioprine	15
1.4. Monitoring Thérapeutique	17
1.4.1. Ciclosporine	18
1.4.2. Tacrolimus	20
1.4.3. Sirolimus	21
1.4.4. Everolimus	21
1.4.5. Mycophénolate mofétil	22
1.4.6. Azathioprine	23
1.5. Effets indésirables	23
1.5.1. Ciclosporine	23
1.5.2. Tacrolimus	24
1.5.3. Sirolimus et everolimus	24
1.5.4. Mycophénolate mofétil	25
1.5.5. Azathioprine	25
1.5.6. Anticorps antilymphocytaires	26
1.6. Interactions	26
1.6.1. Ciclosporine et tacrolimus	26
1.6.2. Sirolimus et everolimus	29
1.6.3. Mycophénolate mofétil	30
1.6.4. Azathioprine	30
1.6.5. Anticorps antilymphocytaires	30
1.7. Utilisation clinique	30
1.7.1. Traitement préventif du rejet de greffe	31
1.7.2. Traitement curatif du rejet de greffe	32
1.7.3. Transplantation de moelle osseuse	33

2. Techniques de dosage des immunosuppresseurs	34
2.1. Introduction	34
2.2. Techniques immunologiques	34
2.2.1. Ciclosporine	36
2.2.2. Tacrolimus	38
2.2.3. Mycophénolate mofétil	40
2.3. Méthodes chromatographiques	41
2.3.1. Préparation de l'échantillon	41
2.3.2. Exemple de spectromètre de masse	45
2.3.3. Ciclosporine	47
2.3.4. Tacrolimus	49
2.3.5. Sirolimus	50
2.3.6. Everolimus	51
2.3.7. Mycophénolate mofétil	52
2.3.8. Dosage simultané de plusieurs immunosuppresseurs	53
2.4. Conclusion	54
3. Objectifs du travail	55
4. Matériel	57
4.1. Appareillage	57
4.1.1. Identification	57
4.2. Produits chimiques et biologiques	57
4.2.1. Identification	57
4.2.2. Caractéristiques physico-chimiques	58
4.2.3. Préparation des solutions mères	61
5. Mise au point de la détection par spectrométrie de masse	62
5.1. Méthodes	62
5.1.1. Détermination du type d'adduit formé	62
5.1.2. Détermination des conditions optimales d'ionisation	62
5.2. Résultats et discussion	64
5.2.1. Détermination du type d'adduit formé	64
5.2.2. Détermination des conditions optimales d'ionisation	67
5.3. Conclusion	71

6. Mise au point de la séparation par chromatographie liquide	72
6.1. Méthode	72
6.2. Résultats et discussion	73
6.2.1. Colonne XTerra™ MS C18 5µm, 2,1 x 50 mm	73
6.2.2. Colonne Nucleodur® C18 Gravity 5µm, 2 x 125 mm	74
6.2.3. Colonne Alltima® C18 5µm, 2,1 x 150 mm	75
6.3. Conclusion	75
7. Etude préliminaire à l'aide d'une méthode par extraction liquide-liquide off-line	76
7.1. Objectifs	76
7.2. Méthode	76
7.2.1. Procédure d'analyse	76
7.2.2. Spécificité	77
7.2.3. Fonction de réponse et linéarité	78
7.2.4. Estimation de la limite de détection et de quantification	78
7.2.5. Rendement d'extraction absolu	79
7.3. Résultats et discussion	79
7.3.1. Spécificité	79
7.3.2. Fonction de réponse et linéarité	81
7.3.3. Estimation de la limite de détection et de quantification	82
7.3.4. Rendement d'extraction absolu	84
7.4. Conclusion	85
8. Mise au point de la méthode par extraction on-line en phase solide	86
8.1. Objectifs	86
8.2. Principe	86
8.3. Préparation de l'échantillon	88
8.3.1. Choix du réactif de précipitation des protéines	88
8.3.2. Procédure de préparation de l'échantillon	90
8.4. Mise au point du système d'extraction on-line	90
8.4.1. Méthodes	90
8.4.2. Résultats et discussion	94
8.5. Couplage de l'extraction à la séparation chromatographique	98
8.5.1. Méthode	98
8.5.2. Résultats et discussion	98
8.6. Comparaison avec deux méthodes similaires	100

9. Prévalidation de la méthode par extraction on-line en phase solide	101
9.1. Méthodes	101
9.1.1. Conditions opératoires	101
9.1.2. Spécificité	101
9.1.3. Suppression de signal	101
9.1.4. Effet mémoire	102
9.1.5. Estimation de la limite de détection et de quantification	102
9.1.6. Estimation de la linéarité et de la fonction de réponse	102
9.1.7. Stabilité du signal MS	102
9.2. Résultats et discussions	103
9.2.1. Spécificité	103
9.2.2. Suppression de signal	108
9.2.3. Effet mémoire	109
9.2.4. Estimation de la limite de détection et de quantification	109
9.2.5. Estimation de la linéarité et de la fonction de réponse	109
9.2.6. Stabilité du signal MS	110
9.3. Conclusion	112
10. Validation de la méthode par extraction on-line en phase solide	113
10.1. Méthode	113
10.1.1. Objectifs	113
10.1.2. Protocole de validation	113
10.1.3. Fonction de réponse et linéarité	114
10.1.4. Limite de quantification	114
10.1.5. Justesse	115
10.1.6. Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	115
10.1.7. Stabilité des échantillons sanguins	115
10.2. Résultats et discussion	116
10.2.1. Tacrolimus	116
10.2.2. Sirolimus	118
10.2.3. Everolimus	120
10.2.4. Ciclosporine A	122
10.3. Conclusion	125

11. Echantillons réels et comparaison de méthodes	126
11.1. Objectifs	126
11.2. Méthode	126
11.3. Résultats et discussion	128
11.3.1. Sirolimus	128
11.3.2. Tacrolimus	129
11.3.3. Ciclosporine A	130
11.4. Conclusion	131
12. Conclusion et Perspectives	132
13. Bibliographie	134
14. Annexe	148
14.1. Procédure d'analyse	148

1. PHARMACOLOGIE DES IMMUNOSUPPESSEURS

1.1. Introduction

L'espérance de vie des patients après transplantation d'organes a nettement augmenté ces dernières décennies, non seulement en raison des progrès réalisés dans les techniques chirurgicales et dans les soins post-opératoires des patients, mais également suite au développement de nouveaux agents immunosuppresseurs résultant d'une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse immunitaire (Hariharan 2000, Hong 2000). Le tableau 1.1. présente les différents médicaments immunosuppresseurs utilisés dans le cadre de la transplantation d'organes.

Tableau 1.1. Médicaments immunosuppresseurs

Principe actif	Nom commercial (CH)	Forme galénique	Dosage
Inhibiteurs de la calcineurine			
ciclosporine A	Sandimmun®	Concentré pour perf iv	50 mg/ml
	Sandimmun Neoral®	Capsules	10, 25, 50 et 100 mg
		Solution buvable	100 mg/ml
tacrolimus	Ciclosol®	Capsules	25, 50 et 100 mg
	Prograf®	Concentré pour perf iv	5 mg/ml
		Capsules	0,5, 1 et 5 mg
Inhibiteurs de la mTOR			
sirolimus	Rapamune®	Comprimés	1 et 2 mg
		Solution buvable	1 mg/ml
everolimus	Certican®	Comprimés (commercialisation prévue pour 2004)	
Antimétabolites			
azathioprine	Imurek®	Solution injectable	50 mg/5 ml
		Comprimés	25 et 50 mg
	Azarek®	Comprimés	25 et 50 mg
mycophénolate mofétil	CellCept®	Capsules	250 mg
		Comprimés	500 mg
		Suspension	200 mg/ml
acide mycophénolique	Myfortic®	Cp. gastro-résistants	180 et 360 mg
Principaux corticostéroïdes utilisés en transplantation			
prednisone	Prednisone Streuli/-Galepharm	Comprimés	1, 5, 20 et 50 mg
méthyl-prednisolone	Medrol®	Comprimés	4, 16, 32 et 100 mg
	Solu-Medrol®	Solutions injectables	40, 125, 250, 500, 1000 et 2000 mg/ml

Anticorps polyclonaux et monoclonaux			
anticorps anti-lymphocytaires	Atgam [®] , ATG-Fresenius [®] , Lymphoglobuline [®] , Thymoglobuline [®]	Solutions injectables	Divers
muromonab-CD3	Othoclone OKT [®] 3	Solution injectable	5 mg/5 ml
basiliximab	Simulect [®]	Solutions injectables	10 et 20 mg/5 ml
daclizumab	Zenapax [®]	Solution injectable	25 mg/5 ml

1.2. Mode d'action et effets

1.2.1. Inhibiteurs de la calcineurine

Les inhibiteurs de la calcineurine, à savoir la **ciclosporine A** et le **tacrolimus**, sont actuellement les médicaments centraux de la plupart des thérapies immunosuppressives mises en place après transplantation d'organes. La ciclosporine, polypeptide cyclique dérivé du champignon *Tolypocladium inflatum gams*, a été introduite dans la pratique clinique en 1983 et a provoqué une grande révolution en transplantation (Kahan 2001a). Le tacrolimus, initialement connu sous le nom de FK506, a été commercialisé en 1996. Il s'agit d'un macrolide dérivé du *Streptomyces tsukubaensis* dont l'activité immunosuppressive est 10 à 100 fois plus puissante que celle de la ciclosporine (Undre 1999).

Les effets de ces substances découlent principalement de leur liaison à des récepteurs cytoplasmiques lymphocytaires (immunophilines) qui sont la cyclophiline pour la ciclosporine et la FK-binding protein (FKBP) pour le tacrolimus (figure 1.1.). Les complexes ainsi formés vont inhiber la calcineurine, une enzyme clé dans la cascade de signalisation intracellulaire activée lors de stimulation antigénique. Il en résulte un blocage de la déphosphorylation du NFAT (nuclear factor of activated T cells), empêchant ainsi son entrée dans le noyau et par conséquent la stimulation de la transcription du gène de l'interleukine-2 (IL-2). Il en découle une inhibition de la production de cette cytokine qui est un facteur de stimulation de la prolifération des lymphocytes T, principaux acteurs impliqués dans le mécanisme du rejet de greffe (Denton 1999).

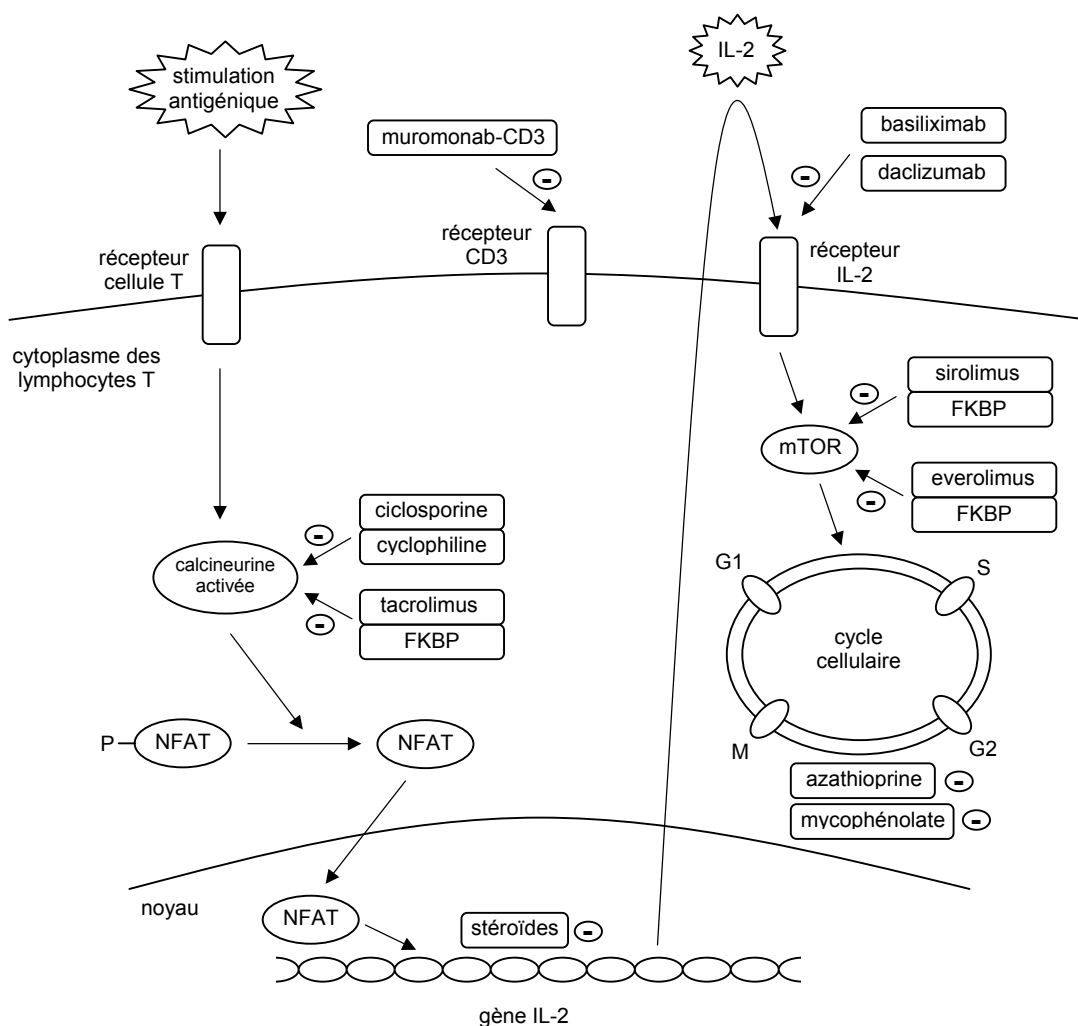


Figure 1.1. Sites d'action des immunosuppresseurs (voir textes pour explications)

1.2.2. Inhibiteurs de la mTOR

Le premier représentant de cette catégorie d'immunosuppresseurs est le **sirolimus**. Ce composé est un antibiotique macrocyclique initialement connu sous le nom de rapamycine et produit par le *Streptomyces hygroscopicus*. Il a été isolé pour la première fois à partir d'échantillons de sol collectés à l'île de Pâques (Rapa Nui) au début des années 1970 dans le cadre de la recherche de nouveaux agents antifongiques. Cette molécule a tout d'abord montré une activité particulièrement puissante chez l'animal contre la levure *Candida albicans*, ainsi qu'une activité immunosuppressive dans des modèles de maladies auto-immunes chez le rat. Ce n'est que bien plus tard que son activité pour la prévention du rejet de greffe a été investiguée, après qu'un composé structurellement similaire, le tacrolimus, ait

démontré une activité immunosuppressive puissante. En 1995, la rapamycine prend le nom de sirolimus et la marque Rapamune® est déposée par les laboratoires Wyeth. L'élucidation de son activité immunosuppressive puissante ainsi que l'identification d'un important synergisme pharmacologique avec d'autres immunosuppresseurs, amènent la FDA à approuver son utilisation lors de greffes rénales en 1999 (Napoli 2001). Il obtient l'autorisation de mise sur le marché suisse en 2000. Le sirolimus est devenu un important composant de l'arsenal immunosuppresseur, avec une utilité se situant au niveau de la diminution de la toxicité des autres agents immunosuppresseurs par une réduction de leurs doses, tout en maintenant une activité immunosuppressive suffisante, à des concentrations inférieures à celles provoquant son propre spectre de toxicité (Napoli 2001).

Le deuxième inhibiteur de la mTOR est l'**everolimus** qui est également connu sous le nom de SDZ-RAD. Il s'agit du dérivé 40-O-(2-hydroxyethyl) du sirolimus, dont la commercialisation est prévue pour 2004 (Sedrani 1998).

Alors que les inhibiteurs de la calcineurine bloquent la libération d'IL-2 par les lymphocytes T, les inhibiteurs de la mTOR (mammalian target of rapamycine), à savoir le sirolimus et l'everolimus, bloquent la réponse des lymphocytes T à cette cytokine. Ces agents se lient comme le tacrolimus à la FKBP, mais le complexe formé agit différemment en bloquant la mTOR qui est un facteur de la signalisation intracellulaire déclenché par la stimulation du récepteur à l'IL-2. Il en résulte une inhibition de la progression du cycle cellulaire de la phase G₁ à S avec pour conséquence un arrêt de la prolifération des lymphocytes (Sehgal 1998, Denton 1999).

1.2.3. Antimétabolites

Les expérimentations initiales réalisées au début du siècle passé utilisant des agents cytotoxiques (benzene, toluene, irradiations) dans le but d'interrompre la réponse immunitaire, ont ouvert la porte à l'utilisation d'agents antimétabolites dans le cadre de thérapie immunosuppressive après transplantation d'organes, dont le premier représentant apparu vers la fin des années 1950 était la 6-mercaptopurine (6-MP). Cette molécule présentait une biodisponibilité assez faible avec une grande variabilité interindividuelle. L'apparition de l'**azathioprine**, dérivé nitro-imidazolé de la 6-MP, en 1961, a permis de remédier à ces problèmes et a révolutionné la transplantation (Hong 2000). Pendant près de 20 ans, la combinaison de cette molécule avec des corticostéroïdes et des anticorps

polyclonaux anti-lymphocytaires a servi de thérapie immunosuppressive chez la plupart des patients transplantés. Aujourd'hui, l'azathioprine est généralement utilisée en combinaison avec un inhibiteur de la calcineurine et des corticostéroïdes. A noter que la 6-MP (Puri-Nethol®) a encore sa place actuellement dans le traitement de certaines leucémies (Johnston 1999, Gaston 2001).

L'azathioprine est un pré-médicament qui est rapidement converti en 6-MP puis en une série de métabolites intracellulaires dont les actions principales se situent au niveau du blocage de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) et de la phosphoribosyl-pyrophosphate aminotransférase qui sont des enzymes clé dans la synthèse *de novo* des bases puriques. Certains métabolites agissent également par incorporation frauduleuse dans l'ADN. Il en résulte un effet cytostatique par blocage de la réplication de l'ADN ayant pour conséquence l'inhibition de nombreuses fonctions lymphocytaires (Suthanthiran 1996, Hong 2000, Kelly 2002).

Un nouvel agent antimétabolite, le **mycophénolate mofétil** (MMF), a été commercialisé en 1995. Il s'agit d'un pré-médicament de l'acide mycophénolique (MPA), composé actif isolé à partir du *Penicillium glaucum*. Ce médicament agit par inhibition non compétitive et réversible de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) et de la guanylate synthétase, résultant en un blocage de la synthèse *de novo* de la guanine. Les lymphocytes B et T sont hautement dépendants de cet apport pour leur prolifération, tandis que d'autres cellules peuvent obtenir de la guanine à partir de voies de récupération. Il en découle une inhibition de la prolifération des lymphocytes ainsi que de leurs fonctions qui incluent la formation d'anticorps, l'adhésion cellulaire et la migration. Le MMF présente une meilleure sélectivité vis-à-vis des lymphocytes que l'azathioprine (Shaw 1995, Ransom 1995, Hong 2000, Hardman 2001, Pascual 2002).

1.2.4. Corticostéroïdes

L'introduction des corticostéroïdes en tant que traitement immunosuppresseur dans les années 1960 a été un élément clé de la thérapie après transplantation d'organes. Les principaux représentants utilisés dans ce contexte sont la **prednisone** et la **méthylprednisolone**. Ces molécules agissent par une diminution de l'expression des gènes codant pour les cytokines, interrompant ainsi l'activation des lymphocytes T et l'atteinte tissulaire médiée par les macrophages. Les corticostéroïdes produisent également des effets

anti-inflammatoires non spécifiques et des effets antiadhésion pouvant contribuer à l'immunosuppression (Denton 1999).

1.2.5. Anticorps polyclonaux et monoclonaux

Vers la fin des années 1960 sont apparus les premiers **anticorps polyclonaux anti-lymphocytaires**. Ces derniers sont obtenus à partir de sérums de lapins ou de chevaux immunisés par des lymphocytes T humains. Après administration au patient, ces anticorps vont diminuer le nombre de lymphocytes en circulation, s'opposant de ce fait à la réponse immunitaire (Gummert 1999, Hong 2000). Ces agents présentent le désavantage de provoquer une immunosuppression non spécifique et leur efficacité et toxicité peuvent varier d'un lot à l'autre.

En 1981 a été commercialisé le premier anticorps monoclonal, le **muromonab-CD3**, de type murin, dont la spécificité porte sur le récepteur CD3 présent sur les lymphocytes T. Sa liaison provoque la modulation et l'inactivation immunologique des cellules CD3+ impliquées dans le processus de rejet de greffe. L'obstacle principal de cette thérapie réside dans le fait qu'environ 50% des patients produisent des anticorps contre les anticorps administrés avec pour conséquence une résistance au traitement (Hong 2000).

Un nouveau type d'anticorps a été mis sur le marché en 1998, il s'agit d'anticorps monoclonaux recombinant dont les représentants sont le **basiliximab** (chimérique murin/humain) et le **daclizumab** (humain). Ces derniers se lient spécifiquement au récepteur à l'IL-2 sur les lymphocytes T activés suite à une stimulation antigénique. La fixation de l'IL-2 s'en trouve ainsi inhibée avec pour conséquence un blocage de l'activation de la prolifération de ces cellules (Gummert 1999, Taylor DO 2000).

1.3. Pharmacocinétique

1.3.1. Ciclosporine

La ciclosporine était initialement disponible sous forme d'une préparation huileuse (Sandimmun®) dont l'absorption intestinale était mauvaise, dépendante de la bile et dont il existait une forte variabilité intra- et inter-individuelle. Ces inconvénients ont pu être en partie

améliorés par l'introduction en 1995 de la microémulsion préconcentrée (Sandimmun Neoral®) dont la biodisponibilité s'élève à environ 50-60% (Billaud 2000, Hong 2000).

La ciclosporine est distribuée largement à travers l'organisme, son volume de distribution se situe entre 3 et 5 l/kg d'après une estimation à partir des taux sanguins (Dunn 2001). Dans le sang, elle est répartie entre 41-58% dans les érythrocytes, 4-9% dans les lymphocytes, 4-12% dans les granulocytes et 33-47% dans le plasma. Aux concentrations élevées, l'absorption par les érythrocytes et les leucocytes est saturée. Dans le plasma, la ciclosporine se fixe à environ 90-98% aux protéines, principalement aux lipoprotéines (85-90%) (Hong 2000, McEvoy 2003).

La ciclosporine est fortement métabolisée par le CYP 3A4 (>99%), majoritairement au niveau hépatique et dans une moindre mesure dans la paroi intestinale, avec formation de plus de 30 métabolites différents par hydroxylation, déméthylation et cyclisation, tout en conservant sa structure cyclique (figure 1.2.). Les métabolites sont désignés par A pour ciclosporine A, puis M pour métabolite et finalement par un numéro indiquant l'acide aminé sur lequel se produit la modification. L'utilisation de 2 numéros indique une transformation similaire à deux emplacements. Lorsque ni un n (qui désigne une N-déméthylation) ou un c (qui désigne une cyclisation) n'est indiqué, il s'agit d'une hydroxylation (Maurer 1984, Copeland 1990a, 1990b et 1990c, Yatscoff 1991, Christians 1991a et 1991b). Les métabolites principaux rencontrés dans le sang sont l'AM1, AM4N et AM9 qui comptent respectivement pour 70%, 21% et 7,5% de l'aire sous la courbe de la concentration sanguine (ASC) de la ciclosporine (Dunn 2001). Aux taux résiduels, des concentrations en hydroxy-ciclosporine supérieures à celles de la ciclosporine ont été observées (Kirchner 2000). Certains métabolites sont actifs, le principal est l'AM1, suivi de l'AM9, qui ont une activité immunosuppressive correspondant à 10-20% de celle de la molécule mère (Tsunoda 1996, Kelly 2002). Il a été montré que l'augmentation des concentrations de AM1 et AM19 était liée à la néphrotoxicité (, Wong 2001). D'après les données disponibles, il n'est pas possible de savoir si la mesure spécifique individuelle des métabolites est cliniquement significative.

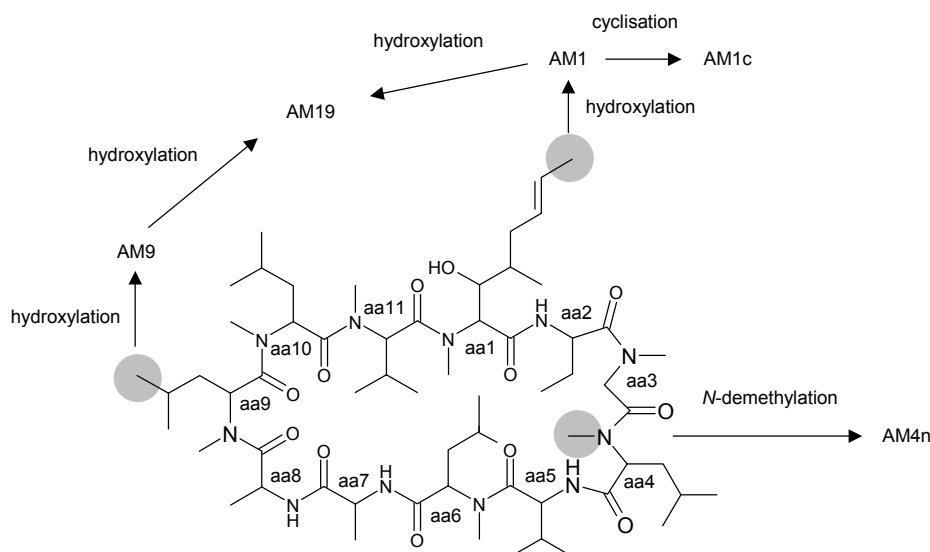


Figure 1.2. Principaux sites de métabolisation de la ciclosporine. D'autres métabolites sont formés par métabolisation supplémentaire des métabolites primaires.

Plus de 90% des métabolites sont excrétés dans la bile et seulement 6% dans l'urine. On retrouve moins de 1% de forme inchangée dans la bile (Kelly 2002). Les concentrations de ciclosporine déclinent généralement de manière biphasique avec une demi-vie d'élimination terminale se situant entre 5-18 h. Cette demi-vie relativement courte nécessite une prise biquotidienne (Wong 2001). Le tableau 1.3. en fin de chapitre présente un résumé des principales caractéristiques pharmacocinétiques des différents immunosuppresseurs.

1.3.2. Tacrolimus

L'absorption du tacrolimus après administration par voie orale est sujette à une grande variation, avec une concentration sanguine maximale atteinte après environ 1,5 h (0,5-4h) et une biodisponibilité variant entre 6 et 43% (Undre 1999, Wong 2001). L'absorption est diminuée lorsque le médicament est pris avec les repas (Trull 1998). Cette variabilité requiert une individualisation du dosage afin d'atteindre l'exposition systémique souhaitée.

Le tacrolimus est lié entre 92-98% aux érythrocytes, cette répartition dépend de la concentration, de la température et de l'hématocrite (Trull 1998, Wong 2001). La portion présente dans le plasma est liée à 99% principalement à l'albumine et à l' α -1-glycoprotéine acide (Undre 1999). Le tacrolimus est largement distribué dans l'organisme avec un volume

de distribution apparent d'environ de 2,5 l/kg d'après une estimation à partir des taux sanguins (Regazzi 1999).

Le tacrolimus systémique est métabolisé à plus de 99%, principalement par le CYP 3A4 au niveau hépatique. Cette isoenzyme est également présente au niveau de la paroi intestinale et il a été estimé qu'elle était responsable d'une métabolisation présystémique d'environ 50% de la dose (Undre 1999). Huit métabolites ont été mis en évidence à partir de microsomes hépatiques de rat (tableau 1.2. et figure 1.3.), une activité immunosuppressive *in vitro* équivalente à celle de la molécule mère a été mise en évidence avec le M-II, les autres métabolites ont montré une activité très faible ou négligeable (Christians 1991c, Iwasaki 1993 et 1995). Dans le sang de patients transplantés rénal ou hépatique, les principaux métabolites retrouvés étaient le demethyl-, demethyl-hydroxy-, di-demethyl-, di-demethyl-hydroxy- et hydroxy-tacrolimus qui ont compté en moyenne pour 43% (0-152%) de la concentration en tacrolimus (Gonschior 1995 et 1996, Liu 1998).

Tableau 1.2. Métabolites du tacrolimus isolés à partir de microsomes hépatiques de rat et activité immunosuppressive *in vitro* (d'après Iwasaki 1995)

Tacrolimus et métabolites		Activité immunosuppressive in vitro, IC50 (ng/ml)
Tacrolimus		0.11
M-I	13-O-demethyl-	1.71
M-II	31-O-demethyl-	0.11
M-III	15-O-demethyl-	>1000
M-IV	12-hydroxy-	3.13
M-V	15,31-O-di-demethyl-	>1000
M-VI	13,31-O-di-demethyl-	8.78
M-VII	13,15-O-di-demethyl-	>1000
M-VIII	31-demethyl et cyclisation de 19 à 22	15.27

Les métabolites étant excrétés majoritairement par la bile (> 95%) avec moins de 2% retrouvés dans l'urine, l'insuffisance rénale n'influence pas la pharmacocinétique du tacrolimus (Trull 1998, Wong 2001). La demi-vie d'élimination du tacrolimus est sujette à une grande variabilité, elle est de 12-15 h en moyenne, ce qui requiert une prise du médicament deux fois par jour. Des temps de demi-vie plus élevés ont également été observés (Venkataramanan 1995).

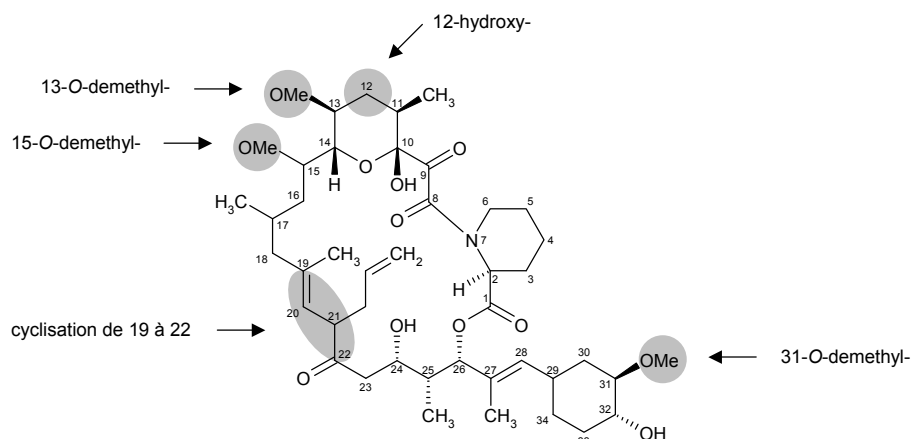


Figure 1.3. Principaux sites de métabolisation du tacrolimus. D'autres métabolites sont formés par métabolisation supplémentaire des métabolites primaires.

1.3.3. Sirolimus

Le sirolimus est rapidement absorbé par voie orale, avec une concentration sanguine maximale atteinte après 0,7-3 h (Zimmerman 1997). La biodisponibilité orale apparente a été estimée à environ 15% en raison d'une métabolisation intestinale et hépatique importante, chez des patients recevant simultanément de la ciclosporine microémulsion. Une diminution d'environ 1/3 a été observée lorsque les deux médicaments étaient pris séparément. Cette différence peut être expliquée par une saturation par la ciclosporine des CYP 3A4 et du contre transport réalisé par la glycoprotéine P (P-gp) (Napoli 2001, Wong 2001).

En raison de sa liposolubilité, le sirolimus est largement distribué au niveau des membranes lipidiques des tissus corporels et des érythrocytes, impliquant un large volume de distribution apparent s'élevant à environ 1,7 l/kg d'après une estimation à partir des taux sanguins (Wong 2001). Dans le sang complet, 95-97% de la substance est distribuée dans les érythrocytes, 3% dans plasma, 1% dans les lymphocytes et 1% dans les granulocytes. Cette séquestration à l'intérieur des érythrocytes serait due en tout cas en partie à leur contenu abondant en immunophilines. Contrairement à la ciclosporine et au tacrolimus, cette distribution intra-érythrocytaire n'est pas dépendante de la concentration ni de la température (Yatscoff 1995, Mahalati 2001). Dans la fraction plasmatique, environ 2,5% se trouve sous forme libre, le reste étant lié aux protéines (40% aux lipoprotéines), ainsi moins de 0,1% du sirolimus total circule sous forme libre. Le relativement faible degré de liaison avec les

lipoprotéines par rapport à la ciclosporine pourrait expliquer la faible influence de la température sur la distribution intraérythrocytaire (Napoli 2001).

Le sirolimus est métabolisé principalement par le CYP 3A4 (Sattler 1992) et il existe une grande variabilité interindividuelle. A l'aide de microsomes hépatiques humains, 12 métabolites ont été isolés avec une proposition de structure pour 10 (46-, 24-, 25-, 12-, 11-, 14- et 49-hydroxy- ainsi que 39-O-, 27-O- et 16-O-demethyl-sirolimus), le 39-O-demethyl- était le métabolite principal (figure 1.4.) (Jacobsen 2001). Dans le sang de patients greffés rénal, les métabolites hydroxy-, demethyl-, di-hydroxy- et di-demethyl-sirolimus ont été identifiés, les deux premières formes étant majoritaires. Selon les études, la concentration cumulée en métabolites au taux résiduels allait de 1/3 à une valeur supérieure à la concentration en sirolimus (Streit 1996, Kirchner 2001). Certains métabolites ont une activité immunosuppressive correspondant au maximum à 10% de celle de la molécule mère (Christians 1992a, Goodyear 1996, Nickmilder 1998).

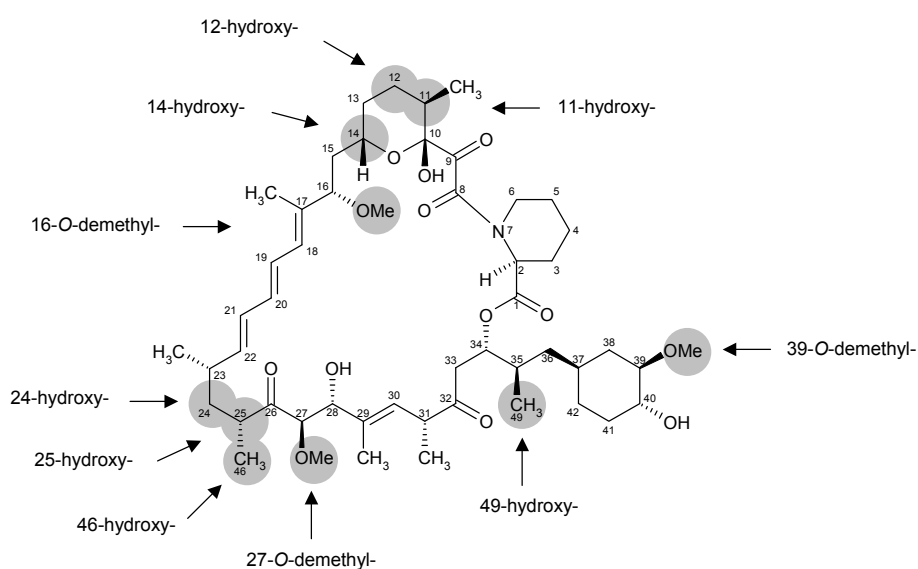


Figure 1.4. Principaux sites de métabolisation du sirolimus. D'autres métabolites sont formés par métabolisation supplémentaire des métabolites primaires.

Les métabolites sont excrétés en majorité par la bile avec 91% de la quantité retrouvée dans les selles et seulement 2% dans l'urine. De manière similaire à la ciclosporine et au tacrolimus, les troubles de la fonction hépatique ont pour conséquence une augmentation des concentrations de sirolimus et de ses métabolites (Mahalati 2001). La demi-vie

d'élimination est de 62 ± 16 h chez des patients recevant également de la ciclosporine et de la prednisone (Zimmerman 1997). La longue demi-vie nécessite une dose de charge pour atteindre rapidement les concentrations à l'état d'équilibre, mais cette molécule présente l'avantage par rapport à la ciclosporine et au tacrolimus de pouvoir être administrée en une dose journalière unique (Mahalati 2001).

1.3.4. Everolimus

L'everolimus est absorbé rapidement avec des concentrations sanguines maximales atteintes après environ 1,5 h (Kirchner 2000). La biodisponibilité est similaire à celle du sirolimus, avec une forte métabolisation pré-systémique (Kelly 2002). Il semble que cette molécule présente moins de variabilité intra-individuelle au niveau des concentrations sanguines que le sirolimus (Kahan 2002). Le volume de distribution est d'environ 1,5 l/kg d'après les taux sanguins chez des patients transplantés rénal recevant également de la ciclosporine et de la prednisone (Kovarik 2001a). L'everolimus est lié à plus de 75% aux érythrocytes (Kovarik 2001b).

L'everolimus est métabolisé majoritairement par le CYP 3A4, principalement par demethylation et hydroxylation. Treize métabolites ont été mis en évidence à partir de microsomes hépatiques humains et une structure a été proposée pour 11 d'entre eux (figure 1.5.), il s'agit du 46-, 24-, 25-, 12-, 11-, 14- et 49-hydroxy- et du 39-O-, 27-O- et 16-O-demethyl- ainsi que du 40-O-dehydroxyethyl-everolimus (= sirolimus). La formation de sirolimus était une voie mineure et ne comptait que pour 5% de tous les métabolites, indiquant que l'everolimus n'est pas un pré-médicament du sirolimus. Les sites de métabolisation étaient similaires à ceux du sirolimus, mais des différences ont été observées quant aux proportions des différents métabolites formés, avec notamment une formation beaucoup plus faible de la forme 39-O-demethyl- qui est majoritaire pour le sirolimus (Jacobsen 2001). Dans le sang de patients transplantés rénal, le métabolite principal identifié était l'hydroxy- qui a compté pour la moitié de l'ASC de l'everolimus, suivi du demethyl- et du dihydroxy- (Kirchner 2000).

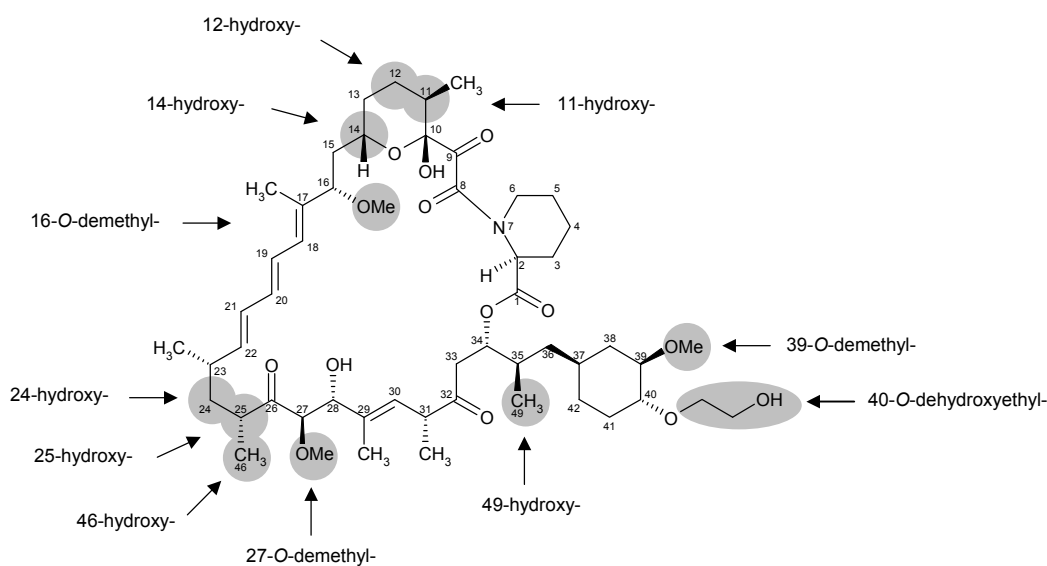


Figure 1.5. Principaux sites de métabolisation de l'everolimus. D'autres métabolites sont formés par métabolisation supplémentaire des métabolites primaires.

Selon les études, des demi-vies d'élimination de 16-19 h et de 24-35 h ont été rapportées chez des patients transplantés rénal (Kahan 1999, Neumayer 1999). La demi-vie d'élimination de l'everolimus plus courte que celle du sirolimus nécessite la prise du médicament deux fois par jour (Hong 2000). Les métabolites sont éliminés en majorité par la bile.

1.3.5. Mycophénolate mofétil

Le mycophénolate mofétil (MMF) est le pré-médicament 2-morpholinoethyl-ester de l'acide mycophénolique (MPA). Après administration, le MMF est rapidement hydrolysé par des estérases en MPA, le composé actif. Le MMF est rapidement absorbé après administration par voie orale et une concentration plasmatique maximale en MPA est atteinte après 0,5-1,3 h (Wong 2001, Kelly 2002). La biodisponibilité est de 94% environ (Bullingham 1998). La prise concomitante d'aliments diminue la concentration plasmatique maximale de 40% et il est recommandé de prendre ce médicament avant les repas. La pharmacocinétique du MPA montre une grande variabilité intra- et inter-patients (Shaw 1998a et 2001).

Le volume de distribution apparent est d'environ 4 l/kg (Wong 2001). Le MPA est lié à l'albumine sérique à 97-99%. En cas d'insuffisance rénale, la liaison aux protéines

plasmatiques peut diminuer avec pour résultat une augmentation de la fraction libre de MPA qui détermine l'activité immunosuppressive (Shaw 2001a et 2001b).

Le MPA est métabolisé principalement au niveau hépatique par l'UDP-glucuryltransférase en conjugué 7-O-glucuronide de l'acide mycophénolique (MPAG) avec perte de l'activité immunosuppressive (figure 1.6.). Au niveau plasmatique, il existe un équilibre dynamique entre la MPA et le MPAG. Ce dernier est éliminé majoritairement par voie rénale (96%). La petite fraction éliminée dans les selles via la bile est déglucuronidée au niveau intestinal et réabsorbée sous forme de MPA, formant un cycle entéro-hépatique (Shaw 1998b). Une accumulation de MPA a été observée chez les patients présentant une insuffisance rénale (Kelly 2002). Deux métabolites minoritaires ont également été observés dans le plasma, il s'agit du conjugué 7-O-glucoside et de la forme acyl-glucuronide (AcMPAG) pharmacologiquement active. La relevance clinique de ce métabolite nécessite des études complémentaires. La demi-vie d'élimination du MPA est d'environ 17 h (Wong 2001).

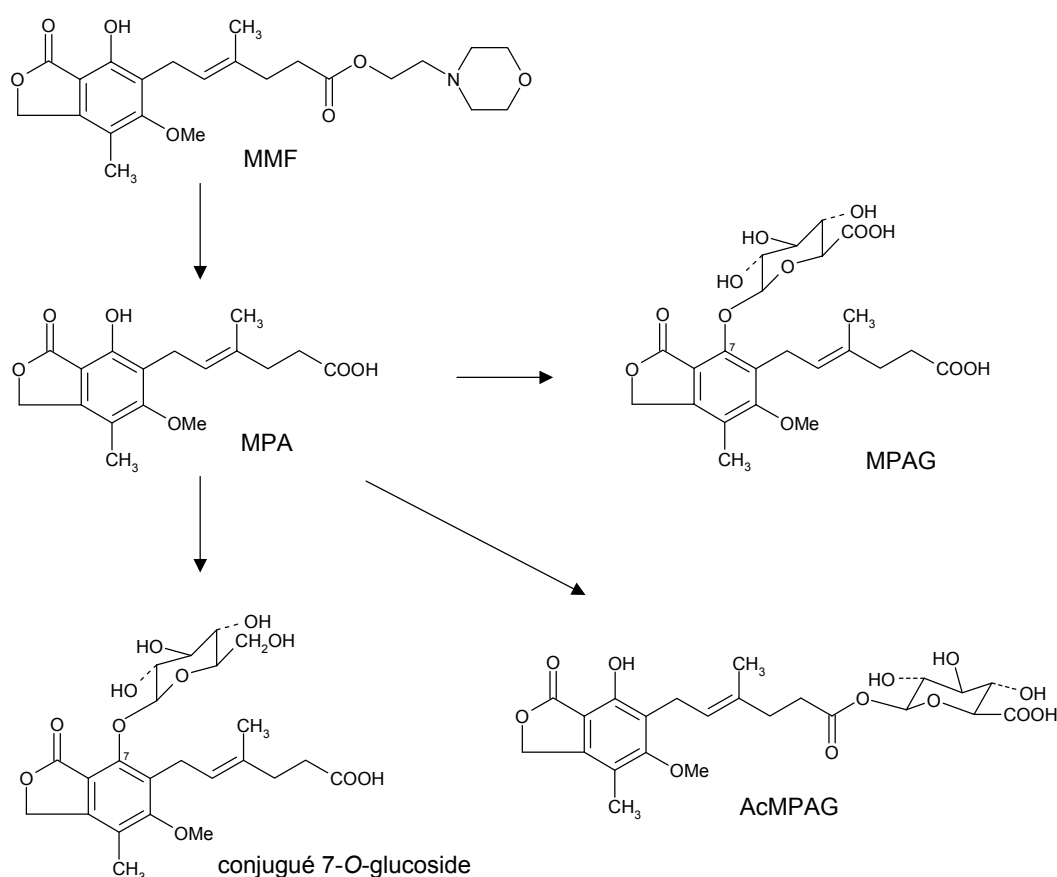


Figure 1.6. Métabolisation du mycophénolate mofétil.

1.3.6. Azathioprine

Environ 50% de la dose d'azathioprine est absorbée après administration par voie orale, avec une concentration plasmatique maximale atteinte après 1-2 h (Hong 2000, Hardman 2001). L'azathioprine et le métabolite actif 6-mercaptopurine (6-MP) sont modérément liés (30% environ) aux protéines plasmatiques (Hardman 2001).

Le métabolisme de l'azathioprine est complexe et non entièrement élucidé (figure 1.7.). Après administration, ce pré-médicament est rapidement converti en 6-MP à l'aide de la glutathion S-transférase (GST). La 6-MP est ensuite métabolisée selon 3 voies compétitives : l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT) catalyse la génération d'acide thioinosinique qui est ensuite converti par l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) en 6-thioguanine nucléotides (6-TGNs) pouvant s'incorporer frauduleusement dans l'ADN. La 6-MP est également oxydée par la xanthine oxydase (XO) ou S-déméthylée par la thiopurine-S-méthyltransférase (TPMT) avec formation de métabolites inactifs. L'activité de la TPMT présente un polymorphisme génétique, avec 0,3 % de la population ayant un déficit en cette enzyme. Il en résulte une augmentation des concentrations de 6-TGNs qui a été associée à une toxicité médullaire, avec un risque accru de myélosuppression sévère chez ces patients (Kelly 2002). Ces complications sévères peuvent être évitées par la mesure de l'activité de la TPMT dans les érythrocytes (Johnston 1999).

Les demi-vies de l'azathioprine, de la 6-MP et des autres métabolites sont respectivement de 10 min, 1 h et 5 h environ. Les métabolites sont éliminés par voie rénale; seule une faible proportion d'azathioprine et de 6-MP est éliminée sous forme inchangée (Hardman 2001).

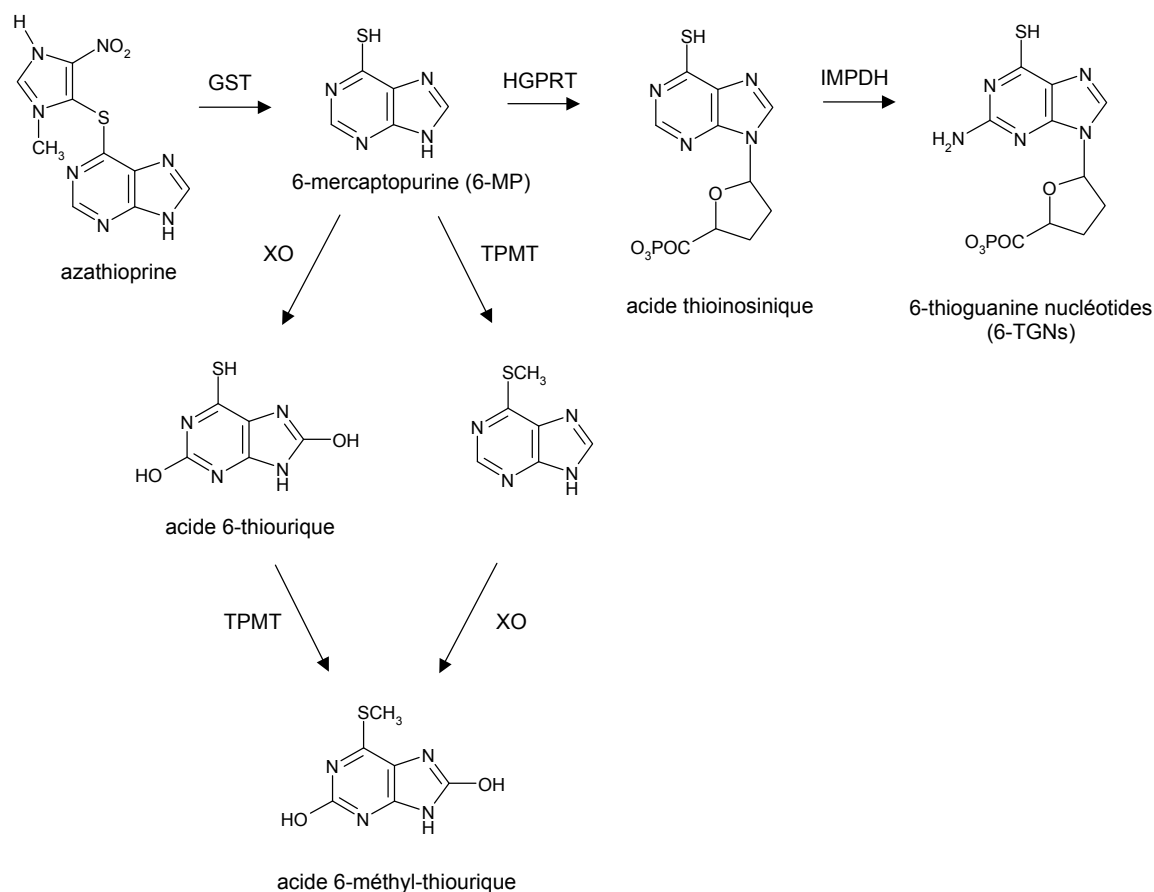


Figure 1.7. Principales voies de métabolisme de l'azathioprine

Tableau 1.3. Résumé des principales caractéristiques pharmacocinétiques des immunosuppresseurs

	Biodisponibilité	Volume de distribution	Répartition sanguine	Métabolisation	Demi-vie d'élimination
Ciclosporine microémulsion	50-60 %	3-5 l/kg	41-58 % érythrocytes	CYP 3A4	5-18 h
Tacrolimus	6-43 %	~2,5 l/kg	92-98 % érythrocytes	CYP 3A4	12-15 h
Sirolimus	~15 %	~1,7 l/kg	95-97 % érythrocytes	CYP 3A4	62 ± 16 h
Everolimus	?	~1,5 l/kg	>75 % érythrocytes	CYP 3A4	16-35 h
Mycophénolate mofétil	~94%	4 l/kg	97-99 % albumine	glucuro-conjugaison	MPA: 17 h
Azathioprine	~50 %	?	30 % protéines plasmatiques	GST, HGPRT, IMPDH, XO, TPMT	6-MP: 1h mét. actifs: 5 h

1.4. Monitoring Thérapeutique

Une thérapie immunosuppressive optimale est un élément essentiel dans la prévention d'un rejet après une transplantation d'organe. Le monitoring thérapeutique de ces médicaments, qui consiste à individualiser la posologie sur la base de la concentration sanguine individuelle, a été accepté comme étant un outil indispensable à la prise en charge des patients transplantés et a contribué à l'augmentation de la durée de vie observée ces dernières années chez ces patients (Kahan 2002). L'existence d'une corrélation entre les concentrations sanguines et l'effet thérapeutique et toxique, ainsi que l'absence de mesure clinique simple des effets recherchés, sont des critères importants pour la mise en place d'un monitoring thérapeutique.

Il est recommandé de suivre régulièrement les concentrations sanguines de ciclosporine, tacrolimus, sirolimus et everolimus pour les raisons suivantes :

- Leur marge thérapeutique est étroite, c'est-à-dire qu'ils ne déploient leur effet pharmacologique désiré avec une tolérance acceptable qu'à l'intérieur d'un faible domaine de concentrations sanguines. Les conséquences d'un sous-dosage peuvent être désastreuses (rejet de greffe, décès), il en est de même en cas de surdosage avec l'apparition d'une toxicité médicamenteuse importante.
- Leur pharmacocinétique présente une grande variabilité intra- et inter-individuelle, en raison notamment d'une biodisponibilité sujette à une large fluctuation (il n'existe pas de corrélation entre la dose et les concentrations sanguines) et de la métabolisation par le CYP 3A4, cible de nombreuses interactions médicamenteuses.

Alors que le dosage de la plupart des médicaments se fait dans le plasma, celui des immunosuppresseurs est réalisé dans le sang complet (mise à part pour le mycophénolate mofétil). Les raisons de cette exception sont les suivantes (Morris 1994, Jusko 1995a et 1995b, Streit 1996):

- Ces molécules sont distribuées largement dans les érythrocytes, leurs concentrations peuvent donc être mesurées plus aisément dans le sang complet que dans le plasma.
- La distribution érythrocytaire dépend de la température. Des erreurs de reproductibilité ont en effet été observées lorsque le dosage était effectué à partir du plasma. Ces

erreurs ont pu être limitées par une standardisation du processus de séparation des deux matrices (centrifugation) à l'aide d'un équilibrage de l'échantillon à une température déterminée pendant au moins 1 heure. Cette pratique n'est cependant plus utilisée en routine.

- La distribution érythrocytaire dépend de la concentration en immunosuppresseurs.
- Les concentrations plasmatiques peuvent être influencées par la concentration en lipoprotéines ainsi que par l'hématocrite.

1.4.1. Ciclosporine

Le monitoring thérapeutique de la ciclosporine est réalisé depuis près de 20 ans. La valeur la plus utilisée est la concentration sanguine résiduelle (C_0), c'est-à-dire celle obtenue juste avant l'administration de la dose suivante, pour laquelle des recommandations de concentrations cibles ont été établies (tableau 1.4.) (Kahan 2002). Cependant, il semble que cette pratique ne soit pas optimale, des meilleures corrélations entre d'autres paramètres pharmacocinétiques et les effets cliniques ayant été observées.

Tableau 1.4. Marges thérapeutiques basées sur C_0 pour la ciclosporine dans le sang complet (d'après Gimenez 2000)

Type de transplantation	Fonction rénale	Période post transplantation (mois)	Marges thérapeutiques (ng/ml)
Rénale	normale	début traitement	100-250
		dès 3 mois	100-150
	médiocre		100-125
Hépatique, cardiaque, pulmonaire, moelle osseuse		début traitement	150-250
		dès 3 mois ou 1 an	100-150

Une meilleure corrélation qu'avec C_0 a été mise en évidence entre l'aire sous la courbe de la concentration sanguine sur 12 h (ASC_{0-12} , en ng·h/ml) et la survie du greffon chez des patients transplantés rénal (Grevel 1991). Les méthodes conventionnelles de mesure de l' ASC_{0-12} requièrent cependant de nombreux prélèvements, ce qui est coûteux et difficilement réalisable dans le cadre de la routine clinique. Le monitoring basé sur l' ASC_{0-12} peut être simplifié en utilisant des stratégies d'échantillonnages limités et en procédant à une

estimation de l'ASC₀₋₁₂ selon l'un des nombreux algorithmes développés, comme par exemple une mesure à C₂ (2 h après l'administration) pour estimer l'absorption et à C₆ pour l'élimination (David 2001).

D'autre part, il a été mis en évidence récemment que l'utilisation de l'ASC de la phase d'absorption (ASC₀₋₄) permettait d'obtenir une bonne prédiction du devenir clinique précoce (Mahalati 1999 et 2000) et que la plus grande variabilité pharmacocinétique intra- et inter-patient se produisait dans les 4 h après la prise de la ciclosporine microémulsion (Johnston 2000). De plus, une stratégie basée sur deux prélèvements (C₀ et C₂) a montré une meilleure corrélation avec l'ASC₀₋₁₂ que celle basée uniquement sur C₀ (Keown 1996). Il a par ailleurs été montré que le plus grand effet pharmacodynamique (inhibition de la calcineurine et suppression de la libération d'interleukine-2) se produisait dans les 2 h après l'administration du médicament, d'où l'importance de la vérification des taux à ce moment là (Halloran 1999, Sindhi 2000). Une étude récente a mis en évidence des ASC₀₋₄ plus faibles chez les patients ayant présentés un épisode de rejet aigu que chez ceux n'ayant pas rencontré cette complication, alors que les C₀ étaient identiques entre les deux groupes (Mahalati 1999).

D'autre part, plusieurs études ont montré que la détermination de C₂ uniquement donnait une bonne estimation de l'ASC₀₋₄ (Barama 2000, Kahan 2002). Une incidence de rejet aigu plus faible a été observée chez des patients recevant des doses permettant d'atteindre des C₂ entre 850-1400 ng/ml que chez ceux dont les doses permettaient d'atteindre des C₀ entre 250-400 ng/ml avec une tolérance identique dans les 2 groupes (Levy 2000). Selon certains auteurs, le monitoring thérapeutique de la ciclosporine basé sur la mesure de C₂ représenterait un indice plus sensible que sur C₀ dans la prédiction de la survenue d'un épisode de rejet aigu (Kahan 2002). Le tableau 1.5. indique les valeurs de C₂ recommandées. Finalement, il faut garder à l'esprit que les doses doivent également être adaptées en fonction de l'état clinique du patient (rejet ou apparition d'effets secondaires).

Il est recommandé de procéder à un dosage sanguin 1 à 2 jours après la transplantation, ensuite 2 à 3 fois par semaine pendant les 3 à 6 premiers mois jusqu'à ce que le patient soit stable, puis à partir de 6 mois à un intervalle de plusieurs mois ou lors de changements de posologie, de modifications dans les traitements concomitants ou de l'état clinique du patient (Wong 2001).

Tableau 1.5. Valeurs cibles de C_2 pour la ciclosporine microémulsion dans le sang complet (d'après Kahan 2002)

Type de transplantation	Période post transplantation (mois)	Valeurs cibles de C_2 (ng/ml)
Hépatique	0-3	1000
	3-6	800
	> 6	600
Rénale	1	1700
	2	1500
	3	1300
	4-6	1100
	7-12	900
	> 12	800

1.4.2. Tacrolimus

Plusieurs études cliniques ont montré qu'il existait une corrélation entre les C_0 du tacrolimus et l'efficacité thérapeutique ainsi que la toxicité dans le cadre de transplantations rénales ou hépatiques (Backman 1994). Cette valeur est devenue le standard pour l'optimisation des thérapies. Le tableau 1.6. indique les marges thérapeutiques recommandées sur la base de ce paramètre. Les études de la relation existant entre C_0 et l'ASC ont cependant rapporté des corrélations très variables (Venkataramanan 1995, Wong 2000) et certains auteurs ont mis en évidence de bonnes corrélations entre l'ASC et C_2 (Mekki 1993), C_4 (Wong 2000) et également C_{12} (à la fin précise de l'intervalle posologique) (Jusko 1995). Actuellement, il manque encore d'autres études afin d'explorer des outils d'adaptation posologique plus précis (Undre 1999, Kahan 2002). Les recommandations par rapport à la fréquence des dosages sanguins sont les mêmes que pour la ciclosporine.

Tableau 1.6. Marges thérapeutiques du tacrolimus dans le sang complet basées sur C_0 (d'après Kahan 2002)

Type de transplantation	Période post transplantation (mois)	Marges thérapeutiques d'après C_0 (ng/ml)
Hépatique	1-12	5-20
Rénale	1-3	7-20
	4-12	5-15

1.4.3. Sirolimus

Il a été montré que C_0 pouvait être utilisé pour le monitoring thérapeutique du sirolimus, en raison d'une bonne corrélation existant entre cette valeur et l'ASC, l'efficacité immunosuppressive et l'apparition d'effets secondaires (Trepanier 1998, Kahan 2000, Aspeslet 2000, Holt 2003). Cependant, il manque encore des études prospectives testant les valeurs de C_0 selon un protocole rigoureux permettant de compenser le biais dû aux différences d'exposition à la ciclosporine concomitante (Kahan 2002). Le tableau 1.7. indique les marges thérapeutiques recommandées en fonction des concentrations de ciclosporine.

Tableau 1.7. Marges thérapeutiques du sirolimus dans le sang complet basées sur C_0 (d'après Kahan 2002)

Réduction des doses de ciclosporine	Marges thérapeutiques d'après C_0 (ng/ml)
30%	5-10
60%	10-15
100%	> 20

Un dosage sanguin peut être effectué à partir de 4 jours post transplantation. Il est recommandé de doser ensuite le sirolimus toutes les semaines lors du premier mois puis toutes les 2 semaines pendant le deuxième mois, puis uniquement lors de changement de dose, d'introduction d'un nouveau médicament, de suspicion de toxicité, d'apparition de troubles gastro-intestinaux pouvant modifier l'absorption ou de suspicion de non compliance (Mahalati 2001).

1.4.4. Everolimus

Les informations limitées disponibles jusqu'à présent ont montré que le monitoring thérapeutique de l'everolimus était bénéfique dans l'optimisation des dosages afin de maintenir une immunosuppression suffisante tout en minimisant la toxicité potentielle (Salm 2002). Une bonne corrélation a été observée entre C_0 et l'ASC, indiquant que la détermination du taux résiduel est un bon indicateur de l'exposition. Un risque accru de rejet aigu a été observé avec des taux résiduels inférieurs à 3 ng/ml et les effets secondaires étaient acceptables jusqu'à des concentrations de 22 ng/ml environ chez des patients recevant des doses conventionnelles de ciclosporine. Ces données n'ont toutefois pas

permis de définir des marges thérapeutiques précises et des études supplémentaires sont nécessaires afin d'établir ces paramètres (Kovarik 2002 et 2003).

1.4.5. Mycophénolate mofétil

Le monitoring thérapeutique du mycophénolate mofétil se base sur la mesure du métabolite actif, le MPA. Contrairement aux autres immunosuppresseurs, les dosages sont effectués à partir du plasma. Cet outil est encore à un stade d'investigation, les données disponibles jusqu'à présent vont toutefois en faveur de l'utilisation de cet outil pour l'optimisation des traitements (Kahan 2002). Les avis ne sont pas uniformes quant à l'utilisation de C_0 ou de l'ASC pour l'adaptation posologique. Une étude a montré une incidence de rejets aigus plus faible chez les patients dont les doses étaient adaptées en fonction des C_0 par rapport à ceux recevant des doses fixes (Meiser 1999). D'autres études ont montré qu'il existait une relation entre l'ASC et l'effet thérapeutique d'une part (DeNofrio 2000) et les effets secondaires d'autre part (Mourad 2001). Il a également été montré que l'ASC était un meilleur estimateur de l'efficacité du traitement que C_0 , en raison d'une plus faible variation intra- et inter-patient. Une corrélation entre C_2 et l'ASC et non entre C_0 et l'ASC a également été mise en évidence (Shaw 2001b). Les concentrations plasmatiques recommandées, qui sont environ 250 fois plus élevées que celles du tacrolimus ou du sirolimus, sont indiquées dans le tableau 1.8. (Wong 2001).

Tableau 1.8. Marges thérapeutiques de l'acide mycophénolique dans le plasma en association avec la ciclosporine (d'après Wong 2001)

ASC ₀₋₁₂ recommandée (µg·h/ml)	Correspondance approximative avec C_0 (µg/ml)
30-60	1-3,5

Il est recommandé de procéder à des dosages plasmatiques immédiatement après la transplantation afin de s'assurer d'une biodisponibilité convenable, puis à des intervalles de plusieurs mois, ou lors de modifications thérapeutiques ou cliniques. Dans certains cas cliniques particuliers, il peut être utile de déterminer la fraction libre de MPA, notamment chez les patients présentant une baisse de l'albumine observée lors d'insuffisance rénale par exemple (Shaw 2001b).

1.4.6. Azathioprine

Aucune relation entre la concentration plasmatique d'azathioprine ou de 6-MP et l'efficacité ou la toxicité de ces molécules n'a été mise en évidence. Ces molécules sont hautement métabolisées, plusieurs métabolites ont une activité significative et des concentrations tissulaires élevées peuvent être atteintes. Il n'est par conséquent pas utile d'effectuer du monitoring thérapeutique avec ces molécules qui présentent par ailleurs un intervalle thérapeutique relativement large (Johnston 1999, Hardman 2001). Par contre, il est recommandé de déterminer l'activité de la TPMT dans les érythrocytes.

1.5. Effets indésirables

Comme conséquence directe de l'immunosuppression, la survenue de cancers et de complications infectieuses représente la principale cause de morbidité et de mortalité. Les lymphomes non hodgkiniens représentent la majorité des désordres lymphoprolifératifs secondaires à l'immunosuppression. On retrouve également des sarcomes de Kaposi, ainsi que certaines tumeurs cutanées. La régression complète ou partielle des désordres lymphoprolifératifs et des sarcomes de Kaposi après réduction de la thérapie immunosuppressive indique que ces complications sont fortement liées au degré d'immunosuppression (Penn 1993). D'autres effets indésirables sont spécifiques à certains médicaments immunosuppresseurs.

1.5.1. Ciclosporine

La néphrotoxicité, se manifestant par une augmentation de la créatininémie et de l'urémie, est le principal effet indésirable de la ciclosporine et touche un grand nombre de patients. Elle est dose-dépendante et habituellement réversible après réduction de la dose ou arrêt du traitement (Leaker 1994).

Des troubles neurologiques, également dose-dépendants, peuvent survenir le plus souvent en début de traitement. Ils sont caractérisés par des tremblements des extrémités, des paresthésies et parfois même des convulsions. Ils peuvent être améliorés par une diminution de la dose (Bechstein 2000, Lier 2002).

D'autres effets indésirables sont également fréquents, notamment une hypertension (Textor 1994), surtout en transplantation cardiaque, et une hyperlipidémie caractérisée par une augmentation notable des LDL et des triglycérides (Ballantyne 1989). L'hypertension est volontiers traitée par des inhibiteurs calciques de la classe des diaminopyrimidines.

On note fréquemment des troubles gastro-intestinaux de type nausées ou diarrhées et parfois une hyperplasie gingivale, qui peut être prévenue par une bonne hygiène bucco-dentaire (Brunet 1996).

1.5.2. Tacrolimus

Le spectre d'effets indésirables du tacrolimus est assez proche de celui de la ciclosporine. On retrouve une néphrotoxicité et une neurotoxicité dose-dépendantes (Ader 1998, Bechstein 2000). On retrouve également des troubles gastro-intestinaux comme sous ciclosporine. Le tacrolimus semble être moins associé à une hypertension que la ciclosporine (Taylor DO 1999). Il peut augmenter la glycémie et favoriser l'apparition d'un diabète sucré, surtout en association avec des corticostéroïdes (Pirsch 1997).

1.5.3. Sirolimus et everolimus

Divers effets indésirables ont été rapportés dans les essais cliniques et les rapports d'utilisateurs. Des troubles dose-dépendants et réversibles du métabolisme lipidique (hypercholestérolémie et hypertriglycémie), ainsi que des troubles hématologiques (leucopénie) également dose-dépendants et réversibles sont les plus fréquents (Neuhaus 2001). Comme la majorité des patients sont traités de manière concomitante avec de la ciclosporine et des corticostéroïdes, le rôle du sirolimus seul dans la survenue d'effets indésirables est difficile à établir. Il semblerait que l'association ciclosporine-sirolimus provoque plus d'hyperlipidémie et de troubles hématologiques que les deux médicaments seuls, à cause d'un effet pharmacodynamique additif (Podder 2001).

Le sirolimus seul ne semble *a priori* pas présenter de toxicité rénale (Kahan 2001b). Par contre il pourrait exacerber la néphrotoxicité de la ciclosporine par le biais d'une interaction pharmacocinétique augmentant la ciclosporinémie sanguine et surtout intrarénale (Podder 2001). Il en va de même pour l'hypertension due à la ciclosporine. Le sirolimus a également

été associé à des oedèmes périphériques et à des troubles gastro-intestinaux. Il ne semble pas présenter de neurotoxicité (Neuhaus 2001).

Les effets secondaires de l'everolimus pourraient être comparables à ceux du sirolimus (Neuhaus 2001).

1.5.4. Mycophénolate mofétil

Des troubles gastro-intestinaux ont fréquemment été associés au mycophénolate mofétil. Il s'agit surtout de diarrhées, parfois de gastrites, d'ulcérations duodénales ou coliques, voire d'hémorragies gastriques. Dans certains cas, ces troubles nécessitent une réduction des doses ou l'arrêt du traitement. On note également des cas de leucopénies, favorisant les complications infectieuses.

1.5.5. Azathioprine

Le premier effet indésirable de l'azathioprine est la toxicité médullaire dose-dépendante. Cette toxicité est principalement caractérisée par une leucopénie et une thrombopénie, avec péjoration possible en pancytopénie. Bien que l'atteinte médullaire se présente le plus souvent dans les 4 premières semaines de traitement, une surveillance stricte et régulière de la formule sanguine est recommandée aussi longtemps que le traitement est maintenu. La myélotoxicité semble liée à des taux trop élevés en 6-thioguanine nucléotides (6-TGNs), notamment chez les patients déficients en TPMT (McLeod 1994, Kelly 2002). Le dosage de l'activité intra-érythrocytaire de la TPMT pourrait être prédictif d'un risque de myélotoxicité, bien que d'autres facteurs puissent être en cause (Johnston 1999).

Des réactions d'hypersensibilité ont été décrites et sont regroupées sous le nom de syndrome d'hypersensibilité à l'azathioprine, caractérisé par des symptômes variés qui peuvent se produire séparément ou de manière concomitante, comme de la fièvre, une rigidité musculaire, des arthralgies, des myalgies, des réactions cutanées, une hypotension, une atteinte hépatique, une pancréatite, une néphrite interstitielle ou une pneumonie (Saway 1988). Des troubles gastro-intestinaux à caractère de nausées, vomissements et diarrhées sont fréquents.

1.5.6. Anticorps antilymphocytaires

Les réactions d'hypersensibilité (maladie sérique) constituent l'effet secondaire principal des anticorps polyclonaux. Ces réactions sont caractérisées par un rash cutané, une arthralgie et de la fièvre. On peut également observer une leucopénie et une thrombopénie.

Le muromonab-CD3 est associé à un ensemble d'effets secondaires systémiques regroupés sous le nom de cytokine-released syndrome (CRS). L'état grippal est la composante clé de ce syndrome complexe, qui inclut fièvre, frissons, céphalées, myalgies, tachycardie et troubles gastro-intestinaux. Le syndrome apparaît environ 1 heure après la première dose et dure quelques heures. Les symptômes peuvent être limités par une perfusion lente et l'administration de corticoïdes à hautes doses (Buysmann 1997).

L'utilisation de muromonab-CD3 a également été associée à un risque élevé de complications infectieuses et de syndromes lymphoprolifératifs, à cause de sa puissante activité immunosuppressive. Ces complications dépendent de la dose et de la durée du traitement, c'est pourquoi le muromonab-CD3 n'est indiqué en Suisse que dans le traitement du rejet aigu de greffe et non dans la prophylaxie.

Les anticorps monoclonaux antagonistes de l'IL-2 ont toujours été associés à un traitement immunosuppresseur de base dans les études cliniques. Aucun effet secondaire supplémentaire par rapport à ceux dus au traitement de base n'a été mis en évidence pour le moment.

1.6. Interactions

L'immunosuppression, de quelque origine qu'elle soit, peut diminuer l'efficacité des vaccins, voire les rendre potentiellement dangereux quand il s'agit de vaccins vivants. Les autres interactions dues aux immunosuppresseurs sont spécifiques à chaque classe de molécules.

1.6.1. Ciclosporine et tacrolimus

La ciclosporine et le tacrolimus sont métabolisés au niveau hépatique et intestinal par le CYP 3A4. Les inhibiteurs de ces enzymes peuvent augmenter les concentrations sanguines de ciclosporine et de tacrolimus, alors que les inducteurs peuvent les diminuer. Ce phénomène est à l'origine de nombreuses interactions pharmacocinétiques (Campana 1996). La

ciclosporine et le tacrolimus sont aussi des substrats de la glycoprotéine P (P-gp) localisée principalement au niveau des entérocytes et responsable de l'efflux de nombreux xénobiotiques. Les substances interagissant avec ce système vont avoir une influence sur la pharmacocinétique de ces immunosuppresseurs, principalement par modification de leur biodisponibilité (Kahan 2002, van Gelder 2002).

a) Inhibition enzymatique

L'inhibition enzymatique est un processus rapide (24h) qui débute dès que l'inhibiteur a atteint une concentration critique; un nouvel équilibre s'établira en fonction de la nouvelle demi-vie du médicament-cible. Dans le cas de la ciclosporine ou du tacrolimus, les conséquences de l'interaction apparaissent dans les 3 à 5 jours suivant l'introduction de l'inhibiteur. La disparition de l'inhibition survient dès l'élimination de l'inhibiteur (dans le cas d'une inhibition compétitive) et dépend de la demi-vie de ce dernier; les concentrations de ciclosporine et de tacrolimus retrouveront l'ancien équilibre 3 à 4 jours après. La conséquence principale d'une augmentation des taux sanguins de ciclosporine ou de tacrolimus est une augmentation de la toxicité.

Les principaux inhibiteurs enzymatiques du CYP 3A4, à l'origine d'une augmentation de la ciclosporinémie et de la tacrolémie, sont principalement les macrolides (érythromycine, clarithromycine, roxithromycine) (Sadaba 1998), les antifongiques azolés (kétoconazole, itraconazole, fluconazole, voriconazole) (Romero 2002), les inhibiteurs calciques (diltiazem, vérapamil, nicardipine (Brockmoller 1990, Yildiz 1999), les inhibiteurs des protéases anti-HIV (ritonavir, indinavir, saquinavir, amprénavir) (Brinkman 1998), l'amiodarone, la méthyprednisolone et le jus de grapefruit. Ce dernier a peu d'influence sur les taux de ciclosporine si celle-ci est administrée par voie parentérale, suggérant une interaction principalement sur les enzymes intestinales. La plupart des médicaments inhibiteurs du CYP 3A4 bloquent les enzymes aussi bien au niveau hépatique qu'intestinal; un blocage principalement intestinal provoquera une interaction moins marquée si les deux médicaments sont pris à plusieurs heures d'écart. On a tenté de mettre à profit l'interaction des antifongiques azolés et des inhibiteurs calciques avec la ciclosporine pour diminuer les doses de cette dernière dans un souci économique (Keogh 1995). Cette méthode a cependant été critiquée, puisque source de variations inter-individuelles considérables dans les taux de ciclosporine, et d'effets secondaires dus à l'inhibiteur enzymatique utilisé (Jones 1997).

Dans la mesure du possible, la posologie de ciclosporine ou de tacrolimus doit être adaptée avant l'introduction de l'inhibiteur enzymatique. En pratique, il est conseillé de diminuer d'emblée la dose de moitié, de contrôler le taux à 2 jours, puis de réadapter en fonction de ce taux, selon la règle de trois atténuée, c'est-à-dire un peu moins que proportionnellement au rapport entre le taux visé et le taux observé. De même, à l'arrêt de l'inhibiteur, il est conseillé de doubler la dose, de contrôler le taux à 2 jours, puis de réadapter.

b) Induction enzymatique

L'induction enzymatique est un processus graduel. Il faut en effet attendre quelques jours à quelques semaines pour que les concentrations plasmatiques de l'inducteur se situent dans une zone d'efficacité inductive, que la synthèse des enzymes hépatiques soit maximale et que les concentrations sanguines du médicament-cible soient effectivement diminuées. Selon l'inducteur, le premier effet détectable débute entre 3 jours et 1 semaine après la première prise et l'effet maximal est atteint en 6 jours à 2-3 semaines. L'induction enzymatique disparaît également progressivement, le temps de sa disparition étant néanmoins prolongé par rapport au temps imparti pour son déclenchement. Cette disparition dépend de la vitesse d'élimination de l'inducteur, de la durée de vie des enzymes induites et de la normalisation des concentrations sanguines du médicament-cible. La durée de la disparition de l'effet inducteur est située entre 2 et 4 semaines suivant l'inducteur. La conséquence principale d'une diminution des taux sanguins de ciclosporine ou de tacrolimus est le rejet de greffe.

Les principaux inducteurs enzymatiques du CYP 3A4, à l'origine d'une diminution de la ciclosporinémie et de la tacrolémie, sont principalement les antiépileptiques (phénobarbital, primidone, phénytoïne, carbamazépine, topiramate et felbamate), la rifampicine, l'éfavirenz et les extraits de millepertuis (*Hypericum perforatum*). La rifampicine est l'inducteur le plus rapide, le phénobarbital le plus lent (Breidenbach 2000).

Dans la mesure du possible, la posologie de ciclosporine ou de tacrolimus doit être adaptée avant l'introduction de l'inducteur enzymatique. En pratique, il est conseillé de doubler progressivement la dose sur 1 semaine, de contrôler le taux à 2 jours et à 7-10 jours, puis de réadapter en fonction de ce taux, selon la règle de trois atténuée. De même, à l'arrêt de l'inducteur, il est conseillé de diminuer progressivement la dose de moitié sur 1 semaine, de contrôler le taux à 2 jours et à 7-10 jours, puis de réadapter. Dans le cas d'une induction

lente (par exemple par le phénobarbital), les délais peuvent être plus longs. Il est évident que l'éviction de l'inducteur, si son administration n'est pas vitale, est la solution la plus simple et la plus économique.

c) Autres interactions

Enfin, la ciclosporine et le tacrolimus peuvent être responsables d'interactions pharmacodynamiques. Leur toxicité rénale peut être exacerbée par une association avec d'autres médicaments néphrotoxiques, comme les diurétiques, les aminoglycosides ou encore l'amphotéricine B (Termeer 1986, Kennedy 1983). Un effet additif dans l'hyperplasie gingivale a été rapporté entre la ciclosporine et la nifédipine (Slavin 1987).

1.6.2. Sirolimus et everolimus

Le sirolimus est lui aussi métabolisé par le CYP 3A4 et ses taux sanguins sont donc soumis aux mêmes influences par les inhibiteurs et inducteurs enzymatiques que ceux de la ciclosporine et du tacrolimus. Il est également un substrat de la P-gp (MacDonald 2000, Kahan 2002).

Lorsqu'ils sont associés, la ciclosporine et le sirolimus ont une biodisponibilité accrue, par compétition au niveau du CYP 3A4 et de la P-gp. Cette augmentation de biodisponibilité est maximale si les deux médicaments sont pris en même temps, probablement à cause d'une interaction au niveau intestinal. Elle peut être minimisée en maintenant 4 heures entre la prise de chacun (Kaplan 1998). Une interaction correspondante pourrait être attendue entre le sirolimus et le tacrolimus.

En plus de leurs effets immunosuppresseurs additifs, le sirolimus et la ciclosporine peuvent cumuler leur toxicité, causant des interactions pharmacodynamiques. Ainsi, l'hyperlipidémie et les troubles hématologiques rapportés sous sirolimus sont plus fréquents et plus marqués en cas d'association avec la ciclosporine. De même, la néphrotoxicité et l'hypertension associées à la ciclosporine sont exacerbées par l'administration de sirolimus (Podder 2001). C'est pourquoi l'association des deux médicaments n'est recommandée que pendant 3 mois, la ciclosporine devant être progressivement arrêtée.

Lors de l'arrêt de la ciclosporine, les concentrations de sirolimus vont diminuer, à moins que la posologie du sirolimus ne soit augmentée. En moyenne, la posologie de sirolimus

recommandée doit être 4 fois plus élevée pour tenir compte à la fois de la disparition de l'interaction pharmacocinétique avec la ciclosporine (augmentation d'un facteur 2) et de l'augmentation du besoin en immunosuppresseur suite à son retrait (augmentation d'un facteur 2).

L'everolimus est lui aussi métabolisé par le CYP 3A4 et ses interactions sont probablement comparables à celles du sirolimus.

1.6.3. Mycophénolate mofétil

Le mycophénolate mofétil n'est pas sujet à des interactions au niveau des cytochromes en raison de l'absence de relation avec ces derniers. L'absorption de ce médicament peut être diminuée par la prise d'antacides ou de résines échangeuses.

1.6.4. Azathioprine

L'association de l'azathioprine avec l'allopurinol a été associée à une toxicité médullaire accrue. L'allopurinol est un inhibiteur de la xanthine oxydase, l'enzyme responsable de la dégradation des bases puriques et pyrimidiques en acide urique, et impliquée dans l'inactivation de l'azathioprine et de la 6-mercaptopurine. Une inhibition de cette enzyme a donc pour conséquence une augmentation des 6-thioguanine nucléotides, les métabolites actifs dans l'immunosuppression, responsables également de la toxicité médullaire.

1.6.5. Anticorps antilymphocytaires

Les anticorps polyclonaux et monoclonaux n'ont pas été associés à des interactions.

1.7. Utilisation clinique

Le champ d'action des immunosuppresseurs concerne la transplantation d'organes solides (rein, foie, cœur, poumon, intestin, pancréas), la transplantation de moelle osseuse et certaines maladies auto-immunes (par exemple syndrome néphrotique, psoriasis, polyarthrite rhumatoïde, etc.). Dans la transplantation d'organes solides, la stratégie thérapeutique a pour objectif d'une part de prévenir le phénomène du rejet, et d'autre part de le traiter.

1.7.1. Traitement préventif du rejet de greffe

Le traitement immunosuppresseur de référence dans la prévention du rejet de greffe est constitué d'une trithérapie associant classiquement un inhibiteur de la calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus), un antimétabolite (azathioprine ou mycophénolate mofétil) et des corticostéroïdes (Denton 1999). Le choix des molécules, parfois dépendant des habitudes des centres de transplantation, est tout de même fonction de la nature de l'organe greffé et des comorbidités. Ainsi le tacrolimus semble provoquer moins d'hypertension, mais a été associé à un risque de diabète sucré plus élevé (Billaud 2000). De plus son utilisation n'est aujourd'hui reconnue en Suisse que dans la transplantation rénale ou hépatique. En transplantation cardiaque, il a été suggéré que le tacrolimus pourrait être substitué à la ciclosporine chez des patients ayant souffert d'épisodes de rejets récidivants, ou en cas de mauvaise tolérance de la ciclosporine (De Bonis 2001). L'azathioprine est de plus en plus souvent remplacée par le mycophénolate mofétil, du moins en transplantation rénale, hépatique et cardiaque. Ce dernier en effet a été associé à une incidence plus faible de rejet aigu en transplantation rénale (Pascual 2002), hépatique (Moser 2002) et cardiaque (Taylor DO 2000).

Le traitement préventif comporte une phase d'induction, qui dure entre 4 et 6 semaines, et une phase d'entretien qui lui succède. Durant la phase d'induction, la trithérapie est administrée à dose élevée et est parfois combinée à l'administration d'anticorps antilymphocytaires qui ne seront plus administrés durant la phase d'entretien, surtout à cause du risque de complications infectieuses ou cancéreuses (Denton 1999). Les anticorps monoclonaux antagonistes des récepteurs à l'IL-2 ont aujourd'hui en Suisse pour seule indication reconnue la prévention du rejet de greffe rénale dans la phase d'induction; leur rôle dans la transplantation d'autres organes est en cours d'évaluation. Dans les autres transplantations, les anticorps polyclonaux peuvent avoir encore une place, bien que leur utilisation hors transplantation rénale ne soit pas reconnue en Suisse; le muromonab-CD3 est en principe réservé au traitement curatif du rejet aigu, du moins en Suisse, à cause du risque élevé de complications infectieuses ou lymphoprolifératives. La trithérapie durant la phase d'induction peut parfois être séquentielle, avec une introduction différée de la ciclosporine (entre le 5^{ème} et le 21^{ème} jour postgreffe) ou de l'azathioprine (entre le 30^{ème} et le 40^{ème} jour postgreffe), en vue de limiter les effets indésirables.

Durant la phase d'entretien, la trithérapie est souvent maintenue mais à dose plus faible. Pourtant, certains centres de transplantation préconisent l'arrêt de la ciclosporine ou des corticostéroïdes quelques mois après la greffe, en vue de diminuer les effets secondaires rénaux, respectivement cardio-vasculaires. Malheureusement ces protocoles peuvent être accompagnés d'épisodes de rejet plus nombreux (Oaks 2001).

Dans la prévention du rejet lors d'une transplantation rénale, et chez les patients présentant un risque immunologique faible à modéré, le sirolimus peut remplacer l'antimétabolite dans la trithérapie dès la phase d'induction. La ciclosporine doit alors être progressivement supprimée sur une période de 4 à 8 semaines durant la phase d'entretien, pour limiter la toxicité cumulée avec le sirolimus (néphrotoxicité, hypertension, hyperlipidémie, leucopénie). Chez les patients pour lesquels l'arrêt de la ciclosporine est un échec ou ne peut être envisagé, l'association de ciclosporine et de sirolimus ne doit pas être poursuivie au-delà de 3 mois après la transplantation; le sirolimus doit être arrêté et un autre protocole immunosuppresseur doit être instauré. Le rôle du sirolimus dans la transplantation d'autres organes reste encore à déterminer.

Les complications infectieuses de l'immunosuppression peuvent être prévenues par une chimioprophylaxie anti-infectieuse, pouvant comprendre des antiviraux comme le ganciclovir en prévention des infections à cytomegalovirus (CMV), du co-trimoxazole en prévention des pneumonies à *Pneumocystis carinii*, et des antifongiques comme l'amphotéricine B.

1.7.2. Traitement curatif du rejet de greffe

Malgré la mise en place d'un traitement préventif, une crise de rejet peut survenir, le risque maximal se situant pendant la première année. Le traitement mis en œuvre est fonction de la gravité et de l'évolution du rejet.

Ce traitement comprend tout d'abord des corticostéroïdes à haute dose, parfois combinés à des anticorps antilymphocytaires, particulièrement le muromonab-CD3. En cas d'échec, le choix thérapeutique porte alors sur le tacrolimus, du moins en transplantation rénale et hépatique, l'extension en transplantation cardiaque étant en train de se préciser (Baran 2002).

1.7.3. Transplantation de moelle osseuse

Le rôle des immunosuppresseurs en transplantation de moelle osseuse est de prévenir ou traiter le rejet de greffe ainsi que la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD), caractérisée par des atteintes cutanées, hépatiques et gastro-intestinales. En prévention de la GvHD, plusieurs combinaisons ont été testées, particulièrement ciclosporine ou tacrolimus avec methotrexate. La GvHD aiguë est habituellement traitée par adjonction de corticoïdes au schéma prophylactique (Jacobsohn 2002).

2. TECHNIQUES DE DOSAGE DES IMMUNOSUPPESSEURS

2.1. Introduction

De nombreuses techniques ont été développées pour le dosage sanguin des immunosuppresseurs. Il s'agit principalement d'immunoessais, mais également de méthodes séparatives par chromatographie liquide (HPLC) couplées à la spectrophotométrie d'absorption de l'ultra-violet (LC-UV), à la spectrométrie de masse (LC-MS) et également à la spectrométrie de masse en mode tandem (LC-MS/MS). Pour la ciclosporine, le tacrolimus et le mycophénolate mofétil, les immunoessais sont largement utilisés. Ces techniques présentent l'avantage par rapport aux méthodes séparatives conventionnelles de pouvoir effectuer des analyses avec un débit relativement élevé et une certaine facilité d'emploi. Ces méthodes ont cependant le désavantage de donner des réactions croisées avec certains métabolites pouvant ainsi conduire à une surestimation des taux réels en immunosuppresseurs. En raison de leur spécificité pour les molécules mères, les techniques par LC-UV et surtout par LC-MS ou LC-MS/MS sont actuellement considérées comme les méthodes de choix pour le dosage de ces médicaments (Oellerich 1998, Johnston 1999, Deters 2003). Le dosage sanguin du sirolimus et de l'everolimus est réalisé à l'aide de méthodes par chromatographie, aucun immunoessai n'étant actuellement commercialisé pour ces deux médicaments.

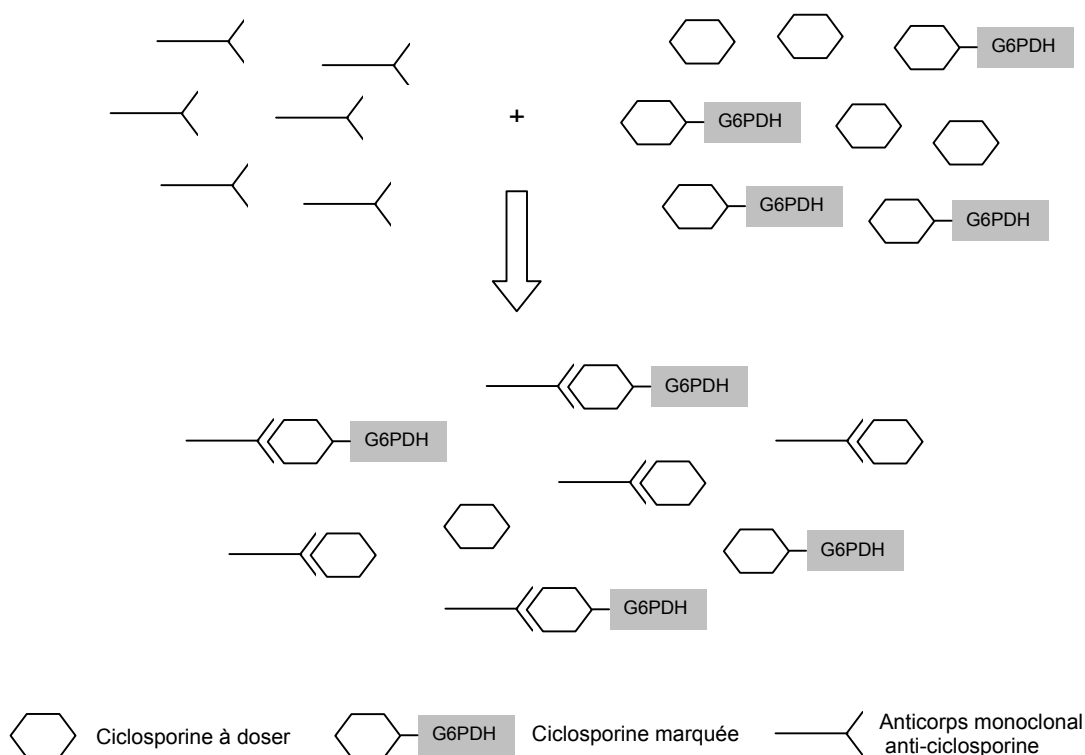
2.2. Techniques immunologiques

Les immunoessais regroupent l'ensemble des méthodes analytiques quantitatives mettant en jeu la réaction immunologique antigène-anticorps. La majorité de ces techniques utilisent un troisième élément, le traceur, qui résulte de l'association de l'antigène ou de l'anticorps avec un marqueur (radioélément, enzyme, luminophore) (Barbier 1989).

Un grand nombre de techniques immunologiques différentes sont utilisées pour le dosage sanguin des immunosuppresseurs. Le principe de la technique EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique), utilisée dans notre laboratoire pour le dosage de la ciclosporine, du tacrolimus et du mycophénolate mofétil, est décrit ici à titre d'exemple. Son principe pour la ciclosporine, illustré sur la figure 2.1., est le suivant: la ciclosporine à doser ainsi que de la ciclosporine marquée par une enzyme, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH),

entrent en compétition pour se lier à un anticorps anti-ciclosporine. Lorsque la ciclosporine marquée est liée à l'anticorps, la G6PDH perd son activité en raison de l'encombrement stérique qui en résulte. L'activité enzymatique est en revanche conservée lorsque la ciclosporine marquée est libre. La G6PDH convertit le glucose-6-phosphate en 6-phosphogluconolactone alors que le coenzyme NAD⁺ est réduit en NADH, résultant en une modification de l'absorbance à 340 nm. Plus la concentration de ciclosporine dans l'échantillon à doser sera élevée, moins la ciclosporine marquée pourra se lier à l'anticorps et plus l'activité de la G6PDH sera importante.

A) Réaction immunologique de compétition



B) Réaction enzymatique

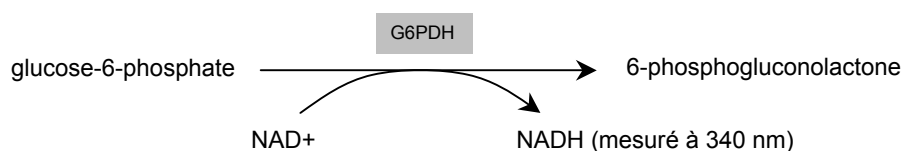


Figure 2.1. Principe de la technique immunologique EMIT

2.2.1. Ciclosporine

De nombreux immunoessais utilisant des anticorps anti-ciclosporine ont été commercialisés pour le dosage de cette molécule dans le sang complet. Le tableau 2.1. donne un aperçu des principales techniques utilisées actuellement en routine et la figure 2.2. indique la proportion de leurs utilisations parmi les laboratoires européens (n=405) participant au contrôle de qualité externe « International Proficiency Testing Scheme » coordonné par l'Unité Analytique de l'Hôpital St-George à Londres. Les principales différences entre ces immunoessais résident dans la facilité de manipulation, la spécificité pour la substance mère par rapport aux métabolites et la précision. Le Laboratoire Central de Chimie Clinique des HUG dose actuellement la ciclosporine à l'aide de la technique EMIT.

Tableau 2.1. Principales techniques immunologiques pour le dosage de la ciclosporine

Abréviation	Méthode
FPIA - Abbott TDx TM - poly	Fluorescence polarisation immunoassay avec anticorps polyclonaux non spécifiques pour la ciclosporine et ses métabolites.
FPIA - Abbott TDx TM - mono	Fluorescence polarisation immunoassay avec anticorps monoclonaux spécifiques.
FPIA - Abbott AxSYM TM	Fluorescence polarisation immunoassay avec anticorps monoclonaux spécifiques.
RIA - DiaSorin CYCLO-Trac TM - NS	Radioimmunoassay avec anticorps monoclonaux non spécifiques.
RIA - DiaSorin CYCLO-Trac TM - SP	Radioimmunoassay avec anticorps monoclonaux spécifiques.
CEDIA PLUS TM - Microgenics	Cloned enzyme donor immunoassay.
EMIT TM - Dade Behring	Enzyme multiplied immunoassay technique, extraction méthanolique ou avec "green liquid" breveté.
ACMIA - Dade Behring	Antibody conjugated magnetic immunoassay.

Parmi les immunoessais disponibles pour le dosage de la ciclosporine, deux ne sont pas spécifiques et présentent une forte réactivité croisée avec les métabolites. Il s'agit du TDx-poly qui utilise des anticorps polyclonaux reconnaissant la ciclosporine et les métabolites et du RIA-ns qui utilise des anticorps monoclonaux non spécifiques. Les résultats obtenus avec ces techniques sont de respectivement 3 à 5 fois et 5 à 7 fois supérieurs à ceux obtenus à l'aide d'une technique par HPLC. Le rapport entre les immunoessais non spécifiques et les techniques par HPLC varie en fonction du rapport de la concentration sanguine en ciclosporine sur celle des métabolites, qui dépend du type de transplantation, de la période écoulée depuis la greffe ainsi que de la capacité métabolique

et de l'état clinique du patient. Les résultats obtenus avec ces techniques présentent une faible corrélation avec les événements cliniques (Johnston 1999).

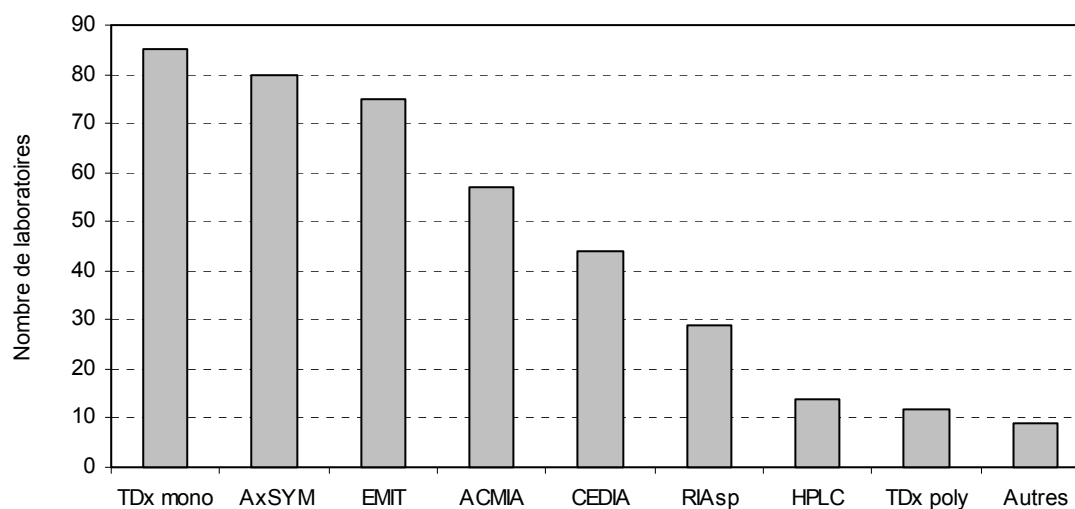


Figure 2.2. Techniques de dosage de la ciclosporine en Europe (n=405)

Les autres immunoessais dits « spécifiques » comportent néanmoins un certain degré de réactivité croisée, variable selon la technique (tableau 2.2.), ne donnant pas nécessairement le même résultat pour un échantillon donné (Johnston 1999, Tredger 2000).

Tableau 2.2. Réactivité croisée (en %) des principaux métabolites selon différents immunoessais (informations des fabricants)

Méthodes	AM1	AM9	AM4N	AM19	AM1c9
TDx poly	96	19	62	9	<1
RIA sp	0,7	1,7	0,8	<0,1	ND
TDx mono	6,7	19,4	NS	NS	NS
EMIT	<0,3	7,3	<0,3	3	ND
AxSYM	6,9	10,8	NS	NS	NS
CEDIA	5,1	11,9	15,5	0,2	0,5

NS: non significatif, ND: non déterminé

Plusieurs études ont mis en évidence des différences importantes entre les résultats obtenus avec les méthodes immunologiques par rapport à ceux obtenus à l'aide d'une méthode chromatographique de référence. Chez différents types de transplantés, les surestimations moyennes suivantes ont été observées: EMIT: 8-30%, CEDIA: 17-22%, AxSYM: 17-32% et

TDx monoclonal: 51-57%, avec une grande variabilité interindividuelle pouvant aller jusqu'à plus de 200% de surestimation (Oellerich 1995, Schütz 1998, Steimer 1999, Hamwi 1999). Des différences plus élevées ont été observées chez des patients transplantés hépatique: EMIT: 31%, CEDIA: 43% et AxSYM: 47%, ce qui a pu être expliqué par une altération de l'élimination de la ciclosporine et de ses métabolites chez cette catégorie de patients (Schütz 1998). Il a été montré que les concentrations sanguines de certains métabolites étaient augmentées lors de choléstase en raison d'une diminution de l'excrétion biliaire (Bleck 1991) et qu'il existait une corrélation entre les concentrations de ces métabolites et les taux sériques de bilirubine totale et conjuguée (Christians 1995). Une étude a montré que les ratios métaboliques, estimés d'après le rapport des valeurs obtenues avec une méthode non spécifique (TDx polyclonal) sur celles obtenues par LC-UV, variaient jusqu'à 10 fois selon les patients et corrélaient avec les biais observés avec les différents immunoessais monoclonaux. La grande variabilité interindividuelle observée au niveau de la proportion de métabolites semble correspondre à la variabilité catalytique du CYP 3A4 qui peut également s'élever jusqu'à un facteur 10 (Steimer 1999).

Dans certaines situations cliniques pour lesquelles une concentration sanguine élevée en métabolites est observée, comme par exemple lors de choléstase, seules les méthodes chromatographiques spécifiques peuvent mesurer avec exactitude les taux sanguins réels de ciclosporine (Tredger 2000).

Il semble que les déterminations effectuées à la concentration maximale (C_2) présentent moins de divergences entre les différents essais que celles effectuées à C_0 en raison de la plus faible proportion de métabolites donnant des réactions croisées à C_2 (Kahan 2002).

2.2.2. Tacrolimus

La mesure des concentrations résiduelles de tacrolimus présentes dans le sang est rendue plus difficile que pour la ciclosporine en raison des faibles concentrations rencontrées (< 30 ng/ml). Différentes techniques immunologiques utilisant un anticorps monoclonal anti-tacrolimus sont disponibles pour le dosage cette molécule (tableau 2.3.) (Salm 2000a). La figure 2.3. indique la proportion de leurs utilisations parmi les laboratoires européens (n=291) participant au contrôle de qualité externe « International Proficiency Testing Scheme » coordonné par l'Unité Analytique de l'Hôpital St-George à Londres. Le Laboratoire Central de

Chimie Clinique des HUG utilise actuellement la technique EMIT pour le dosage du tacrolimus.

Tableau 2.3. Techniques immunologiques pour le dosage du tacrolimus

Abréviation	Méthode
ELISA - DiaSorin PRO-Trac™ II	Enzyme-linked immunosorbent assay
MEIA - Abbott IMx™ II	Microparticle enzyme-linked immunoassay
EMIT™ - Dade Behring	Enzyme multiplied immunoassay technique

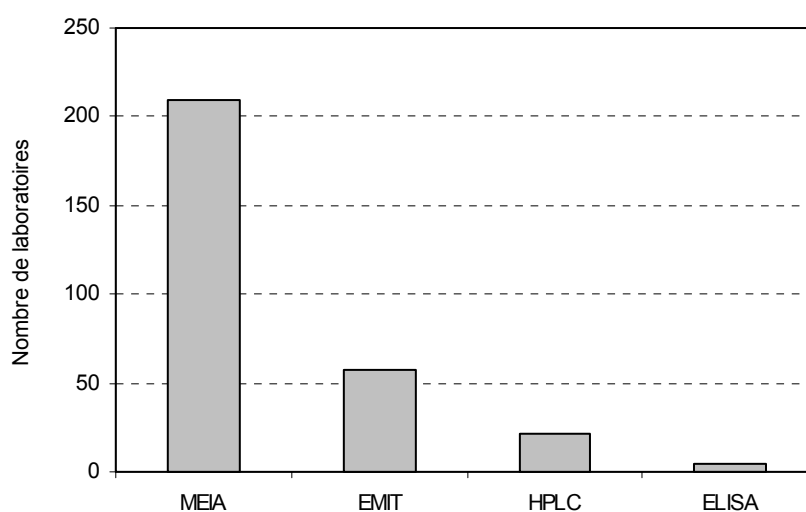


Figure 2.3. Techniques de dosage du tacrolimus en Europe (n=291)

De façon similaire à la ciclosporine, les trois immunoessais réagissent de manière croisée avec les métabolites (Murthy 1998, Holt 2002). Il a été estimé que la détection non spécifique des métabolites pouvait aller jusqu'à 30% de la concentration apparente en tacrolimus mesurée (Staatz 2002). Le tableau 2.4. indique les réactivités croisées des principaux métabolites pour la méthode EMIT.

Tableau 2.4. Réactivité croisée (en %) des principaux métabolites pour la méthode EMIT (information du fabricant)

Méthode	13-demethyl	31-demethyl	15-demethyl	12-hydroxy	13,31-di-demethyl	15,31-di-demethyl
EMIT	64,5	6,8	4	0,6	2,6	< 0,1

La quantité et le type de métabolites rencontrés dans le sang dépendent du type de greffe, de la période écoulée depuis la transplantation et de la fonction hépatique. Une accumulation de métabolites, en particulier ceux de seconde génération (di-demethyl- et di-demethyl-hydroxy-tacrolimus), a été mise en évidence chez des patients présentant des troubles hépatiques (choléstase en particulier), en raison d'une diminution de l'élimination biliaire. D'autre part, une corrélation a pu être établie entre certains marqueurs de la fonction hépatique (concentrations sériques de γ -glutamyltransférase, phosphatase alcaline et alanine aminotransférase) et l'augmentation des concentrations sanguines de certains métabolites (Gonschior 1996). Une étude a rapporté qu'un nombre significatif d'échantillons de patients avec des troubles de la fonction hépatique présentaient un biais inacceptable lorsque le tacrolimus était mesuré avec une méthode immunologique (Armstrong 2001).

Plusieurs auteurs ont comparé les résultats obtenus avec certaines méthodes immunologiques par rapport à ceux obtenus par LC-MS ou LC-MS/MS. Les biais moyens observés allaient de -5% à 17% pour la méthode ELISA et de 10% à 25% pour la méthode MEIA II, avec des biais pouvant aller jusqu'à 118% chez certains patients (Staatz 2002). La méthode par EMIT n'a à notre connaissance pas encore fait l'objet de comparatifs par rapport à une méthode par LC-MS.

En raison de ces différences, les méthodes par LC-MS ou LC-MS/MS sont actuellement considérées comme les méthodes de choix pour le dosage du tacrolimus, et plus particulièrement chez les patients présentant des troubles de la fonction hépatique (MacFarlane 1999).

2.2.3. Mycophénolate mofétil

Un seul immunoessai (EMIT) est actuellement commercialisé pour le dosage du mycophénolate mofétil. Une étude a montré que cette technique donnait des valeurs environ 20% supérieures à celles obtenues par HPLC (Beal 1998). Il semble que cette différence soit due à une réactivité croisée avec le métabolite acyl-glucuronide (AcMPAG). Une activité immunosuppressive équivalente à celle de l'acide mycophénolique (MPA) a été observée *in vitro* avec ce métabolite (Schutz 1999, Wong 2001). Cette réactivité croisée semble donc souhaitable et devrait aller dans le sens d'une meilleure estimation de l'état d'immunosuppression du patient. Toutefois, une méthode chromatographique permettant de quantifier séparément le MPA et ses métabolites est encore mieux.

La figure 2.4. indique la proportion d'utilisation des différentes méthodes de dosage du MPA parmi les laboratoires européens (n=119) participant au contrôle de qualité externe « International Proficiency Testing Scheme » coordonné par l'Unité Analytique de l'Hôpital St-George à Londres.

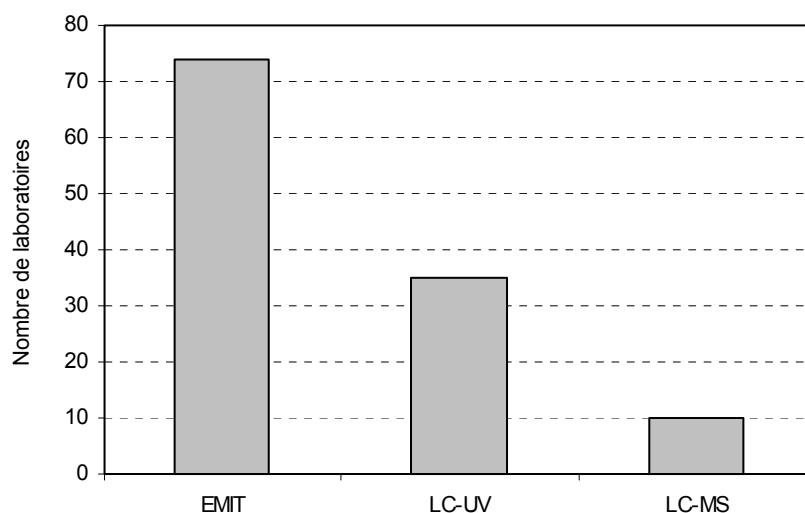


Figure 2.4. Techniques de dosage du mycophénolate mofétil en Europe (n=119)

2.3. Méthodes chromatographiques

2.3.1. Préparation de l'échantillon

La première étape de la plupart des processus analytiques (figure 2.5.) consiste en une préparation de l'échantillon. Cette étape relève d'une importance particulière dans le cadre du dosage des immunosuppresseurs, en raison de la complexité de la matrice utilisée (le sang complet). La préparation de l'échantillon permet d'augmenter la sélectivité (suppression des interférences avec les composés endogènes), de diminuer la contamination du système analytique (élimination des contaminants) et également de concentrer l'analyte (amélioration de la sensibilité).

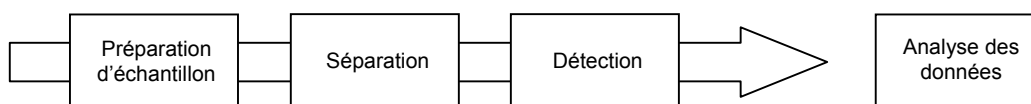


Figure 2.5. Processus analytique

Les principales techniques utilisées pour la préparation des échantillons dans le cadre du dosage sanguin des immunosuppresseurs sont indiquées ci-dessous.

a) Extraction liquide-liquide

Le principe de l'extraction liquide-liquide (LLE) repose sur une différence de solubilité entre les analytes et la matrice par rapport au solvant d'extraction (figure 2.6.). Après lyse des érythrocytes et précipitation des protéines à l'aide de différents réactifs (méthanol, acétonitrile, acétone, seuls ou en mélange avec une solution de sulfate de zinc par exemple) les immunosuppresseurs sont ensuite extraits à l'aide de solvants organiques (1-chlorobutane, diéthyléther, méthyl-t-butyléther par exemple). Le principal désavantage de cette technique, qui comporte généralement de nombreuses étapes incluant des phases d'évaporation, est le temps important nécessaire à sa réalisation, ce qui la rend difficilement compatible avec une utilisation en routine pour le dosage de grandes quantités d'échantillons. Par ailleurs, cette technique est difficilement automatisable.

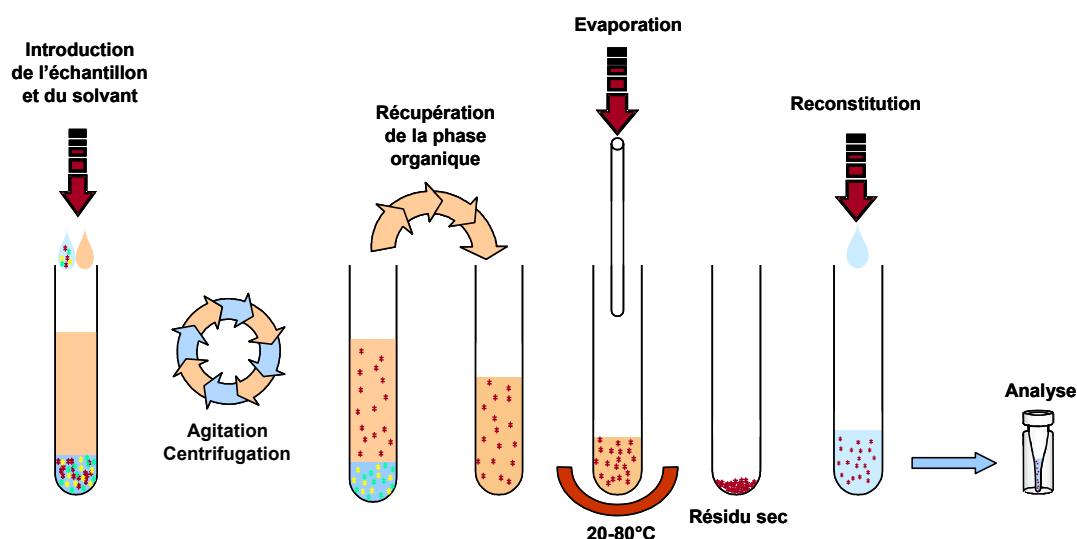


Figure 2.6. Principe de l'extraction liquide-liquide (LLE), d'après Laboratoire de chimie analytique pharmaceutique, UNIGE

b) Extraction en phase solide

L'extraction en phase solide (SPE) se déroule généralement en deux étapes (figure 2.7.). Après lyse des érythrocytes et précipitation des protéines, les immunosuppresseurs sont

retenus sur un support solide (cartouches C18 par exemple) et la matrice est éliminée par élution à l'aide de solvants appropriés. Les analytes sont ensuite libérés par élution à l'aide de solvants organiques qui seront ensuite évaporés afin de permettre une reconcentration des analytes. Cette technique nécessite, tout comme la LLE, un temps de réalisation important. Elle peut par contre être automatisée à l'aide de systèmes à 96 puits et de robots par exemple. On parle généralement de SPE off-line lorsque celle-ci n'est pas couplée directement au système analytique.

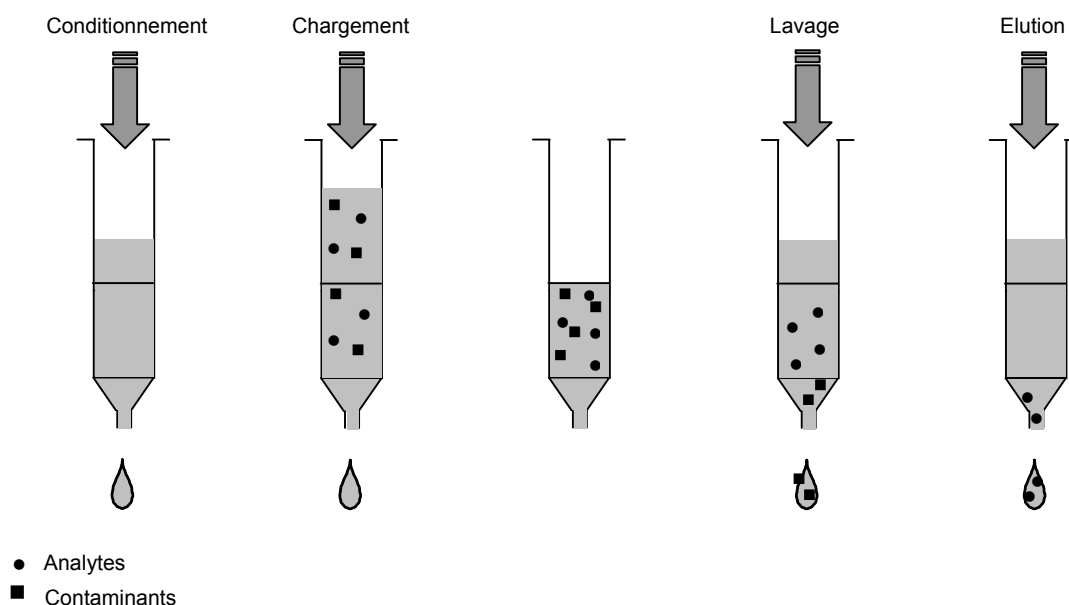


Figure 2.7. Principe de l'extraction en phase solide (SPE)

c) Système de commutation de colonnes

Cette technique de préparation de l'échantillon est une SPE on-line, c'est-à-dire couplée directement à la séparation chromatographique, à l'aide d'un système de commutation de colonnes. Après lyse des érythrocytes et précipitation des protéines, l'échantillon est injecté dans un système à deux colonnes (colonne d'extraction et colonne analytique). A l'aide d'une phase mobile appropriée, les analytes sont retenus sur la colonne d'extraction pendant que la matrice est éluée vers la poubelle (chargement). Après changement de configuration du système et de composition de phase mobile, les analytes sont libérés et transférés en flux inverse de la colonne d'extraction sur la colonne analytique où se déroulera la séparation chromatographique (figure 2.8.). Il s'agit d'une technique rapide et automatisée se prêtant

particulièrement bien à l'analyse de séries de taille moyenne. Le principe de cette technique qui a été retenue pour le développement de notre méthode analytique est décrit plus en détail au chapitre 8.2.

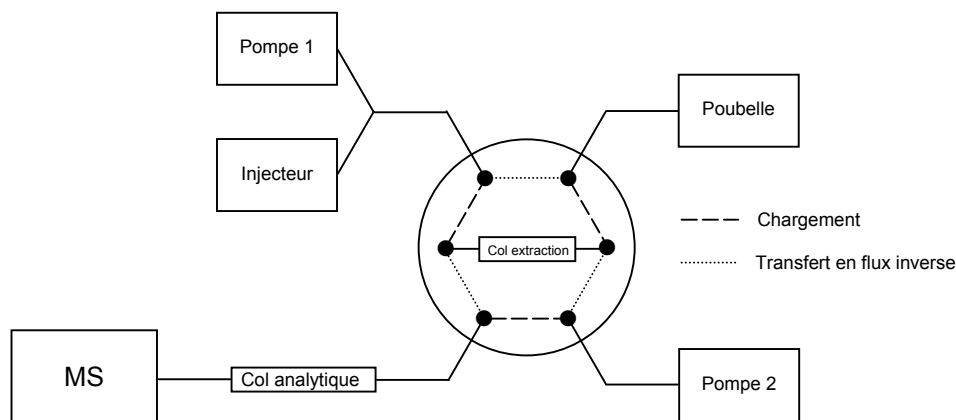


Figure 2.8. Système de commutation de colonnes (SPE on-line)

d) Injection directe

Cette technique consiste à injecter l'échantillon directement sur la colonne analytique après précipitation des protéines. A l'aide d'une phase mobile appropriée, les analytes sont dans un premier temps retenus sur la colonne analytique, tandis que la matrice est éluée vers la poubelle. Après commutation de la valve et modification de la composition de la phase mobile, les analytes sont libérés et élués directement vers le détecteur. Les débits d'analyse peuvent être élevés et le développement de méthodes est relativement aisé. Cette technique manque cependant de sélectivité et nécessite d'être couplée à un mode de détection permettant de combler ce déficit, comme par exemple la spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS).

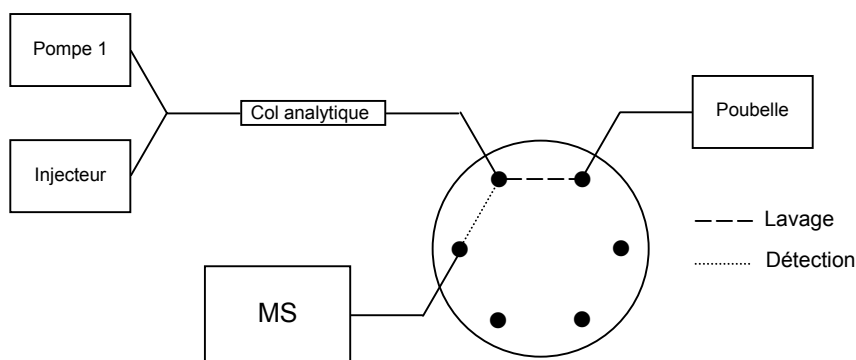


Figure 2.9. Système d'injection directe (lavage puis détection)

2.3.2. Exemple de spectromètre de masse

De manière générale, une analyse par spectrométrie de masse se déroule selon les étapes suivantes (Rouessac 2000):

- 1- *Ionisation*: les analytes sont vaporisés et ionisés dans la source de l'appareil par un des très nombreux procédés existants.
- 2- *Accélération*: aussitôt formés, les ions sont extraits de la source, focalisés et accélérés par des lentilles électroniques, pour accroître leur énergie cinétique.
- 3- *Séparation*: les ions sont filtrés suivant leur rapport masse/charge (m/z) par l'analyseur.
- 4- *Détection*: après séparation les ions terminent leur course en venant frapper un détecteur qui amplifie le courant ionique très faible.
- 5- *Affichage du spectre de masse* issu du traitement du signal envoyé par le détecteur.

De nombreux types de spectromètres de masse ont été développés. Nous décrivons ici, à titre d'exemple, le principe général de fonctionnement du spectromètre de masse utilisé dans le cadre de notre travail, qui est constitué d'une source électrospray de type orthogonal, couplée à un analyseur à quadripôle (figure 2.10.). Ce type d'appareil, couplé avec la chromatographie en phase liquide, est devenu un outil largement utilisé dans les laboratoires d'analyses. La plupart des méthodes de dosage des immunosuppresseurs par LC-MS ont été développées avec un appareil de ce type.

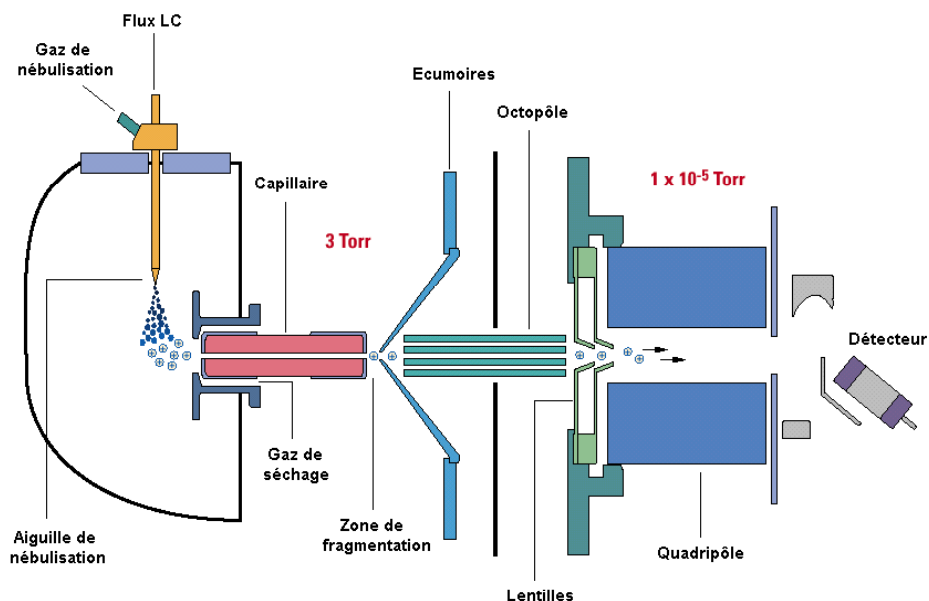


Figure 2.10. Représentation schématique du spectromètre de masse utilisé dans le cadre de notre travail, qui est constitué d'une source électrospray de type orthogonal couplée à un analyseur à quadripôle

a) Electrospray

Le flux de phase mobile provenant de la chromatographie en phase liquide et contenant les analytes et également des ions H^+ selon le pH de la solution ou des cations tels NH_4^+ , Na^+ ou K^+ , est vaporisé à pression atmosphérique en un fin brouillard. Les gouttelettes sont formées à l'extrémité d'un capillaire porté à un potentiel élevé (3000-6000V). Le champ électrique intense leur confère une densité de charge importante. Par application d'un gaz sec et chaud, elles s'évaporent progressivement en perdant des molécules de solvant par des mécanismes complexes de désolvatation et d'évaporation. Leur densité de charges devenant trop grande, elles explosent en libérant des ions non fragmentés et protonés ou cationisés de l'analyte (adduits), porteurs d'un nombre de charges variables (figure 2.11.). A l'aide de champs électriques, seuls les ions vont pénétrer par un orifice dans le spectromètre de masse sous haut vide.

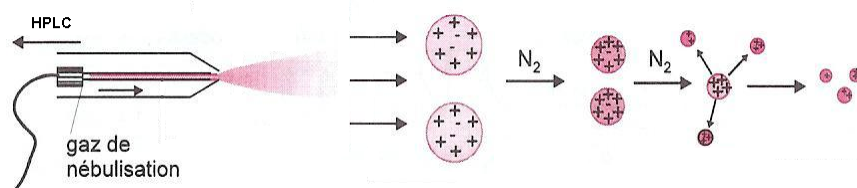


Figure 2.11. Principe de l'électrospray (d'après Rouessac 2000)

b) Analyseur à filtre quadripolaire

Les ions formés à l'aide de l'électrospray vont ensuite arriver dans le quadripôle qui est formé de quatre barres métalliques parallèles équidistantes d'un axe central imaginaire (figure 2.12.). Par application de tensions alternatives et continues variables entre les barres, il y a création à l'intérieur du quadripôle d'un champ électrique fluctuant. Seuls les ions qui ont un certain rapport masse sur charge (m/z) peuvent passer au travers du filtre ainsi formé, les autres ions étant perdus par collision sur l'une des barres.

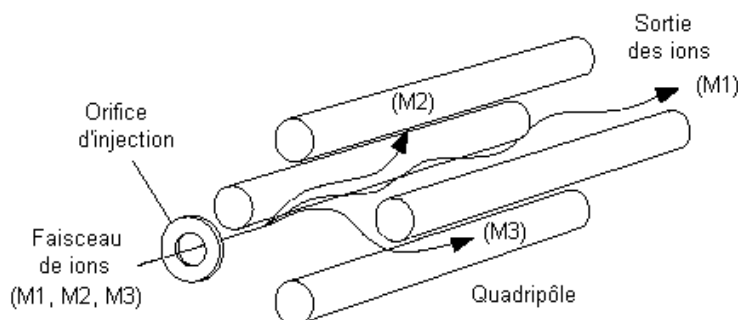


Figure 2.12. Représentation schématique d'un filtre quadripolaire

2.3.3. Ciclosporine

a) Méthodes par LC-UV

La sensibilité des techniques par LC-UV est suffisante pour la quantification de la ciclosporine dans le sang complet en raison des concentrations relativement élevées rencontrées dans cette matrice (entre 100 et 1500 ng/ml selon le moment de prélèvement). Un grand nombre de méthodes par LC-UV ont été développées pour le dosage de cette molécule depuis 1981 (Sawchuk 1981, Lensmeyer 1985, Annesley 1986, Moyer 1986a et 1986b, Sangalli 1987, Kabra 1987a et 1987b, Charles 1988, Bowers 1990, Holman 1992,

Salm 1993, Poirier 1994, Amini 2003). Un certain nombre de méthodes permettant de doser simultanément les métabolites principaux ont également été publiées (Christians 1988a et 1988b, Brozmanova 2000). La préparation des échantillons était réalisée principalement par SPE off-line manuelle ou parfois automatisée à l'aide de robots, mais également par LLE off-line ou injection directe de l'échantillon dans la colonne analytique après une simple précipitation des protéines. Les limites de quantification se situaient entre 15-100 ng/ml et les temps de séparation chromatographique entre 6 et 60 minutes.

Le large domaine de concentrations rencontré avec la ciclosporine peut conduire à des problèmes de linéarité et la plupart des méthodes n'étendaient pas leur intervalle de dosage aux hautes concentrations, c'est à dire celles rencontrées lors des prélèvements à C₂, ce qui nécessitait la dilution de certains échantillons. Les méthodes par LC-UV sont vulnérables aux interférences liées à la matrice ainsi qu'à d'autres médicaments administrés simultanément et nécessitent des procédures d'extraction préalables souvent fastidieuses et de longue durée. Afin de limiter les interférences, de bonnes séparations chromatographiques sont également nécessaires, conduisant dans la plupart des cas à des temps d'élution relativement longs, ce qui peut causer des problèmes en cas d'utilisation en routine dans certains centres de transplantation où de nombreuses analyses sont effectuées chaque jour.

b) Méthodes par LC-MS et LC-MS/MS

Une meilleure spécificité ainsi qu'une limite de quantification plus basse peuvent être obtenues à l'aide de méthode par LC-MS et surtout LC-MS/MS. Les procédures de préparation des échantillons peuvent être simplifiées et les temps de séparation chromatographique raccourcis. Des méthodes par LC-MS (Zhou 2001) et LC-MS/MS (Simpson 1998, Taylor 1998b, Keevil 2002a) ont été développées pour le dosage de la ciclosporine dans le sang complet. Les techniques de préparation des échantillons étaient une SPE off-line, une LLE off-line ou une simple précipitation des protéines avec une injection directe du surnageant dans le système analytique. Les limites de quantification se situaient entre 1-5 ng/ml et les temps de séparation chromatographiques entre 2 et 20 minutes.

2.3.4. Tacrolimus

Le tacrolimus ne possède pas de chromophore, il n'est par conséquent pas possible de le doser par LC-UV (Alak 1997b). Une méthode de dosage dans le sang complet par HPLC et détection par fluorimétrie a été proposée après dérivation à l'aide de dansylhydrazine (Beysens 1994). La préparation de l'échantillon consistait en une LLE off-line suivie d'une double SPE on-line. La limite de quantification était de 3 ng/ml.

a) Méthodes par LC-MS

Plusieurs méthodes par LC-MS ont été développées pour le dosage du tacrolimus dans le sang complet. Cette technique présente une meilleure sélectivité et permet d'atteindre des limites de quantification plus faibles, ce qui est important au vu des faibles concentrations rencontrés (5-20 ng/ml). Une méthode par LC-MS (ionisation chimique) (Christians 1991d et 1992b) a été proposée pour le dosage de cette molécule avec ses métabolites, avec une préparation de l'échantillon par SPE off-line. La séparation chromatographique durait 12,5 minutes et la limite de détection obtenue était de 0,25 ng/ml. Des modifications apportées à cette méthode (simplification de la SPE et optimisation de la séparation chromatographique) ont permis d'obtenir des temps d'élution de 3 minutes (Gonschior 1995). Une méthode avec une préparation de l'échantillon à l'aide d'une SPE off-line automatisée suivie d'une analyse par LC-MS a été récemment développée, la séparation chromatographique était inférieure à 1 minute (Lensmeyer 2001).

b) Méthodes par LC-MS/MS

Un certain nombre de méthodes par LC-MS/MS ont été développées pour le dosage du tacrolimus. La préparation de l'échantillon était réalisée par soit par LLE off-line (Alak 1997a), ou par SPE off-line (Taylor 1996, 1997 et 1998c, Salm 1997, Staatz 2002), avec des temps de séparations chromatographiques se situant entre 1,5 et 4 minutes. Les limites de quantifications étaient de l'ordre de 0,1-0,2 ng/ml. Une autre méthode par LLE off-line suivie d'une séparation chromatographique de 17 minutes a permis de quantifier le tacrolimus et 7 de ses métabolites (Zhang 1997). Une méthode opérant à l'aide d'un système à 96 puits miniaturisé a été récemment développée (Keevil 2002b) permettant de diminuer considérablement le temps de préparation de l'échantillon. Après simple précipitation des protéines, les échantillons étaient injectés directement sur la colonne analytique. Les temps d'analyse étaient de 2,5 minutes et la limite de quantification de 0,5 ng/ml.

2.3.5. Sirolimus

En raison de l'absence d'immunoessai pour le dosage du sirolimus, de nombreuses méthodes chromatographiques ont été développées. Il semble toutefois qu'Abbott devrait mettre sur le marché un immunoessai (technique MEIA) durant l'année 2004. La figure 2.13. indique la proportion de laboratoires utilisant une méthode par LC-UV ou par LC-MS, parmi les participants européens (n=109) au contrôle de qualité externe « International Proficiency Testing Scheme » coordonné par l'Unité Analytique de l'Hôpital St-George à Londres.

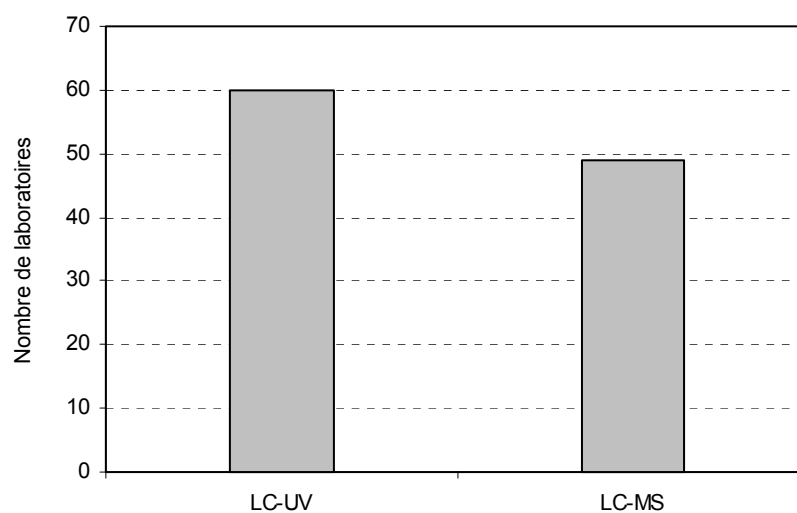


Figure 2.13. Techniques de dosage du sirolimus en Europe (n=109)

a) Méthodes par LC-UV

Plusieurs méthodes par LC-UV pour le dosage du sirolimus dans le sang complet ont été développées. Les faibles concentrations rencontrées aux taux résiduels (5-20 ng/ml) et la sensibilité limitée de cette technique de détection impliquent un processus d'extraction souvent complexe afin d'obtenir un échantillon suffisamment propre en vue de limiter les interférences. Plusieurs techniques de préparation de l'échantillon ont été utilisées, elles consistaient en une LLE off-line (Yatscoff 1992, Napoli 1994 et 1996, Maleki 2000, Holt 2000a, Napoli 2000, French 2001), une LLE off-line suivie d'une SPE off-line (Svensson 1997) ou une SPE off-line (Cattaneo 2002, Connor 2002). Les volumes d'échantillons requis pour ces méthodes étaient assez élevés (0,5-2 ml), les temps d'élutions relativement longs (10-35 minutes) et les rendements d'extraction absolu se situaient entre 35-101%. Les limites de quantifications étaient satisfaisantes (1-2,5 ng/ml).

b) Méthodes par LC-MS

Un certain nombre de laboratoires préfèrent utiliser des techniques de dosage par LC-MS (Streit 1996, Kirchner 2001) qui sont plus spécifiques et qui permettent d'atteindre des limites de quantification plus basses (0,25 ng/ml) avec une meilleure fidélité, tout en utilisant des volumes d'échantillons plus faibles (100 µl). Les procédures de préparation des échantillons peuvent être simplifiées et les temps d'élution raccourcis (6-12 minutes). Les techniques de préparation des échantillons utilisées étaient une SPE off-line (Streit 1996) ainsi qu'une SPE on-line avec un système de commutation de colonnes (Kirchner 2001). Une quantification des quatre métabolites principaux du sirolimus était également possible avec ces méthodes.

c) Méthodes par LC-MS/MS

Plusieurs méthodes de dosage du sirolimus par LC-MS/MS ont également été développées. Les techniques de préparation de l'échantillon étaient une LLE off-line (Holt 2000b), une SPE off-line (Taylor 1998a, Salm 1999 et 2000b), une SPE on-line avec un système de commutation de colonnes (Vogeser 2002) ou une injection directe de l'échantillon sur le système analytique après précipitation des protéines (Wallemacq 2003). Les temps de séparation chromatographique se situaient entre 8 et 10 minutes pour les quatre premières méthodes. La cinquième a permis d'obtenir une analyse incluant la préparation de l'échantillon en seulement 5 minutes et la dernière en 2,5 minutes. Les limites de quantification se situaient entre 0,25-1 ng/ml.

2.3.6. Everolimus

a) Méthodes par LC-MS et LC-MS/MS

Aucune méthode de dosage de l'everolimus par LC-UV n'a été publiée à notre connaissance. Une méthode par LC-MS (Segarra 1998) et par LC-MS/MS (Salm 2002) ont été développées avec une préparation de l'échantillon consistant en une SPE off-line. La limite de quantification était de respectivement 0,1 et 0,5 ng/ml et le temps de la séparation chromatographique de 16 et 8 minutes.

2.3.7. Mycophénolate mofétil

a) Méthodes par LC-UV

Le dosage du mycophénolate mofétil (MMF) et de ses métabolites (principalement le métabolite actif MPA) par LC-UV, est rendu plus aisé que celui des autres immunosuppresseurs en raison de la détermination de ces composés à partir du plasma qui est une matrice moins complexe que le sang complet et également en raison des plus hautes concentrations rencontrées (1-3,5 µg/ml pour le MPA). Plusieurs méthodes par LC-UV ont été développées pour le dosage du MMF (Tsina 1996a), du MPA (Li 1996, Gummert 1999b, Na-Bangchang 2000), du MMF et du MPA (Sugioka 1994, Shipkova 2001) du MPA et du MPAG (Tsina 1996b, Huang 1997, Jones 1998, Seebacher 1999, Svensson 1999, Hosotsubo 2001a, Wiwattanawongsa 2001), du MPA, du MPA libre (non lié aux protéines plasmatiques) et du MPAG (Shipkova 1998) et également du MPA, du MPAG et du AcMPAG qui est le second métabolite actif réagissant de manière croisée avec la technique EMIT (Shipkova 2000). En raison de la matrice relativement propre, une simple précipitation des protéines était utilisée dans la majorité des cas en guise de préparation de l'échantillon. Des SPE off-line manuelles et parfois automatisées à l'aide de robots ou des LLE off-line ont également été utilisées. Les temps de séparation chromatographique allaient de 9 à 25 minutes. Une méthode par HPLC avec une détection par fluorescence a également été proposée pour le dosage du MPA (Hosotsubo 2001b). L'intérêt du dosage du métabolite inactif MPAG se situe plutôt au niveau d'études pharmacocinétiques que de monitoring thérapeutique.

b) Méthodes par LC-MS/MS

En ce qui concerne la détection par spectrométrie de masse, seules des méthodes par LC-MS/MS ont été décrites. Il s'agissait de méthodes pour le dosage du MPA libre après une ultrafiltration suivie d'une SPE off-line (Willis 2000, Atcheson 2004) et d'une méthode pour le dosage du MPA libre et total, avec une ultrafiltration pour obtenir la forme libre, suivie d'une SPE on-line avec un système de commutation de colonnes permettant d'obtenir des temps d'analyse de l'ordre de 4 minutes (Streit 2003).

2.3.8. Dosage simultané de plusieurs immunosuppresseurs

Certains protocoles d'immunosuppression actuels associent entre autres un inhibiteur de la calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus) à un inhibiteur de la mTOR (sirolimus ou everolimus). Il est par conséquent utile de disposer d'une méthode permettant de doser simultanément ces composés. De plus, il est intéressant pour les laboratoires de pouvoir doser différents protocoles d'immunosuppression avec la même méthode. En raison de leur spécificité, les méthodes par LC-MS ou LC-MS/MS conviennent à cette utilisation.

a) Méthodes par LC-MS

Un certain nombre de méthodes par LC-MS permettant de doser simultanément plusieurs immunosuppresseurs ont été récemment développées. Il s'agit de méthodes dont la préparation de l'échantillon est réalisée à l'aide d'une SPE on-line avec un système de commutation de colonnes, permettant de doser simultanément la ciclosporine et le sirolimus (Kirchner 1999a), la ciclosporine et l'everolimus (Vidal 1998), la ciclosporine, l'everolimus et leurs métabolites (Kirchner 1999b) et la ciclosporine, le tacrolimus, le sirolimus et l'everolimus (Christians 2000, Deters 2002). Les quatre premières méthodes utilisaient deux pompes, ce qui permettait de laver et rééquilibrer la colonne d'extraction pendant la séparation chromatographique des composés sur la colonne analytique, permettant d'obtenir des temps d'analyse relativement courts (9,5-15 minutes) incluant la préparation de l'échantillon. La cinquième méthode n'utilisait qu'une seule pompe, résultant en un temps d'analyse plus long (27 minutes). Les limites de quantification se situaient entre 0,25 et 0,4 ng/ml pour le sirolimus, le tacrolimus et l'everolimus et entre 2 et 7,5 ng/ml pour la ciclosporine. Une méthode de dosage pour la ciclosporine et l'everolimus à haut débit à l'aide d'une SPE semi-automatique réalisée sur un système à 96 puits a également été développée (McMahon 2000), avec une séparation chromatographique de 6 minutes.

b) Méthodes par LC-MS/MS

Plusieurs méthodes par LC-MS/MS permettant le dosage simultané d'immunosuppresseurs ont été développées ces dernières années. Il s'agit d'une méthode de dosage du tacrolimus avec le sirolimus (Taylor PJ 2000), de la ciclosporine avec le tacrolimus et l'everolimus (Volosov 2001) ou de la ciclosporine avec le tacrolimus, le sirolimus et l'everolimus (Streit 2002). La première de ces méthodes utilise une préparation de l'échantillon selon une SPE off-line, les deux dernières opèrent selon une injection directe de l'échantillon après

précipitation des protéines. Les temps d'analyse se situaient entre 4 et 5 minutes incluant la préparation de l'échantillon. La détection par MS/MS a permis de diminuer les temps de séparations chromatographiques, la spécificité étant assurée par le détecteur. Les limites de quantification se situaient entre 0,25-1 ng/ml pour le sirolimus, le tacrolimus et l'everolimus et entre 5-10 ng/ml pour la ciclosporine. Une méthode de dosage de la ciclosporine et de l'everolimus à haut débit selon une LLE semi-automatique à l'aide d'un système à 96 puits a également été développée (Brignol 2001), avec une séparation chromatographique de 4 minutes.

2.4. Conclusion

Les techniques immunologiques sont largement utilisées pour le dosage des immunosuppresseurs. Ces méthodes peuvent donner des réactions croisées avec certains métabolites de la ciclosporine et du tacrolimus, pouvant conduire chez certains types de patients à des surestimations cliniquement significatives des taux réels. Un nombre important de techniques différentes sont utilisées parmi les laboratoires, une standardisation serait souhaitable afin de diminuer la variabilité au niveau des résultats. Les marges thérapeutiques doivent être déterminées en fonction de la technique analytique utilisée. Les méthodes immunologiques sont également très coûteuses en terme de réactifs. Une meilleure spécificité pour les molécules mères peut être obtenue à l'aide des méthodes chromatographiques qui sont considérées, selon les consensus internationaux, comme les méthodes de référence. Ces dernières présentent cependant le désavantage d'être techniquement plus compliquées à mettre en œuvre et nécessitent un investissement financier important, surtout en ce qui concerne la détection par spectrométrie de masse.

3. OBJECTIFS DU TRAVAIL

La demande de dosages sanguins d'immunosuppresseurs au Laboratoire Central de Chimie Clinique (LCCC) des Hôpitaux Universitaires de Genève (HUG), dans le cadre du monitoring thérapeutique, n'a cessé d'augmenter ces dernières années avec près de 15'000 analyses effectuées en 2003 pour la ciclosporine, le tacrolimus, le sirolimus et le mycophénolate mofétil.

Les dosages de la ciclosporine, du tacrolimus et du mycophénolate mofétil sont actuellement réalisés aux HUG à l'aide d'une méthode immunologique appelée Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT) qui présente l'avantage d'être rapide et simple d'utilisation. Les immunoessais manquent cependant de spécificité et des réactions croisées avec certains métabolites, pouvant conduire à des surestimations des taux cliniquement significatives chez certains types de patients, ont été mises en évidence. Ces techniques présentent également le désavantage d'être coûteuses en terme de réactifs (9, 17 et 20 CHF par analyse, respectivement pour la ciclosporine, le tacrolimus et le mycophénolate mofétil avec pour résultat une facture annuelle s'élevant à environ 200'000 CHF) et ne permettent pas de doser simultanément plusieurs molécules. Les consensus internationaux recommandent l'utilisation d'une méthode spécifique (comme la chromatographie) pour le dosage de ces médicaments

Le dosage du sirolimus, pour lequel aucun immunoessai n'est actuellement disponible, est réalisé aux HUG à l'aide d'une méthode par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) après une préparation de l'échantillon selon un processus d'extraction liquide-liquide comportant de nombreuses étapes. Le LCCC ne dispose pas de méthode pour le dosage de son analogue l'everolimus, qui devrait être mis sur le marché prochainement et pour lequel les premières études ont montré qu'il était également nécessaire de procéder à un monitoring thérapeutique des concentrations sanguines.

En réponse aux besoins du LCCC de pouvoir disposer (1) d'une méthode spécifique et moins coûteuse pour le dosage de la ciclosporine et du tacrolimus, (2) d'une méthode comportant une préparation de l'échantillon plus rapide pour le sirolimus et (3) d'une nouvelle méthode pour l'everolimus, les objectifs de notre travail consistaient à développer et valider une méthode spécifique permettant de doser simultanément ces quatre médicaments dans le sang complet. Une méthode par LC-MS avec une préparation de l'échantillon automatisée selon un processus d'extraction on-line en phase solide avec un système de commutation de colonnes, devrait permettre d'atteindre les objectifs évoqués et d'obtenir une méthode rapide, compatible avec la quantité importante d'échantillons analysés chaque jour

au laboratoire. Une méthode de ce type ayant été publiée récemment (Christians 2000), l'intérêt de notre travail consistait à développer un outil similaire au sein des HUG.

Le mycophénolate mofétil ne pouvant être dosé simultanément avec les autres molécules en raison de la matrice différente, à savoir le plasma, la mise au point d'une méthode par LC-MS pour cet immunosuppresseur n'a pas fait l'objet de ce travail.

Les étapes de notre travail consistaient (1) à mettre au point la détection par spectrométrie de masse et la séparation chromatographique (2) à réaliser une étude préliminaire à l'aide d'une méthode par extraction liquide-liquide (3) à développer et valider la méthode par extraction on-line en phase solide (4) à doser des échantillons provenant de patients transplantés et à comparer les résultats obtenus avec ceux provenant des méthodes utilisées actuellement en routine.

Il est souhaité que la méthode développée puisse être utilisée en routine au LCCC ainsi que dans le cadre d'études cliniques futures, après comparaison et évaluation par rapport aux méthodes actuelles. Elle pourrait également être exportée vers d'autres laboratoires cliniques.

4. MATÉRIEL

4.1. Appareillage

4.1.1. Identification

Le système de chromatographie liquide utilisé était le modèle HP Series 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Etats-Unis) équipé d'une pompe binaire et d'un commutateur de valves. Une pompe additionnelle a été utilisée, il s'agissait du modèle HP Series 1050. Le détecteur était le spectromètre de masse HP Series 1100 MSD muni d'une source électrospray de type orthogonal et d'un simple quadripôle. Le détecteur DAD du système HP Series 1100 a également été utilisé. Le contrôle des instruments et l'acquisition des données ont été effectués à l'aide du logiciel HP Chemstation versions 08.03, 09.01 et 10.01.

4.2. Produits chimiques et biologiques

4.2.1. Identification

Le tacrolimus hydrate nous a été offert par Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd. (Osaka, Japon), le sirolimus et le demethoxy-sirolimus par Wyeth-Ayerst Research (Princeton, Etats-Unis) et l'everolimus et la ciclosporine D par Novartis (Bâle, Suisse). La ciclosporine A et l'ascomycine ont été achetés chez Fluka Chemie GmbH (Buchs, Suisse).

Le méthanol de qualité Absolute HPLC Supra Gradient et l'acétonitrile HPLC-S Gradient grade provenaient de chez Biosolve LTD (Valkenswaard, Pays-Bas). L'eau ultra-pure était produite par notre laboratoire à l'aide du système Milli-Q (Millipore, Molsheim, France). L'acide formique et le formiate de sodium, tous deux de qualité puriss pour analyse, ainsi que le sulfate de zinc heptahydrate et la dodécylamine provenaient de chez Fluka Chemie GmbH (Buchs, Suisse). L'acétone de qualité p.a. et l'hydroxyde de sodium en pastilles ont été achetés chez Merck (Darmstadt, Allemagne). Le 1-chlorobutane était de qualité pour analyse et provenait de chez Panreac Quimica SA (Barcelone, Espagne).

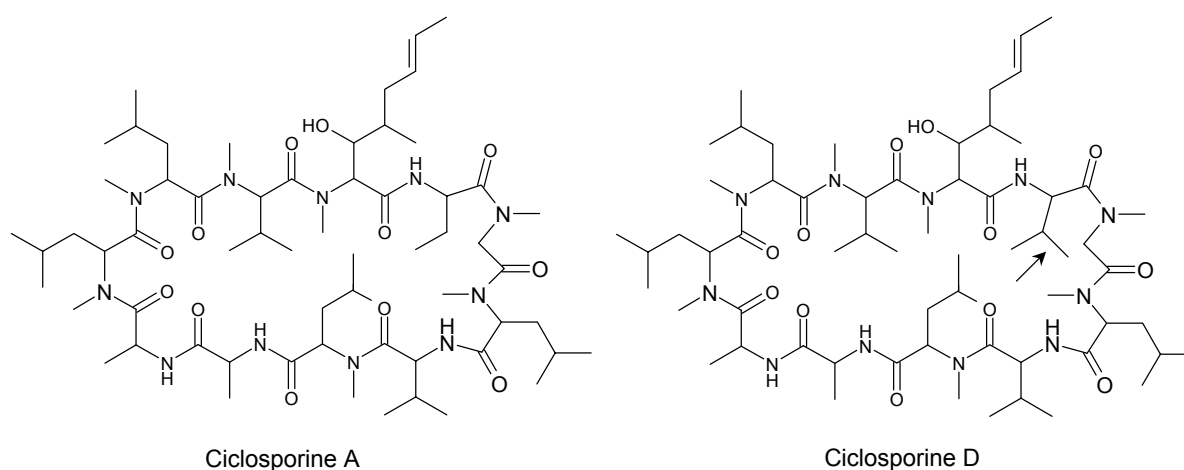
Le sang complet, anticoagulé à l'aide d'EDTA, contenant ou non des immunosuppresseurs, provenait du solde d'échantillons de patients analysés par le Laboratoire Central de Chimie Clinique des HUG.

4.2.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les formules brutes ainsi que les masses moléculaires moyennes et mono-isotopiques calculées des immunosuppresseurs et des étalons internes sont indiquées dans le tableau 4.1., les structures chimiques sont représentées sur la figure 4.1.

Tableau 4.1. Formules brutes, masses moléculaires moyennes et mono-isotopiques calculées des immunosuppresseurs et des étalons internes

Composé	Formule brute	Masse moléculaire moyenne	Masse moléculaire mono-isotopique
Ciclosporine A	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	1202,6	1201,8
Ciclosporine D	$C_{63}H_{113}N_{11}O_{12}$	1216,7	1215,9
Tacrolimus	$C_{44}H_{69}NO_{12}$	804,0	803,5
Ascomycine	$C_{43}H_{69}NO_{12}$	792,0	791,5
Sirolimus	$C_{51}H_{79}NO_{13}$	914,2	913,6
Everolimus	$C_{53}H_{83}NO_{14}$	958,2	957,6
Demethoxy-sirolimus	$C_{50}H_{77}NO_{12}$	884,2	883,6



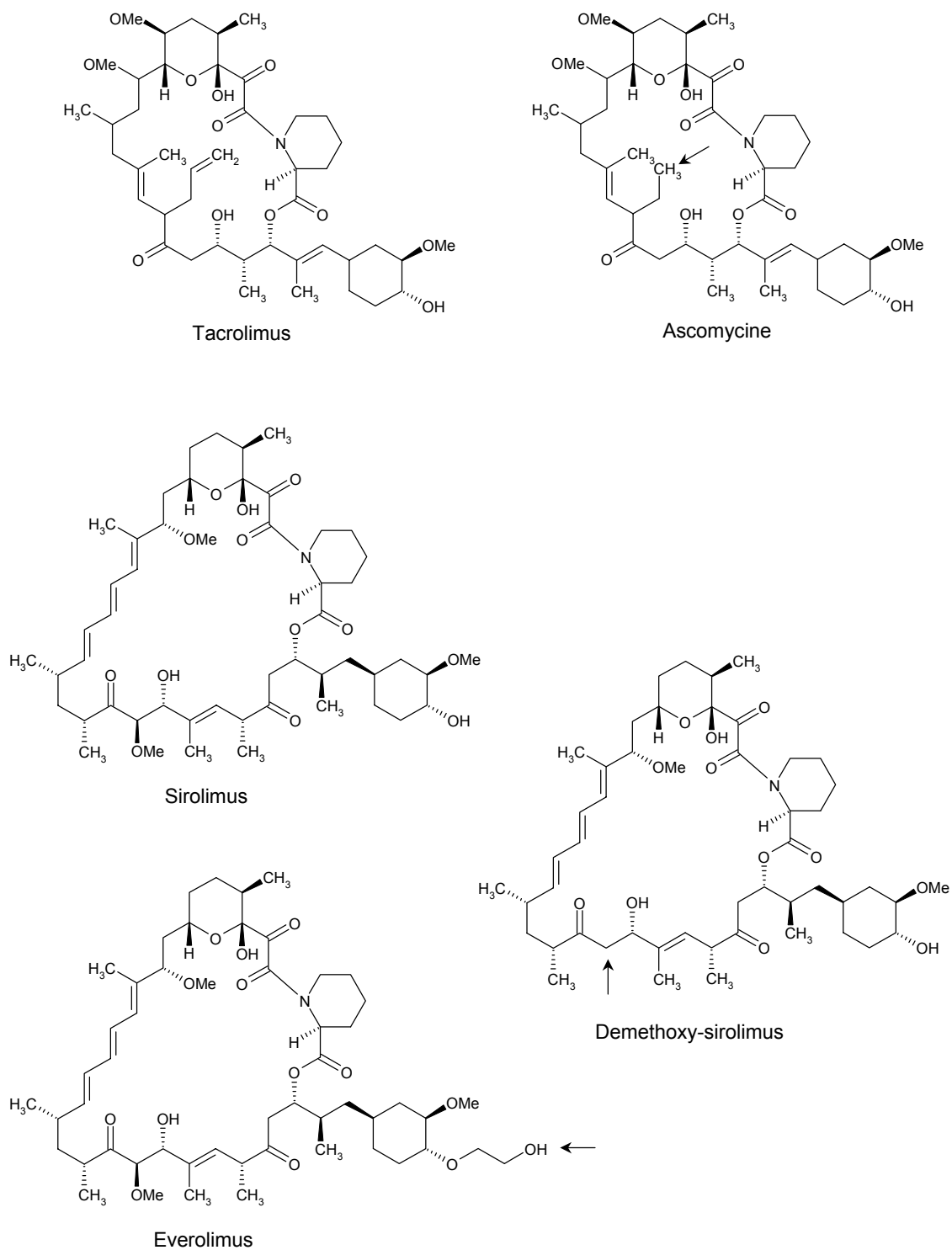


Figure 4.1. Structures chimiques des immunosuppresseurs et des étalons internes.
Les flèches indiquent les différences au niveau des structures chimiques.

a) Ciclosporine A

La ciclosporine A, polypeptide cyclique composé de 11 acides aminés, est soluble dans les solvants organiques et les lipides (éthanol > 80 mg/ml, 25°C) et pratiquement insoluble dans l'eau (0,04 mg/ml, 25°C) (McEvoy 2003). Elle présente un maximum d'absorption dans l'ultra-violet à 210 nm (Poirier 1994). Les solutions méthanoliques sont stables 2 mois à -22°C (Poirier 1994) et les échantillons sanguins au moins 4 jours à température ambiante (Kirchner 1999a), 2 mois à 4°C (Kabra 1987a) et 1 année à -20°C (Deters 2002). La stabilité d'échantillons sanguins après précipitation par un mélange de MeOH/ZnSO₄ 0,4 M 8/2 (1 volume sang/1 volume réactif) a été vérifiée sur 36 heures à température ambiante (Kirchner 1999a).

b) Tacrolimus

Le tacrolimus est un macrolide soluble dans le méthanol (653 mg/ml), l'acétone (571 mg/ml) et l'éthanol (355 mg/ml) et pratiquement insoluble dans l'eau (2-3 µg/ml) (Fujisawa 2002). Il n'absorbe pas dans l'ultra-violet ou le visible. La substance sèche est stable à température ambiante pendant 3 ans (Fujisawa 2002) et les solutions méthanoliques pendant plus de 4 mois à -22°C (Alak 1997a). Les échantillons sanguins sont stables 5 jours à température ambiante, 1 semaine à 4°C (Dade Behring 2003), 1 année à -20 °C (Deters 2002) et résistent à 5 cycles congélation-décongélation (Lensmeyer 2001).

c) Sirolimus

Le sirolimus est un macrolide soluble dans les solvants organiques (acétonitrile, méthanol, acétone, éthanol) et pratiquement insoluble dans l'eau (Napoli 2001). Le spectre d'absorption ultra-violet (structure triénique) montre un pic principal à 277 nm et deux pics secondaires à 267 et 288 nm (Mahalati 2001). Il est recommandé de conserver la substance sèche en dessous de -10°C (Wyeth 2001) et il a été montré que les solutions méthanoliques étaient stables au moins 6 mois à -80°C (Streit 1996). Dans le sang, la stabilité du sirolimus est fonction de la quantité séquestrée dans les érythrocytes avec une meilleure stabilité dans le sang complet que dans le plasma (Napoli 2001). Les échantillons sanguins sont stables au moins 8 jours à 30°C avec ou sans lumière (Salm 2001), 30 jours à 4°C (Napoli 2001) et 1 année à -20°C (Deters 2002). Cette molécule résiste à 3 cycles de congélation-décongélation après 6 semaines de conservation à -80°C (Salm 2000c). La stabilité d'échantillons sanguins après précipitation par un mélange de MeOH/ZnSO₄ 0,4 M 8/2 (1 volume sang/1 volume réactif) a été vérifiée sur 36 heures à température ambiante (Kirchner 1999a). La dégradation du sirolimus se produit par ouverture de la chaîne et formation de la seco-rapamycine (Napoli 2001). Des analyses par HPLC à 20°C ont montré

la présence de deux isomères (*trans-* et *cis-*) dans un rapport 4/1. Un autre isomère (forme oxepane), comptant pour environ 7% du pic, a été identifié lors d'analyses par HPLC effectuées à 40-50°C (Napoli 2001).

d) Everolimus

L'everolimus est le dérivé semi-synthétique 40-O-(2-hydroxyethyl)- du sirolimus. C'est un macrolide qui est soluble dans les solvants organiques (acétonitrile, méthanol, acétone, éthanol) et pratiquement insoluble dans l'eau. Il possède un maximum d'absorption à 276 nm (structure triénique) (Segarra 1998). Il a été montré que des solutions mères dans un mélange d'acétonitrile/acide sulfurique pH 3 75/25 étaient stables pendant au moins 6 mois à -80°C. Les échantillons sanguins sont stables au moins 7 jours à 20°C (Segarra 1998), 1 année à -20°C (Deters 2002) et résistent à 3 cycles congélation-décongélation (Salm 2002). La stabilité d'échantillons sanguins dans un mélange MeOH/H₂O 8/2 après précipitation a été vérifiée sur 24 heures à température ambiante (Salm 2002). Une meilleure stabilité a été constatée dans le sang par rapport aux solvants organiques, l'hypothèse d'une liaison avec les immunophilines stabilisant l'everolimus a été formulée (Segarra 1998).

4.2.3. Préparation des solutions mères

Les solutions mères d'immunosuppresseurs et d'étalons internes ont été préparées dans du méthanol à une concentration de 100 µg/ml et ont été conservées à -80°C.

5. MISE AU POINT DE LA DÉTECTION PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

5.1. Méthodes

5.1.1. Détermination du type d'adduit formé

La première étape de notre travail consistait à déterminer le type d'adduit majoritairement formé lors de la détection par spectrométrie de masse. En se basant sur le travail de certains auteurs (Christians 2000), les spectres de masses des différents composés ont été déterminés dans un premier temps avec une phase mobile composée d'un mélange méthanol/eau contenant 0,02% d'acide formique et 1 μM de formiate de sodium. D'autres auteurs (Stefansson 1996, Ortelli 2000) ont montré que l'ajout d'une amine primaire, comme par exemple la propylamine, pentylamine, hexylamine ou dodécylamine (DDA) dans la phase mobile pouvait inhiber la formation d'adduits multiples par formation d'une espèce dominante (adduit analyte-amine primaire) et conduire à une augmentation de l'intensité du signal. Des essais ont été réalisés dans notre cas avec une phase mobile contenant 0,05 mM de dodécylamine et 25 mM d'acide formique.

Conditions opératoires :

Injection:	10 μl , en mode d'injection en flux direct (FIA, flow injection analysis)
Echantillons:	Analytes et étalons internes individuellement à 100 ng/ml dans chacune des phases mobiles ci-dessous.
Phases mobiles:	Mélange MeOH/H ₂ O 80/20 avec 0,02% d'acide formique et 1 μM de formiate de sodium, le pH de la phase méthanolique était de 3,4 et celui de la phase aqueuse de 3,1. Mélange MeOH/H ₂ O 80/20 avec 0,05 mM de dodécylamine et 25 mM d'acide formique.
Débit:	200 $\mu\text{l}/\text{min}$
Réglages du MS:	Voltage du capillaire: 3500 V, voltage du fragmenteur: 150 V pour le tacrolimus et l'ascomycine, 200 V pour le sirolimus et le demethoxy-sirolimus, 250 V pour la ciclosporine A, la ciclosporine D et l'everolimus, pression de nébulisation: 40 psi, débit du gaz de séchage: 9 l/min, température du gaz de séchage: 300°C.
Détection MS:	Mode SCAN : balayage d'un rapport m/z de 750 à 1500 selon les composés et la phase mobile.

5.1.2. Détermination des conditions optimales d'ionisation

Il s'agissait de déterminer la valeur de chacun des paramètres du spectromètre de masse permettant d'obtenir la meilleure intensité de signal. Les paramètres étudiés ont été le voltage du capillaire et du fragmenteur, la pression de nébulisation ainsi que le débit et la température du gaz de séchage.

Le voltage du capillaire est la tension appliquée (en V) entre l'aiguille de nébulisation et l'entrée du capillaire. Elle permet la nébulisation et l'ionisation de l'échantillon. Sa valeur optimale dépend du composé à analyser. Les mesures ont été effectuées pour des tensions allant de 2000 V à 6000 V.

Le voltage du fragmenteur est la tension appliquée (en V) entre la sortie du capillaire et les écumeurs. Il influence la transmission et la fragmentation des ions. Sa valeur optimale dépend du composé à analyser. Les mesures ont été effectuées pour des tensions allant de 50 V à 400 V.

La pression de nébulisation requise (en psi) dépend du débit de la chromatographie liquide et de la composition de la phase mobile. Les phases mobiles contenant une forte proportion d'eau nécessitent des pressions de nébulisation plus élevées. Les mesures ont été effectuées pour des pressions allant de 10 psi à 60 psi.

Le gaz de séchage utilisé était de l'azote, son débit requis (en l/min) dépend de sa température et du débit de la chromatographie liquide. De manière générale, plus le débit de la chromatographie est élevé, plus le débit du gaz de séchage doit être augmenté. Les mesures ont été effectuées pour des débits allant de 7 l/min à 13 l/min.

La température du gaz de séchage requise (en °C) dépend de son débit, de celui de la chromatographie liquide et de la stabilité thermique de l'échantillon. Les mesures ont été effectuées pour des températures allant de 150 °C à 350 °C.

Conditions opératoires :

Injection:	10 µl, en mode d'injection en flux direct (FIA, flow injection analysis)
Echantillons:	Analytes et étalons internes individuellement à 100 ng/ml dans la phase mobile.
Phase mobile:	Mélange MeOH/H ₂ O 80/20 avec 0,02% d'acide formique et 1 µM de formiate de sodium.
Débit:	200 µl/min
Réglages du MS:	Variation d'un paramètre à la fois, les autres étant réglés de la manière suivante: voltage du capillaire: 3500 V, voltage du fragmenteur: tacrolimus et ascomycine: 150 V, sirolimus et demethoxy-sirolimus: 200 V, ciclosporine A, ciclosporine D et everolimus: 250 V, pression de nébulisation 40 psi, débit du gaz de séchage: 9 l/min, température du gaz de séchage: 300°C.
Détection MS:	Mode SIM (single ion monitoring) pour des rapports m/z correspondant aux adduits [M+Na] ⁺ déterminés au paragraphe 5.2.1 : ascomycine: m/z 814,4, tacrolimus: m/z 826,4, demethoxy-sirolimus: m/z 906,5, sirolimus: m/z 936,5, everolimus: m/z 980,5, ciclosporine A: m/z 1224,7, ciclosporine D: m/z 1238,7

5.2. Résultats et discussion

5.2.1. Détermination du type d'adduit formé

a) Phase mobile avec acide formique et formiate de sodium

Les spectres de masses des immunosuppresseurs et des étalons internes obtenus avec la phase mobile contenant de l'acide formique et du formiate de sodium sont représentés sur les figures 5.1. à 5.7. Ces résultats ont permis de constater que l'ion majoritairement formé avec tous les composés était l'adduit sodium [M+Na]⁺. On notait également la présence d'un adduit potassium [M+K]⁺ de manière assez importante selon les substances. L'ion moléculaire [M+H]⁺ n'a été observé qu'avec la ciclosporine A et D. La variation des réglages du spectromètre de masse (voir chapitre 5.2.2.) n'a pas eu d'influence sur les intensités relatives des différents adduits observés. Les différents composés n'ont pas présenté de pics en communs, ce qui a permis d'exclure d'éventuelles interférences.

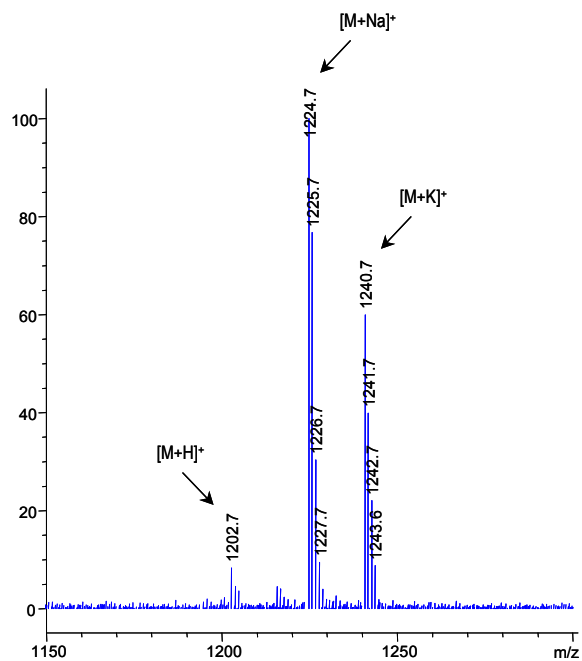


Figure 5.1. Spectre de masse de la cyclosporine A

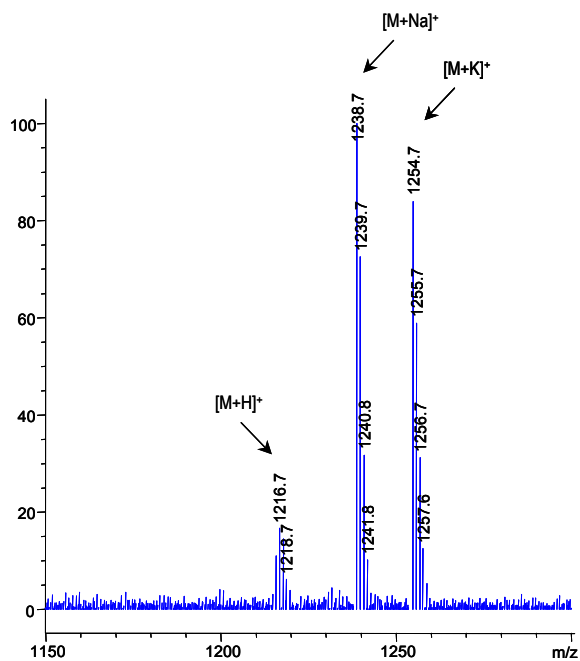


Figure 5.2. Spectre de masse de la cyclosporine D

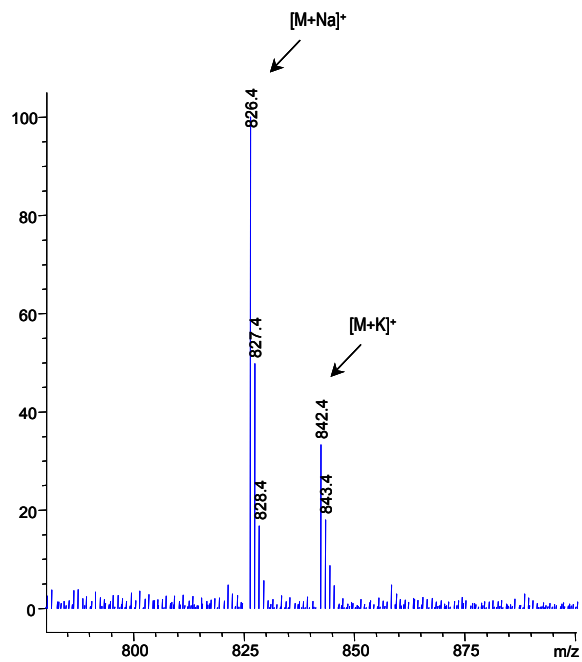


Figure 5.3. Spectre de masse du tacrolimus

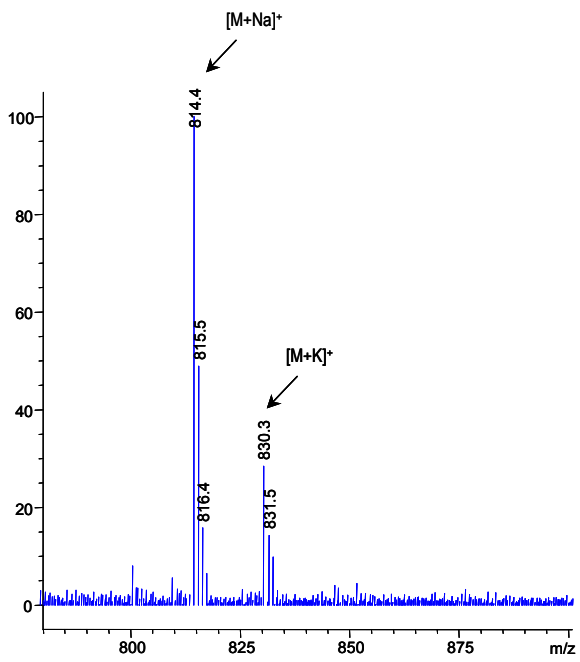


Figure 5.4. Spectre de masse de l'ascomycine

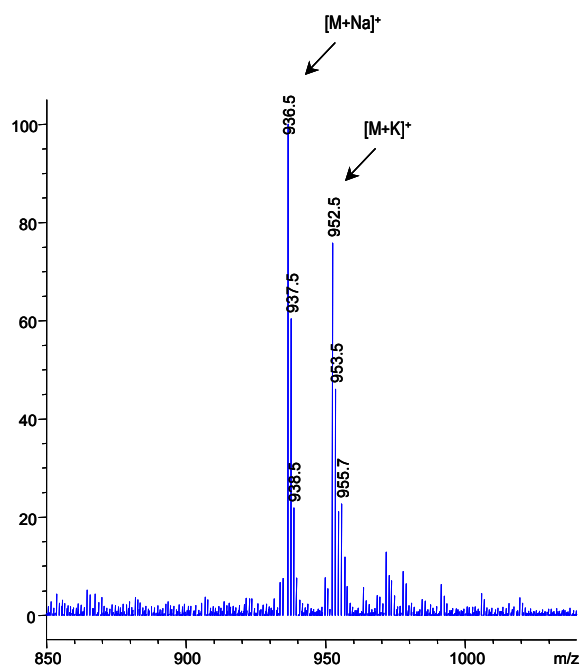


Figure 5.5. Spectre de masse du sirolimus

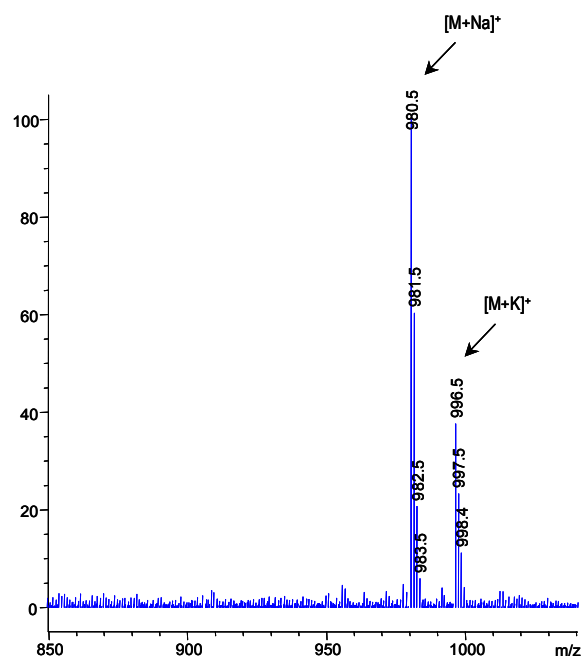


Figure 5.6. Spectre de masse l'everolimus

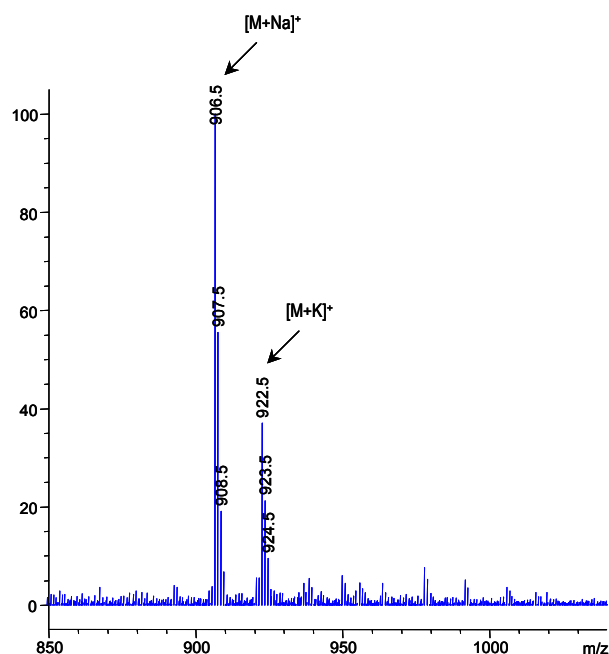


Figure 5.7. Spectre de masse du demethoxy-sirolimus

b) Phase mobile avec dodécylamine et acide formique

Les essais réalisés en présence de DDA dans la phase mobile n'ont pas permis d'obtenir un adduit préférentiel. La formation d'un adduit $[M+DDA+H]^+$ a été observé, mais on notait toujours la présence d'un adduit $[M+Na]^+$ a une abondance pouvant aller jusqu'à égaler celle

de l'adduit $[M+DDA+H]^+$ selon les composés. Il semble que la formation de l'adduit $[M+Na]^+$ soit favorisée par le type de spectromètre de masse utilisé. Les adduits $[M+H]^+$ et $[M+K]^+$ ont également été observés pour la ciclosporine A et D.

c) Conclusion

La phase mobile contenant de l'acide formique et du formiate de sodium a été retenue pour la suite du travail. Le détecteur du spectromètre de masse a été réglé sur les valeurs m/z correspondant aux adduits sodium et représentées dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1. *Masses moléculaires mono-isotopiques et rapports m/z des adduits $[M+Na]^+$ observés*

	Masse moléculaire mono-isotopique	m/z $[M+Na]^+$
Ascomycine	791,5	814,4
Tacrolimus	803,5	826,4
Demethoxy-sirolimus	883,6	906,5
Sirolimus	913,6	936,5
Everolimus	957,6	980,5
Ciclosporine A	1201,8	1224,7
Ciclosporine D	1215,9	1238,7

5.2.2. Détermination des conditions optimales d'ionisation

a) Voltage du capillaire

Les résultats obtenus (figure 5.8.) ont permis de constater que l'intensité du signal augmentait dans un premier temps, de manière plus ou moins marquée selon les substances, avec l'augmentation du voltage du capillaire. Cette augmentation était suivie d'une phase de plateau. Le voltage du capillaire devant être le même pour tous les composés et en raison de recommandations allant dans le sens d'une utilisation de la tension la plus faible donnant une intensité acceptable, la valeur retenue a été de 3500 V.

On a pu également constater que l'abondance obtenue pouvait être assez variable selon les composés et que de manière générale, les molécules de structure chimique proche avaient des intensités comparables. On a pu toutefois remarquer une différence d'intensité entre l'everolimus et le sirolimus qui pouvait être expliquée par le fait que les mesures concernant ces deux substances avaient été effectuées à des périodes différentes. Des expériences

préalables avaient en effet montré que l'intensité obtenue pour un même échantillon pouvait être différente au cours du temps. Des mesures effectuées le même jour pour le sirolimus et l'everolimus ont montré des intensités comparables.

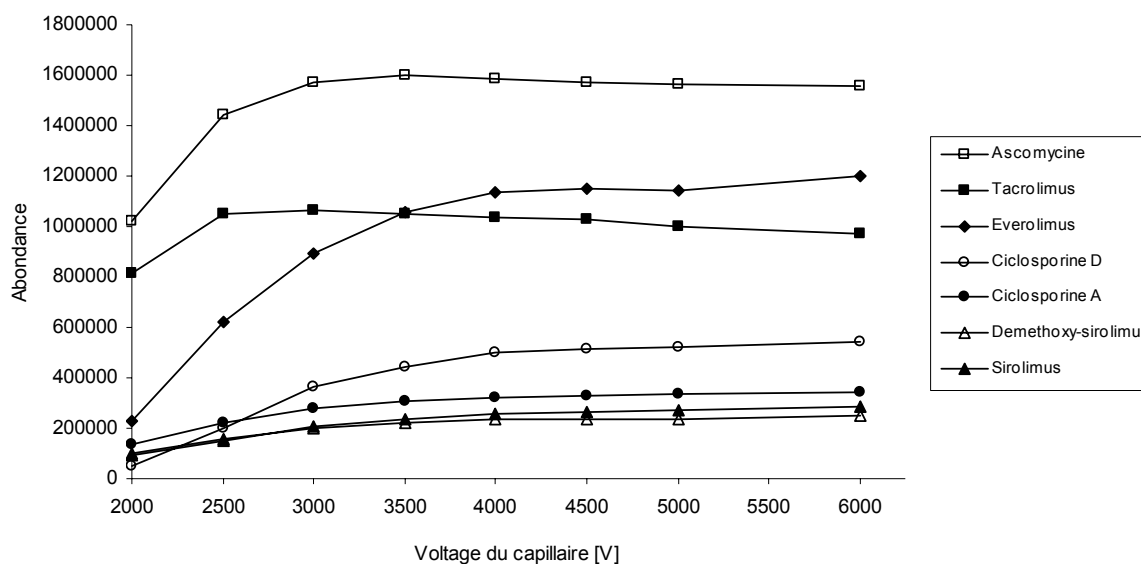


Figure 5.8. Influence du voltage du capillaire

b) Voltage du fragmenteur

De manière générale, on a pu constater que dans une première phase, l'augmentation du voltage du capillaire permettait d'obtenir une abondance plus élevée (figure 5.9.). A partir d'une certaine tension, l'effet inverse a été observé, probablement en raison de la fragmentation des molécules. Afin d'éviter ce risque de fragmentation et du fait que des tensions trop élevées pouvaient être néfastes pour l'appareil, nous avons choisi de travailler 50 V au-dessous de la valeur du fragmenteur donnant l'intensité maximale. Le spectromètre de masse permettant de régler une valeur du fragmenteur différente pour chaque composé, les tensions suivantes ont été retenues: 150 V pour l'ascomycine et le tacrolimus, 200 V pour le sirolimus et le demethoxy-sirolimus, 250 V pour la ciclosporine A, la ciclosporine D et l'everolimus.

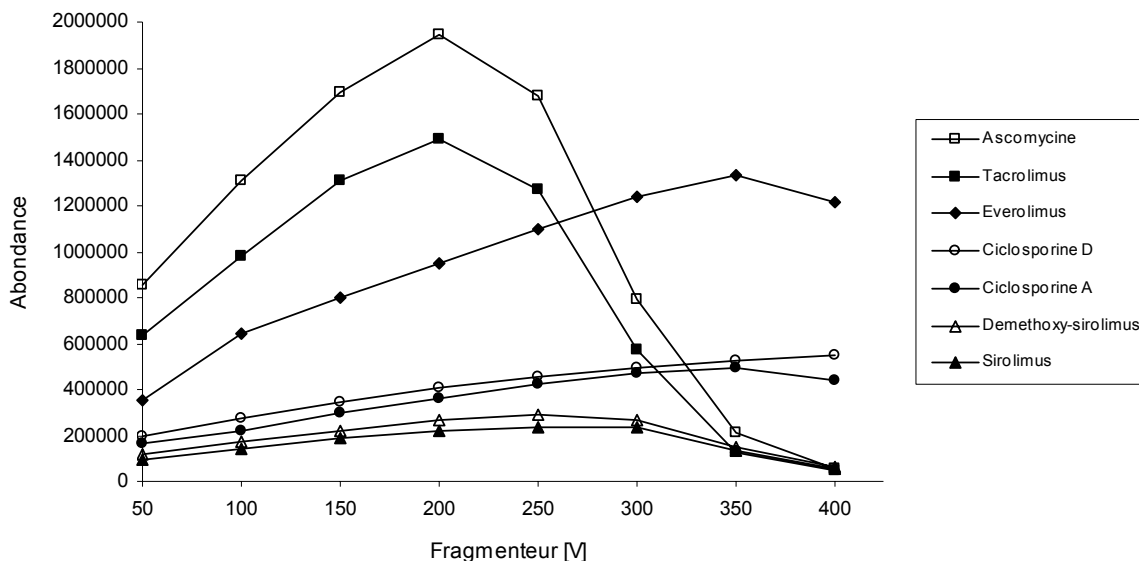


Figure 5.9. Influence du voltage du fragmenteur

c) Pression de nébulisation

La figure 5.10. a permis de constater que la pression de nébulisation influençait l'ionisation des composés de manière plus ou moins similaire, avec un optimum se situant entre 30 et 40 psi. La valeur de ce paramètre devant être la même pour tous les composés, il a été choisi de travailler à 40 psi.

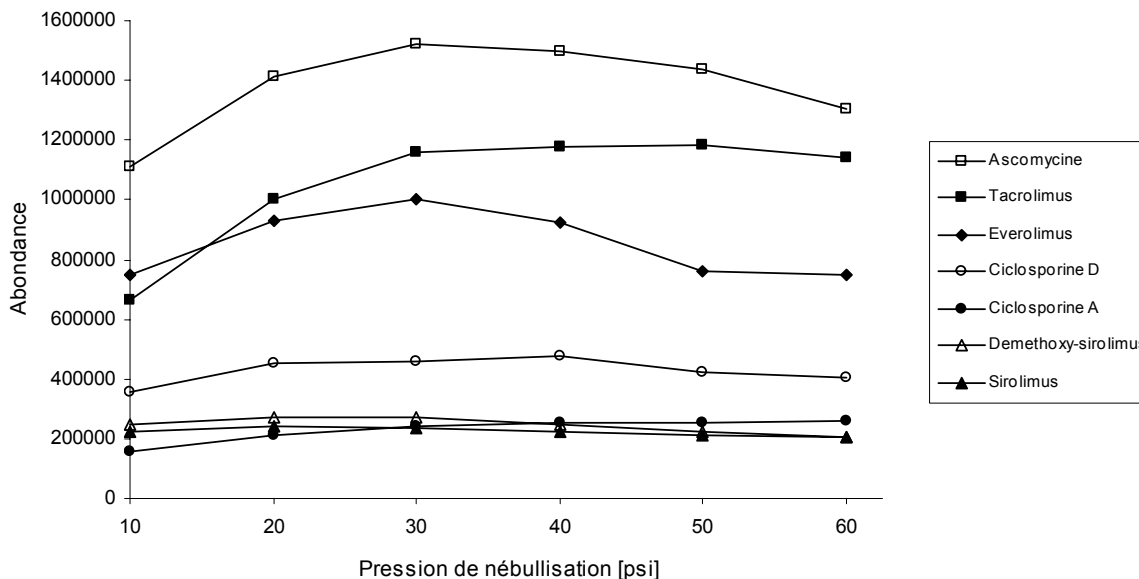


Figure 5.10. Influence de la pression de nébulisation

d) Débit du gaz de séchage

Les résultats obtenus (figure 5.11.) ont permis de constater que des débits trop élevés étaient défavorables à l'ionisation de certaines molécules. La valeur de ce paramètre devant être la même pour tous les composés, nous avons choisi de travailler à 9 l/min.

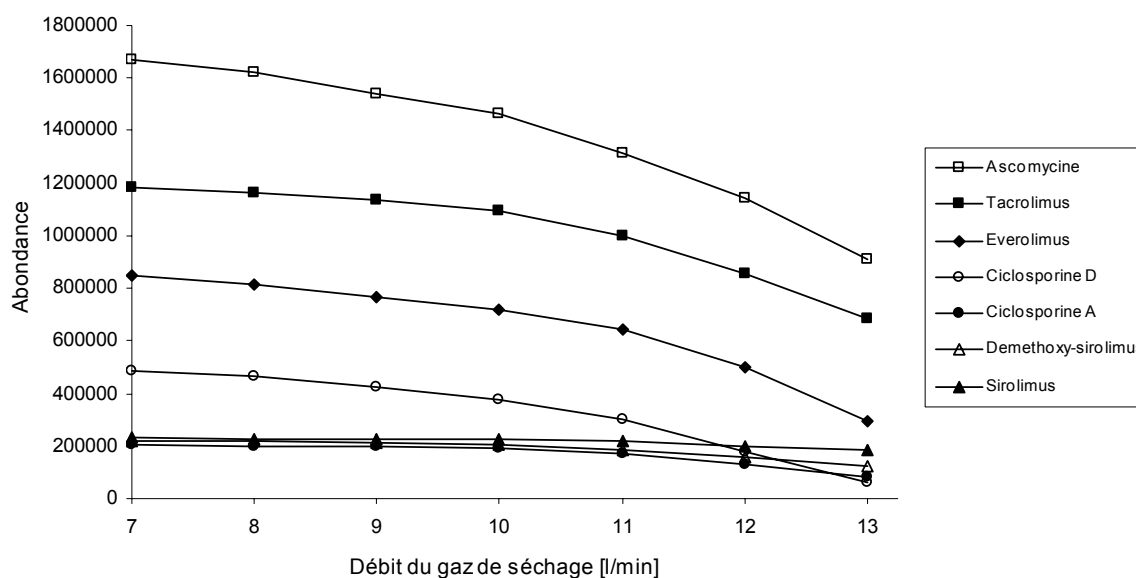


Figure 5.11. Influence du débit du gaz de séchage

e) Température du gaz de séchage

On a pu constater sur la figure 5.12. que l'abondance augmentait avec la température. Cette dernière devant être la même pour tous les composés, il a été décidé de travailler à 300 °C.

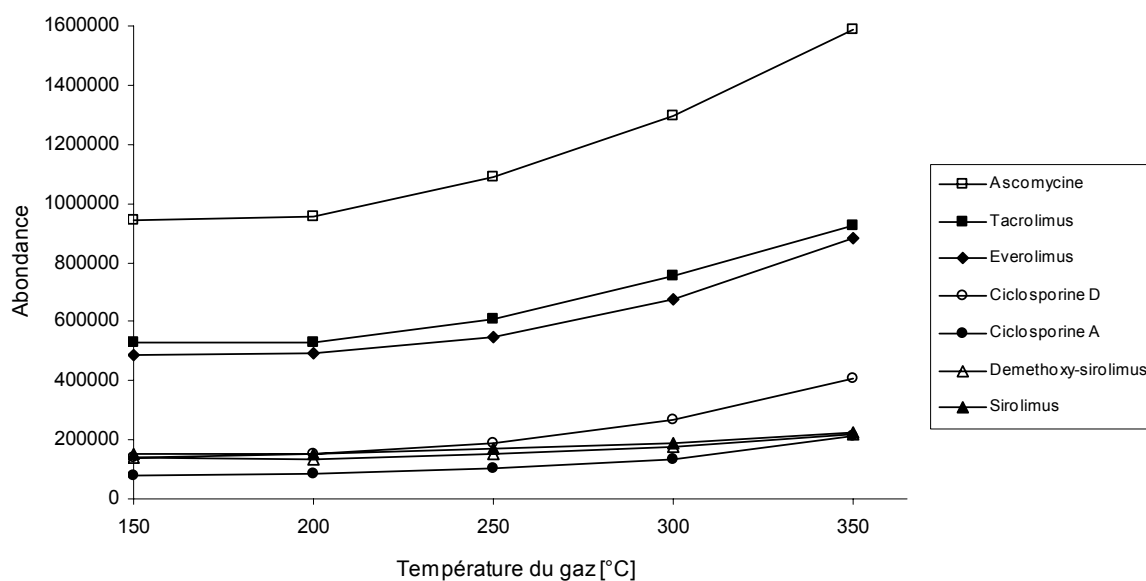


Figure 5.12. Influence de la température du gaz de séchage

f) Résumé des conditions retenues

Les conditions retenues pour le réglage du spectromètre de masse sont indiquées dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2. Réglages du spectromètre de masse

Paramètres	Composés	Conditions retenues
Voltage du capillaire		3500 V
Voltage du fragmenteur	tacrolimus, ascomycine	150 V
	sirolimus, demethoxy-sirolimus	200 V
	ciclosporine A, ciclosporine D, everolimus	250 V
Pression de nébulisation		40 psi
Débit du gaz de séchage		9 l/min
Température du gaz de séchage		300°C

5.3. Conclusion

Cette première étape de notre travail a permis de déterminer que l'adduit sodium était majoritairement formé lors de la détection par spectrométrie de masse, avec une phase mobile composée d'un mélange méthanol/eau contenant 0,02% d'acide formique et 1 μ M de formiate de sodium. Les réglages optimaux de l'appareil ont également pu être déterminés au cours de cette partie.

6. MISE AU POINT DE LA SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

6.1. Méthode

Cette étape de notre travail avait pour but de déterminer les conditions opératoires permettant d'obtenir une séparation chromatographique satisfaisante des immunosuppresseurs et étalons internes. Les essais ont été réalisés avec différentes colonnes chromatographiques, pour lesquelles différentes phases mobiles, débits et températures ont été expérimentés. Le couplage LC-MS présente certaines contraintes chromatographiques, notamment au niveau du choix de la phase mobile (doit être volatile) et de son débit (plus faible qu'avec un détecteur UV).

Conditions opératoires :

Injection:	20 μ l
Echantillons:	Analytes et étalons internes à 100 ng/ml dans différentes proportions de de MeOH (selon la phase mobile).
Colonnes:	XTerra™ MS C18 5 μ m, 2,1 x 50 mm (Waters® Corporation, Milford, Etats-Unis) munie d'une pré-colonne XTerra™ MS C18 5 μ m, 2,1 x 10 mm. Nucleodur® C18 Gravity 5 μ m, 2 x 125 mm (Macherey-Nagel, Oensingen, Suisse) munie d'une pré-colonne Nucleodur® C18 Gravity 5 μ m, 3 x 8 mm. Alltima® C18 5 μ m, 2,1 x 150 mm (Alltech Associates, Inc., Deerfield, Etats-Unis), pré-colonne non disponible.
Phases mobiles:	Différents gradients de MeOH/H ₂ O et de ACN/H ₂ O contenant chacun 0,02% d'acide formique et 1 μ M de formiate de sodium.
Débits:	250 et 400 μ l/min
Températures:	Température ambiante, 30, 40, 50 et 60°C
Détection MS:	Ascomycine: m/z 814,4, tacrolimus: m/z 826,4, demethoxy-sirolimus: m/z 906,5, sirolimus: m/z 936,5, everolimus: m/z 980,5, ciclosporine A: m/z 1224,7, ciclosporine D: m/z 1238,7

6.2. Résultats et discussion

6.2.1. Colonne XTerra™ MS C18 5µm, 2,1 x 50 mm

a) Phase mobile méthanol/eau

L'étude de la variation de la température a montré que cette dernière avait une forte influence sur la largeur des pics. Les essais réalisés à température ambiante et à 30°C ont donné des pics assez larges, avec un effet marqué pour la ciclosporine D (figure 6.1.A.). L'augmentation de la température à 40°C et surtout 50°C a permis d'obtenir des pics plus fins (figure 6.1.B.), en raison d'une augmentation de la cinétique (meilleurs échanges), tandis qu'une température de 60°C n'a pas apporté d'améliorations.

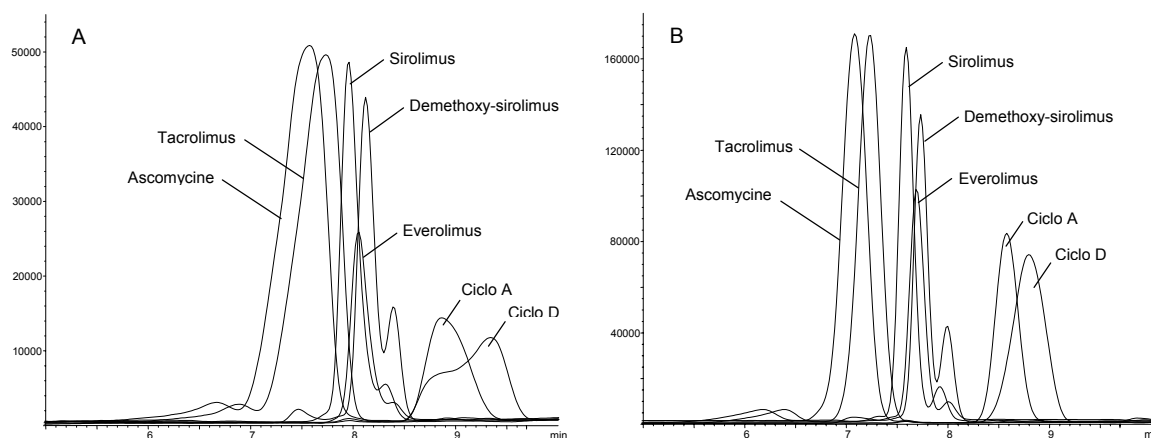


Figure 6.1. Chromatographie à 30°C (A) et 50°C (B),
débit: 250 µl/min, gradient: 65% à 95% de méthanol en 5 minutes

Les différents débits testés ont montré des résultats similaires en terme de séparation chromatographique, avec un avantage pour les débits à 400 µl/min qui permettaient de raccourcir les temps d'élution par rapport aux débits à 250 µl/min.

Parmi les nombreux gradients expérimentés, la meilleure séparation a été obtenue avec un mélange débutant à 65% de méthanol et évoluant vers 95% en 7 minutes avec un débit de 400 µl/min et une température de 50°C (figure 6.2.).

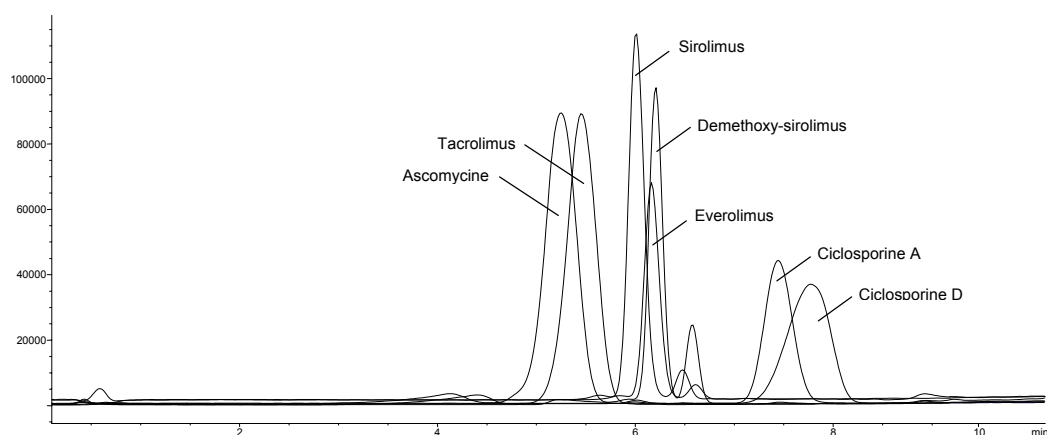


Figure 6.2. Chromatogramme obtenu avec la colonne XTerra™, débit: 400 $\mu\text{l}/\text{min}$, température 50°C, gradient: 65% à 95% de méthanol en 7 minutes

b) Phase mobile acétonitrile/eau

Les essais réalisés avec la phase mobile constituée d'un mélange d'acétonitrile et d'eau, aux différents gradients testés avec un débit de 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ et une température de 50°C n'ont pas permis d'obtenir de meilleure séparation qu'avec le mélange méthanol/eau.

6.2.2. Colonne Nucleodur® C18 Gravity 5 μm , 2 x 125 mm

Les différents gradients de méthanol/eau expérimentés avec la colonne Nucleodur® à un débit de 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ et une température de 40°C n'ont pas permis d'obtenir une meilleure séparation qu'avec la colonne XTerra™. Le principal désavantage de cette colonne résidait dans le fait que les temps de rétention obtenus étaient plus élevés en raison d'une plus grande longueur de la colonne. La meilleure séparation obtenue avec cette colonne dans les conditions testées est représentée sur la figure 6.3.

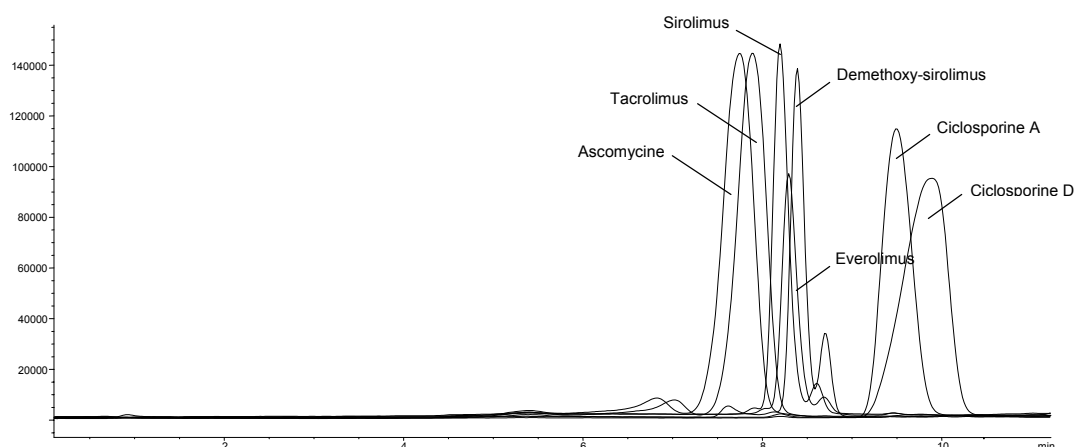


Figure 6.3. Chromatogramme obtenu avec la colonne Nucleodur®, débit: 400 $\mu\text{l}/\text{min}$, température: 40°C, gradient: de 65% à 95 % de méthanol en 7 min

6.2.3. Colonne Alltima® C18 5µm, 2,1 x 150 mm

Parmi les gradients de méthanol/eau testés avec la colonne Alltima® à un débit de 400 µl/min et à 40°C, une séparation légèrement meilleure qu'avec la colonne XTerra™ a pu être obtenue avec un gradient très progressif, passant de 65% à 95% de méthanol en 18 minutes (figure 6.4.). Les désavantages de ces conditions opératoires étaient une augmentation du temps d'analyse de près de deux fois et un élargissement des pics.

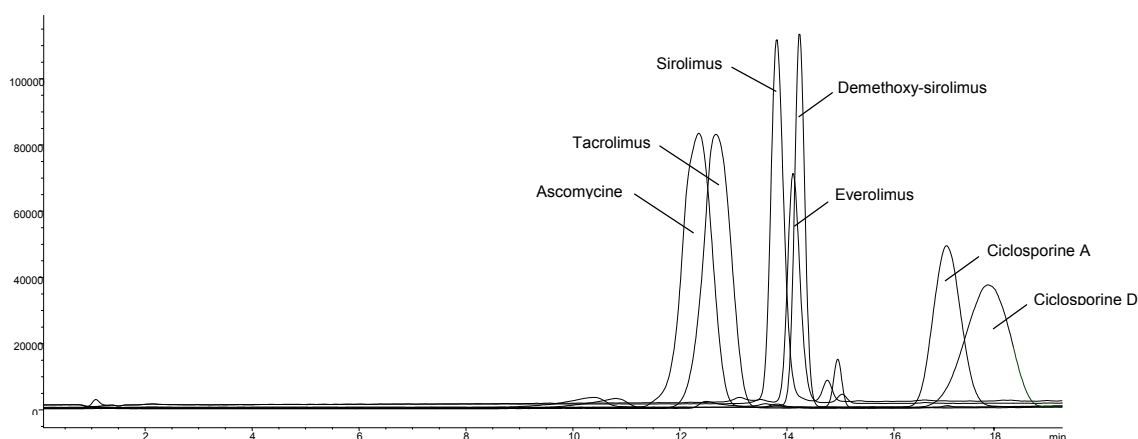


Figure 6.4. Chromatogramme obtenu avec la colonne Alltima®, débit: 400 µl/min, température: 40°C, gradient: de 65% à 95 % de méthanol en 18 min

6.3. Conclusion

Le meilleur compromis entre séparation, élargissement des pics et temps d'analyse a été obtenu avec la colonne XTerra™ MS C18 5µm, 2,1 x 50 mm avec une phase mobile débutant avec 65% de méthanol et évoluant vers 95% en 7 minutes avec un débit de 400 µl/min et une température de 50°C (figure 6.2.). Ces conditions chromatographiques ont été retenues pour la suite de notre travail.

7. ETUDE PRÉLIMINAIRE À L'AIDE D'UNE METHODE PAR EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE OFF-LINE

7.1. Objectifs

Préalablement au développement plus complexe de la méthode d'analyse selon une préparation de l'échantillon par extraction on-line en phase solide, il a été nécessaire de déterminer, à l'aide d'une technique par extraction liquide-liquide off-line, le comportement des immunosuppresseurs lors de l'analyse par LC-MS après leur extraction à partir du sang complet. Il s'agissait d'étudier la spécificité, la fonction de réponse, la linéarité, le rendement d'extraction absolu, ainsi que d'estimer la limite de détection et de quantification de ces substances. La préparation de l'échantillon par extraction liquide-liquide s'est basée sur une technique développée par le laboratoire de toxicologie des HUG pour le dosage de routine du sirolimus et a été couplée à la séparation chromatographique et à la détection par spectrométrie de masse selon les conditions déterminées précédemment dans notre travail respectivement aux chapitres 6. et 5. Ces études n'ont pas été effectuées avec l'everolimus qui n'était pas en notre possession à ce moment-là.

7.2. Méthode

7.2.1. Procédure d'analyse

a) Principe

Après lyse des érythrocytes et précipitation des protéines à l'aide d'un mélange de sulfate de zinc et d'acétone, les analytes sont extraits avec du 1-chlorobutane en milieu basique. Ce solvant est ensuite évaporé et le résidu est reconstitué dans 65% de méthanol.

b) Mode opératoire

Extraction liquide-liquide

- Dans un tube en polypropylène, placer 300 μ l de sang complet et ajouter 50 μ l de solution méthanolique contenant les étalons internes, bien mélanger.
- Ajouter 1 ml de sulfate de zinc à 50g/l et 1 ml d'acétone, vortexer. Mélanger par rotations 15 min à une vitesse de 40 t/min puis centrifuger 5 min à 3500 t/min.

- Transférer le surnageant à l'aide d'une pipette pasteur dans un tube en polypropylène contenant 200 µl de NaOH 100 mmol/l et 2 ml de 1-chlorobutane. Mélanger par rotations 15 min à 40 t/min puis centrifuger 5 min à 3500 t/min. Transférer le surnageant à l'aide d'une pipette pasteur dans un tube en polypropylène.
- Evaporer à sec sous courant d'azote lentement et sans chauffer.
- Reconstituer le résidu sec avec 150 µl de méthanol 65% et vortexer au moins 5 min, puis centrifuger 5 min à 3500 t/min.
- Transférer 130 µl de l'extrait dans un flacon d'injection du LC/MS.

Analyse par LC-MS

Injection:	20 µl
Echantillons:	Variables selon les analyses (voir textes respectifs)
Colonne:	XTerra MS C18 5µm, 2,1 x 50 mm (Waters® Corporation, Milford, Etats-Unis)
Pré-colonne:	XTerra MS C18 5µm, 2,1 x 10 mm (Waters® Corporation, Milford, Etats-Unis)
Phase mobile:	Gradient de méthanol/eau de 65/35 à 95/5 en 5 minutes, les 2 solvants contenant chacun 0,02 % d'acide formique et 1 µM de formiate de sodium
Débit:	400 µl/min
Température:	50°C
Temps de rétention:	Ascomycine: 4,6 min, tacrolimus: 4,7 min, sirolimus: 5,2 min, demethoxy-sirolimus: 5,3 min, ciclosporine A: 6,3 min, ciclosporine D: 6,5 min
Détection MS:	Ascomycine: m/z 814,4, tacrolimus: m/z 826,4, demethoxy-sirolimus: m/z 906,5, sirolimus: m/z 936,5, ciclosporine A: m/z 1224,7, ciclosporine D: m/z 1238,7

7.2.2. Spécificité

Une procédure d'analyse est dite spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient uniquement de la substance à analyser (Hubert 2003). Dans le but de vérifier cette propriété, nous avons analysé différents types d'échantillons, il s'agissait d'échantillons aqueux et sanguins blancs ainsi que d'échantillons aqueux et de sanguins dopés à 10 ng/ml de sirolimus, demethoxy-sirolimus, tacrolimus et ascomycine et à 100 ng/ml de ciclosporine A et D. Les analyses ont été répétées avec trois sangs d'origines différentes. Les chromatogrammes obtenus avec les différents échantillons ont été comparés dans le but d'identifier d'éventuelles interférences.

7.2.3. Fonction de réponse et linéarité

La fonction de réponse d'une procédure d'analyse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (signal) et la concentration en substance à examiner dans l'échantillon. Cette fonction peut être linéaire, mais il n'y a aucune raison de la rattacher obligatoirement à ce type de modèle. La linéarité d'une procédure d'analyse est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon (Hubert 2003).

Ces paramètres ont été déterminés en analysant du sang dopé à cinq concentrations différentes en immunosuppresseurs. Les intervalles de dosages ont été choisis en fonction des concentrations habituellement dosées en routine, soit 2,5, 5, 10, 20 et 30 ng/ml pour le sirolimus et le tacrolimus et 20, 100, 250, 500 et 1000 ng/ml pour la ciclosporine A. Les étalons internes demethoxy-sirolimus et ascomycine se trouvaient à une concentration de 15 ng/ml et la ciclosporine D à 200 ng/ml. Chaque niveau a été répété 2 fois. Des analyses ont également été effectuées en injectant directement des standards dans du méthanol aux mêmes concentrations que les échantillons sanguins utilisés.

7.2.4. Estimation de la limite de détection et de quantification

La limite de détection (LOD) d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte, dans les conditions expérimentales décrites de la procédure. La limite de quantification (LOQ) est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites avec une exactitude définie (Hubert 2003). Il est possible d'obtenir une estimation de ces deux paramètres en considérant le rapport de la hauteur du signal de l'analyte sur celle du blanc au même temps de rétention. Il est généralement admis de fixer un rapport de 3 pour l'estimation de la LOD et de 10 pour celle de la LOQ, cette dernière devant être confirmée sur la base d'échantillons de référence au niveau estimé.

Sur la base de résultats préliminaires obtenus avec des échantillons sanguins dopés à 2,5 ng/ml pour le sirolimus et le tacrolimus et à 20 ng/ml pour la ciclosporine A, nous avons préparé des échantillons contenant 0,2, 0,7 et 1,4 ng/ml de sirolimus et de tacrolimus et 1,1, 3,8 et 7,6 ng/ml de ciclosporine A. Trois solutions différentes ont été préparées pour chaque niveau et ces dernières ont été analysées chacune trois fois.

7.2.5. Rendement d'extraction absolu

Le rendement d'extraction absolu est égal au rapport des signaux mesurés, d'une part après extraction et analyse de sang dopé avec une quantité connue d'analytes et d'autre part après injection directe dans le système analytique d'une solution de référence contenant une concentration équivalente de substances à analyser (Hubert 2003). Ce paramètre a été déterminé aux cinq niveaux de concentration utilisés lors de l'étude de la linéarité.

7.3. Résultats et discussion

7.3.1. Spécificité

De manière générale, les chromatogrammes obtenus avec les trois sangs d'origines différentes n'ont pas montré de différences significatives. Les chromatogrammes obtenus avec les sangs blancs n'ont pas présenté de pics aux temps de rétention des analytes et étalons internes permettant de conclure à une absence d'interférences (figures 7.1. à 7.6.). Certains pics d'intensité assez importante ont été observés sur les chromatogrammes du sirolimus et du tacrolimus à des temps de rétention supérieurs à ceux des analytes. Ces pics étaient présents avec les échantillons sanguins et aqueux pour le sirolimus, permettant d'attribuer leur origine à la méthode et non à la matrice sanguine, ce qui n'a pas été le cas pour le tacrolimus où les pics ont été observés uniquement avec les échantillons sanguins.

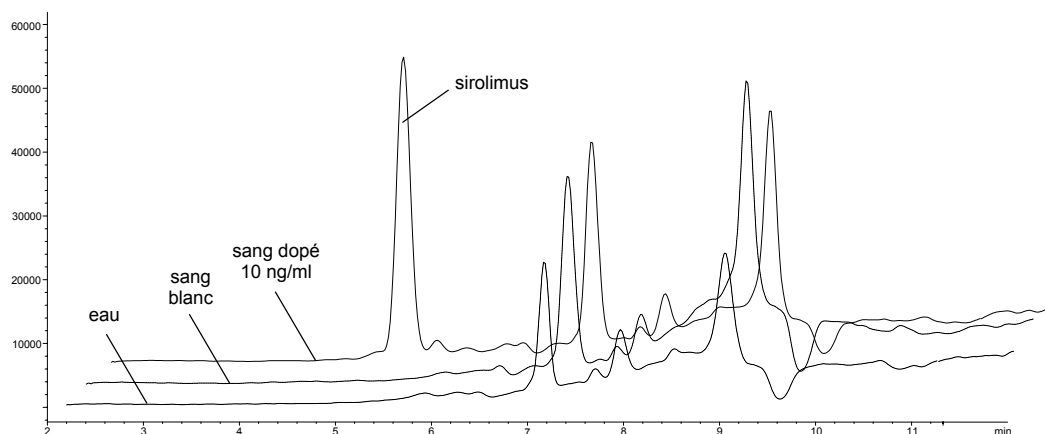


Figure 7.1. Chromatogrammes du sirolimus

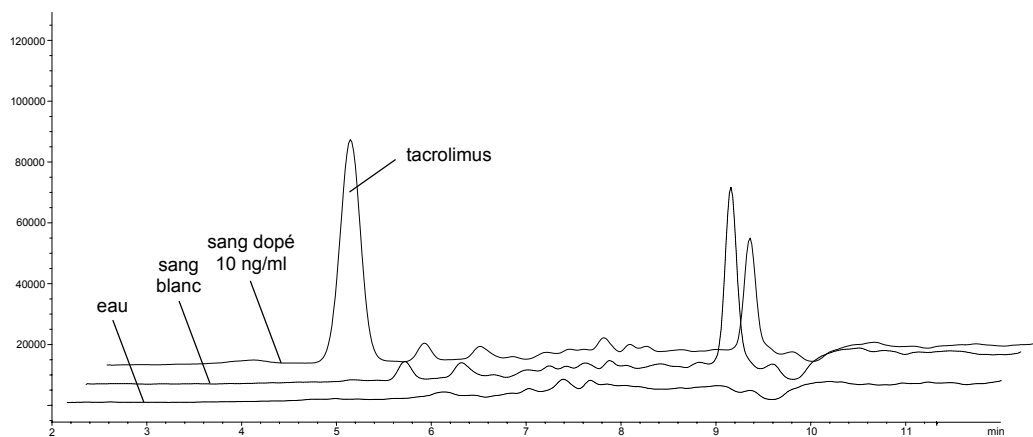


Figure 7.2. Chromatogrammes du tacrolimus

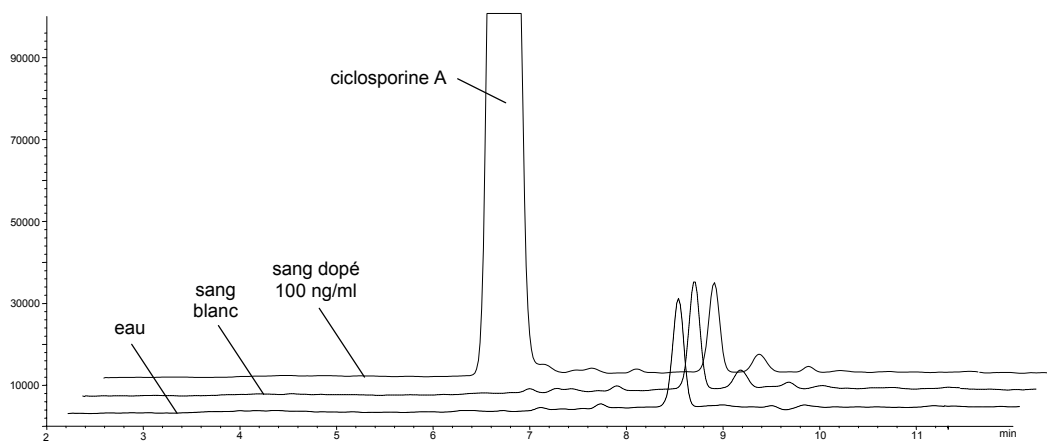


Figure 7.3. Chromatogrammes de la cyclosporine A

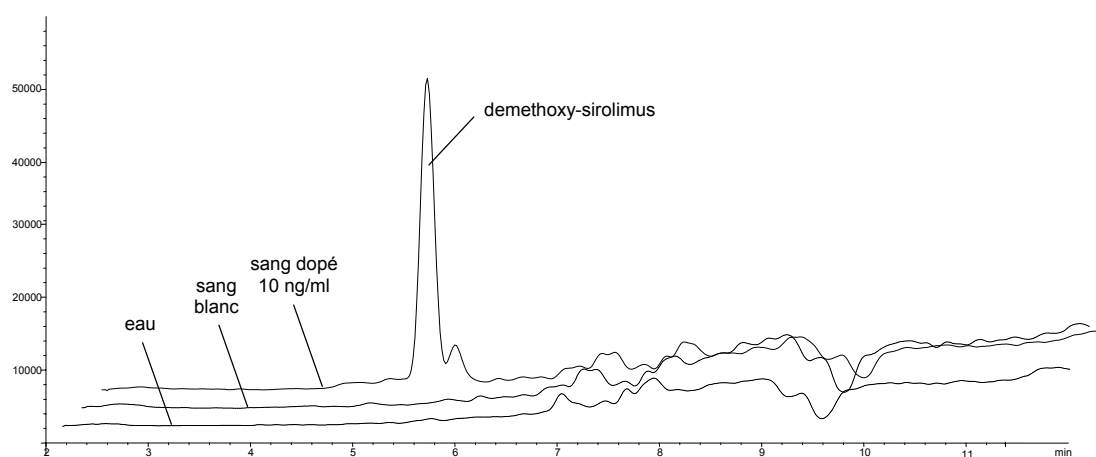


Figure 7.4. Chromatogrammes du demethoxy-sirolimus

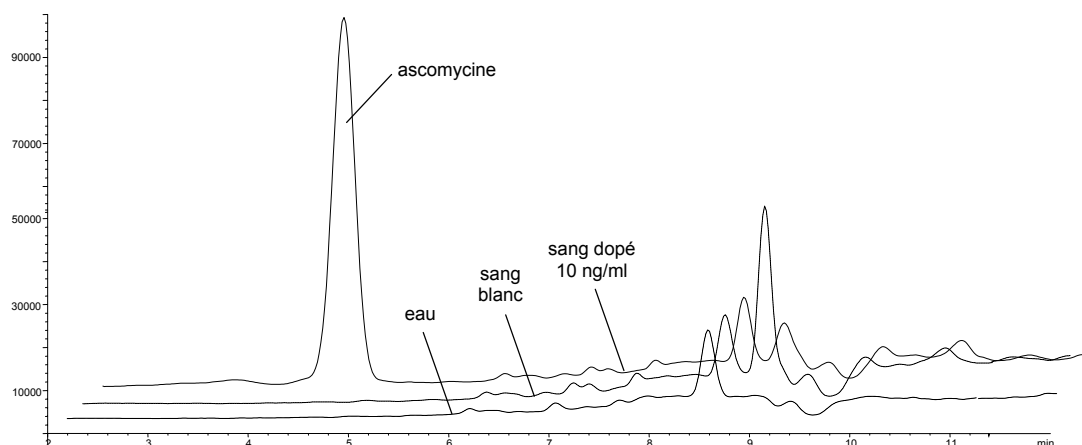


Figure 7.5. Chromatogrammes de l'ascomycine

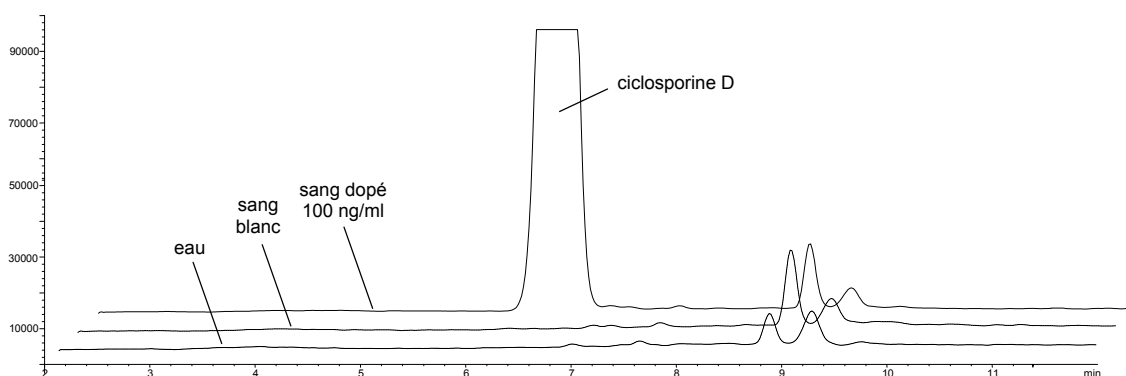


Figure 7.6. Chromatogrammes de la ciclosporine D

7.3.2. Fonction de réponse et linéarité

Les réponses obtenues en fonction de la concentration pour le sirolimus et le tacrolimus étaient de type linéaire (droites d'équation $y = mx + h$, où m est la pente et h l'ordonnée à l'origine) pour l'intervalle de dosage allant de 2,5 à 30 ng/ml pour les échantillons sanguins et les standards (figures 7.7. et 7.8.). Les coefficients de détermination r^2 obtenus avec les échantillons sanguins étaient de 0,9932 pour le sirolimus et 0,9969 pour le tacrolimus. La relation existant entre les concentrations estimées et les concentrations introduites était également linéaire.

La relation entre la concentration et la réponse pour la ciclosporine A était linéaire sur l'intervalle de dosage allant de 20 à 500 ng/ml (figure 7.9.). La fonction de réponse pour des concentrations allant jusqu'à 1000 ng/ml n'a pas été déterminée en raison du manque de répétitions pour établir précisément cette relation et du caractère indicatif de cette

investigation. Une réponse linéaire a par contre été obtenue avec les standards méthanoliques non extraits pour des concentrations allant jusqu'à 1000 ng/ml.

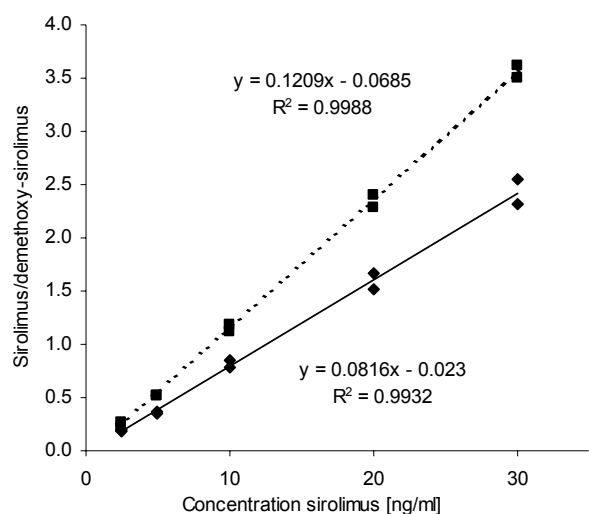


Figure 7.7. Fonction réponse du sirolimus, standards dans du MeOH ■ et sang dopé suivi d'une LLE ◆

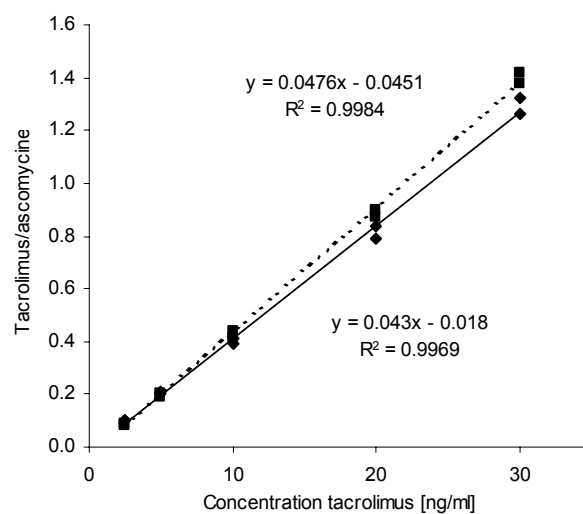


Figure 7.8. Fonction réponse du tacrolimus, standards dans du MeOH ■ et sang dopé suivi d'une LLE ◆

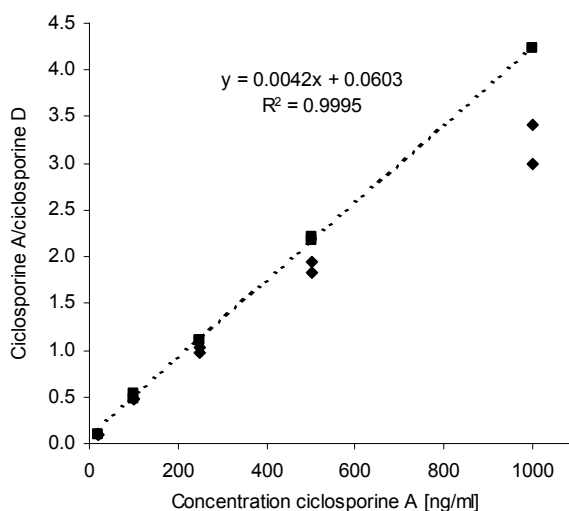


Figure 7.9. Fonction réponse de la ciclosporine A, standards dans du MeOH ■ et sang dopé suivi d'une LLE ◆

7.3.3. Estimation de la limite de détection et de quantification

Les figures 7.10. à 7.12. représentent le signal obtenu avec des échantillons blancs et dopés à 0,7 ng/ml pour le sirolimus et le tacrolimus et à 1,1 ng/ml pour la ciclosporine A.

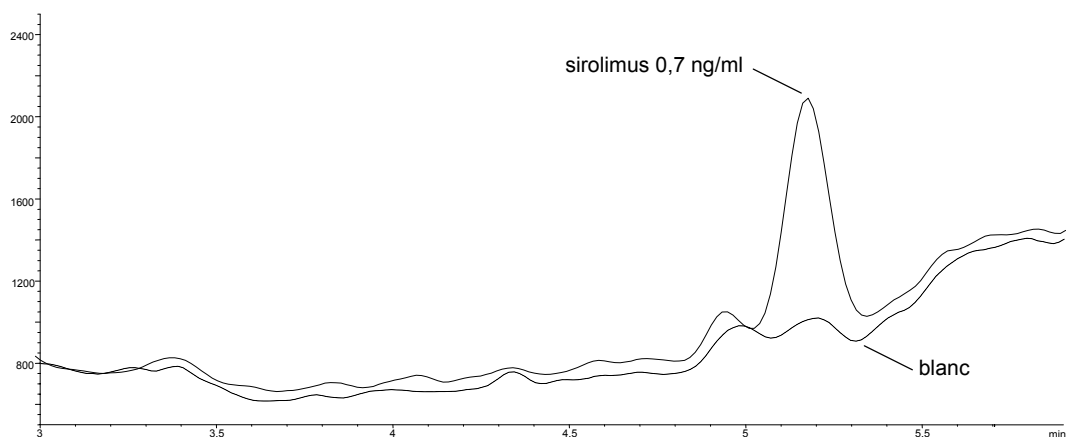


Figure 7.10. Comparaison entre le signal d'un échantillon dopé avec 0,7 ng/ml de sirolimus et celui de sang blanc

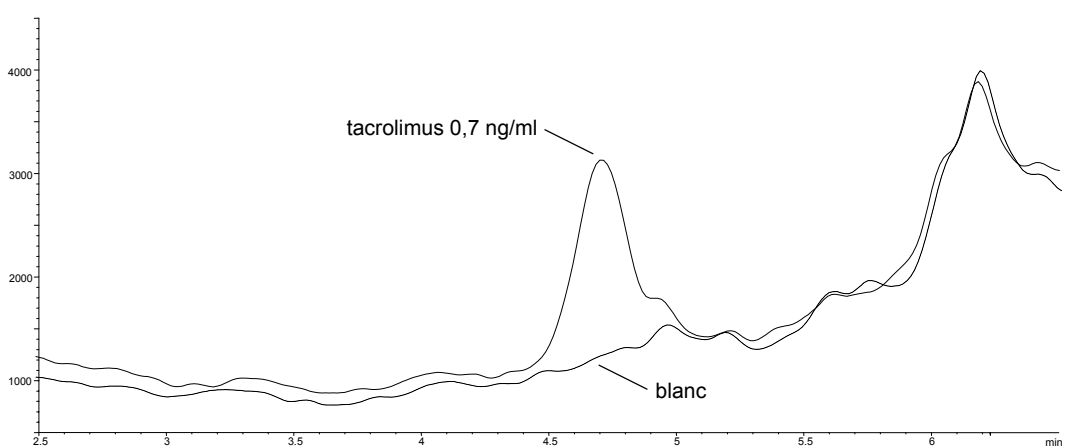


Figure 7.11. Comparaison entre le signal d'un échantillon dopé avec 0,7 ng/ml de tacrolimus et celui de sang blanc

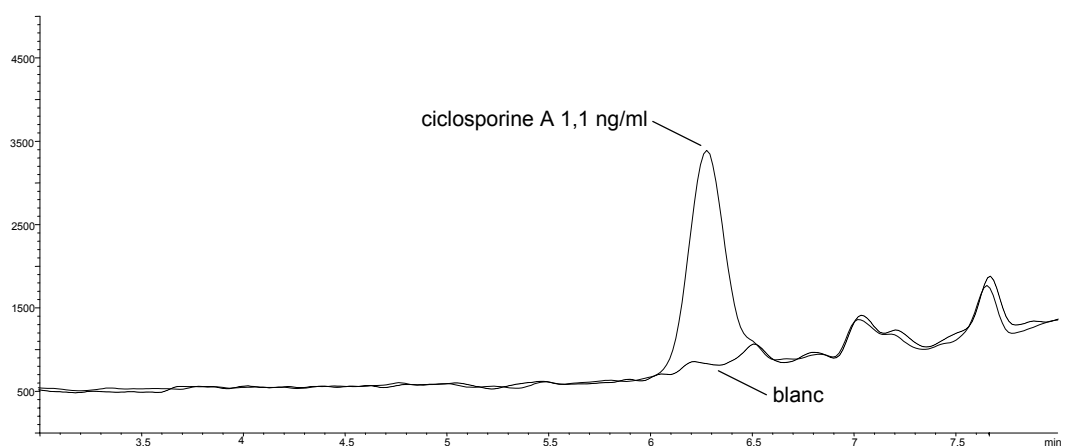


Figure 7.12. Comparaison entre le signal d'un échantillon dopé avec 1,1 ng/ml de ciclosporine A et celui de sang blanc

Les rapports de la hauteur du signal de l'analyte sur celle du blanc au même temps de rétention ont été calculés pour les neuf mesures effectuées avec chaque substance à chaque niveau de concentration et sont indiqués dans le tableau 7.1.

Tableau 7.1. Rapports de la hauteur du signal de l'analyte sur celle du blanc (n=9)

Sirolimus		Tacrolimus		Ciclosporine A	
concentration [ng/ml]	signal/bruit	concentration [ng/ml]	signal/bruit	concentration [ng/ml]	signal/bruit
0,2	4 ± 1	0,2	8 ± 3	1,1	19 ± 2
0,7	9 ± 2	0,7	18 ± 4	3,8	74 ± 15
1,4	14 ± 3	1,4	25 ± 4	7,6	195 ± 9

En appliquant une règle de trois, il a ensuite été possible d'estimer la LOD d'après la valeur obtenue avec la plus faible concentration et la LOQ d'après celle obtenue à la concentration intermédiaire (tableau 7.2.). En regard des concentrations habituellement dosées en routine pour ces immunosuppresseurs (marges thérapeutiques se situant entre 5 et 20 ng/ml pour le sirolimus et le tacrolimus et entre 100 et 250 ng/ml pour la ciclosporine A), les LOQ estimées ont pu être qualifiées de très satisfaisantes. Ces dernières nécessitent toutefois d'être confirmées en terme d'exactitude.

Tableau 7.2. Estimation des LOD et LOQ

	Sirolimus	Tacrolimus	Ciclosporine A
LOD (ng/ml)	0,2	0,1	0,2
LOQ (ng/ml)	0,8	0,4	0,5

7.3.4. Rendement d'extraction absolu

Les rendements d'extraction absolus des analytes étaient constants sur l'intervalle de dosage testé, les résultats ont été rassemblés. Les valeurs obtenues pour les analytes et les étalons internes se situaient entre 59 et 87% et ont été jugées de satisfaisantes (tableau 7.3.).

Tableau 7.3. Rendements d'extraction (n=10)

Composé	Concentration [ng/ml]	Rendement [%]
Sirolimus	2,5 à 30	59 ± 9
Tacrolimus	2,5 à 30	87 ± 8
Ciclosporine A	20 à 1000	59 ± 6
Demethoxy-sirolimus	15	83 ± 12
Ascomycine	15	87 ± 8
Ciclosporine D	200	67 ± 6

7.4. Conclusion

Les essais réalisés à l'aide de la méthode de préparation de l'échantillon par extraction liquide-liquide ont permis de s'assurer que les analytes avaient des comportements chromatographiques, après extraction à partir de sang complet, similaires à ceux observés avec les standards non biologiques. La spécificité vis-à-vis de la matrice biologique était adéquate et une relation linéaire a pu être établie entre la concentration et la réponse du sirolimus et du tacrolimus pour un intervalle de dosage englobant les valeurs habituellement rencontrées en routine. Le domaine de linéarité de la ciclosporine ne s'étendait pas aux hautes concentrations, des mesures complémentaires seraient nécessaires afin de pouvoir déterminer la fonction de réponse dans ce domaine. Les limites de détection et de quantification estimées ainsi que les rendements d'extraction absolus étaient très satisfaisants.

Cette technique de préparation de l'échantillon était cependant trop longue pour pouvoir être utilisée lors de dosages de routine. Notre travail a été poursuivi comme prévu par le développement d'une technique plus rapide et automatisable.

8. MISE AU POINT DE LA METHODE PAR EXTRACTION ON-LINE EN PHASE SOLIDE

8.1. Objectifs

Compte tenu du nombre important de dosages d'immunosuppresseurs effectués chaque jour par le LCCC, il était nécessaire de développer une méthode d'analyse simple et rapide, comportant une préparation de l'échantillon automatisée et couplée directement à l'analyse par LC-MS.

Notre choix s'est porté sur une analyse effectuée à l'aide d'un système à commutation de colonnes qui devrait nous permettre d'atteindre les performances souhaitées. Son principe est décrit au chapitre 8.2.

Cette technique n'étant pas appliquée par le laboratoire, son introduction pourrait par ailleurs fournir un apport en tant que plate-forme pour le développement de nouvelles méthodes d'analyses de médicaments.

8.2. Principe

Après élimination de la majorité des protéines à l'aide d'un réactif de précipitation, l'échantillon est injecté dans un système composé de deux colonnes, l'une servant au nettoyage de l'échantillon et l'autre à la séparation des composés avant l'analyse par spectrométrie de masse. La séquence des opérations se déroule selon les trois étapes décrites ci-dessous.

1) Chargement

La première étape consiste en un lavage de l'échantillon et est illustrée sur la figure 8.1. Après injection de l'échantillon, les analytes, qui ont un caractère plutôt lipophile, sont retenus en tête de la colonne d'extraction, tandis que la matrice de type hydrophile, constituée principalement de sels et de protéines, est éluée vers la poubelle. Pendant cette étape a lieu également l'équilibrage de la colonne analytique.

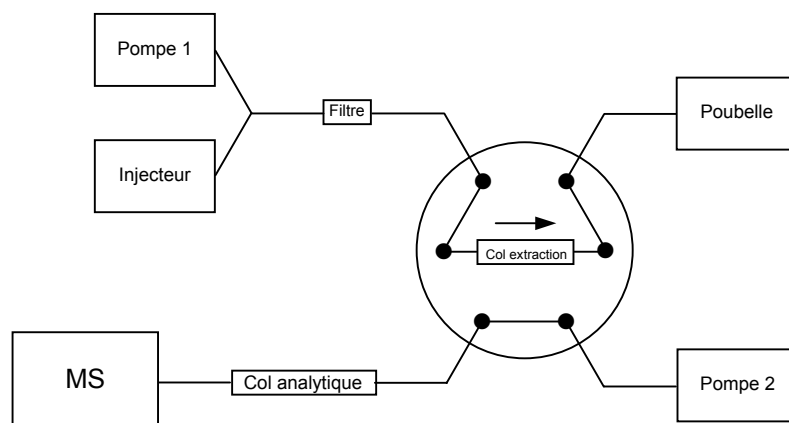


Figure 8.1. Configuration du système lors de la phase de chargement

2) Transfert

Après changement de configuration du système, les analytes sont transférés en flux inverse de la colonne d'extraction sur la colonne analytique (figure 8.2.). La combinaison des deux colonnes et de la phase mobile devra être choisie de manière à libérer rapidement les analytes de la colonne d'extraction et à les retenir en tête de la colonne analytique, permettant ainsi d'obtenir une reconcentration des ces derniers avant la séparation et d'éviter de ce fait un élargissement des pics. La colonne d'extraction sera donc choisie pour son caractère moins rétentif que la colonne analytique.

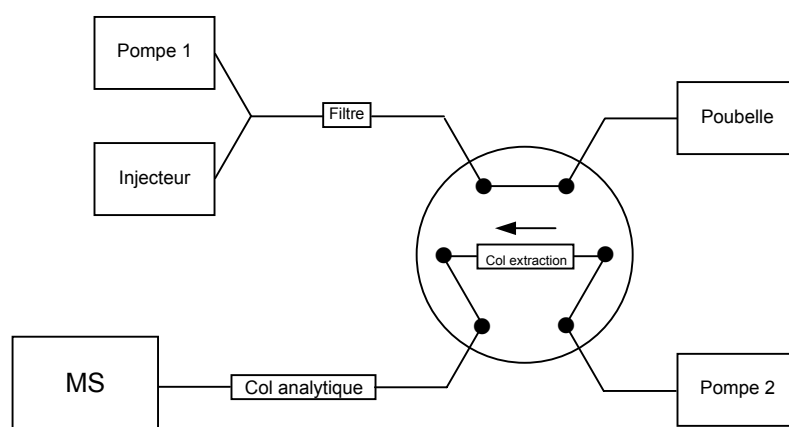


Figure 8.2. Configuration du système lors de la phase de transfert

3) Séparation et détection

Après retour du système dans la configuration de départ, les analytes sont séparés sur la colonne analytique et envoyés vers le spectromètre de masse. Pendant ce temps la colonne d'extraction est lavée et ré-équilibrée (figure 8.3.).

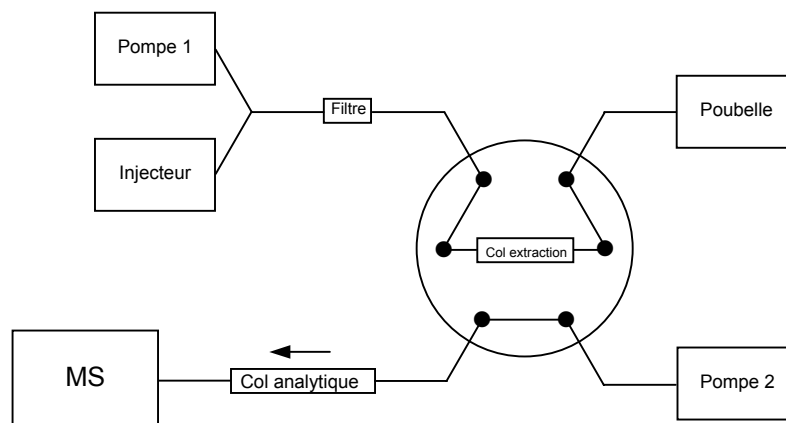


Figure 8.3. Configuration du système lors de la phase de séparation et de détection

8.3. Préparation de l'échantillon

8.3.1. Choix du réactif de précipitation des protéines

Avant d'injecter l'échantillon sanguin dans le système analytique, il était nécessaire de traiter ce dernier avec un réactif permettant de lyser les érythrocytes, précipiter les protéines et extraire les composés à analyser. Le tableau 8.1. présente certains types de réactifs de précipitation des protéines ainsi que leur efficacité dans le plasma après 20 secondes de vortex, 20 minutes de repos et 10 minutes de centrifugation à 3000 t/min.

Dans le cadre de dosages sanguins d'immunosuppresseurs, plusieurs méthodes de précipitation des protéines ont été publiées (tableau 8.2.). En plus de l'efficacité du réactif, la solubilité des analytes dans ce dernier doit être prise en considération afin d'obtenir une bonne mise en solution. Des essais réalisés avec un mélange de méthanol et de sulfate de zinc 0,4 M dans un rapport 8/2 ayant été satisfaisants, ce mélange a été retenu pour la suite de notre travail.

Tableau 8.1. Efficacité de réactifs de précipitation des protéines dans le plasma humain (d'après Polson 2003)

Réactifs de précipitations		Pourcentage de précipitation des protéines						
		Rapport réactif sur plasma						
		0,5:1	1:1	1,5:1	2:1	2,5:1	3:1	4:1
Acides	Acide trichloracétique 10%	91	92	92	91	91	91	91
	Acide m-phosphorique 5%	89	91	90	90	91	91	90
Ions métalliques	Sulfate de zinc ^a	89	97	97	99	99	99	> 99
Solvants organiques	Acétonitrile	4	89	92	92	93	94	95
	Ethanol	0	78	87	88	90	92	92
	Méthanol	13	64	88	90	90	91	92
Sels	Sulphate d'ammonium ^b	25	50	64	84	90	90	89

^asolution aqueuse de sulfate de zinc heptahydrate 10% m/v : hydroxyde de sodium 0,5 N (1:1)

^bsolution aqueuse saturée à température ambiante

Tableau 8.2. Aperçu de différentes méthodes de précipitation des protéines dans le cadre de dosages sanguins d'immunosuppresseurs

Volume sang	Volume réactif	Réactif	Vortex	Centrifugation	Auteurs
1 part	9 parts	MeOH	3 min	10'000 g 15 min	Zhou 2001
100 µl	200 µl	MeOH/ZnSO ₄ 0,3 M (7/3)	30 sec	4'000 g 5 min	Streit 2002
100 µl	200 µl	MeOH/ZnSO ₄ 0,4 M (8/2)	20 sec	8'000 g 5 min	Christians 2000
250 µl	350 µl	ACN	30 sec	14'000 g 10 min	Volosov 2001
500 µl	2 ml	ACN/ZnSO ₄ 0,1 M (7/3)	durée non précisée	850 g 5 min	Taylor 1998a
100 µl	200 µl	ACN/H ₂ O (7/3)	1 min	850 g 5 min	Taylor 1998b
200 µl	600 µl	ACN/MeOH/ZnSO ₄ 10% (2/3/5)	durée non précisée	durée non précisée	Brozmanova 2000
0,5 ml	2 ml	Acétone/ZnSO ₄ (1/1)	20 sec	2'600 g 5 min	French 2001

8.3.2. Procédure de préparation de l'échantillon

La procédure de préparation de l'échantillon retenue a été la suivante :

- Dans un tube Eppendorf® de 2 ml, placer 500 µl du mélange méthanol/ZnSO₄ 0,4 M (8/2) et ajouter 250 µl de sang complet, vortexer de suite brièvement le tube afin d'éviter la formation d'un agrégat compact.
- Vortexer ensuite le tube pendant 5 minutes (appareil automatique) afin d'obtenir un mélange homogène et d'assurer une bonne solubilisation des analytes.
- Centrifuger le mélange pendant 5 minutes à 3500 t/min.
- Transférer environ 300 µl de surnageant dans un flacon d'injection prévu pour l'analyse par LC-MS.

8.4. Mise au point du système d'extraction on-line

8.4.1. Méthodes

Le développement de la méthode d'extraction par commutation de colonnes s'est déroulée en trois phases qui étaient l'étude de la rétention des analytes, l'élution de la matrice et le transfert des analytes. Quatre colonnes d'extraction ont été testées; il s'agissait de deux supports à larges particules (Oasis® HLB 25 µm 2,1 x 20 mm et TurboFlow® HTLC™ C8 50 µm 1,0 x 50 mm) et de deux colonnes classiques (XTerra™ MS C18 5µm 2,1 x 10 mm et XTerra™ MS C8 5µm 2,1 x 10 mm).

a) Rétention des analytes

La première étape consistait à déterminer les conditions chromatographiques permettant de retenir les analytes sur la colonne d'extraction pendant une durée suffisante pour permettre le lavage de l'échantillon. Le montage réalisé lors de cette phase est représenté sur la figure 8.4. et les conditions opératoires sont indiquées ci-dessous.

Echantillons:	Analytes à 100 ng/ml dans 53% de méthanol (quantité correspond à celle obtenue après traitement des échantillons par le réactif de précipitation)
Injection:	50 µl
Colonnes:	Oasis [®] HLB 25 µm 2,1 x 20 mm (Waters [®] Corporation, Milford, Etats-Unis) XTerra [™] MS C18 5µm 2,1 x 10 mm (Waters [®] Corporation, Milford, Etats-Unis) XTerra [™] MS C8 5µm 2,1 x 10 mm (Waters [®] Corporation, Milford, Etats-Unis)
Phases mobiles:	Test de différentes proportions de méthanol/eau de 5/95 à 80/20 avec 0,02% d'acide formique et 1 µM de formiate de sodium
Débits:	Colonne Oasis [®] HLB: 4 ml/min, colonnes XTerra [™] C18 et C8: 400 µl/min Branchement d'un séparateur pour les débits à 4 ml/min (envoi de seulement 1/10 du flux dans le MS)
Diamètre interne des tubulures:	Débits à 4 ml/min: 0,25 mm, débits à 400 µl/min: 0,12 mm
Température:	40°C
Détection MS:	Ascomycine: m/z 814,4, tacrolimus: m/z 826,4, demethoxy-sirolimus: m/z 906,5, sirolimus: m/z 936,5, everolimus: m/z 980,7, ciclosporine A: m/z 1224,7, ciclosporine D: m/z 1238,7

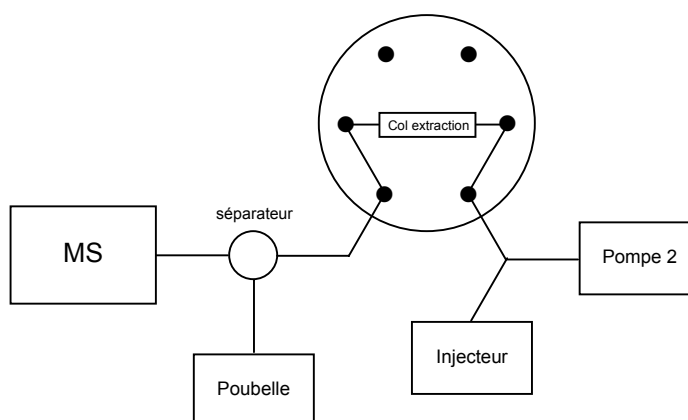


Figure 8.4. Configuration du système pour l'étude de la rétention des analytes

b) Elution de la matrice

La deuxième étape consistait à déterminer les conditions chromatographiques et la durée d'élution nécessaires au lavage de l'échantillon. Le montage réalisé lors de cette étape est représenté à la figure 8.5. et les conditions opératoires sont indiquées ci-dessous.

Echantillons:	Sang complet et échantillons aqueux traités selon la procédure de précipitation des protéines décrite au paragraphe 8.3.2.
Injection:	50 μ l
Colonnes:	Oasis [®] HLB 25 μ m 2,1 x 20 mm (Waters [®] Corporation, Milford, Etats-Unis) XTerra [™] MS C18 5 μ m 2,1 x 10 mm (Waters [®] Corporation, Milford, Etats-Unis) XTerra [™] MS C8 5 μ m 2,1 x 10 mm (Waters [®] Corporation, Milford, Etats-Unis)
Phases mobiles:	Test de différentes proportions de méthanol/eau de 5/95 à 20/80 avec 0,02% d'acide formique et 1 μ M de formiate de sodium
Débits:	Colonne Oasis [®] HLB: 4 ml/min, colonnes XTerra [™] C18 et C8: 400 μ l/min Branchement d'un séparateur pour les débits à 4 ml/min (envoi de 1/10 du flux dans le DAD)
Diamètre interne des tubulures:	Débits à 4 ml/min: 0,25 mm, débits à 400 μ l/min: 0,12 mm
Température:	40°C
Détection DAD:	Balayage global de 190 à 500 nm et détection plus précise à 280 nm (protéines) et 220 nm (maximum d'absorption de la matrice)

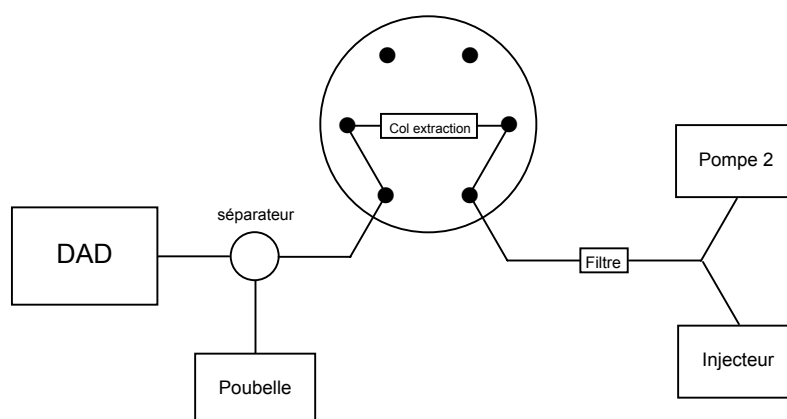


Figure 8.5. Configuration du système lors de l'étude de l'élution de la matrice

c) Transfert

Cette étape consistait à identifier la composition de la phase mobile permettant de transférer, après le laps de temps nécessaire au lavage de l'échantillon, les analytes en flux inverse, le plus rapidement possible, de la colonne d'extraction sur la colonne analytique sans qu'il n'y ait de migration sur cette dernière. Le montage réalisé lors de cette étape est représenté à la figure 8.6. et les conditions opératoires sont indiquées ci-dessous.

Echantillons:	Analytes à 100 ng/ml dans un mélange eau/réactif de précipitation (1/2) puis analytes à 20 ng/ml dans le sang complet préparé selon la procédure de précipitation des protéines
Injection:	50 µl
Colonnes:	Oasis [®] HLB 25 µm 2,1 x 20 mm (Waters [®] Corporation, Milford, Etats-Unis) TurboFlow [®] HTLC [™] C8 50 µm 1,0 x 50 mm (Cohesive [®] Technologies Inc., Franklin, Etats-Unis) XTerra [™] MS C18 5µm 2,1 x 10 mm (Waters [®] Corporation, Milford, Etats-Unis) XTerra [™] MS C8 5µm 2,1 x 10 mm (Waters [®] Corporation, Milford, Etats-Unis)
Phases mobiles:	Pompe 1: méthanol/eau 5/95 avec 0,02% d'acide formique et 1 µM de formiate de sodium (lavage) Pompe 2: test de différentes proportions de méthanol/eau de 100/0 à 60/40 avec 0,02% d'acide formique et 1 µM de formiate de sodium (transfert)
Débits:	Pompe 1: colonnes Oasis [®] HLB et TurboFlow [®] HTLC [™] : 4 ml/ml, colonnes XTerra [™] C18 et C8: 400 µl/min Pompe 2: 400 µl/min
Commutation:	Après 1 minute, soit le temps nécessaire au lavage de l'échantillon
Diamètre interne des tubulures:	Débits à 4 ml/min: 0,25 mm, débits à 400 µl/min: 0,12 mm
Température:	40°C
Détection MS:	Ascomycine: m/z 814,4, tacrolimus: m/z 826,4, demethoxy-sirolimus: m/z 906,5, sirolimus: m/z 936,5, everolimus: m/z 980,7, ciclosporine A: m/z 1224,7, ciclosporine D: m/z 1238,7

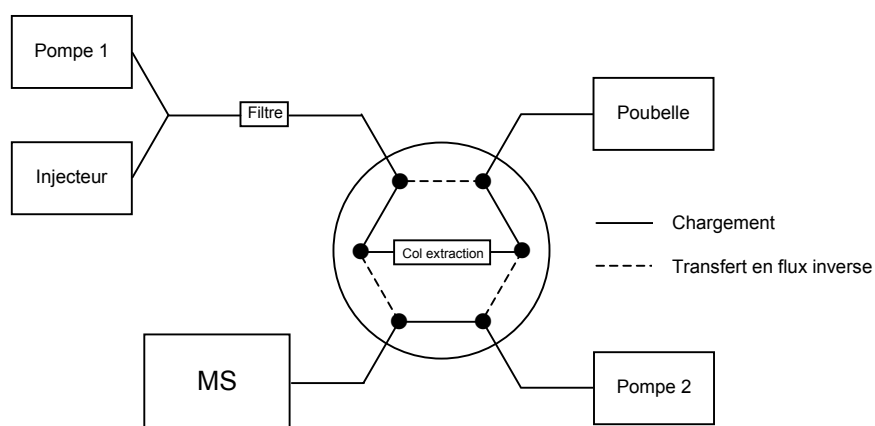


Figure 8.6. Configuration du système lors de l'étude du transfert des analytes

8.4.2. Résultats et discussion

a) Rétention des analytes

Les trois colonnes testées ont permis d'obtenir une rétention des analytes pendant plus de 20 minutes avec les phases mobiles de composition allant jusqu'à 40 % de méthanol (tableau 8.3.). Les résultats observés avec 60% de méthanol ont permis de constater que la colonne la plus rétentive était l'Oasis[®] HLB, suivie de la colonne XTerra[™] C18 et comme prévu de la C8. Afin de s'assurer que l'absence de signal était due à une rétention des analytes et non pas à un problème analytique, les composés ont été élués après un certain temps à l'aide de 100% de méthanol (figure 8.7.).

Tableau 8.3. Temps de rétention des analytes

Phase mobile	Oasis [®] HLB	XTerra [™] C18	XTerra [™] C8
5% MeOH	> 20 min	> 20 min	> 20 min
20% MeOH	> 20 min	> 20 min	> 20 min
40% MeOH	> 20 min	> 20 min	> 20 min
60% MeOH	> 15 min	Cs A et D: > 20 min autres: élution 2-11 min	Cs A et D: > 20 min autres: élution 0,5-5 min
70% MeOH	non effectué	Cs A et D: élution 1-7 min autres: aucune rétention	Cs A et D: élution 1-4 min autres: aucune rétention
80% MeOH	aucune rétention	aucune rétention	aucune rétention

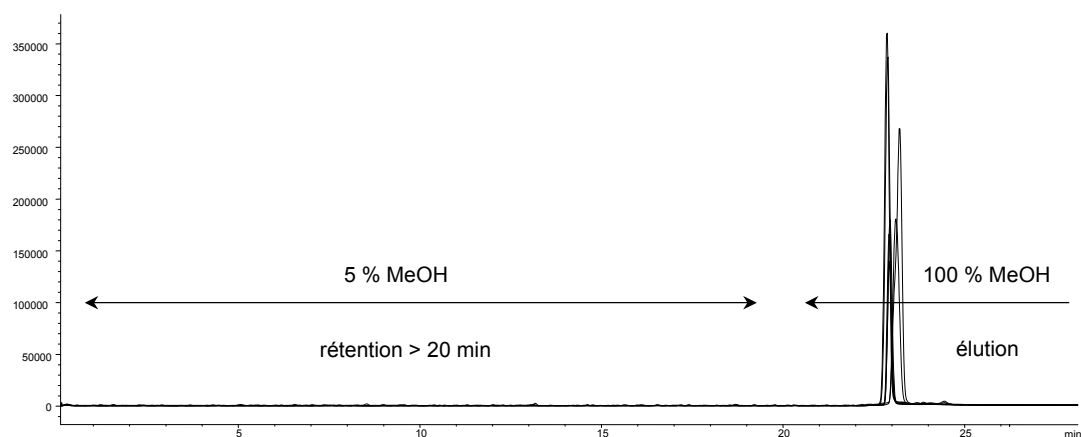


Figure 8.7. Rétention puis élution des analytes sur la colonne XTerra™ C8

b) Elution de la matrice

Les trois colonnes testées ont permis de laver rapidement l'échantillon (tableau 8.4.), la meilleure performance a été obtenue avec la colonne Oasis® HLB (figure 8.8.). Il s'agit d'un support à larges particules (25 μm) permettant de travailler à des débits élevés (4 ml/min), résultant en un flux turbulent avec pour résultat un meilleur nettoyage de l'échantillon. Cependant le débit élevé requis par ce type de colonne expose à une forte consommation de solvant et l'utilisation d'une simple colonne C18 ou C8 semblerait également convenir, bien que ces dernières risquent de se boucher plus rapidement.

Tableau 8.4. Temps d'élution de la matrice

Phase mobile	Oasis® HLB	XTerra™ C18	XTerra™ C8
5% MeOH	0,5 min	1,1 min	0,8 min
20% MeOH	0,5 min	1,1 min	0,8 min

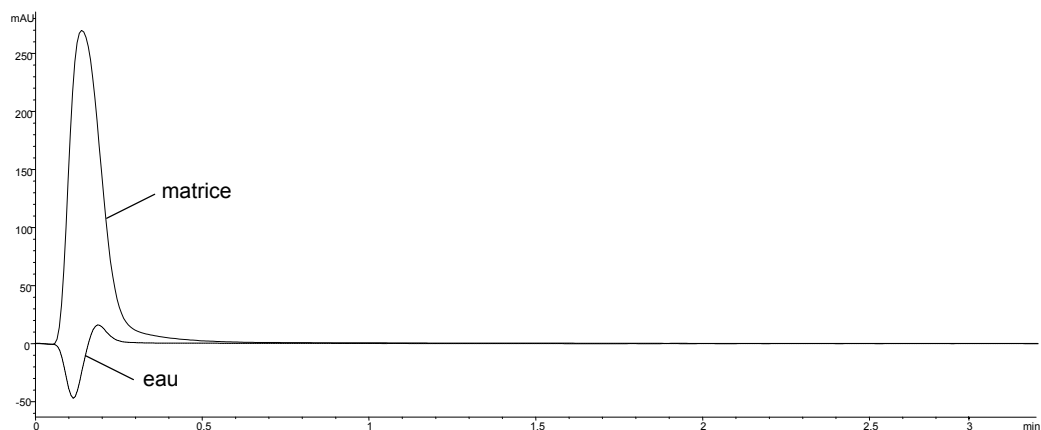


Figure 8.8. Elution de la matrice en 0,5 minutes pour la colonne Oasis® HLB, phase mobile 5% méthanol, débit 4 ml/min, détection 220 nm

c) Transfert

La contrainte principale concernant le transfert des analytes était que la proportion de méthanol dans la phase mobile de transfert ne devait pas être supérieure à celle du début du gradient fixé pour la séparation chromatographique sur la colonne analytique XTerra™ MS C18 5 µm, 2,1 x 50 mm retenue, qui évoluait de 65% à 95% en 7 minutes (voir chapitre 6.3.). Compte tenu de cette exigence, seule la colonne XTerra™ C8 a permis d'obtenir un transfert optimal avec 65% de méthanol (figure 8.9.). Les supports à larges particules Oasis® HLB et TurboFlow® HTLC™ étaient trop rétentifs et nécessitaient respectivement 80% et 90% de méthanol pour aboutir à un transfert acceptable (tableau 8.5.), ce qui ne permettait pas d'obtenir une séparation satisfaisante des analytes sur les colonnes analytiques testées.

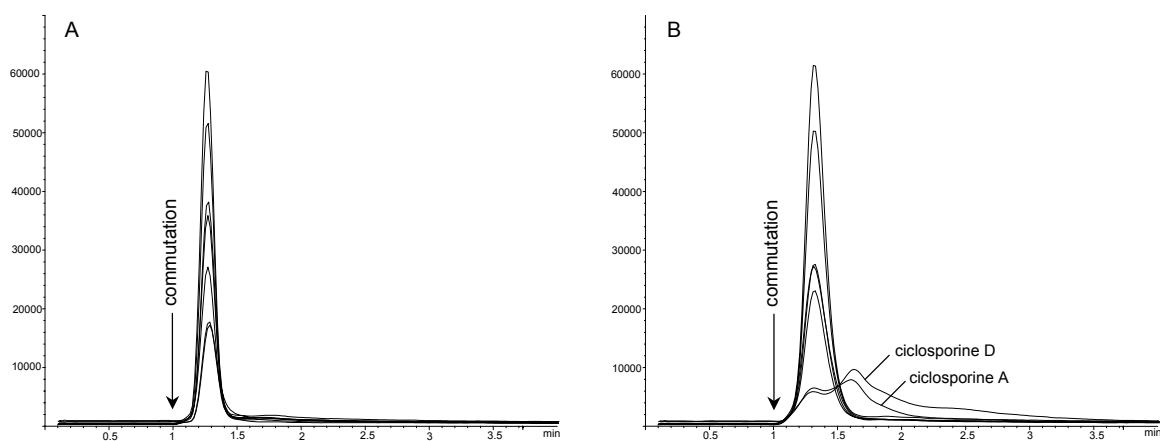


Figure 8.9. Transfert des analytes, colonne XTerra™ C8, phases mobiles: A: 65% de méthanol, B: 60% de méthanol

Tableau 8.5. Temps de transfert des analytes

Phase mobile	TurboFlow [®] HTLC [™]	Oasis [®] HLB	XTerra [™] C18	XTerra [™] C8
100% MeOH	0,9 min	0,9 min	0,6 min	0,4 min
90% MeOH	1,0 min	0,9 min	0,6 min	0,4 min
80% MeOH	1,8 min	1,0 min	0,6 min	0,5 min
75% MeOH	3,5 min	1,8 min	0,7 min	0,5 min
70% MeOH	5,0 min	3,0 min	0,7 min	0,5 min
65% MeOH	-	-	1,3 min	0,6 min
60% MeOH	-	-	2,5 min	2,5 min

d) Conditions retenues

Le choix de la colonne d'extraction a été effectué principalement sur la base de sa capacité à transférer rapidement l'échantillon, les performances concernant la rétention des analytes et l'élution de la matrice étant plus ou moins similaires pour toutes les colonnes testées. Les meilleures performances ont été atteintes avec la colonne XTerra[™] C8 qui a été adoptée pour le processus d'extraction on-line. Les supports à larges particules Oasis[®] HLB et TurboFlow[®] HTLC[™] étaient beaucoup plus cher que les colonnes XTerra[™] et exposaient à une grande consommation de solvant en raison des débits élevés requis avec ce type de colonnes. Les conditions opératoires retenues ont été une phase mobile à 5 % de méthanol pour le lavage de l'échantillon pendant 1 minute puis une phase mobile à 65 % de méthanol pour le transfert des analytes en flux inverse pendant 0,7 minutes avec un débit de 400 µl/min et une température de 40°C (tableau 8.6.). Signalons encore que lors de l'utilisation en routine de la méthode développée dès la fin de notre travail, la colonne XTerra[™] C8 a conservé ses performances jusqu'à plus de 500 analyses.

Tableau 8.6. Conditions retenues pour l'extraction on-line

Temps	Etape	Commutateur	Pompe 1	Pompe 2
0 - 1,0 min	chargement	position 1	5 % MeOH	65% MeOH
1 - 1,7 min	transfert	position 2	5 % MeOH	65 % MeOH

8.5. Couplage de l'extraction à la séparation chromatographique

8.5.1. Méthode

L'étape suivante dans la mise au point de la méthode de dosage consistait à coupler la phase d'extraction à la séparation chromatographique. Le montage réalisé correspondait aux différentes configurations présentées sur les figures 8.1. à 8.3. et les conditions opératoires sont indiquées ci-dessous.

Echantillons:	Analytes à 100 ng/ml dans un mélange eau/réactif de précipitation (1/2) puis analytes à 100 ng/ml dans le sang complet préparé selon la procédure de précipitation des protéines
Injection:	50 μ l
Colonnes:	Extraction: XTerra™ MS C8 5 μ m 2,1 x 10 mm (Waters® Corporation, Milford, Etats-Unis) Analytique: XTerra™ MS C18 5 μ m 2,1 x 50 mm (Waters® Corporation, Milford, Etats-Unis) munie d'une pré-colonne XTerra™ MS C18 5 μ m 2,1 x 10 mm
Phases mobiles:	Pompe 1: 0-1,2 min: 5% MeOH; 1,2-6,2 min: 100% MeOH; 6,2-17 min: 5% MeOH Pompe 2: 0-1,7 min: 65% MeOH; 1,7-8,7 min: gradient 65% à 95% MeOH; 8,7-9 min: 95% MeOH; 9-12 min: 100 % MeOH; 12-17 min: 65% MeOH Toutes les phases mobiles contenaient 0,02% d'acide formique et 1 μ M de formiate de sodium
Débits:	Pompes 1 et 2: 400 μ l/min
Commutations:	1 ^{ère} commutation: après 1,0 min. (fin du lavage de l'échantillon) 2 ^{ème} commutation: après 1,7 min. (fin du transfert des analytes)
Températures:	Colonne extraction: 40°C, colonne analytique: 50°C
Détection MS:	Ascomycine: m/z 814,4, tacrolimus: m/z 826,4, demethoxy-sirolimus: m/z 906,5, sirolimus: m/z 936,5, everolimus: m/z 980,7, ciclosporine A: m/z 1224,7, ciclosporine D: m/z 1238,7

8.5.2. Résultats et discussion

Les conditions retenues pour la phase d'extraction et de séparation chromatographique ont permis d'obtenir une séparation satisfaisante des composés que ce soit avec des échantillons aqueux ou biologiques. L'utilisation de la colonne XTerra™ MS C8 5 μ m 2,1 x 10

mm pour l'extraction et XTerra™ MS C18 5µm 2,1 x 50 mm pour la séparation semble constituer une bonne combinaison. Un exemple de chromatogramme est représenté à la figure 8.10.

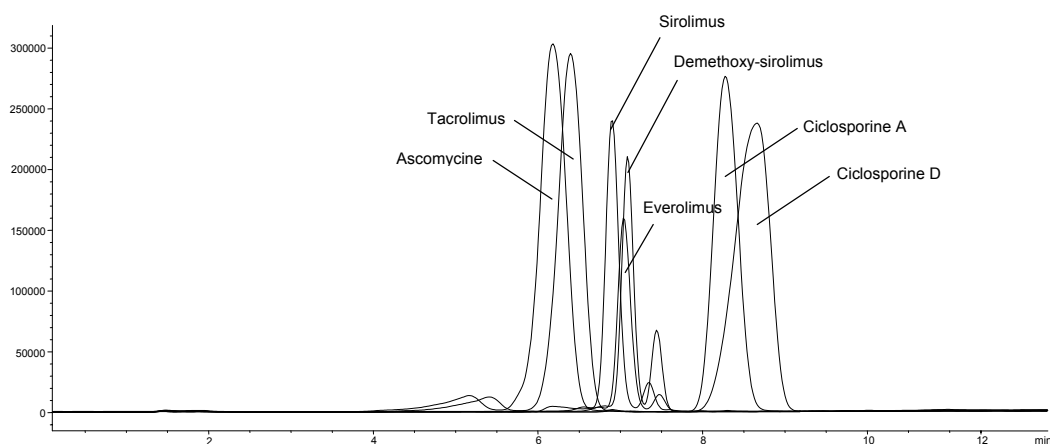


Figure 8.10. Chromatogramme obtenu avec la méthode complète, échantillon: analytes à 100 ng/ml dans de l'eau traitée avec le réactif de précipitation

L'analyse globale incluant la préparation de l'échantillon a duré 17 minutes y compris le lavage et le ré-équilibrage des colonnes. Les temps de rétention obtenus étaient les suivants: ascomycine: 6,2 min, tacrolimus: 6,4 min, sirolimus: 6,9 min, everolimus: 7,0 min, demethoxy-sirolimus: 7,1 min, ciclosporine A: 8,3 min, ciclosporine D: 8,7 min. Le tableau 8.7. présente un résumé des différentes phases de l'analyse. La procédure d'analyse complète est présentée à l'annexe 14.1.

Tableau 8.7. Résumé des différentes phases de l'analyse

Temps	Commutateur - Etapes	Pompe 1	Pompe 2
0,0 min	Position 1 - Chargement	5% MeOH	65% MeOH
1,0 min	Position 2 - Transfert		
1,2 min		100% MeOH - lavage	
1,7 min	Position 1 - Séparation		65% MeOH
6,2 min		5% MeOH - lavage, ré-équilibrage	↓ gradient ↓
8,7 min			95% MeOH
9,0 min			100% MeOH - lavage
12,0 min			65% MeOH - ré-équilibrage
17,0 min	stop		

8.6. Comparaison avec deux méthodes similaires

Deux méthodes (tableau 8.8.), pour le dosage simultané de la ciclosporine, du tacrolimus, du sirolimus et de l'éverolimus, par LC-MS avec une préparation de l'échantillon par SPE on-line, ont été publiées, dont une au cours de notre projet (Christian 2000, Deters 2002). La première fonctionne selon un principe similaire à celui développé dans ce travail, tandis que la deuxième n'utilise qu'une seule pompe, ce qui ne permet pas de laver et ré-équilibrer la colonne d'extraction pendant la séparation chromatographique, conduisant à des temps d'analyse plus élevés (27 min).

Tableau 8.8. Comparaison entre la méthode développée et les deux méthodes similaires publiées

Paramètres	Méthode développée	Christians 2000	Deters 2002
Analytes	ciclosporine A, tacrolimus, sirolimus, everolimus	ciclosporine A, tacrolimus, sirolimus, everolimus	ciclosporine A, tacrolimus, sirolimus, everolimus
Etalons internes	ciclosporine D, 27-demethoxy-sirolimus	ciclosporine D, ascomycine, 28,40-diacetyl-sirolimus	27-demethoxy-sirolimus
Spectromètre de masse	Agilent MSD 1100 Series	Agilent MSD 1100 Series	Agilent MSD 1100 Series
Pompe additionnelle	OUI	OUI	NON
Volume échantillon	250 µl	100 µl	300 µl
Précipitation des protéines	MeOH/ZnSO ₄ 0,4 M (8/2)	MeOH/ZnSO ₄ 0,4 M (8/2)	MeOH/ZnSO ₄ 0,2 M (8/2)
Colonne d'extraction	XTerra TM MS C8 5 µm, 2,1 x 10 mm	Hypersil [®] ODS-1 C18 10 µm 2 x 10 mm	Oasis [®] HLB 25 µm, 2,1 x 20 mm
Lavage	5% MeOH, 0,4 ml/min, 40°C, 1 min	40% MeOH, 5 ml/min, 65°C, 0,75 min	100% H ₂ O, 0,35 ml/min, 33°C, 3 min
Colonne analytique	XTerra TM MS C18 5 µm, 2,1 x 50 mm	Zorbax [®] XDB C8 3,5µm, 4,6 x 50 mm	Hypersil [®] C18 5 µm, 2 x 250 mm
Séparation	gradient 65-95% MeOH en 7 min, 0,4 ml/min, 50°C	gradient 65-95% MeOH en 9 min, 0,4 ml/min, 65°C	90% MeOH, 0,25 ml/min, 33°C
Durée globale de l'analyse	17 min	9,5 min	27 min

9. PRÉVALIDATION DE LA METHODE PAR EXTRACTION ON-LINE EN PHASE SOLIDE

9.1. Méthodes

9.1.1. Conditions opératoires

Les différentes déterminations effectuées dans le cadre de la prévalidation de la méthode de dosage ont été réalisées selon les conditions opératoires retenues lors de la phase de mise au point (chapitre 8.5.1.).

9.1.2. Spécificité

Afin de déterminer la spécificité de la méthode de dosage, nous avons analysés des échantillons sanguins blancs et dopés à 100 ng/ml pour la ciclosporine A et D, 20 ng/ml pour le tacrolimus, le sirolimus et l'everolimus et 10 ng/ml pour l'ascomycine et le demethoxy-sirolimus. Les analyses ont été répétées avec dix sangs de provenances différentes. Des échantillons aqueux blancs et dopés aux mêmes concentrations ainsi que du plasma et du sérum ont également été analysés. Les chromatogrammes obtenus avec les différents types d'échantillons ont été comparés dans le but d'identifier d'éventuelles interférences.

Il s'agissait également de déterminer la spécificité par rapport aux nombreux métabolites qui ont mis en évidence dans le sang (Streit 1996, Gonschior 1996, Zhang 1997, Simpson 1998, Kirchner 1999b, Christians 2000, Kirchner 2001, Deters 2002).

9.1.3. Suppression de signal

Certains analytes et étalons internes n'étant pas totalement séparés à l'aide de la chromatographie liquide, il était nécessaire de mettre en évidence un éventuel effet de suppression de signal des analytes sur les étalons internes. Le signal obtenu pour une concentration fixe de demethoxy-sirolimus (10 ng/ml) a été comparé pour des concentrations croissantes de sirolimus et d'everolimus (2,5, 10, 15, 20 et 30 ng/ml). La même expérience a été réalisée avec une concentration fixe de ciclosporine D (250 ng/ml) et des concentrations

croissantes de ciclosporine A (50, 150, 250, 1000, 1500 ng/ml). Les échantillons étaient du sang complet dopé et ont été préparés selon la procédure habituelle.

9.1.4. Effet mémoire

Afin de s'assurer de l'absence d'effet mémoire, des échantillons de sangs blancs ont été analysés avant et après des échantillons sanguins dopés avec 10 ng/ml de demethoxy-sirolimus, 45 ng/ml de tacrolimus, sirolimus, everolimus, 250 ng/ml de ciclosporine D et 1500 ng/ml de ciclosporine A. Les analyses ont été répétées trois fois.

9.1.5. Estimation de la limite de détection et de quantification

Sur la base des résultats d'analyses préliminaires obtenues avec des échantillons sanguins dopés avec chaque immunosuppresseur à des concentrations de 1, 2,5, 5 et 10 ng/ml, quatre sangs différents blancs et dopés à 2,5 ng/ml ont été analysés afin de déterminer plus précisément le rapport des hauteurs des signaux des analytes sur celles du blanc aux mêmes temps de rétention.

9.1.6. Estimation de la linéarité et de la fonction de réponse

La linéarité et la fonction de réponse ont été estimées en prévalidation en analysant des échantillons sanguins dopés à 2,5, 5, 10, 20, 30 et 45 ng/ml de sirolimus, everolimus et tacrolimus et à 50, 100, 200, 400, 600 et 900 ng/ml de ciclosporine A. Les étalons internes étaient à une concentration de 10 ng/ml pour le demethoxy-sirolimus et de 100 ng/ml pour la ciclosporine D.

9.1.7. Stabilité du signal MS

Certaines observations antérieures nous ont amené à constater que le signal obtenu à l'aide du spectromètre de masse n'était pas très stable. Afin d'étudier plus en détail ce phénomène, l'injection répétée d'un standard à intervalle régulier sur une série de 62 échantillons a été réalisée. Les substances étaient en solution dans du méthanol à une concentration de 250 ng/ml pour la ciclosporine A et D, 30 ng/ml pour le sirolimus, everolimus et tacrolimus et 10 ng/ml pour le demethoxy-sirolimus.

9.2. Résultats et discussions

9.2.1. Spécificité

a) Spécificité par rapport à la matrice sanguine

De manière générale, les chromatogrammes obtenus avec les dix sangs d'origines différentes n'ont pas montré de différences significatives. Les chromatogrammes obtenus avec les sangs blancs n'ont pas présentés de pics aux temps de rétention des analytes et étalons internes permettant de conclure à une absence d'interférences (figures 9.1. à 9.7.). Certains pics d'intensité assez importante ont été observés principalement sur les chromatogrammes du tacrolimus et de l'ascomycine à des temps de rétention supérieurs à ceux des analytes. Ces pics n'ont été observés qu'avec les échantillons sanguins, permettant d'attribuer leur origine à la matrice sanguine et non à la méthode.

D'autre part, afin de déterminer si ces pics provenaient des éléments figurés du sang, nous avons analysé des échantillons de plasma et de sérum. Les résultats ont montré que ce n'était pas le cas, la présence de pics similaires ayant été observée également avec ces matrices différentes.

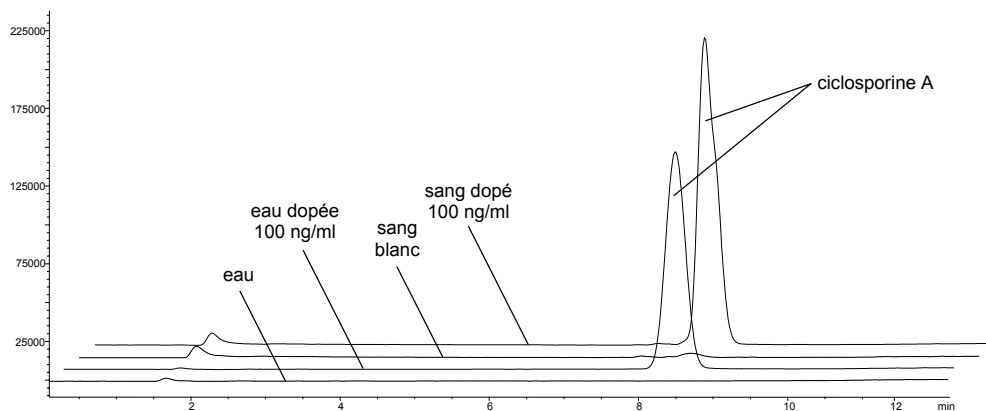


Figure 9.1. Chromatogramme pour la ciclosporine A

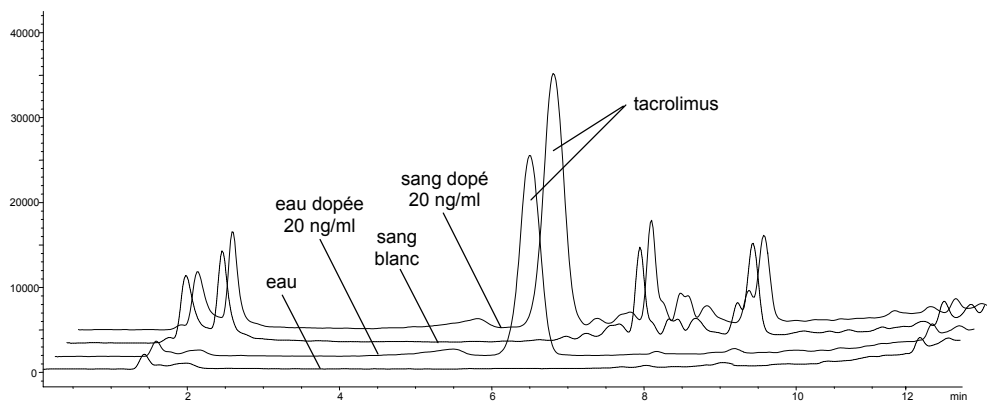


Figure 9.2. Chromatogramme pour le tacrolimus

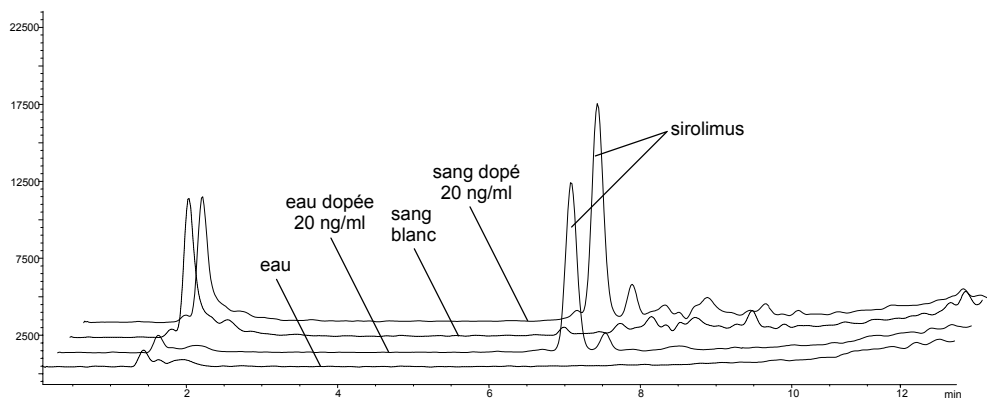


Figure 9.3. Chromatogramme pour le sirolimus

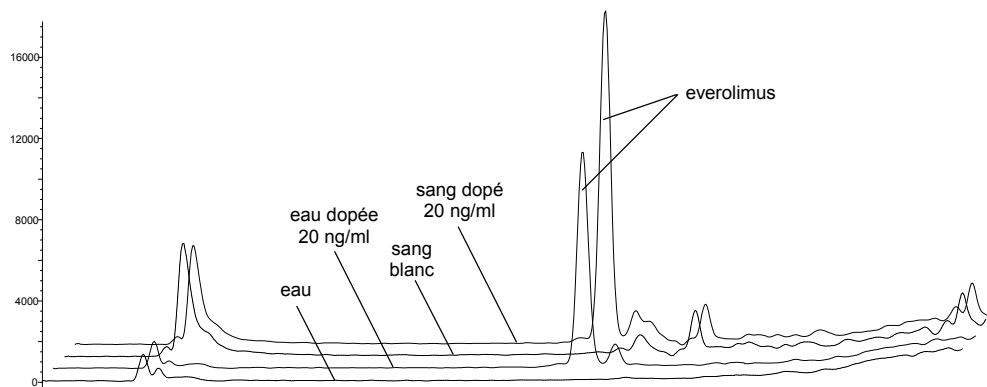


Figure 9.4. Chromatogramme pour l'everolimus

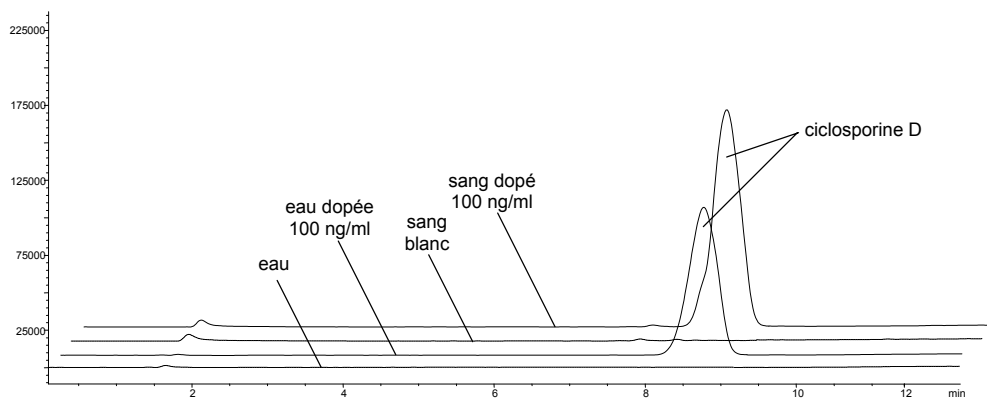


Figure 9.5. Chromatogramme pour la cyclosporine D

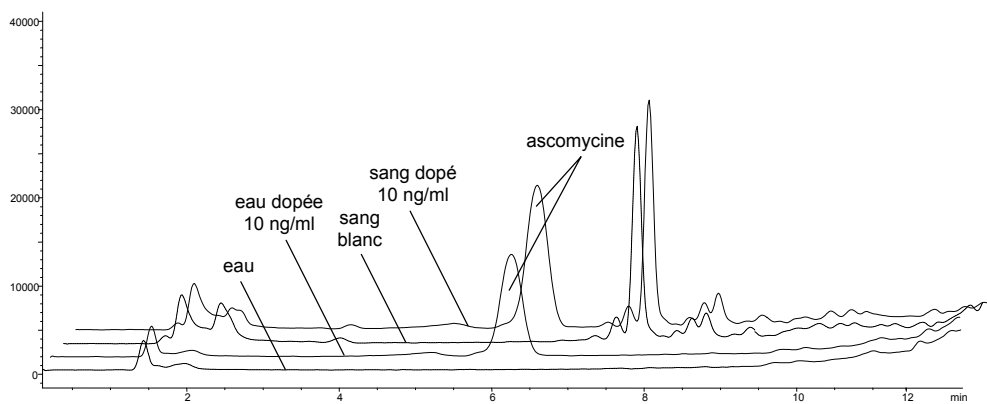


Figure 9.6. Chromatogramme pour l'ascomycine

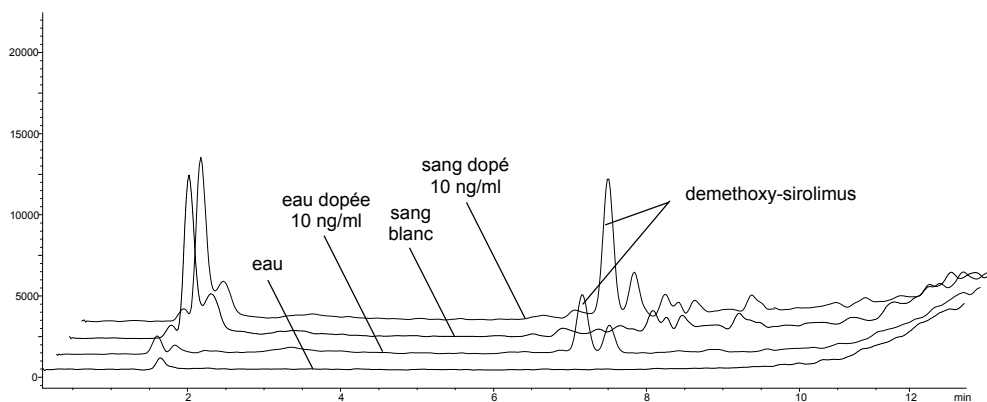


Figure 9.7. Chromatogramme pour le demethoxy-sirolimus

Des analyses complémentaires ont été effectuées avec une détection par spectrophotométrie UV à 280 nm, afin de déterminer si les pics supplémentaires observés provenaient de certaines protéines hydrophobes qui n'auraient pas été éliminées lors de la phase de lavage. Les résultats de ces analyses ont montré qu'il ne s'agirait a priori pas de ce type de composé, aucun signal n'ayant été observé avec ce détecteur.

D'autres analyses ont été effectuées avec les mêmes échantillons mais avec une détection à des rapports m/z correspondant aux adduits $[M+K]^+$ dans le but d'obtenir éventuellement des chromatogrammes plus propres. Ces nouvelles conditions de détection n'ont cependant pas permis d'obtenir les résultats souhaités, les chromatogrammes obtenus présentaient également des pics parasites et les rapports signal sur bruit observés étaient plus faibles qu'avec les adduits $[M+Na]^+$.

Une amélioration n'a pas non plus été obtenue avec des essais réalisés en présence de dodécylamine (DDA) dans la phase mobile (voir chapitre 5.2.1.) avec une détection effectuée à des rapports m/z correspondant aux adduits $[M+DDA+H]^+$.

b) Spécificité par rapport aux métabolites

Les rapports m/z des adduits $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ des différents métabolites pouvant être rencontrés dans le sang ont été recensés afin d'identifier d'éventuelles interférences (tableaux 9.1. à 9.3.). Il ressort de cette analyse que l'adduit $[M+Na]^+$ du di-demethyl-hydroxy-tacrolimus ainsi que l'adduit $[M+K]^+$ du di-demethyl-tacrolimus avaient des rapports m/z de 814 qui étaient identiques à celui de l'ascomycine. Ces composés devraient en principe migrer à des temps de rétention différents de celui de l'ascomycine. Cette hypothèse n'ayant cependant pas pu être vérifiée et afin d'éviter tout risque d'interférence et également dans un but de simplification, il a été décidé de ne pas utiliser cet étalon interne pour doser nos analytes, le demethoxy-sirolimus servant à la fois pour le tacrolimus, le sirolimus et l'everolimus. A noter qu'il était nécessaire de conserver un deuxième étalon interne, la ciclosporine D, utilisé à une plus haute concentration que le demethoxy-sirolimus, pour le dosage de la ciclosporine A, en raison des concentrations rencontrées de cette molécule nettement supérieures aux autres immunosuppresseurs.

Tableau 9.1. Rapports m/z des principaux métabolites du tacrolimus

Immunosuppresseurs et étalons internes	Métabolites détectables dans le sang	m/z [M+Na] ⁺	m/z [M+K] ⁺
ascomycine tacrolimus	di-demethyl-tacrolimus	798	
	demethyl-tacrolimus	812	
	di-demethyl-tacrolimus		814
	di-demethyl-hydroxy-tacrolimus	814	
		814	
ascomycine	demethyl-hydroxy-tacrolimus	826	
	demethyl-tacrolimus	828	828
			830
tacrolimus	di-demethyl-hydroxy-tacrolimus		830
	hydroxy-tacrolimus	842	
			842
	demethyl-hydroxy-tacrolimus		844
	hydroxy-tacrolimus		858

Tableau 9.2. Rapports m/z des principaux métabolites du sirolimus et de l'everolimus

Immunosuppresseurs et étalons internes	Métabolites détectables dans le sang	m/z [M+Na] ⁺	m/z [M+K] ⁺
demethoxy-sirolimus		906	
demethoxy-sirolimus	di-demethyl-sirolimus	908	
	demethyl-sirolimus	922	922
sirolimus	di-demethyl-sirolimus		924
		936	
sirolimus	hydroxy-demethyl-sirolimus	938	
	demethyl-sirolimus		938
	hydroxy-sirolimus	952	
sirolimus			952
	hydroxy-demethyl-sirolimus		954
everolimus	demethyl-everolimus	966	
	di-hydroxy-sirolimus	968	
	hydroxy-sirolimus		968
		980	
everolimus	demethyl-everolimus		982
	di-hydroxy-sirolimus		984
	hydroxy-everolimus	996	
			996
everolimus	ring-opened-everolimus	998	
	dihydroxy-everolimus	1012	
	hydroxy-everolimus		1012
	ring-opened-everolimus		1014
	dihydroxy-everolimus		1028

Tableau 9.3. Rapports m/z des principaux métabolites de la ciclosporine A

Immunosuppresseurs et étalons internes	Métabolites détectables dans le sang	m/z [M+Na] ⁺	m/z [M+K] ⁺
ciclosporine A	N-demethyl-ciclosporine A	1210	
		1224	
ciclosporine D	N-demethyl-ciclosporine A		1226
ciclosporine A ciclosporine D	hydroxy-ciclosporine A	1238	
		1240	
			1240
			1254
ciclosporine A ciclosporine D	dihydroxy-ciclosporine A	1256	
	hydroxy-ciclosporine A		1256
	dihydroxy-ciclosporine A		1272

9.2.2. Suppression de signal

Les résultats obtenus avec le sirolimus et l'everolimus n'ont pas montré d'effet de suppression de signal significatif sur le demethoxy-sirolimus aux concentrations testées (figure 9.8.). La ciclosporine A à haute concentration (1500 ng/ml) a produit un léger effet de suppression de signal ($-12\% \pm 2\%$) sur la ciclosporine D (figure 9.9.). Ce phénomène ne devrait cependant pas causer de problèmes en pratique car il devrait être pris en compte par la calibration. Autrement dit, à une concentration donnée, l'effet devrait être le même avec le calibrateur et l'échantillon à doser.

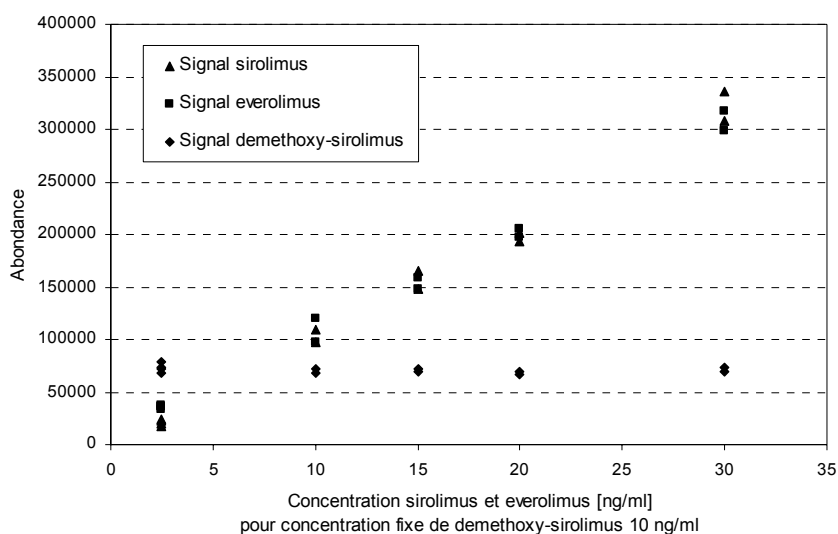


Figure 9.8. Etude de la suppression de signal pour le demethoxy-sirolimus

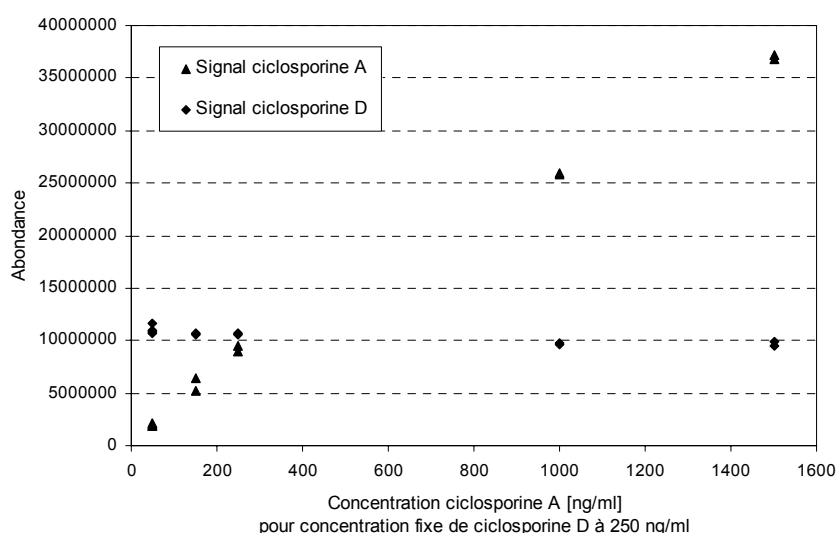


Figure 9.9. Etude de la suppression de signal pour la ciclosporine D

9.2.3. Effet mémoire

Les chromatogrammes obtenus avec les échantillons blancs analysés après les échantillons dopés n'ont pas montré la présence de signal provenant de résidus d'analytes, indiquant une absence d'effet mémoire. Les temps de lavage des colonnes entre deux analyses ont donc été jugés suffisants.

9.2.4. Estimation de la limite de détection et de quantification

Le rapport de la hauteur du signal de l'analyte à 2,5 ng/ml sur celle du blanc était de $6 \pm 0,7$ pour la ciclosporine A, de $9 \pm 0,2$ pour le tacrolimus, de $11 \pm 1,7$ pour le sirolimus et de $10 \pm 3,7$ pour l'everolimus. Les limites de détection et de quantification ont été estimées à l'aide d'une règle de trois sur la base de ces résultats et sont indiquées dans le tableau 9.4. Les LOQ sont un peu plus élevées que celles obtenues à l'aide de la méthode de préparation de l'échantillon par extraction liquide-liquide (voir chapitre 7.3.3.), mais se situent quand-même en dessous des concentrations habituellement dosées en routine et ont été jugées de satisfaisantes. Ces dernières seront confirmées lors de la phase de validation.

Tableau 9.4. Estimation des LOD et LOQ

	Ciclosporine A	Tacrolimus	Sirolimus	Everolimus
LOD (ng/ml)	1,3	0,8	0,7	0,8
LOQ (ng/ml)	4,2	2,8	2,3	2,5

9.2.5. Estimation de la linéarité et de la fonction de réponse

Les quatre immunosuppresseurs ont montré une fonction de réponse de type linéaire (droite d'équation $y = mx + h$, où m est la pente et h l'ordonnée à l'origine) sur les intervalles de dosages testés, avec également une relation linéaire entre les concentrations estimées et les concentrations introduites (figures 9.11. à 9.13.). Ces résultats doivent toutefois être considérés avec précaution en raison du manque de répétition et nécessitent d'être confirmés par la phase de validation.

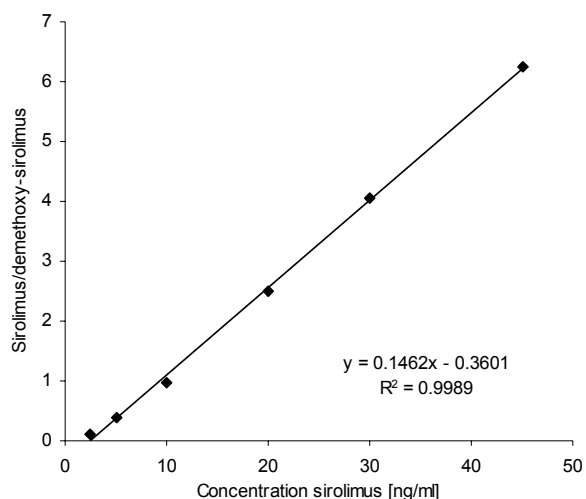


Figure 9.10. Fonction de réponse du sirolimus

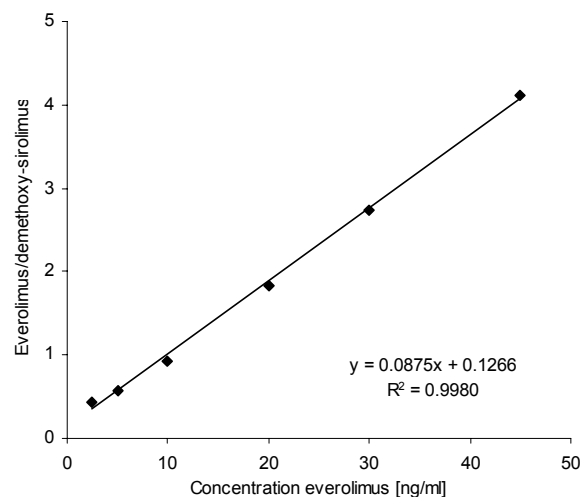


Figure 9.11. Fonction de réponse de l'everolimus

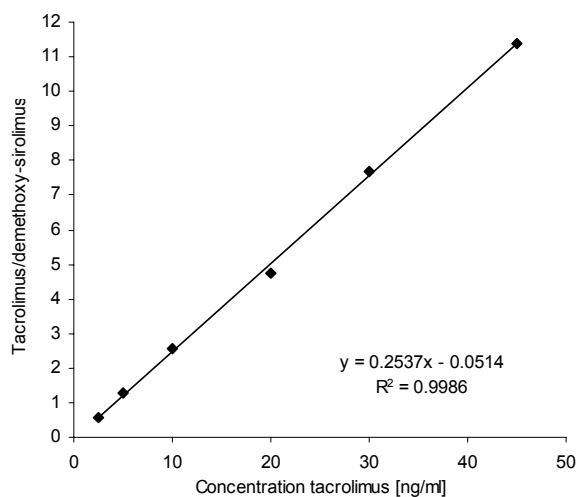


Figure 9.12. Fonction de réponse du tacrolimus

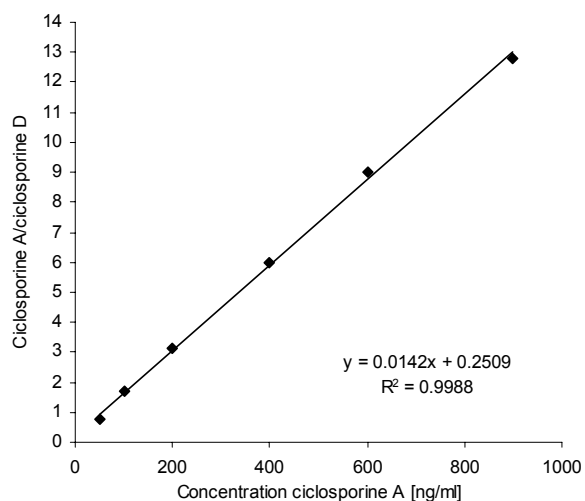


Figure 9.13. Fonction de réponse de la ciclosporine A

9.2.6. Stabilité du signal MS

La ciclosporine A et D ont montré une bonne stabilité de leur signal pendant toute la durée de la série (figure 9.14.), ce qui n'était pas le cas avec les autres molécules pour lesquelles une diminution du signal a été observée de manière plus importante pour le demethoxy-sirolimus par rapports aux analytes, résultant en une augmentation du rapport analyte/étalon interne au cours du temps (figures 9.15. à 9.17.). A noter que cette expérience avait été réalisée avec des échantillons non biologiques et qu'il s'agissait d'une série particulièrement longue, d'une durée de près de 20 heures.

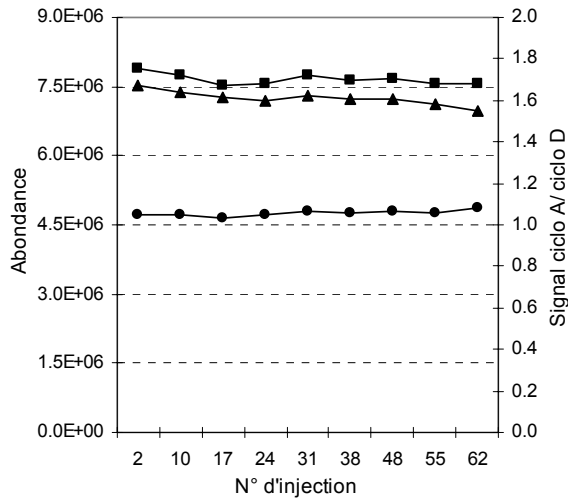


Figure 9.14. Signal ciclosporine A ■, ciclosporine D ▲, rapport ciclosporine A/ciclosporine D ●

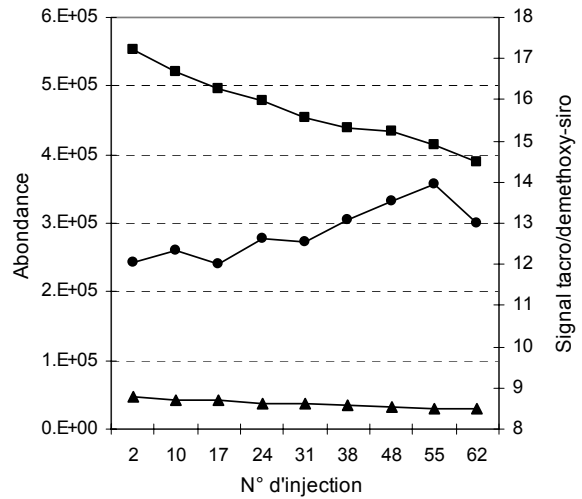


Figure 9.15. Signal tacrolimus ■, demethoxy-sirolimus ▲, rapport tacrolimus/demethoxysirolimus ●

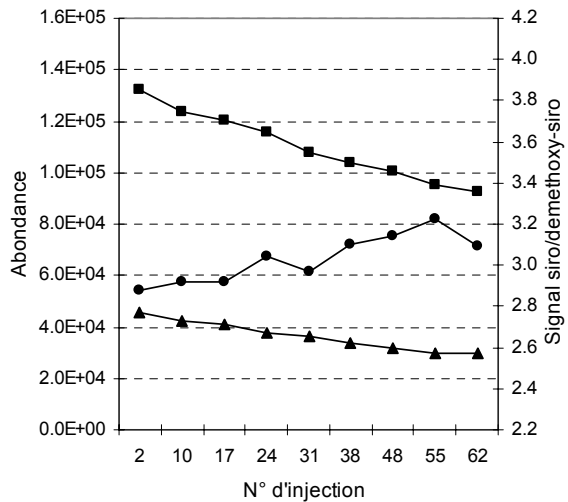


Figure 9.16. Signal sirolimus ■, demethoxy-sirolimus ▲, rapport sirolimus/demethoxysirolimus ●

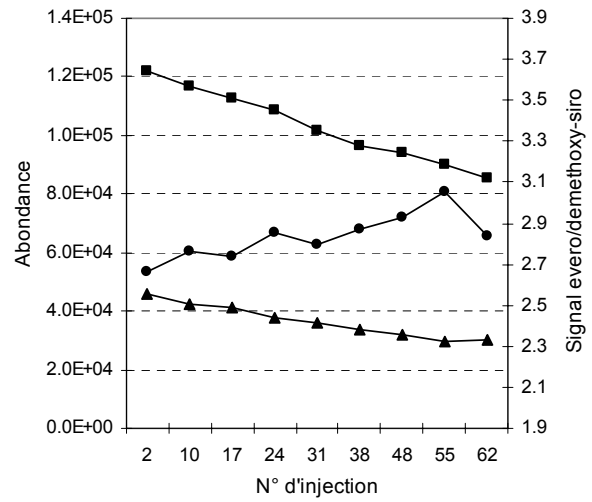


Figure 9.17. Signal everolimus ■, demethoxy-sirolimus ▲, rapport everolimus/demethoxysirolimus ●

Ce phénomène a été réévalué à l'aide d'échantillons sanguins en analysant des calibrateurs (3 niveaux à double) en début et fin d'une série de 47 échantillons. Une différence au niveau des équations des droites de calibration a été constatée, mise à part pour la ciclosporine A, avec une pente plus élevée pour les calibrateurs analysés en fin de série, ce qui était en concordance avec nos premières observations (tableau 9.5.). La différence au niveau des résultats obtenus avec des échantillons de contrôle de qualité, selon l'estimation de leurs taux avec la première ou la deuxième droite, était, suivant la concentration, de 1-9% pour le

tacrolimus, de 4-6% pour le sirolimus et de 12% pour l'everolimus. Ces différences, qui n'ont pas été jugées comme cliniquement significatives pour des séries plus courtes, peuvent être minimisées en analysant les calibrateurs en milieu de série ou en recalibrant tous les 25 à 30 échantillons en cas de longue série.

Tableau 9.5. Répétition de calibrateurs en début et fin de série

	Ciclosporine A	Tacrolimus	Sirolimus	Everolimus
1 ^{ère} courbe	$y = 0.0025x + 0.1349$	$y = 0.6383x - 0.1165$	$y = 0.1531x - 0.0901$	$y = 0.1397x + 0.1039$
2 ^{ème} courbe	$y = 0.0025x + 0.1407$	$y = 0.7103x - 0.3083$	$y = 0.1635x - 0.0973$	$y = 0.1591x + 0.1026$

Deux hypothèses ont été formulées quant à l'origine de ce phénomène. La première serait une dégradation des substances en solutions dans le réactif de précipitation. Cette explication semble cependant peu probable en raison d'une certaine stabilité documentée de ces molécules (voir chapitre 4.2.2.). La deuxième explication serait un problème d'adsorption progressive de ces substances lipophiles sur le capillaire en verre (silice) à haute température du spectromètre de masse. La ciclosporine A et D étant présentes en plus forte concentration que les autres analytes, la part relative adsorbée serait plus faible, ce qui pourrait expliquer l'absence de mise en évidence de ce phénomène avec ces molécules.

9.3. Conclusion

La phase de prévalidation a permis de montrer que la méthode développée était spécifique vis-à-vis de la matrice biologique et également des métabolites. Un effet mémoire n'a pas été observé et un léger effet de suppression de signal a été mis en évidence avec la ciclosporine A à haute concentration sur la ciclosporine D, ce phénomène n'a pas été constaté avec les autres substances. Une relation linéaire a pu être établie entre la concentration et la réponse sur un intervalle de dosage englobant les concentrations habituellement rencontrées en routine. Les limites de détection et de quantification estimées étaient satisfaisantes. Une diminution du signal au cours du temps a été observée pour certaines substances, ne conduisant cependant pas à des erreurs cliniquement significatives. Sur la base de ces résultats, nous avons jugé qu'il était approprié de poursuivre notre travail par la phase de validation de la méthode.

10. VALIDATION DE LA METHODE PAR EXTRACTION ON-LINE EN PHASE SOLIDE

10.1. Méthode

10.1.1. Objectifs

La stratégie de validation appliquée s'est basée sur une adaptation d'une approche proposée par la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) (Chapuzet 1997, Hubert 2003). Il s'agissait d'établir pour chaque substance plus précisément la fonction de réponse, de vérifier la linéarité sur l'intervalle de dosage choisi, de confirmer les limites de quantification estimées et de déterminer, pour chaque niveau de concentration testé, la justesse ainsi que les paramètres de fidélité, à savoir la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

10.1.2. Protocole de validation

Afin d'évaluer les performances de la méthode de dosage, deux types d'échantillons ont été préparés, il s'agissait des standards d'étalonnage et de validation. Ces échantillons ont été obtenus en dopant du sang complet à partir de deux solutions mères d'immunosuppresseurs indépendantes. La validation s'est déroulée sur quatre jours, avec trois niveaux de standards d'étalonnage répétés deux fois et trois niveaux de standards de validation répétés quatre fois (tableaux 10.1 et 10.2.).

Les marges thérapeutiques du tacrolimus, du sirolimus et de l'everolimus se situant entre 5 et 20 ng/ml, le domaine de calibration testé a été choisi à partir de la limite de quantification estimée (2,5 ng/ml) et jusqu'à la limite supérieure des valeurs habituellement rencontrées lors des dosages de routine (30 ng/ml). Pour la ciclosporine A, en raison de marges thérapeutiques plus élevées (100-250 ng/ml), l'intervalle de dosage a été débuté à 50 ng/ml, soit une valeur nettement supérieure à la limite de quantification préalablement estimée. D'autre part, dans l'optique d'être compatible avec un monitoring thérapeutique basé sur la détermination du taux sanguin deux heures après l'administration du médicament, et afin d'éviter de devoir diluer ces échantillons à haute concentration, il a été choisi d'étendre le domaine de calibration au delà des concentrations résiduelles thérapeutiques, soit jusqu'à

1500 ng/ml. Les concentrations des standards de validation ont été réparties à l'intérieur de l'intervalle de dosage avec le niveau le plus faible correspondant à la limite de quantification estimée. Les étalons internes étaient à une concentration de 10 ng/ml pour le demethoxy-sirolimus et à 250 ng/ml pour la ciclosporine D.

Tableau 10.1. Standards d'étalonnage

Niveaux	Concentration tacrolimus, sirolimus et everolimus	Concentration ciclosporine A	Nombre de répétitions			
			Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4
1	2,5 ng/ml	50 ng/ml	2	2	2	2
2	15 ng/ml	250 ng/ml	2	2	2	2
3	30 ng/ml	1500 ng/ml	2	2	2	2

Tableau 10.2. Standards de validation

Niveaux	Concentration tacrolimus, sirolimus et everolimus	Concentration ciclosporine A	Nombre de répétitions			
			Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4
1	2,5 ng/ml	50 ng/ml	4	4	4	4
2	10 ng/ml	150 ng/ml	4	4	4	4
3	20 ng/ml	1000 ng/ml	4	4	4	4

10.1.3. Fonction de réponse et linéarité

La fonction de réponse et la linéarité ont été déterminés à partir des résultats obtenus avec les standards d'étalonnage sur les quatre jours.

10.1.4. Limite de quantification

La limite de quantification a été déterminée à partir des résultats obtenus avec les standards de validation à la plus basse concentration, pour lesquels une justesse et une fidélité acceptables étaient requises, afin de confirmer les estimations effectuées basées sur le rapport de la hauteur du signal sur le bruit.

10.1.5. Justesse

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série de résultats d'essais et une valeur qui est acceptée soit comme une valeur conventionnellement vraie, soit comme une valeur de référence acceptée. Ce paramètre rend compte des erreurs systématiques (Hubert 2003). La justesse, exprimée en pourcentage de recouvrement, a été évaluée en comparant pour chaque niveau, la valeur moyenne obtenue par le calcul en retour des standards de validation avec la valeur attendue du niveau concerné.

10.1.6. Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion, coefficient de variation) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité fournit une indication sur les erreurs liées au hasard, elle peut être évaluée à trois niveaux: la répétabilité (variations intra-jour), la fidélité intermédiaire (variations inter-jour) et la reproductibilité (variations interlaboratoire). La fidélité traduit uniquement la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée (Hubert 2003). La fidélité, exprimée en coefficient de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire, a été évaluée par niveau à l'aide d'une analyse de variance effectuée sur les résultats intra- et inter-jours obtenus avec le calcul en retour des standards de validation.

10.1.7. Stabilité des échantillons sanguins

En raison d'une stabilité bien documentée pour les échantillons sanguins contenant ces immunosuppresseurs (voir chapitre 4.2.2.) et également de la longue expérience du LCCC (notamment en ce qui concerne la ciclosporine et le tacrolimus), il n'a pas été jugé nécessaire d'étudier la stabilité de ces analytes.

10.2. Résultats et discussion

10.2.1. Tacrolimus

La fonction de réponse du tacrolimus était de type linéaire (droite d'équation $y = mx + h$, où m est la pente et h l'ordonnée à l'origine, tableau 10.3.), avec une relation également linéaire entre les concentrations estimées et les concentrations introduites.

Tableau 10.3. Droites d'étalonnage pour le tacrolimus

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4
Pente, m	0.6679	0.2532	0.5467	0.6383
Ordonnée à l'origine, h	-0.8011	-0.1206	-0.3789	-0.1165
Coefficient de détermination, r^2	0.9847	0.9991	0.9958	0.9941

Les valeurs calculées en retour pour les standards de validation sont indiquées dans le tableau 10.4. Ces résultats ont permis de confirmer la limite de détection estimée et de déterminer la justesse, la répétabilité et la fidélité intermédiaire qui sont représentées dans le tableau 10.5.

Tableau 10.4. Valeurs calculées en retour pour les standards de validation du tacrolimus, en absolu [ng/ml] et relatif

x	u1	u2	u3	u4	u1	u2	u3	u4
2.45	3.6	2.6	2.8	2.2	146%	107%	114%	92%
2.45	2.9	2.6	2.9	2.3	117%	108%	117%	93%
2.45	2.8	2.6	2.7	2.3	116%	105%	112%	96%
2.45	2.9	2.8	3.0	2.5	120%	115%	123%	103%
9.8	11.9	11.2	11.5	10.0	122%	115%	117%	103%
9.8	9.9	11.9	9.8	9.0	102%	121%	100%	92%
9.8	10.0	10.5	10.2	9.5	102%	107%	104%	97%
9.8	10.2	11.6	10.2	10.3	104%	118%	104%	105%
19.6	24.6	25.0	23.2	18.9	126%	128%	118%	97%
19.6	20.8	25.5	21.7	19.6	106%	130%	111%	100%
19.6	22.2	25.2	21.3	20.6	113%	129%	109%	105%
19.6	22.5	22.0	20.7	22.6	115%	113%	106%	115%

Tableau 10.5. Paramètres de validation pour le tacrolimus

		Niveaux		
		2.5 ng/ml	9.8 ng/ml	19.6 ng/ml
Justesse		111 %	107 %	114 %
Fidélité	CV de répétabilité	8.2 %	7.4 %	7.6 %
	CV de fidélité intermédiaire	18.3 %	10.7 %	13.3 %

La justesse et la fidélité obtenues aux différents niveaux ont été jugées comme satisfaisantes et correspondent aux besoins de la méthode dans le cadre de son utilisation en routine. La limite de quantification a été confirmée à 2,5 ng/ml. La justesse obtenue indique toutefois une légère tendance de la méthode à surdoser. Ce biais n'est cependant pas cliniquement significatif, ce qui est également le cas du coefficient de variation de fidélité intermédiaire qui s'élevait à 18 % à 2,5 ng/ml.

Les performances de la méthode développée correspondent à celles de la méthode par EMIT utilisée en routine et établies par Dade Behring (tableau 10.6.). Elles sont également comparables à celles obtenues par d'autres auteurs ayant développé une méthode similaire (Christians 2000, Deters 2002), avec toutefois un coefficient de variation de fidélité intermédiaire légèrement plus élevé dans notre cas.

Tableau 10.6. Comparaison avec les performances d'autres méthodes (tacrolimus)

Méthodes (intervalle de dosage)	Niveaux [ng/ml]	Justesse [%]	Répétabilité [%]	Fidélité interm. [%]
Méthode développée (2,5-30 ng/ml)	2,5	111	8,2	18,3
	10	107	7,4	10,7
	20	114	7,6	13,3
EMIT Dade Behring (2-30 ng/ml)	4,2	-	12,9	17,7
	8,4	-	7,2	9,4
	15,2	-	6,2	9,9
Christians 2000 (0,25-100 ng/ml)	5	97	12,3 (0,25 ng/ml)	4,4
	20	109	1,5 (25 ng/ml)	0,7
	70	104	15,8 (100 ng/ml)	1,6
Deters 2002 (0,3-200 ng/ml)	3,4	94	6,7	3,5
	17	100	7,0	7,1
	34	93	9,8	4,8

10.2.2. Sirolimus

La fonction de réponse du sirolimus était de type linéaire (droite d'équation $y = mx + h$, tableau 10.7.), avec une relation également linéaire entre les concentrations déterminées et les concentrations introduites. L'ordonnée à l'origine du jour 3 s'éloignait de celles obtenues les autres jours, cependant, en raison de l'absence de mise en évidence d'une erreur de manipulation ce jour là, et du fait du nombre limité de répétitions, il a été décidé de conserver ces résultats, considérant ainsi que ce type de variation pouvait faire partie intégrante de la méthode de dosage.

Tableau 10.7. Droites d'étalonnage pour le sirolimus

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4
Pente, m	0.1550	0.1257	0.1301	0.1531
Ordonnée à l'origine, h	-0.1420	-0.0447	0.6893	-0.0901
Coefficient de détermination, r^2	0.9925	0.9892	0.9949	0.9987

Les valeurs calculées en retour pour les standards de validation sont indiquées dans le tableau 10.8. Ces résultats ont permis de confirmer la limite de détection et de déterminer la justesse, la répétabilité et la fidélité intermédiaire qui sont représentées dans le tableau 10.9.

Tableau 10.8. Valeurs calculées en retour pour les standards de validation du sirolimus, en absolu [ng/ml] et relatif

x	u1	u2	u3	u4	u1	u2	u3	u4
2.5	2.7	2.3	2.7	2.2	107%	90%	109%	87%
2.5	2.2	2.2	3.1	2.7	90%	89%	124%	109%
2.5	2.2	2.0	2.9	2.8	87%	81%	115%	113%
2.5	2.3	2.2	3.1	2.8	92%	87%	124%	111%
10.0	8.7	10.3	10.5	10.6	87%	103%	105%	106%
10.0	8.4	10.3	9.4	10.0	84%	103%	94%	100%
10.0	8.0	9.2	10.1	10.3	80%	92%	101%	103%
10.0	8.7	9.8	9.8	11.2	87%	98%	98%	112%
20.0	18.8	20.8	21.5	18.9	94%	104%	107%	95%
20.0	18.5	20.8	21.5	20.5	93%	104%	108%	103%
20.0	18.4	19.9	21.3	21.2	92%	100%	106%	106%
20.0	19.3	18.2	20.2	22.9	97%	91%	101%	115%

Tableau 10.9. Paramètres de validation pour le sirolimus

		Niveaux		
		2.5 ng/ml	10.0 ng/ml	20.0 ng/ml
Justesse		101 %	97 %	101 %
Fidélité	CV de répétabilité	8.7 %	4.6 %	5.5 %
	CV de fidélité intermédiaire	20.2 %	12.8 %	8.5 %

La justesse et la fidélité obtenues aux différents niveaux de concentrations ont été jugées comme satisfaisantes et conviennent à une utilisation de la méthode en routine, malgré un coefficient de variation de fidélité intermédiaire de l'ordre de 20% à la concentration inférieure, qui ne conduit cependant pas à une erreur cliniquement significative. La limite de quantification a été confirmée à 2,5 ng/ml.

Les performances de la méthode développée ont été jugées comme équivalentes à celles de la méthode par LLE off-line utilisée en routine (tableau 10.10.). Elles étaient également comparables à celles obtenues par d'autres auteurs ayant développé une méthode similaire (Christians 2000, Deters 2002), mise à part pour le coefficient de variation de fidélité intermédiaire à basse concentration qui était plus élevé dans notre cas.

Tableau 10.10. Comparaison avec les performances d'autres méthodes (sirolimus)

Méthodes (intervalle de dosage)	Niveaux [ng/ml]	Justesse [%]	Répétabilité [%]	Fidélité interm. [%]
Méthode développée (2,5-30 ng/ml)	2,5	101	8,7	20,2
	10	97	4,6	12,8
	20	101	5,5	8,5
Méthode LLE off-line (2,5-30 ng/ml)	variables	-	8,1 (4,9 ng/ml)	10,5 (3,5 ng/ml)
	variables	-	7,2 (7,3 ng/ml)	11,1 (9,4 ng/ml)
	variables	-	3,4 (22,2 ng/ml)	9,7 (18,6 ng/ml)
Christians 2000 (0,25-100 ng/ml)	1,5	104	7,2	7,1
	15	107	5,5	9,8
	40	108	6,2	6,7
Deters 2002 (0,3-200 ng/ml)	4	104	7,3	8,1
	20	98	5,3	2,0
	40	97	3,4	2,1

10.2.3. Everolimus

La fonction de réponse de l'everolimus était de type linéaire (droite d'équation $y = mx + h$, tableau 10.11.), avec une relation également linéaire entre les concentrations déterminées et les concentrations introduites.

Tableau 10.11. Droites d'étalonnage pour l'everolimus

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4
Pente, m	0.1573	0.0805	0.1527	0.1397
Ordonnée à l'origine, h	-0.1015	-0.0344	-0.1866	0.1039
Coefficient de détermination, r^2	0.9987	0.9990	0.9936	0.9995

Les valeurs calculées en retour pour les standards de validation sont indiquées dans le tableau 10.12. Ces résultats ont permis de confirmer la limite de détection et de déterminer la justesse, la répétabilité et la fidélité intermédiaire qui sont représentées dans le tableau 10.13.

Tableau 10.12. Valeurs calculées en retour pour les standards de validation de l'everolimus, en absolu [ng/ml] et relatif

x	u1	u2	u3	u4	u1	u2	u3	u4
2.5	3.3	2.6	3.1	2.8	132%	104%	124%	113%
2.5	2.3	2.7	3.3	3.0	91%	108%	131%	120%
2.5	2.4	2.6	3.0	3.4	96%	102%	122%	135%
2.5	2.5	2.9	3.2	3.3	99%	114%	127%	133%
10.0	10.7	11.8	11.1	11.2	107%	118%	111%	112%
10.0	8.8	12.2	10.0	9.5	88%	122%	100%	95%
10.0	8.7	10.6	10.1	11.0	87%	106%	101%	110%
10.0	8.9	11.5	9.5	11.6	89%	115%	95%	116%
20.0	22.5	24.2	22.0	20.6	112%	121%	110%	103%
20.0	19.5	23.8	22.2	20.6	97%	119%	111%	103%
20.0	20.4	23.6	20.5	22.4	102%	118%	103%	112%
20.0	20.5	21.2	19.6	24.4	102%	106%	98%	122%

Tableau 10.13. Paramètres de validation pour l'everolimus

		Niveaux		
		2.5 ng/ml	10.0 ng/ml	20.0 ng/ml
Justesse		116 %	105 %	109 %
Fidélité	CV de répétabilité	11.1 %	8.2 %	7.1 %
	CV de fidélité intermédiaire	17.9 %	14.7 %	9.4 %

La justesse et la fidélité obtenues aux différents niveaux de concentrations ont été jugées comme satisfaisantes et correspondaient aux besoins de la méthode dans le cadre d'une utilisation en routine. La légère tendance de la méthode à surdoser et le coefficient de variation de fidélité intermédiaire s'élevant à 18% ne conduisaient pas à une erreur cliniquement significative.

Les performances de la méthode développée ont été comparées (tableau 10.14.) à celles obtenues par d'autres auteurs ayant développé une méthode selon le même principe (Christians 2000, Deters 2002). Des coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire légèrement plus élevés, surtout à basse concentration, ont été obtenus avec notre méthode. Ces différences n'ont pas été jugées comme cliniquement significatives.

Tableau 10.14. Comparaison avec les performances d'autres méthodes (everolimus)

Méthodes (intervalle de dosage)	Niveaux [ng/ml]	Justesse [%]	Répétabilité [%]	Fidélité interm. [%]
Méthode développée (2,5-30 ng/ml)	2,5	116	11,1	17,9
	10	105	8,2	14,7
	20	109	7,1	9,4
Christians 2000 (0,25-100 ng/ml)	1	93	2,5	6,5
	25	103	0,9	5,5
	100	96	2,6	9,1
Deters 2002 (0,3-200 ng/ml)	3	94	6,5	7,0
	15	107	4,8	6,6
	30	94	4,4	4,4

10.2.4. Ciclosporine A

Les résultats obtenus avec les standards d'étalonnage ont montré que les variances des réponses par niveau pour le cumul des quatre jours augmentaient significativement en fonction de la concentration (tableau 10.15. et figures 10.1. et 10.2.). Une régression pondérée a donc été retenue. Le facteur de pondération a été déterminé selon une méthode proposée par la SFSTP (Chapuzet 1997). Il s'agissait de reporter graphiquement le logarithme de la variance des réponses par niveau en fonction du logarithme de la concentration (figure 10.3.). Le facteur de pondération a été obtenu par l'inverse de la concentration x élevée à la puissance λ , où λ est égal au nombre entier le plus proche de la pente de la droite ajustée sur les points. Dans notre cas, λ était égal à 1 et le facteur de pondération à $1/x$.

Tableau 10.15. Détermination de la variance de la réponse par niveau

Standards d'étalonnage	Rapport ciclosporine A/ciclosporine D				Variance
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	
Niveau 1 50 ng/ml	0.133	0.196	0.132	0.162	0.00073
	0.176	0.200	0.140	0.174	
Niveau 2 250 ng/ml	0.719	0.951	0.735	0.887	0.01310
	0.690	0.968	0.705	0.849	
Niveau 3 1500 ng/ml	3.274	3.828	3.644	3.782	0.07914
	3.395	4.130	3.483	3.863	

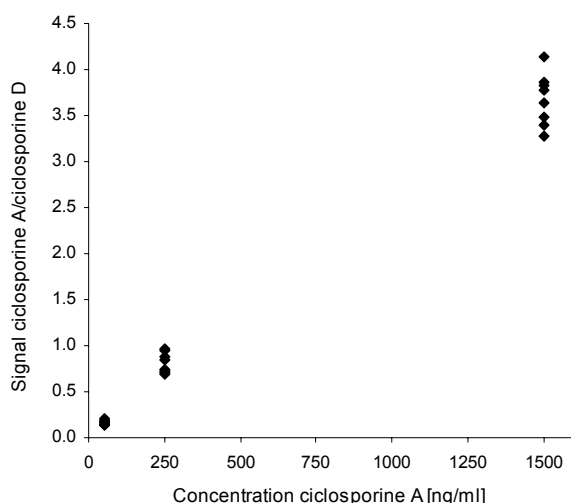


Figure 10.1. Pool des réponses des standards d'étalonnage des quatre jours

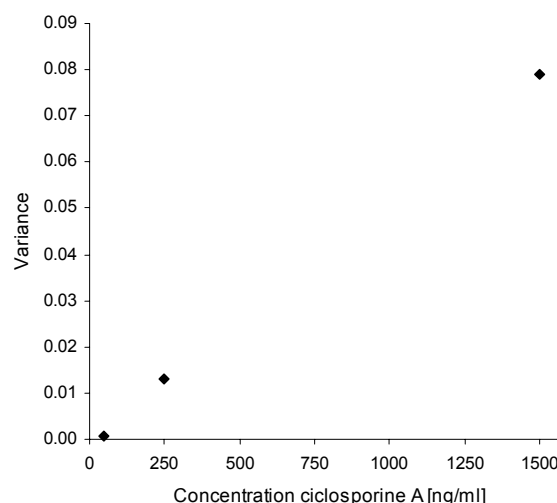


Figure 10.2. Représentation de la variances des réponses par niveau en fonction de la concentration

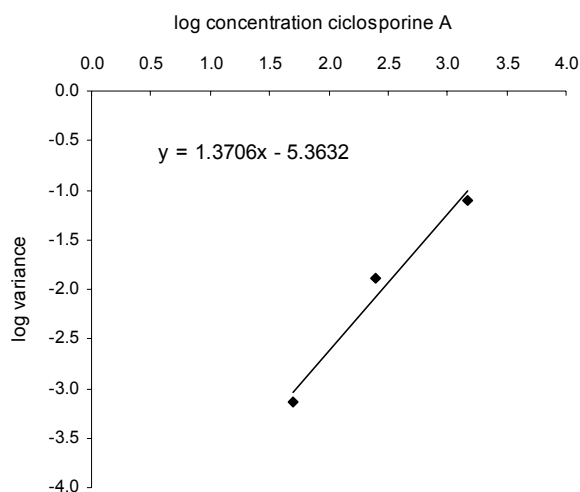


Figure 10.3. Détermination graphique du facteur de pondération

Les paramètres des droites de régression ont ensuite été déterminés selon la méthode des moindres carrés pondérés par $1/x$ et sont indiqués dans le tableau 10.16.

Tableau 10.16. Droites d'étalonnage pour la ciclosporine A avec pondération par $1/x$

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4
Pente, m	0.0022	0.0027	0.0024	0.0026
Ordonnée à l'origine, h	0.0582	0.0962	0.0312	0.0653
Coefficient de détermination, r^2	0.9964	0.9906	0.9973	0.9936

Les valeurs calculées en retour pour les standards de validation sont indiquées dans le tableau 10.17. Ces résultats ont permis de confirmer la limite de détection et de déterminer la justesse, la répétabilité et la fidélité intermédiaire qui sont représentées dans le tableau 10.18.

Tableau 10.17. Valeurs calculées en retour pour les standards de validation de la ciclosporine A, en absolu [ng/ml] et relatif

x	u1	u2	u3	u4	u1	u2	u3	u4
50	49	34	48	51	97%	67%	97%	102%
50	45	38	51	45	91%	76%	103%	91%
50	44	30	50	41	88%	61%	100%	82%
50	46	35	51	41	91%	70%	101%	83%
150	181	196	210	207	121%	131%	140%	138%
150	181	161	181	168	120%	108%	121%	112%
150	181	146	191	170	121%	98%	127%	113%
150	175	167	183	153	116%	112%	122%	102%
1000	1083	990	1001	992	108%	99%	100%	99%
1000	1071	1036	1053	1007	107%	104%	105%	101%
1000	1046	1015	1041	966	105%	102%	104%	97%
1000	1087	960	1023	1001	109%	96%	102%	100%

Tableau 10.18. Paramètres de validation pour la ciclosporine A

		Niveaux		
		50 ng/ml	150 ng/ml	1000 ng/ml
Justesse		88 %	119 %	102 %
Fidélité	CV de répétabilité	5.9 %	11.3 %	2.4 %
	CV de fidélité intermédiaire	19.6 %	12.3 %	5.4 %

Les résultats de la validation ont permis de confirmer que l'utilisation d'une régression linéaire pondérée par $1/x$ était appropriée pour l'établissement d'une relation entre la concentration et la réponse du détecteur. La justesse et la fidélité obtenues aux différents niveaux de concentrations ont été jugées comme acceptables et convenaient à une utilisation de la méthode en routine. On pouvait toutefois constater une légère tendance de la méthode à sous doser à 50 ng/ml et à surdoser à 150 ng/ml, ces erreurs n'ont cependant pas été jugées comme cliniquement significatives. Il en était de même pour le coefficient de variation de fidélité intermédiaire de 20 % obtenu à la concentration inférieure.

La méthode développée présente entre autres l'avantage d'offrir un intervalle de dosage allant jusqu'à 1500 ng/ml par rapport à la technique EMIT qui ne permet pas de doser des échantillons de concentration supérieure à 500 ng/ml sans devoir procéder à des dilutions.

Les performances de notre méthode correspondent à celles de la technique EMIT établies par Dade Behring (tableau 10.19.). Elles sont par contre, pour certains niveaux, légèrement inférieures à celles obtenues par d'autres auteurs ayant développé une méthode similaire (Christians 2000, Deters 2002). Ces différences n'ont toutefois pas été jugées comme cliniquement significatives.

Tableau 10.19. Comparaison avec les performances d'autres méthodes (ciclosporine A)

Méthodes (intervalle de dosage)	Niveaux [ng/ml]	Justesse [%]	Répétabilité [%]	Fidélité interm. [%]
Méthode développée (50-1500 ng/ml)	50	88	5,9	19,6
	150	119	11,3	12,3
	1000	102	2,4	5,4
EMIT Dade Behring (40-500 ng/ml)	72	-	8,9	14,8
	178	-	5,1	8,0
	414	-	4,9	7,4
Christians 2000 (7,5-1250 ng/ml)	75	99	3,9 (125 ng/ml)	2,5
	200	96	0,9 (375 ng/ml)	3,6
	700	103	2,6 (1250 ng/ml)	2,7
Deters 2002 (5-1000 ng/ml)	18	105	8,6	7,5
	90	95	4,0	5,7
	180	94	4,7	0,7

10.3. Conclusion

La phase de validation a permis d'établir que la fonction de réponse était de type linéaire pour le tacrolimus, le sirolimus et l'everolimus, sur l'intervalle de dosage allant de 2,5 à 30 ng/ml et qu'une pondération par 1/x convenait pour la ciclosporine sur l'intervalle de dosage allant de 50 à 1500 ng/ml. La linéarité a également été vérifiée sur le domaine de calibration de ces molécules. Les limites de quantification étaient de 2,5 ng/ml pour le tacrolimus, le sirolimus et l'everolimus et de 50 ng/ml pour la ciclosporine. La justesse et la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) étaient satisfaisantes pour les quatre molécules à chaque niveau de concentration testé et correspondaient aux performances de la technique EMIT.

11. ECHANTILLONS RÉELS ET COMPARAISON DE MÉTHODES

11.1. Objectifs

Les objectifs de cette partie étaient de tester la méthode développée en dosant des échantillons provenant de patients transplantés et en comparant les valeurs obtenues avec celles déterminées à l'aide des méthodes utilisées en routine au LCCC.

Le tacrolimus et la ciclosporine A sont dosés en routine à l'aide d'une méthode immunologique appelée Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT). Selon la littérature, il semble que ce type de méthode manque de spécificité, en raison de réactions croisées avec certains métabolites. La méthode développée par spectrométrie de masse étant spécifique des molécules mères, on s'attend à obtenir des résultats inférieurs, plus proches de la réalité clinique. L'objectif de cette partie consistait donc à évaluer les différences pouvant survenir entre les deux types de méthodes.

En ce qui concerne le sirolimus, les résultats obtenus avec la méthode développée ne devraient pas présenter de différences significatives par rapport à ceux déterminés à l'aide de la méthode utilisée en routine qui bénéficie déjà de la spécificité de la LC-MS. L'apport de la nouvelle méthode se situe principalement au niveau de la réduction du temps de préparation de l'échantillon et de la séparation chromatographique.

11.2. Méthode

Des échantillons récemment dosés en routine provenant de patients transplantés en traitement par des immunosuppresseurs ont été ré-analysés avec la méthode développée (n=31 pour le sirolimus, n=41 pour le tacrolimus et n=38 pour la ciclosporine A). Les calibrateurs utilisés étaient les mêmes pour les deux méthodes afin d'exclure un biais de calibration. Pour le sirolimus, il s'agissait de calibrateurs préparés par le laboratoire en dopant du sang à 2,5, 5, 10, 20 et 30 ng/ml. En ce qui concerne le tacrolimus et la ciclosporine A, nous avons utilisé les calibrateurs fournis par Dade Behring à des concentrations de 2,5, 10 et 20 ng/ml pour le tacrolimus et 50, 200 et 500 ng/ml pour la ciclosporine A. Des calibrateurs de concentration supérieure à 500 ng/ml n'étant pas disponibles pour la ciclosporine A, le domaine de calibration a du être restreint. Les

échantillons qui ont présenté des valeurs supérieures à 500 ng/ml ont du être dilué de la même manière que lors des dosages de routine. En raison de l'intervalle de dosage plus restreint, il n'a pas été nécessaire de pondérer la droite de calibration de la ciclosporine A.

Après un report graphique des résultats obtenus avec une méthode en fonction de ce ceux obtenus avec l'autre, il n'est pas possible d'effectuer directement une régression linéaire, car cette manière de procéder part du principe que l'erreur sur x est nulle, ce qui n'est pas le cas avec nos résultats. Pour parer à cet obstacle, les méthodes ont été comparées avec une analyse de Passing et Bablok (macro Analyse-it + Clinical Laboratory 1.67 sur Microsoft® Excel 2000) qui se base sur le principe qu'une erreur est présente sur x et y. L'équation de la droite reliant les résultats est obtenue par le calcul de la moyenne des équations reliant deux à deux chaque point. L'intervalle de confiance à 95% est ensuite calculé pour la pente et l'ordonnée à l'origine permettant de mettre en évidence respectivement la présence d'un biais proportionnel et constant. Un cusum test est ensuite effectué afin de vérifier la linéarité de la relation établie entre les deux paramètres, par un examen de la répartition au hasard des points d'un côté ou de l'autre de la droite.

11.3. Résultats et discussion

De manière générale, nous avons été satisfaits du déroulement des analyses effectuées avec les échantillons de patients.

11.3.1. Sirolimus

L'analyse de Passing et Bablok a permis de déterminer que la relation existant entre les deux méthodes était linéaire (cusum test, $p < 0,1$), avec une droite de pente de 0,965 (IC 95% de 0,824 à 1,119) et d'ordonnée à l'origine de 0,125 (IC 95% de -2,016 à 1,476) (figure 11.1.). Les intervalles de confiance de ces deux paramètres englobant respectivement 1 et 0, nous avons conclu qu'il n'y avait pas de biais proportionnel ni constant et que les deux méthodes pouvaient être qualifiées d'équivalentes. La figure 11.2. permet de visualiser la différence relative entre les résultats obtenus à l'aide des deux méthodes (LLE off-line - SPE on-line) en fonction de la concentration moyenne. On observe une légère dispersion des valeurs qui a été attribuée à l'erreur expérimentale sur chaque méthode.

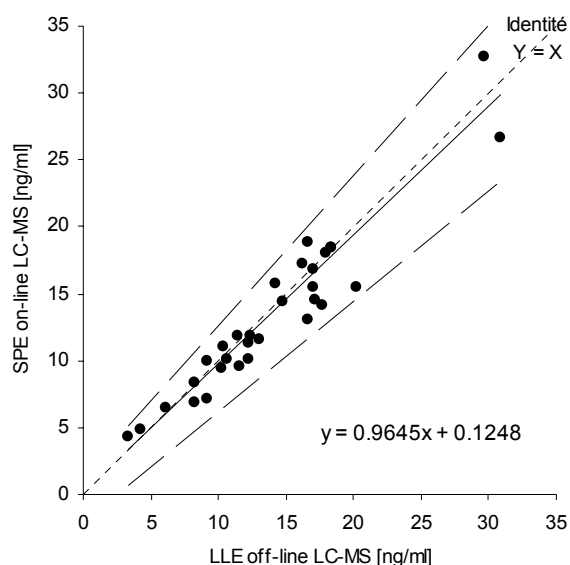


Figure 11.1. Comparaison des méthodes du sirolimus: analyse Passing et Bablok

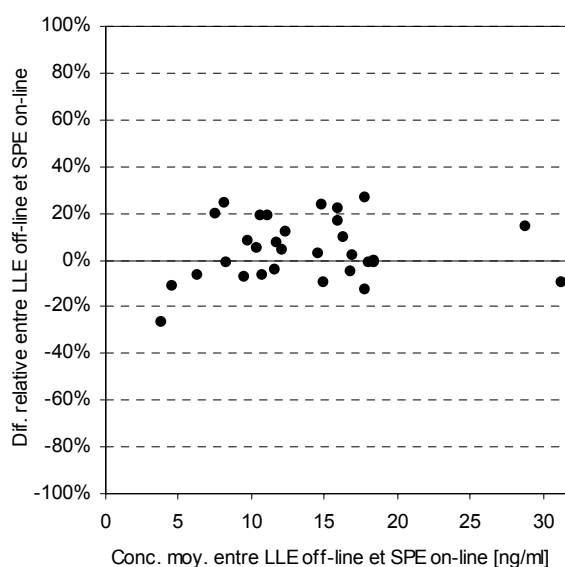


Figure 11.2. Comparaison des méthodes du sirolimus: différence relative en fonction de la concentration

11.3.2. Tacrolimus

L'analyse de Passing et Bablok a permis de déterminer que la relation existant entre les deux méthodes était linéaire (cusum test, $p < 0,1$), avec une droite de pente de 0,729 (IC 95% de 0,660 à 0,826) et d'ordonnée à l'origine de -0,010 (IC 95% de -0,554 à 0,529) (figure 11.3.). L'intervalle de confiance de la pente n'englobant pas 1, nous avons conclu que nous étions en présence d'un biais proportionnel. Les deux méthodes ont été jugées comme non équivalentes avec des valeurs plus élevées pour la technique EMIT. La figure 11.4. permet de visualiser la différence relative entre les résultats recueillis à l'aide des deux méthodes (EMIT - LC-MS) en fonction de la concentration moyenne. On constate que les valeurs obtenues avec la méthode immunologique sont en moyenne de 30% plus élevées qu'avec la LC-MS, avec une forte variabilité inter-individuelle (de -3% à 73%). Des comparaisons similaires entre la technique EMIT et la LC-MS n'ont à notre connaissance pas été publiées. Plusieurs auteurs ont comparés d'autres techniques immunologiques (ELISA, MEIA II) à la LC-MS, avec pour résultat des surestimations des taux par les immunoessais du même ordre de grandeur que nos observations (Staatz 2002). Ces déviations peuvent être expliquées par la plus grande spécificité de la LC-MS qui permet d'éviter les réactions croisées avec certains métabolites.

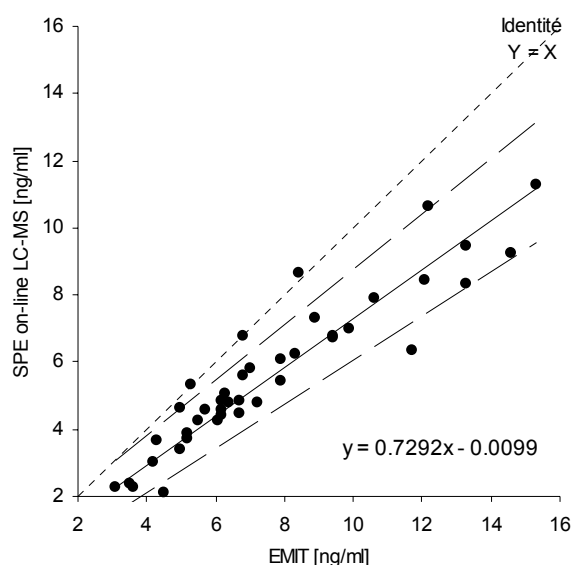


Figure 11.3. Comparaison des méthodes du tacrolimus: analyse Passing et Bablok

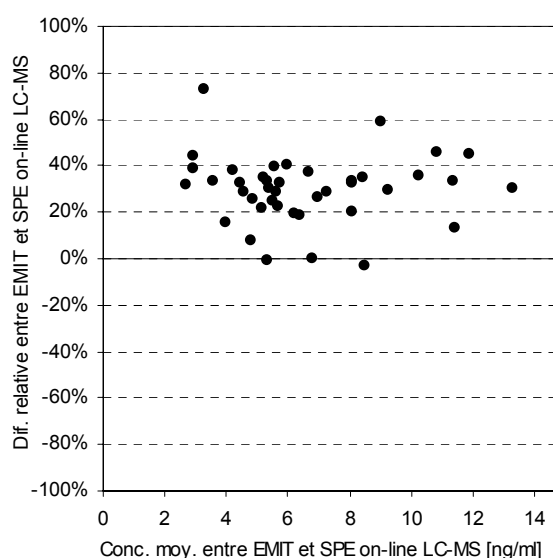


Figure 11.4. Comparaison des méthodes du tacrolimus: différence relative en fonction de la concentration

11.3.3. Ciclosporine A

L'analyse de Passing et Bablok a permis de déterminer que la relation existant entre les deux méthodes était linéaire (cusum test, $p < 0,1$), avec une droite de pente de 0,881 (IC 95% de 0,838 à 0,920) et d'ordonnée à l'origine de -12,71 (IC 95% de -22,18 à -3,84) (figure 11.5.). L'intervalle de confiance de la pente n'englobant pas 1, nous avons conclu que nous étions en présence d'un biais proportionnel. Les deux méthodes ont été jugées comme non équivalentes avec des valeurs plus élevées pour la technique par EMIT. La figure 11.6. permet de visualiser la différence relative entre les résultats recueillis à l'aide des deux méthodes (EMIT - LC-MS) en fonction de la concentration moyenne. On constate que les valeurs obtenues avec la méthode immunologique sont en moyenne de 23% plus élevées qu'avec la LC-MS, avec une forte variabilité inter-individuelle (de 6% à 46%). Ces résultats vont dans le même sens que ceux publiés par d'autres auteurs (Oellerich 1995, Schütz 1998, Steimer 1999, Hamwi 1999) qui ont observé une surestimation de la technique EMIT allant en moyenne de 8-30%. Cette déviation peut être expliquée, de façon similaire au tacrolimus, par la plus grande spécificité de la LC-MS qui permet d'éviter les réactions croisées avec certains métabolites.

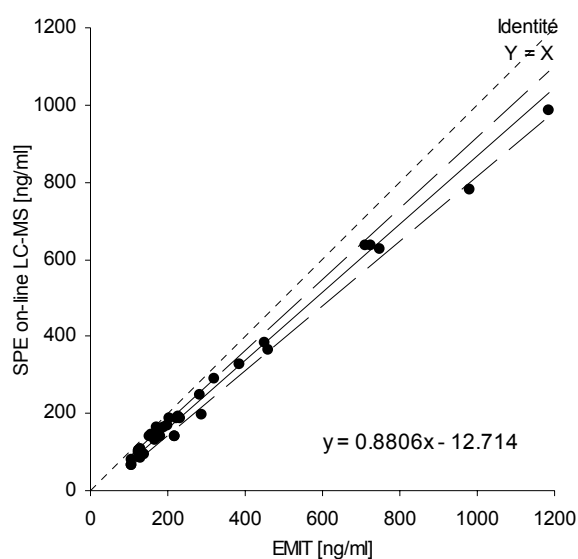


Figure 11.5. Comparaison des méthodes de la ciclosporine A: analyse Passing et Bablok

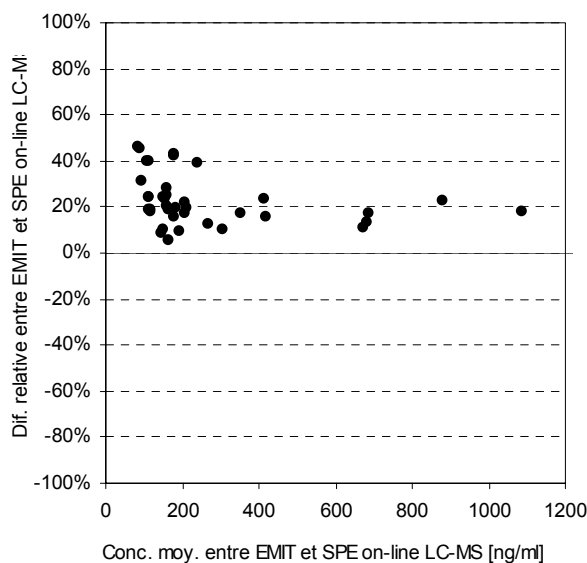


Figure 11.6. Comparaison des méthodes de la ciclosporine A: différence relative en fonction de la concentration

Il ressort toutefois de cette analyse un léger biais par le fait que les résultats obtenus à l'aide de la méthode développée ne pouvaient pas être reliés à la validation en raison de conditions opératoires légèrement différentes. Les calibrateurs utilisés provenaient du commerce et se présentaient sous forme d'échantillons congelés, le domaine de calibration était plus restreint (50 à 500 ng/ml) et il n'a pas été nécessaire de pondérer la droite de régression. Les échantillons à une concentration supérieure à 500 ng/ml ont été dilués ce qui pouvait engendrer une certaine imprécision. A noter que cette pratique est habituellement utilisée en routine pour le dosage de cette molécule.

11.4. Conclusion

Les résultats obtenus avec les échantillons de patients ont montré que la méthode développée était équivalente à celle utilisée en routine pour le dosage du sirolimus. La méthode par extraction liquide-liquide off-line a pu être remplacée avec satisfaction par la technique par extraction on-line en phase solide, avec pour bénéfice un gain important au niveau du temps de travail (4 heures de préparation d'échantillons par semaine avec l'ancienne méthode versus 1 heure avec la nouvelle). Les observations effectuées avec le tacrolimus et la ciclosporine ont montré des différences entre les méthodes immunologiques et par LC-MS, avec des valeurs plus faibles pour cette dernière en raison d'une plus grande spécificité.

12. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le monitoring thérapeutique des immunosuppresseurs est un outil essentiel dans la prise en charge des patients après transplantation d'organes. Différents types méthodes (immunologiques, chromatographiques), dont la spécificité, la facilité d'emploi et les coûts sont très variables, sont utilisées pour le dosage sanguin de ces médicaments.

Au cours de ce travail, nous avons développé et validé une méthode par LC-MS pour le dosage sanguin simultané de la ciclosporine, du tacrolimus, du sirolimus et de l'everolimus. Cette méthode présente l'avantage par rapport aux immunoessais d'être spécifique pour les molécules mères et d'être moins coûteuse en terme de réactifs. Le système de préparation de l'échantillon développé, à savoir une extraction on-line en phase solide avec un système de commutation de colonnes, permet une analyse rapide et automatisée convenant à une utilisation en routine.

Des échantillons sanguins provenant de patients transplantés ont été analysés avec la méthode développée. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus à partir de la technique EMIT utilisée en routine aux HUG pour le dosage de la ciclosporine et du tacrolimus, a montré que l'immunoessai donnait des résultats significativement plus élevés que la LC-MS, en raison d'une réactivité croisée de la technique immunologique avec certains métabolites. Ces écarts, qui peuvent être particulièrement élevés chez certains patients, confirment les observations effectuées par d'autres auteurs et illustrent la nécessité de doser ces médicaments à l'aide d'une méthode spécifique.

La méthode développée a permis de remplacer une méthode par extraction liquide-liquide utilisée pour le dosage du sirolimus en routine, avec un gain de temps important au niveau de la préparation de l'échantillon. Il est également prévu de transférer les dosages de la ciclosporine et du tacrolimus, de l'immunoessai sur la nouvelle méthode par LC-MS, après réglage de certaines considérations organisationnelles, notamment en ce qui concerne le délai plus long pour le rendu des résultats, et également après évaluation clinique de l'impact sur l'interprétation des taux, avec notamment une adaptation des marges thérapeutiques. La méthode développée devrait également servir au dosage de l'everolimus dès son utilisation en clinique.

Par ailleurs, il pourrait être utile d'adapter la méthode de dosage développée afin de permettre une quantification des métabolites principaux de ces médicaments, pouvant se justifier dans certaines situations cliniques.

Le développement d'une méthode par LC-MS pour le dosage de l'acide mycophénolique et de ses principaux métabolites, selon une technique de préparation de l'échantillon similaire à celle utilisée dans ce travail, pourrait également être envisagé, en vue de remplacer la technique EMIT actuelle particulièrement coûteuse (20 CHF de réactifs par analyse) et également afin de pouvoir quantifier séparément la molécule mère et les métabolites.

Finalement, il est souhaité de poursuivre ce travail avec une orientation plus clinique, en utilisant la méthode analytique développée comme outil pour la réalisation d'une étude dans le domaine des immunosuppresseurs (évaluation de son utilisation en clinique dans le cadre du monitoring thérapeutique, étude pharmacocinétique par exemple). Le cadre exact de cette étude reste encore à préciser, en collaboration avec les médecins transplantateurs.

13. BIBLIOGRAPHIE

- Ader JL, Rostaing L. Cyclosporine Nephrotoxicity: Pathophysiology and Comparison with FK-506. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 1998; 7(5): 539-45.
- Alak AM et al. An HPLC/MS/MS assay for tacrolimus in patient blood samples. Correlation with results of an ELISA assay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997a; 16: 7-13.
- Alak AM. Measurement of Tacrolimus (FK506) and Its Metabolites: A Review of Assay Development and Application in Therapeutic Drug Monitoring and Pharmacokinetics Studies. *Ther Drug Monit* 1997b; 19: 338-51.
- Amini H, Ahmadiani A. Simple determination of cyclosporine in human whole blood by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 795(2): 209-14.
- Annesley T, Matz K, Balogh L, Clayton L, Giacherio D. Liquid-chromatographic analysis for cyclosporine with use of a microbore column and small sample volume. *Clin Chem* 1986; 32(7): 1407-9.
- Armstrong VW, Oellerich M. New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus, and azathioprine. *Clin Biochem* 2001; 34: 9-16.
- Aspeslet LJ, Yatscoff RW. Requirements for Therapeutic Drug Monitoring of Sirolimus, an Immunosuppressive Agent Used in Renal Transplantation. *Clin Ther* 2000; 22(Suppl B): B86-B92.
- Atcheson B, Taylor PJ, Mudge DW, Johnson DW, Pillans PI, Tett SE. Quantification of Free Mycophenolic Acid and its Glucuronide Metabolite in Human Plasma by Liquid-Chromatography using Mass Spectrometric and Ultraviolet Absorbance Detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 799(1): 157-63.
- Backman L et al. FK506 trough levels in whole blood and plasma in liver transplant recipients. Correlation with clinical events and side effects. *Transplantation* 1994; 57: 519-25.
- Ballantyne CM, Podet EJ, Patsch WP, Harati Y, Appel V, Gotto AM Jr, Young JB. Effects of cyclosporine therapy on plasma lipoprotein levels. *JAMA* 1989; 262(1): 53-6.
- Barama A, Perner F, Beauregard-Zollinger L, et al. Absorption profiling of cyclosporine therapy for de novo kidney transplantation: A prospective, randomized study comparing sparse sampling to trough monitoring. *Transplantation* 2000; 69: S162.
- Baran DA et al. Current practices: immunosuppression induction, maintenance, and rejection regimens in contemporary post-heart transplant patient treatment. *Current Opinion in Cardiology* 2002; 17: 165-70.
- Barbier Y. Les immunodosages, de la théorie à la pratique. Editions de l'Acomen, Lyon, 1989.
- Beal JL, Jones CE, Taylor PJ, Tett SE. Evaluation of an immunoassay (EMIT) for mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatography assay. *Ther Drug Monit* 1998; 20(6): 685-90.
- Bechstein WO. Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transplant Int* 2000; 13: 313-26.
- Beysens AJ et al. Determination of tacrolimus (FK 506) in whole blood using liquid chromatography and fluorescence detection. *Chromatographia* 1994; 39: 490-6.

- Billaud EM. Clinical pharmacology of immunosuppressive drugs: Year 2000 - time for alternatives. *Thérapie* 2000; 55: 177-183.
- Bleck JS et al. Cyclosporin metabolite pattern in blood and urine of kidney patients in relation to liver function. *J Eur Clin Pharmacol* 1991; 40(60): 565-9.
- Bowers LD. Cyclosporine Analysis by High-Performance Liquid Chromatography: Precision, Accuracy, and Minimum Detectable Quantity. *Transplant Proc* 1990; 22(3): 1150-4.
- Breidenbach T, Hoffmann MW, Becker T, Schlitt H, Klempnauer J. Drug Interaction of St John's Wort with Cyclosporin. *The Lancet* 2000; 355: 1912.
- Brignol N, MacMahon LM, Luo S, Tse FL. High-throughput semi-automated 96-well liquid/liquid extraction and liquid chromatography/mass spectrometric analysis of everolimus (RAD 001) and cyclosporin a (CsA) in whole blood. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; 15: 898-907.
- Brinkman K, Huysmans F, Burger DM. Pharmacokinetic Interaction between Saquinavir and Cyclosporine. *Annals of Internal Medicine* 1998; 129(11): 914-5.
- Brockmoller J, Neumayer HH, Wagner K, Weber W, Heinemeyer G, Kewitz H, Roots I. Pharmacokinetics Interactions between Cyclosporin and Diltiazem. *Eur j Clin Pharmacol* 1990; 38(3): 237-42.
- Brozmanova H, Grundmann M, Safarcik K, Jegorov A. High-performance liquid chromatographic method for therapeutic drug monitoring of cyclosporine A and its two metabolites in renal transplant patients. *Journal of Chromatography B* 2000; 749: 93-100.
- Brunet L, Miranda J, Farre M, Berini L, Mendieta C. Gingival enlargement induced by drugs. *Drug Safety* 1996; 15(3): 219-31.
- Bullingham RES, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical Pharmacokinetics of Mycophenolate Mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34(6): 429-55.
- Buysmann S et al. Administration of OKT3 as Two-Hour Infusion Attenuates First-Dose Side effects. *Transplantation* 1997; 64(11): 1620-3.
- Campana C, Regazzi MB, Buggia I, Molinaro M. Clinical Significant Drug Interactions with Cyclosporin. *Clin Pharmacokinet* 1996; 30(2): 141-79.
- Cattaneo D, Perico N, Gaspari F. Assesment of sirolimus concentrations in whole blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chrom B* 2002; 774: 187-94.
- Chapuzet E, Mercier N, Bervoas-Martin S, et al. Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques: stratégie de validation. Rapport d'une commission SFSTP. *STP Pharma Pratiques* 1997; 7(3): 169-94.
- Charles BG, Norris RLG, Ravenscroft PJ. A modified Assay for Cyclosporine in Blood Using Solid-Phase Extraction with High-Performance Liquid Chromatography. *Ther Drug Monit* 1988; 10: 97-100.
- Christians U et al. Liquid-Chromatography Measurement of Cyclosporin A and Its Metabolites in Blood, Bile, and Urine. *Clin Chem* 1988a; 34(1): 34-9.
- Christians U et al. Measurement of Cyclosporine and 18 Metabolites in Blood, Bile, and Urine by High-Performance Liquid Chromatography. *Transplant Proc* 1988b; 20 (2 Suppl 2): 609-13.
- Christians U et al. Investigations on the metabolic pathways of cyclosporine : I. Excretion of cyclosporine and its metabolites in human bile - isolation of 12 new cyclosporine metabolites. *Xenobiotica* 1991a; 21(9): 1185-98.

- Christians U et al. Investigations on the metabolic pathways of cyclosporine: II. Elucidation of the metabolic pathways *in vitro* by human liver microsomes. *Xenobiotica* 1991b; 21(9): 1199-210.
- Christians U et al. Measurement of FK 506 by HPLC and Isolation and Characterization of Its Metabolites. *Transplantation Proceedings* 1991c; 23(1): 940-1.
- Christians U et al. High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of FK 506 and Its Metabolites in Blood, Bile, and Urine of Liver Grafted Patients. *Transplantation Proceedings* 1991d; 23(6): 2741-4.
- Christians U et al. Isolation of two Immunosuppressives Metabolites after *in vitro* Metabolism of Rapamycin. *Drug Metab Dispos* 1992a; 20(2): 186-91.
- Christians U et al. Specific and Sensitive Measurement of FK506 and Its Metabolites in Blood and Urine of Liver-Graft Recipients. *Clin Chem* 1992b; 38(10): 2025-32.
- Christians U et al. Parallel blood concentrations of second-generation cyclosporine metabolites and bilirubin in liver graft recipients. *Ther Drug Monit* 1995; 17(5): 487-98.
- Christians U et al. Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *J. Chromatogr. B* 2000; 748: 41-53.
- Connor E et al. Measurement of Whole Blood Sirolimus by an HPLC Assay Using Solid-Phase Extraction and UV Detection. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 751-6.
- Copeland KR, Thliveris JA, Yatscoff RW. Toxicity of Cyclosporine Metabolites. *Ther Drug Monit* 1990a; 12: 525-32.
- Copeland KR, Yatscoff RW. Immunosuppressive Activity and Toxicity of Cyclosporine Metabolites Characterized by Mass Spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance. *Transplantation Proceedings* 1990b; 22(3): 1146-9.
- Copeland KR, Yatscoff RW, McKenna RM. Immunosuppressive Activity of Cyclosporine Metabolites Compared and Characterized by Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance. *Clin Chem* 1990c; 36(2): 225-9.
- Dade Behring Syva®. Prospectus Emit® 2000 Tacrolimus Specific Assay, 2003.
- David OJ, Johnston A. Limited Sampling Strategies for Estimating Cyclosporin Area Under the Concentration-Time Curve : Review of Current Algorithms. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 100-14.
- De Bonis M, Reynolds L, Barros J, Madden BP. Tacrolimus as a rescue immunosuppressant after heart transplantation. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 2001; 19: 690-5.
- DeNofrio D, Loh E, Kao A, et al. Mycophenolic acid concentrations are associated with cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 1071-6.
- Denton MD, Magee CC, Sayegh MH. Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 1999; 353: 1083-91.
- Deters M, Kirchner G, Resch K, Kaefer V. Simultaneous Quantification of Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus and Cyclosporine by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(3): 285-92.
- Deters M, Kaefer V, Kirchner GI. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry For Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressants. *Analytica Chimica Acta* 2003; 492: 133-45.

- Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. Cyclosporin: An Updated Review of the Pharmacokinetic Properties, Clinical Efficacy and Tolerability of a Microemulsion-Based Formulation (Neoral®) in Organ Transplantation. *Drugs* 2001; 61: 1957-2016.
- French DC, Saltzgueber M, Hicks DR, Cowper AL, Holt DW. HPLC Assay with Ultraviolet Detection for Therapeutic Drug Monitoring of Sirolimus. *Clin Chem* 2001; 47: 1316-9.
- Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd. Analytical Research Laboratories. Certificat d'analyse du tacrolimus, 2002.
- Gaston RS. Maintenance Immunosuppression in the Renal Transplant Recipient: An Overview. *American Journal of Kidney Diseases* 2001; 38 (Suppl 6): S25-S35.
- Gimenez F, Brazier M, Calop J, Dine T, Tchiakpé L. Pharmacie clinique et thérapeutique. Masson, Paris, 2000.
- Gonschior AK, Christians U, Winkler M, Schiebel HM, Linck A, Sewing KF. Simplified High-Performance Liquid Chromatography-mass Spectrometry Assay for Measurement of Tacrolimus and its Metabolites and Cross-Validation with Microparticle Enzyme Immunoassay. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 504-10.
- Gonschior AK et al. Tacrolimus (FK506) metabolite patterns in blood from liver and kidney transplant patients. *Clin Chem* 1996; 42 (9): 1426-32.
- Goodyear N et al. Comparison of Binding Characteristics of Four Rapamycin Metabolites to the 14 and 52 kDa Immunophilins With Their Pharmacologic Activity Measured by the Mixed-lymphocyte Culture Assay. *Clin Biochem* 1996; 29(4): 309-13.
- Grevel J, Kahan BD. Area under the curve monitoring of cyclosporine therapy: The early posttransplant period. *Ther Drug Monit* 1991; 13: 89-95.
- Gummert JF, Ikonen T, Morris RE. Newer Immunosuppressive Drugs: A Review. *J Am Soc Nephrol* 1999a; 10: 1366-80.
- Gummert JF, Christians U, Barten M, Silva H, Morris RE. High-performance liquid chromatographic assay with a simple extraction procedure for sensitive quantification of mycophenolic acid in rat and human plasma. *J. Chromatogr. B* 1999b; 721: 321-6.
- Halloran PF, Helms LM, Kung L, Noujaim J. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation* 1999; 68: 1356-61.
- Hamwi A et al. Evaluation of Four Automated Methods for Determination of Whole Blood Cyclosporine Concentrations. *Am J Clin Phatol* 1999; 112: 358-65.
- Hardman JG, Limbird LE. Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics. Tenth Edition, McGraw-Hill, New York, 2001.
- Hariharan S et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *The New England Journal of Medicine* 2000; 342: 605-12.
- Holman JW, Felder RA. Robotic automation of cyclosporine analysis in whole blood. *Clin Chem* 1992; 38: 1440-3.
- Holt DW, Lee T, Johnston A. Measurement of Sirolimus in Whole Blood Using High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Clin Ther* 2000a; 22(Suppl. B): B38-B48.
- Holt DW, Lee T, Jones K, Johnston A. Validation of an Assay for Routine Monitoring of Sirolimus Using HPLC with Mass Spectrometric Detection. *Clin Chem* 2000b; 46: 1179-83.

- Holt DW et al. International Federation of Clinical Chemistry/International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Working Group on Immunosuppressive Drug Monitoring. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 59-67.
- Holt DW, Denny K, Lee TD, Johnston A. Therapeutic Monitoring of Sirolimus: Its Contribution to Optimal Prescription. *Transplantation Proceedings* 2003; 35(Suppl 3A): 157S-161S.
- Hong JC, Kahan BD. Immunosuppressive Agents in Organ Transplantation : Past, Present, and Future. *Seminars in Nephrology* 2000; 20 (2): 108-25.
- Hosotsubo H et al. Rapid and simultaneous determination of mycophenolic acid and its glucuronide conjugate in human plasma by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography using isocratic elution. *J. Chromatogr. B* 2001a; 753: 315-20.
- Hosotsubo H et al. Rapid and simple determination of mycophenolic acid in human plasma by ion-pair RP-LC with fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001b; 24: 555-60.
- Huang JJ, Kiang H, Tarnowski TL. Simultaneous Determination of Mycophenolic Acid and Its Glucuronide Conjugate in Human Plasma by a Single-Run-Ion-Paring Method. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997; 698(1-2): 293-300.
- Hubert Ph, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, et al. Validation des procédures analytiques quantitatives. Harmonisation des démarches. *STP Pharma Pratiques* 2003; 13(3): 101-38.
- Iwasaki K et al. Isolation, Identification, and Biological Activities of Oxidative Metabolites of FK506, a Potent Immunosuppressive Macrolide Lactone. *Drug Metab Dispos* 1993; 21(6): 971-7.
- Iwasaki K et al. Further Metabolism of FK506 (Tacrolimus). Identification and Biological Activities of the Metabolites Oxidized at Multiple Sites of FK506. *Drug Metab Dispos* 1995; 23(1): 28-34.
- Jacobsen W et al. Comparison of the In Vitro Metabolism of the Macrolide Immunosuppressants Sirolimus and RAD. *Transplantation Proceedings* 2001; 33: 514-5.
- Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Novel Pharmacotherapeutic Approaches to Prevention and Treatment of GVHD. *Drugs* 2002; 62(6): 879-89.
- Johnston A, Holt DW. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 47: 339-50.
- Johnston A, David OJ, Cooney GE Pharmacokinetic validation of Neoral absorption profiling. *Transplant Pmt* 2000; 32 (Suppl 3A): 53S-56s.
- Jones CE, Taylor Pj, Johnson AG. High-performance liquid chromatography determination of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human plasma. *J. Chromatogr. B* 1998; 708: 229-34.
- Jones TE. The use of other drug to allow a lower dosage of cyclosporin to be used. Therapeutic and pharmacoeconomic considerations. *Clin Pharmacokinetics* 1997; 32(5): 357-67.
- Jusko WJ. Analysis of tacrolimus (FK 506) in relation to therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 1995a; 17: 596-601.
- Jusko WJ et al. Consensus Document :Therapeutic Monitoring of Tacrolimus (FK-506). *Ther Drug Monit* 1995b; 17: 606-14.
- Kabra PM, Wall JH, Dimson P. Automated Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography for Assay of Cyclosporine in Whole Blood. *Clin Chem* 1987a; 33/12: 2272-4.

- Kabra PM, Wall JH. Liquid Chromatographic determination of cyclosporine in whole blood with the advanced automated sample processing unit. *Journal of Chromatography* 1987b; 385: 305-10.
- Kahan BD et al. A phase I study of a 4-week course of SDZ-RAD (RAD) quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68(9):1100-6.
- Kahan BD et al. Therapeutic drug monitoring of sirolimus :correlations with efficacy and toxicity. *Clin Transplantation* 2000; 14: 97-109.
- Kahan BD. The Evolution of Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine. *Transplantation Proceedings* 2001a; 33: 3086-8.
- Kahan BD, Camardo JS. Rapamycin: Clinical Results and Future Opportunities. *Transplantation* 2001b; 72(7): 1181-93.
- Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic Drug Monitoring of Immunosuppressant Drugs in Clinical Practice. *Clinical Therapeutics* 2002; 24(3): 330-50.
- Kaplan B et al. The effects of relative timing of sirolimus and cyclosporine microemulsion formulation coadministration on the pharmacokinetics of each agent. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 63: 48-53.
- Keevil BG, Tierney DP, Cooper DP, Morris MR. Rapid Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Routine Analysis of Cyclosporin A Over an Extended Concentration Range. *Clin Chem* 2002a; 48(1): 69-76.
- Keevil BG, McCann SJ, Cooper DP, Morris MR. Evaluation of a rapid micro-scale assay for tacrolimus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem.* 2002b; 39(5): 487-92.
- Kelly P, Kahan BD. Review: Metabolism of Immunosuppressant Drugs. *Current Drug Metabolism* 2002; 3: 275-87.
- Kennedy MS et al. Acute renal toxicity with combined use of amphotericin B and cyclosporine after marrow transplantation. *Transplantation* 1983; 35(3): 211-5.
- Keogh A et al. Ketoconazole to reduce the need for cyclosporine after cardiac transplantation. *NEJM* 1995; 333(10): 628-33.
- Keown P, Landsberg D, Halloran P, et al. A randomized, prospective multicenter pharmacoepidemiologic study of cyclosporine microemulsion in stable renal graft recipients. Report of the Canadian Neoral Renal Transplantation Study Group. *Transplantation* 1996; 62: 1744-52.
- Kirchner GI et al. Simultaneous on-line extraction and analysis of sirolimus (rapamycin) and cyclosporin in blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1999a; 721: 285-94.
- Kirchner GI et al. LC/ESI-MS Allows Simultaneous and Specific Quantification of SDZ RAD and Cyclosporine, Including Groups of Their Metabolites in Human Blood. *Ther Drug Monit* 1999b; 21: 116-22.
- Kirchner GI et al. Pharmacokinetics of SDZ RAD and cyclosporin including their metabolites in seven kidney graft patients after the first dose of SDZ RAD. *Br J Clin Pharmacol* 2000; 50: 449-54.
- Kirchner GI et al. Fast Quantification Method for Sirolimus and its Major Metabolites. *Transplantation Proceedings* 2001; 33: 1091-2.
- Kovarik JM, Hsu CH, McMahon L, Berthier S, Rordorf C. Population pharmacokinetics of everolimus in de novo renal transplant patients: impact of ethnicity and comedications. *Clin Pharmacol Ther* 2001a; 70(3): 247-54.

- Kovarik et al. Longitudinal assessment of everolimus in de novo renal transplant recipients over the first post-transplant year: Pharmacokinetics, exposure-response relationships, and influence on cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 2001b; 69(1): 48-56.
- Kovarik JM et al. Exposure-response relationships for everolimus in de novo kidney transplantation :defining a therapeutic range. *Transplantation* 2002; 73(6): 920-5.
- Kovarik JM et al. Everolimus in de novo cardiac transplantation: pharmacokinetics, therapeutic range, and influence on cyclosporine exposure. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22(10): 1117-25.
- Leaker B, Cairns HS. Clinical Aspects of Cyclosporin Nephrotoxicity. *British Journal of Hospital Medicine* 1994; 52(10): 529-34.
- Lensmeyer GL, Fields BL. Improved liquid-chromatographic determination of cyclosporine, with concomitant detection of a cell-bound metabolite. *Clin Chem* 1985; 31(2): 196-201.
- Lensmeyer GL, Poquette MA. Therapeutic Monitoring of Tacrolimus Concentrations in Blood :Semi-Automated Extraction and Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 239-49.
- Levy GA, Lake JR, Beauregard-Zollinger L, et al. Improved clinical outcomes for liver transplant recipients using cyclosporine blood level monitoring based on two-hour post-dose levels. *Transplantation* 2000; 69: S387.
- Li S, Yatscoff RW. Improved High-Performance Liquid Chromatographic Assay for the Measurement of Mycophenolic Acid in Human Plasma. *Transplant Proc* 1996; 28(2): 938-40.
- Lier F, Piguet V, Stoller R, Desmeules J, Dayer P. Neurotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine et analogues. *Med Hyg* 2002; 60: 744-8.
- Liu WT, Ren Y, Wang J, Eng RT, Wong PY. The Detection of Tacrolimus and Its Metabolites in Whole Blood of Transplant Patients by an Improved HPLC-Abbott Tacrolimus II Immunoassay. *Journal of Clinical Ligand Assay* 1998; 21: 68-75.
- MacDonald A, Scarola J, Burke JT, Zimmerman JJ. Clinical Pharmacokinetics and Therapeutic Drug Monitoring of Sirolimus. *Clin Ther* 2000; 22(Suppl B): B101-B121.
- MacFarlane GD et al. Analysis of Whole Blood Tacrolimus Concentrations in Liver Transplant Patients Exhibiting Impaired Liver Function. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 585-92.
- Mahalati K, Belitsky P, Sketris I, et al. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: Its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation* 1999; 68: 55-62.
- Mahalati K, Kahan BD. Clinical Pharmacokinetics of Sirolimus. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40(8): 573-85.
- Maleki S et al. Therapeutic Monitoring of Sirolimus in Human Whole-Blood by High-Performance Liquid Chromatography. *Clin Ther* 2000; 22 (Suppl. B): B25-B37.
- Maurer G , Loosli HR, Schreier E, Keller B. Disposition of Cyclosporine in Several Animal Species and Man, I. Structural Elucidation of Its Metabolites. *Drug Metab Dispos* 1984; 12(1): 120-6.
- McEvoy GK. AHFS Drug Information 2003, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, Etats-Unis, 2003.
- McLeod HL, Lin JS, Scott EP, Pui CH, Evans WE. Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 55(1): 15-20.

- McMahon LM, Luo S, Hayes M, Tse FLS. High-throughput analysis of everolimus (RAD001) and cyclosporin A (CsA) in whole blood by liquid chromatography/mass spectrometry using a semi-automated 96-well solid-phase extraction system. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000; 14: 1965-71.
- Meiser BM, Pfeiffer M, Schmidt D, et al. Combination therapy with tacrolimus and mycophenolate mofetil following cardiac transplantation: Importance of mycophenolic acid therapeutic drug monitoring. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18: 143-9.
- Mekki Q, Lee C, Carrier S, et al. The effect of food on oral bioavailability of tacrolimus (FK506) in liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 1993; 53: 229.
- Morris RG, Tett SE, Ray JE. Cyclosporin A Monitoring in Australia : Consensus Recommendations. *Ther Drug Monit* 1994; 16: 570-6.
- Moser MAJ. Options for Induction Immunosuppression in Liver Transplant Recipients. *Drugs* 2002; 62(7): 995-1011.
- Mourad M, Malaise J, Chaib Eddour D, et al. Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in kidney transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 2001; 47: 88-94.
- Moyer TP, Johnson P, Faynor SM, Sterioff S. Cyclosporine: a review of drug monitoring problems and presentation of a simple, accurate liquid chromatographic procedure that solves these problems. *Clin Biochem* 1986a; 19(2): 83-9.
- Moyer TP, Charlson JR, Ebnet LE. Improved Chromatography of Cyclosporine. *Ther Drug Monit* 1986b; 8: 466-8.
- Murthy JN, Davis DL, Yatscoff RW, Soldin SJ. Tacrolimus Metabolite Cross-Reactivity in Different Tacrolimus Assays. *Clin Biochem* 1998; 31: 613-7.
- Na-Bangchang K, Supasynhd O, Supaporn T, Banmairuroi V, Karbwang J. Simple and Sensitive High-Performance Liquid Chromatographic. *J Chrom B Biomed Sci Appl* 2000; 738(1): 169-73.
- Napoli KL, Kahan BD. Sample clean-up and high-performance liquid chromatographic techniques for measurement of whole blood rapamycin concentrations. *J. Chromatogr. B* 1994; 654: 111-120.
- Napoli KL, Kahan BD. Routine clinical monitoring of sirolimus (rapamycin) whole-blood concentrations by HPLC with ultraviolet detection. *Clin Chem* 1996; 42(12): 1943-8.
- Napoli KL. A Practical Guide to the Analysis of Sirolimus Using High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Clin Ther* 2000; 22 (Suppl. B): B14-B24.
- Napoli KL, Taylor PJ. From Beach to Bedside :History of the Development of Sirolimus. *Ther Drug Monit* 2001; 23: 559-86.
- Neuhaus P, Klupp J, Langrehr JM. mTOR Inhibitors: An Overview. *Liver Transplantation* 2001; 7(6): 473-84.
- Neumayer HH et al. Entry-into-human study with the novel immunosuppressant SDZ RAD in stable renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48(5): 694-703.
- Nickmilder MJM et al. Isolation and identification of a C39 demethylated metabolite of rapamycin from pig liver microsomes and evaluation of its immunosuppressive activity. *Clin Chem* 1998; 44(3): 532-8.

- Oaks TE et al. Steroid-Free Maintenance Immunosuppression After Heart Transplantation. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 102-6.
- Oellerich M et al. Lake Louise Consensus Conference on Cyclosporin Monitoring in Organ Transplantation :Report of the Consensus Panel. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 642-54.
- Oellerich M, Armstrong VW, Schütz E, Shaw LM. Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine and Tacrolimus. *Clin Biochem* 1998; 31: 309-16.
- Ortelli D, Rudaz S, Cognard E, Veuthey J.-L. Analysis of Dihydroartemisinin in Plasma by Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. *Chromatographia* 2000; 52(7/8): 445-50.
- Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi B. Strategies to Improve Long-Term Outcomes after Renal Transplantation. *N Engl J Med* 2002; 336(8): 580-90.
- Penn I. Tumors after renal and cardiac transplantation. *Hematology – Oncology Clinics of North America* 1993; 7(2): 431-45.
- Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1997; 63(7): 977-83.
- Podder H et al. Pharmacokinetic Interactions Augment Toxicities of Sirolimus/Cyclosporine Combinations. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1059-71.
- Poirier JM, Lebot M, Cheymol G. Cyclosporine in Whole Blood : Drug Monitoring Difficulties and Presentation of a Reliable Normal-Phase liquid Chromatographic Assay. *Ther Drug Monit* 1994; 16: 388-394.
- Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2003; 785: 263-275.
- Ransom JT. Mechanism of Action of Mycophenolate Mofetil. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 681-4.
- Regazzi MB et al. Clinical Pharmacokinetic of Tacrolimus in Heart Transplant Recipients. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 2-7.
- Romero AJ, Le Pogamp P, Nilsson LG, Wood N. Effect of voriconazole on the pharmacokinetics of cyclosporine in renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 71(4): 226-34.
- Rouessac F. Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes. 5^{ème} édition, Dunod, Paris, 2000.
- Sadaba B et al. Concurrent Clarithromycin and Cyclosporin A Treatment. *JAC* 1998; 42: 393-5.
- Salm P, Norris RL, Taylor PJ, Davis DE, Ravenscroft PJ. A reliable high-performance liquid chromatography assay for high-throughput routine cyclosporin A monitoring in whole blood. *Ther Drug Monit* 1993; 15(1): 65-9.
- Salm P et al. High-Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry as a Reference for Analysis of Tacrolimus to Assess Two Immunoassays in Patients With Liver and Renal Transplants. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 694-700.
- Salm P, Taylor PJ, Pillans PI. Analytical Performance of Microparticle Enzyme Immunoassay and HPLC-Tandem Mass Spectrometry in the Determination of Sirolimus in Whole Blood. *Clin Chem* 1999; 45: 2278-80.

- Salm P, Rutherford DM, Taylor PJ, Black MJ, Pillans PI. Evaluation of Microparticle Enzyme Immunoassay against HPLC-Mass Spectrometry for the Determination of Whole-Blood Tacrolimus in Heart- and Lung-Transplant Recipients. *Clin Biochem* 2000a; 33: 557-62.
- Salm P, Taylor PJ, Pillans PI. The Quantification of Sirolimus by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Microparticle Enzyme Immunoassay in Renal Transplant Recipients. *Clin Ther* 2000b; 22 (Suppl. B): B71-B85.
- Salm P, Tressillian MJ, Taylor PJ, Pillans PI. Stability of Sirolimus (Rapamycin) in Whole Blood. *Ther Drug Monit* 2000c; 22: 423-26.
- Salm P et al. Quantification and stability of everolimus (SDZ RAD) in human blood by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chrom B* 2002; 772: 283-90.
- Sangalli L, Bonati M. Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography Determination of Cyclosporine in Human Blood. *Ther Drug Monit* 1987; 9(3): 353-7.
- Sattler M et al. Cytochrome P-450 3A Enzymes are Responsible for Biotransformation of FK506 and Rapamycin in Man and Rat. *Drug Metab Dispos* 1992; 20(5): 753-61.
- Saway PA, Heck LE, Bonner JR, Kirklin JK. Azathioprine Hypersensitivity. Case Report and Review of the Literature. *American Journal of Medicine* 1988; 84(5): 960-4.
- Sawchuk RJ, Cartier LL. Liquid-Chromatographic Determination of Cyclosporine A in Blood and Plasma. *Clin Chem* 1981; 27(8): 1368-71.
- Schütz E et al. Cyclosporin whole blood immunoassays (AxSYM, CEDIA, and Emit): a critical overview of performance characteristics and comparison with HPLC. *Clin Chem* 1998; 44(10): 2158-64.
- Schutz E, Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Oellerich M. Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 1999; 45(3): 419-22.
- Sedrani R, Cottens S, Kallen J, Schuler W. Chemical Modification of Rapamycin : The Discovery of SDZ RAD. *Transplantation Proceeding* 1998; 30: 2192-4.
- Seebacher G et al. A Simple HPLC Method for Monitoring Mycophenolic Acid and its Glucuronidated Metabolite in Transplant Recipients. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37(4): 409-15.
- Segarra I et al. Development of a high-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric assay for the specific and sensitive quantification of the novel immunosuppressive macrolide 40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin. *J. Chromatogr. B* 1998; 720: 179-87.
- Sehgal SN. Rapamune® (RAPA, rapamycine, sirolimus) :Mechanism of Action Immunosuppressive Effect Results From Blockade of Signal Transduction and Inhibition of Cell Cycle Progression. *Clin Biocheml* 1998; 31(5): 335-40.
- Shaw LM et al. Mycophenolate Mofetil :A report of the Consensus Panel. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 690-9.
- Shaw LM et al. Analysis. Pharmacokinetics and Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid. *Clin Biochem* 1998a; 31: 323-8.
- Shaw LM et al. Therapeutic Monitoring of Mycophenolic Acid A Consensus Panel report. *Clin Biochem* 1998b; 31: 317-22.

- Shaw LM, Korecka M, DeNofrio D, Brayman KL. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and outcome investigations as the basis for mycophenolic acid therapeutic drug monitoring in renal and heart transplant patients. *Clin Biochem* 2001a; 34: 17-22.
- Shaw LM, Holt DW, Oellerich M, Meiser B, van Gelder T. Current Issues in Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid : Report of a Roundtable Discussion. *Ther Drug Monit* 2001b; 23: 305-15.
- Shipkova M et al. Simultaneous determination of mycophenolic acid and its glucuronide in human plasma using a simple high-performance liquid chromatography procedure. *Clin chem* 1998; 44: 1481-8.
- Shipkova M et al. Determination of the Acyl Glucuronide Metabolite of Mycophenolic Acid in Human Plasma by HPLC and Emit. *Clin Chem* 2000; 46(3): 365-72.
- Shipkova M et al. Quantification of Mycophenolic Acid in Plasma Samples Collected during and Immediately after Intravenous Administration of Mycophenolate Mofetil. *Clin Chem* 2001; 47: 1485-8.
- Simpson J, Zhang Q, Ozaeta P, Aboleneen H. A Specific Method for the Measurement of Cyclosporin A in Human Whole Blood by Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Ther Drug Monit* 1998; 20: 294-300.
- Sindhi R, LaVia MF, Paulling E, et al. Stimulated response of peripheral lymphocytes may distinguish cyclosporine effect in renal transplant recipients receiving a cyclosporine + rapamycin regimen. *Transplantation* 2000; 69: 432-6.
- Slavin J, Taylor J. Cyclosporin, nifedipine, and gingival hyperplasia. *Lancet* 1987; 2(8561): 739.
- Staatz CE, Taylor PJ, Tett SE. Comparison of an ELISA and an LC/MS/MS Method for Measuring Tacrolimus Concentrations and Making Dosage Decisions in Transplant Recipients. *Ther Drug Monit* 2002; 24: 607-15.
- Stefansson M, Sjöberg PJR, Markides KE. Regulation of Multimer Formation in Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 1996; 68: 1792-7.
- Steimer W. Performance and Specificity of Monoclonal Immunoassays for Cyclosporine Monitoring: How Specific Is Specific? *Clin Chem* 1999; 45(3): 371-81.
- Streit F et al. Sensitive and specific quantification of sirolimus (rapamycin) and its metabolites in blood of kidney graft recipients by HPLC/electrospray-mass spectrometry. *Clin Chem* 1996; 42: 1417-25.
- Streit F, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Routine Method for Simultaneous Determination of Sirolimus, Everolimus, Tacrolimus, Cyclosporine A in Whole Blood. *Clin Chem* 2002; 48(6): 955-8.
- Streit F, Shipkova M, Armstrong VW, Oellerich M. Validation of a Rapid and Sensitive Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Free and Total Mycophenolic Acid. *Clin Chem* 2003; Nov 18.
- Sugioka N et al. Determination of a New Immunosuppressant, Mycophenolate Mofetil, and its Active Metabolite, Mycophenolic Acid, in Rat and Human Body Fluids by High-Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994; 654(2): 249-56.
- Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB. Immunosuppressants : Cellular and Molecular Mechanisms of Action. *American Journal of Kidney Diseases* 1996; 28 (2): 159-72.

- Svensson JO, Brattström C, Säwe J. Determination of Rapamycin in Whole Blood by HPLC. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 112-6.
- Svensson JO, Brattström C, Säwe J. A Simple HPLC Method for Simultaneous Determination of Mycophenolic acid and Mycophenolic Acid Glucuronide in Plasma. *Ther Drug Monit* 1999; 21: 322-24.
- Taylor DO et al. A Randomized, Multicenter Comparison of Tacrolimus and Cyclosporine Immunosuppressive Regimens in Cardiac Transplantation: Decreased Hyperlipidemia and Hypertension with Tacrolimus. *Lung Transplant* 1999; 18: 336-45.
- Taylor DO. Immunosuppressive therapies after heart transplantation : best, better, and beyond. *Heart Transplantation* 2000; 15: 108-14.
- Taylor PJ, Jones A, Balderson GA, Lynch SV, Norris RLG, Pond SM. Sensitive, specific quantification analysis of tacrolimus (FK506) in blood by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1996; 42: 279-85.
- Taylor PJ, Hogan NS, Lynch SV, Johnson AG, Pond SM. Improved Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus (FK506) by Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem* 1997; 43: 2198-90.
- Taylor PJ, Johnson AG. Quantitative analysis of sirolimus (Rapamycin) in blood by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1998a; 718: 251-7.
- Taylor PJ et al. Microscale high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for cyclosporin A in blood. *J. Chromatogr. B* 1998b; 705: 289-94.
- Taylor PJ, Lynch SV, Balderson GA, Johnson AG. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus (FK506) Using Tandem Mass Spectrometry. *Ther Drug Monit* 1998c; 20: 240-1.
- Taylor PJ, Salm P, Lynch SV, Pillans PI. Simultaneous Quantification of Tacrolimus and Sirolimus, in Human Blood, by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 608-12.
- Termeer A, Hoistma AJ, Koene RA. Severe nephrotoxicity cause by the combined use of gentamicin and cyclosporine in renal allograft recipients. *Transplantation* 1986; 42(2): 220-1.
- Textor et al. Cyclosporine-induced hypertension after transplantation. *Mayo Clinic Proceedings* 1994; 69(12): 1182-93.
- Tredger JM et al. Comparison of Five Cyclosporin Immunoassays with HPLC. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38 (11): 1205-7.
- Trepanier DJ, Gallant H, Legatt DF, Yatscoff RW. Rapamycin : Distribution, Pharmacokinetics and Therapeutic Range Investigations: An Update. *Clin Biochem* 1998; 31: 345-51.
- Trull AK. Therapeutic monitoring of tacrolimus. *Ann Clin Biochem* 1998; 35: 167-180.
- Tsina I, Kaloostian M, Lee R, Tarnowski T, Wong B. High-performance liquid chromatographic method for the determination of mycophenolate mofetil in human plasma. *J. Chromatogr. B* 1996a; 681: 347-53.
- Tsina I et al. Manual and automated (robotic) high-performance liquid chromatography methods for the determination of mycophenolic acid and its glucuronide conjugate in human plasma. *J. Chromatogr. B* 1996b; 675: 119-29.
- Tsunoda SM, Aweeka FT. The Use of Therapeutic Drug Monitoring to Optimise Immunosuppressive Therapy. *Clin Pharmacokinet* 1996; 30(2): 107-40.

- Undre NA, Stevenson P, Schäfer A. Pharmacokinetics of Tacrolimus :Clinical Relevant Aspects. *Transplantation Proceeding* 1999; 31 (Suppl 7A): 21S-24S.
- van Gelder T. Drug Interactions with Tacrolimus. *Drug Safety* 2002; 25: 707-12.
- Venkataramanan R et al. Clinical Pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29(6): 404-30.
- Vidal C, Kirchner GI, Wünsch G, Sewing KF. Automated simultaneous quantification of the immunosuppressants 40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin and cyclosporine in blood with electrospray-mass spectrometric detection. *Clin Chem* 1998; 44: 1275-82.
- Vogeser M, Fleischer C, Meiser B, Groetzner J, Spöhrer U, Seidel D. Quantification of Sirolimus by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using On-Line Solid-Phase Extraction. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 40-45.
- Volosov A, Napoli KL, Soldin SJ. Simultaneous simple and fast quantification of three major immunosuppressants by liquid chromatography-tandem mass-spectrometry. *Clin Biochem* 2001; 34: 285-290.
- Wallemacq PE, Vanbinst R, Asta S, Cooper DP. High-Throughput Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Sirolimus in Whole Blood. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(7): 921-5.
- Willis C, Taylor PJ, Salm P, Tett SE, Pillans PI. Quantification of free mycophenolic acid by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2000; 748: 151-6.
- Wiwattanawongsa K, Heizen EL, Kemp DC, Dupuis RE, Smith PC. Determination of mycophenolic acid and its phenol glucuronide metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 2001; 763: 35-45.
- Wong KM, Shek CC, Chau KF, Li CS. Abbreviated tacrolimus area-under-the-curve monitoring for renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 660-6.
- Wong SHY. Therapeutic drug monitoring for immunosuppressants. *Clinica Chimica Acta* 2001; 313: 241-53.
- Wyeth-Ayerst Research. Certificat d'analyse du sirolimus et du demethoxy-sirolimus, 2001.
- Yatscoff RW, Rosano TG, Bowers LD. The Clinical Significance of Cyclosporine Metabolites. *Clin Biochem* 1991; 24: 23-35.
- Yatscoff RW, Faraci C, Bolingbroke P. Measurement of rapamycin in whole blood using reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 1992; 14(2): 138-41.
- Yatscoff RW et al. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring of Rapamycin : Report of the Consensus Panel. *Ther Drug Monit* 1995; 17: 676-80.
- Yildiz A et al. Interaction between Cyclosporin A and Verapamil, Felodipine, and Isradipine. *Nephron* 1999; 81: 117-8.
- Zhang Q, Simpson J, Aboleneen HI. A Specific Method for the Measurement of Tacrolimus in Human Whole Blood by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Ther Drug Monit* 1997; 19: 470-6.
- Zhou L et al. Optimized analytical method for cyclosporin A by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2001; 754: 201-7.

Zimmerman JJ, Kahan BD. Pharmacokinetics of sirolimus in stable renal transplant patients after multiple oral dose administration. *J Clin Pharmacol* 1997; 37(5): 405-15.

14. ANNEXE

14.1. Procédure d'analyse

1. Introduction

Dosage automatique et simultané, dans le sang complet, des immunosuppresseurs : ciclosporine A, tacrolimus, sirolimus et everolimus.

2. Principe de la méthode

Dosage par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) avec extraction on-line en phase solide automatisée (système de commutation de colonnes).

3. Instrumentation et matériels

a) Identification

Pompe HPLC 1: Hewlett Packard Series 1050

Pompe HPLC 2: Hewlett Packard Series 1100

Spectromètre de masse: HP Series 1100 MSD d'Agilent Technologies

Filtre: In-Line Pre-Column Filter Kit (Waters, N° WAT084560)

Colonne d'extraction: XTerra® MS Guard Column C8 5 µm, 2,1 x 10 mm (Waters, N° 186000649)

Pré-colonne analytique: XTerra® MS Guard Column C18 5 µm, 2,1 x 10 mm (Waters, N° 186000648)

Colonne analytique: XTerra® MS Cartridge Column C18 5 µm, 2,1 x 50 mm (Waters, N° 186000538)

b) Maintenance

Pompes HPLC et spectromètre de masse: se référer aux manuels du fabricant

Filtre: à changer toutes les 500 injections

Colonne d'extraction: à changer toutes les 500 injections

Pré-colonne analytique: à changer toutes les 500 injections

Colonne analytique: à changer toutes les 1000 injections

4. Réactifs

a) Identification

Méthanol Absolute HPLC Supra Gradient de Biosolve LTD

Sulfate de zinc heptahydrate de Fluka Chemie, N° 96500

Acide formique puriss. p.a. de Fluka Chemie, N° 06440

Formiate de sodium puriss. p.a. for HPLC de Fluka Chemie, N° 17841

Eau ultrapure produite par le laboratoire
Ciclosporine A de Fluka Chemie
Ciclosporine D de Novartis
Tacrolimus de Fujisawa Pharmaceutical
Sirolimus de Wyeth, N° AY-22989-53
Everolimus de Novartis
Demethoxy-sirolimus de Wyeth, N° AY-24668-1

b) Préparation, stabilité et stockage

Solution de formiate de sodium 0,1 mg/ml

10 mg dans 100 ml d'eau ultrapure, stable une semaine à température ambiante.

Solution de sulfate de zinc 0,4 M

5,75 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ dans 50 ml d'eau ultrapure.

Solutions d'étalon interne (ciclosporine D et demethoxy-sirolimus)

- Solutions mères à 100 µg/ml:

10,0 mg de demethoxy-sirolimus dans 100 ml de méthanol, stable 6 mois à -20°C.

10,0 mg de ciclosporine D dans 100 ml de méthanol, stable 6 mois à -20°C.

- Solution à 10 µg/ml de ciclosporine D:

1000 µl de solution mère à 100 µg/ml ad 10 ml avec du méthanol, stable 6 mois à -20°C.

- Solution à 1 µg/ml de demethoxy-sirolimus:

100 µl de solution mère à 100 µg/ml ad 10 ml avec du méthanol, stable 6 mois à -20°C.

- Solution de travail de ciclosporine D et demethoxy-sirolimus:

A préparer avant chaque série de mesures :

780 µl de solution à 10 µg/ml de ciclosporine D + 315 µl de solution à 1 µg/ml de demethoxy-sirolimus
ad 50 ml avec du méthanol.

Réactif de précipitation contenant l'étalon interne (méthanol/ZnSO₄ 0,4 M, 8/2, v/v)

Préparer avant chaque série de mesures une quantité correspondant à au moins 0,5 ml par échantillon:

8 parts de solution de travail de ciclosporine D et demethoxy-sirolimus + 2 parts de solution de sulfate de zinc 0,4 M, bien mélanger.

Phases mobiles (préparer 2 litres de chaque)

- Solution méthanolique d'acide formique 0,02% et de formiate de sodium 1 µM

1 litre de méthanol + 200 µl d'acide formique + 680 µl de solution de formiate de sodium 0,1 mg/ml, stable 1 semaine à température ambiante.

- Solution aqueuse d'acide formique 0,02% et de formiate de sodium 1 µM

1 litre d'eau ultrapure + 200 µl d'acide formique + 680 µl de solution de formiate de sodium 0,1 mg/ml, stable 1 semaine à température ambiante.

5. Calibrateurs et contrôles

Réaliser un pool de sang récolté sur EDTA.

Solutions mères :

Dissoudre 10,0 mg de ciclosporine A dans 100 ml de méthanol (solution C)

Dissoudre 10,0 mg de tacrolimus dans 100 ml de méthanol.

Dissoudre 10,0 mg de sirolimus dans 100 ml de méthanol.

Dissoudre 10,0 mg d'everolimus dans 100 ml de méthanol.

Les solutions sont stables 6 mois à -20°C.

Solution de travail de tacrolimus, sirolimus et everolimus (solution TSE) :

A faire avant chaque utilisation :

50 µl de chaque solution mère (tacrolimus, sirolimus et everolimus) + 850 µl de méthanol.

Solutions de base pour les calibrateurs :

Dans des tubes en polypropylène effectuer les préparations suivantes :

Niveaux	Solution TSE [µl]	Solution C [µl]	Méthanol [µl]
1	25	25	1950
2	60	50	690
3	150	375	475

A partir des solutions de base de chaque niveau :

400 µl de chaque niveau + 9,6 ml de sang total sur EDTA dans des tubes en matière plastique. Bien mélanger les tubes.

Répartir les calibrateurs dans des tubes Eppendorf en aliquots de 400 µl. Stables 12 mois à -20°C.

Concentration des 3 calibrateurs : 2,5, 15 et 30 ng/ml pour le tacrolimus, sirolimus et everolimus et 50, 250 et 1500 pour la ciclosporine A.

Solutions de base pour les contrôles :

Dans des tubes en polypropylène effectuer les préparations suivantes :

Niveaux	Solution TSE [µl]	Solution C [µl]	Méthanol [µl]
1	25	25	1950
2	40	30	730
3	100	250	650

A partir des solutions de base de chaque niveau :

400 µl de chaque niveau + 9,6 ml de sang total sur EDTA dans des tubes en matière plastique. Bien mélanger les tubes.

Répartir les contrôles dans des tubes Eppendorf en aliquots de 400 µl. Stables 12 mois à -20°C.

Concentration des 3 contrôles: 2,5, 10 et 20 ng/ml pour le tacrolimus, sirolimus et everolimus et 50, 150 et 1000 pour la ciclosporine A.

6. Echantillons à analyser

Matrice : sang total.

Récepteur : Hémogard mauve 3 ml.

Préparation et conservation avant analyse :

Ciclosporine A et tacrolimus: conserver au réfrigérateur à 4°C.

Sirolimus et everolimus: conserver au congélateur à -20°C.

7. Préparation de l'échantillon

a) Procédure

Dans un tube Eppendorf 2 ml, ajouter 500 µl de réactif de précipitation et 250 µl de sang complet, vortexer de suite brièvement chaque tube afin d'éviter la formation d'un agrégat compact.

Extraire ensuite le principe actif en vortexant les tubes ensemble pendant 5 minutes (appareil automatique).

Centrifuger les tubes pendant 5 min à 3500 t/min.

Transférer 300 µl de surnageant dans un flacon d'injection du LC-MS.

8. Analyse par LC-MS

a) Installation du système

Connecter les tubulures et les colonnes selon le schéma indiqué en dernière page de la procédure d'analyse.

Connecter le câble de liaison entre la pompe 1050 et le système 1100.

Charger la méthode 1 sur la pompe 1050 et la méthode « imsup3 » sur le système 1100.

Placer la phase mobile méthanolique en position A2 sur le système 1100 et la phase aqueuse en position B2 (ne pas oublier d'indiquer le nouveau volume présent dans chaque bouteille), purger les tubulures.

Placer la phase mobile méthanolique en position A sur le système 1050 et la phase aqueuse en position B, purger les tubulures.

Ouvrir l'arrivée d'hélium nécessaire au dégazage des solvants utilisés par la pompe 1050, pression 1,5 bars.

Enclencher les pompes, le thermostat ainsi que le MS et laisser équilibrer le système pendant 45 min avant de démarrer les analyses.

b) Conditions chromatographiques

- Volume d'injection : 50 µl

- Température des colonnes

Filtre: 40°C ⇒ four de gauche

Colonne d'extraction: 40°C ⇒ four de gauche

Colonne analytique: 50°C ⇒ four de droite

- Commutation des colonnes

Temps [min]	Position du commutateur
0,00	column 1
1,00	column 2
1,70	column 1

- Programmation de la pompe 1050 : débit 400 µl/min

Temps [min]	Phase organique (A)	Phase aqueuse (B)
0,00	5 %	95 %
1,20	5 %	95 %
1,21	100 %	0 %
6,20	100 %	0 %
6,21	5 %	95 %

- Programmation de la pompe 1100 : débit 400 µl/min

Temps [min]	Phase organique (A2)	Phase aqueuse (B2)
0,00	65 %	35 %
1,70	65 %	35 %
8,70	95 %	5 %
9,00	95 %	5 %
9,01	100 %	0 %

Stop time : 12 min, Post time : 5 min

- Pression de départ

Colonne analytique (pompe 1100): 72 bars

Colonne extraction (pompe 1050): 16 bars

- Temps de rétention

Tacrolimus: 6,4 min, sirolimus: 6,9 min, everolimus: 7,0 min, demethoxy-sirolimus: 7,1 min, ciclosporine A: 8,3 min, ciclosporine D: 8,7 min.

c) Réglages du spectromètre de masse

Rapport masse/charge: tacrolimus : 826,4, demethoxy-sirolimus: 906,5, sirolimus: 936,5, everolimus : 980,7, ciclosporine A : 1224,7, ciclosporine D : 1238,7

Voltage du fragmenteur: tacrolimus: 150 V, sirolimus et demethoxy-sirolimus: 200 V, ciclosporine A, ciclosporine D et everolimus: 250 V

Voltage du capillaire: 3500 V

Débit du gaz de séchage: 9 l/min

Pression de nébulisation: 40 psig

Température du gaz: 300 °C

9. Rinçage des colonnes

A la fin de la série d'analyses :

Déconnecter le câble de liaison afin d'éviter un conflit entre les deux pompes.

Rincer les colonnes 30 min. avec 100 % d'eau puis 30 min. avec 100 % de MeOH.

10. Résultats

a) Traitement des résultats

Pour le tacrolimus, sirolimus et everolimus : déterminer les valeurs des échantillons inconnus à l'aide de la droite de régression obtenue avec les calibrateurs (directement à l'aide du logiciel d'acquisition des données HPChemstation).

Pour la ciclosporine A : déterminer les valeurs des échantillons inconnus à l'aide de la droite de régression pondérée par $1/x$ obtenue avec les calibrateurs (selon feuille de calcul Microsoft® Excel).

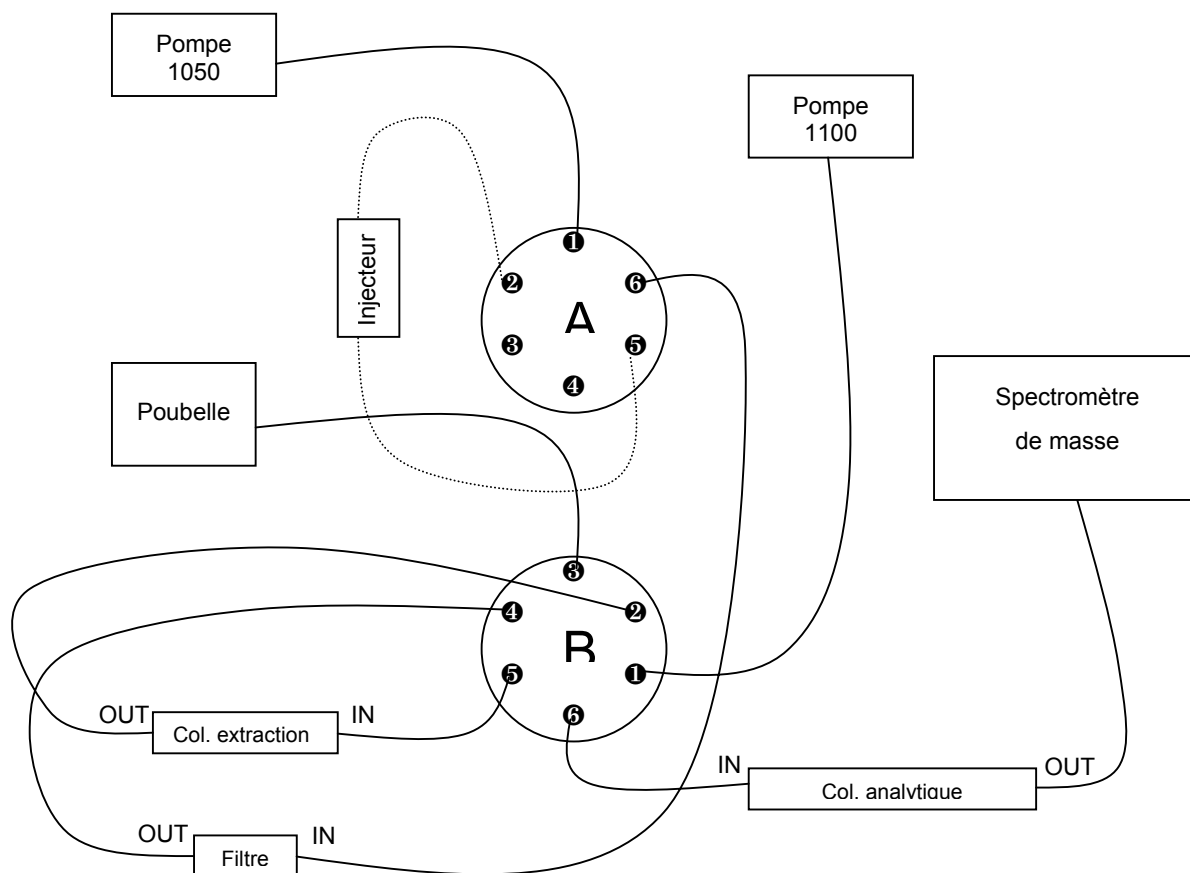
b) Unité

Les résultats sont exprimés en ng/ml.

c) Valeurs usuelles

Les valeurs usuelles dépendent du protocole d'immunosuppression du patient et se situent en général entre 5 et 20 ng/ml pour le tacrolimus et le sirolimus et entre 100 et 250 ng/ml pour la ciclosporine A.

11. Schéma des connections



Diamètre des tubulures : 0,12 mm (rouge)