

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE HOSPITALIERE**

Soutenu devant le Jury interrégional
le 16 octobre 2008

par M. **DESLANDES Guillaume**

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 6 mai 1987 tient lieu de :

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

**Comparaison de méthodes de dosage des médicaments
immunosuppresseurs (ciclosporine, tacrolimus, sirolimus et
évérolimus) sur sang total :**

chromatographie liquide haute performance couplée à la
spectrométrie de masse en tandem versus immunodosage.

Président :

-M. Alain PINEAU, Professeur de Toxicologie - Faculté de Pharmacie - Nantes

Membres du Jury :

-Mme Pascale JOLLIET, Professeur de Pharmacologie - Faculté de Médecine - Nantes

-M. Yves MAURAS, Professeur de Toxicologie - Faculté de Pharmacie - Angers

-M. Eric DAILLY, Maître de Conférence de Pharmacologie - Faculté de Médecine -
Nantes

-Mme Dominique NAVAS, Praticien Hospitalier Pharmacien – CHU de Nantes

-Mme Muriel COURANT-MENANTEAU, Assistant Spécialiste Pharmacien – CHU
de Nantes

Liste des tableaux et figures :	4
Liste des abréviations	7
Introduction	9
Pharmacologie des immunosuppresseurs : (sirolimus, évérolimus, tacrolimus, ciclosporine).....	11
1 Formules chimiques	13
2 Mécanismes d'action.....	15
2.1 inhibiteurs de la calcineurine	15
2.2 inhibiteurs de la mTOR	15
3 Pharmacocinétique	16
3.1 ciclosporine (absorption, distribution, métabolisme, élimination)	16
3.2 tacrolimus (absorption, distribution, métabolisme, élimination)	18
3.3 sirolimus	20
3.4 évérolimus	21
4 Suivi thérapeutique pharmacologique	22
4.1 ciclosporine	23
4.1.1 Paramètres à mesurer	23
4.1.2 Relation exposition-réponse	23
4.1.3 Concentrations efficaces (Marquet, 2004)	23
4.2 tacrolimus	25
4.2.1 Paramètres à mesurer	25
4.2.2 Relation exposition-réponse	25
4.2.3 Concentrations efficaces	25
4.3 sirolimus	26
4.3.1 Paramètres à mesurer	26
4.3.2 Relation exposition-réponse	26
4.3.3 Concentrations efficaces	26
4.4 évérolimus	27
4.4.1 Paramètres à mesurer	27
4.4.2 Relation exposition-réponse :	27
4.4.3 Concentrations efficaces	27
5 Effets indésirables	28
5.1 Inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine et tacrolimus)	28
5.1.1 Effets communs aux deux molécules	28
5.1.2 ciclosporine.....	28
5.1.3 tacrolimus	28
5.2 Inhibiteurs de la mTOR (sirolimus et évérolimus)	29
6 Interactions	30
6.1 Inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine et tacrolimus)	30
6.1.1 Les médicaments à l'origine d'une interaction pharmacocinétique	30
6.1.2 Les médicaments à l'origine d'une interaction pharmacodynamique	31
6.2 Inhibiteurs de la mTOR (sirolimus et évérolimus)	31
Matériels et méthodes	33
1 Techniques de dosage des immunosuppresseurs	34
1.1 Techniques immunologiques :	34
1.1.1 ciclosporine.....	35
1.1.2 tacrolimus :	36
1.1.3 sirolimus	37
1.1.4 évérolimus	38
1.2 Techniques chromatographiques :	39
1.2.1 ciclosporine.....	39
1.2.1.1 HPLC/UV	39
1.2.1.2 LC/MS et LC/MS-MS.....	39
1.2.2 tacrolimus	40
1.2.2.1 Méthode HPLC/UV	40
1.2.2.2 HPLC/Fluorimétrie	40
1.2.2.3 LC/MS	40
1.2.2.4 LC/MS-MS	40
1.2.3 sirolimus	41

1.2.3.1 HPLC/UV	41
1.2.3.2 LC/MS	41
1.2.3.3 LC/MS-MS	41
1.2.4 évérolimus	42
1.2.4.1 HPLC/UV	42
1.2.4.2 LC/MS et LC/MS-MS.....	42
1.2.5 La technique chromatographique utilisée au CHU de Nantes pour le dosage des immunosuppresseurs.	43
1.2.5.1 Préparation des échantillons (patients, gamme et contrôle)	43
1.2.5.2 Extraction On-line et chromatographie	43
2 Analyse statistique	49
2.1 Méthode graphique : méthode de Altman et Bland (Bland & Altman, 1986).	49
2.2 Méthodes statistiques.....	51
2.2.1 Test t de Student sur séries appariées	51
2.2.2 Analyse de Passing-Bablok (Passing & Bablok, 1983)	52
2.2.3 Test t de Student sur séries appariées dans les sous populations.	53
2.2.4 La régression de Deming et la régression linéaire par les moindres carrés.	54
2.2.4.1 Régression de Deming	54
2.2.4.2 La régression linéaire simple ou méthode des moindres carrés	55
Résultats.....	56
1 ciclosporine	57
1.1 Population	57
1.2 Résultats de la comparaison de méthodes	57
1.3 Influence du sexe et du type de greffe	61
2 tacrolimus.....	63
2.1 Population	63
2.2 Résultats de la comparaison de méthodes	63
2.3 Influence du sexe et du type de greffe	66
3 sirolimus	68
3.1 Population	68
3.2 Résultats de la comparaison de méthodes	68
3.3 Influence du sexe et du type de greffe.....	71
4 évérolimus	72
4.1 Population	72
4.2 Résultats de la comparaison de méthodes	72
4.3 influence du sexe et du type de greffe	75
Discussion.....	76
1 ciclosporine	77
2 tacrolimus.....	80
3 sirolimus	82
4 évérolimus	84
5 discussion générale	86
5.1 Avantages de la LC/MS-MS	86
5.2 Inconvénients de la LC/MS-MS :	87
5.3 Conséquences du passage des méthodes immunologiques vers la méthode chromatographique	87
Conclusion.....	88
Bibliographie.....	90

Liste des tableaux et figures :

Tableau 1 : immunosuppresseurs commercialisés (Vidal, 2008)	12
Tableau 2 : ciclosporine - zone thérapeutique de la concentration résiduelle (C0) en fonction de l'indication	23
Tableau 3 : ciclosporine - évaluation en fonction du temps écoulé depuis la greffe de la zone thérapeutique de la concentration résiduelle (C0) après transplantation rénale.....	24
Tableau 4 : ciclosporine - zone thérapeutique de la concentration à 2 heures en fonction du délai et de l'indication.	24
Tableau 5 : sirolimus - concentration cible de sirolimus après une greffe rénale.....	26
Tableau 6 : sirolimus-concentration cible en fonction des doses de ciclosporine	26
Tableau 7 : évérolimus - efficacité et effet indésirable hématologique en fonction des concentrations sanguines.....	27
Tableau 8 : ciclosporine - méthodes immunologiques de dosage.....	35
Tableau 9 : tacrolimus - méthodes immunologiques de dosage	36
Tableau 10 : sirolimus - méthodes immunologiques de dosage	37
Tableau 11 : évérolimus - méthode immunologique de dosage.....	38
Tableau 12 : temps de rétention et transition des molécules.....	47
Tableau 13 : concentration des calibrateurs et contrôles en fonction des molécules (coffret Chromsystem®).....	48
Tableau 14 : influence du sexe, Méthode A versus méthode B	54
Tableau 15 : ciclosporine - répartition des patients en fonction de leur service d'origine	57
Tableau 16 : ciclosporine - différence entre les méthodes en fonction des intervalles de concentration mesurées	59
Tableau 17 : ciclosporine - équation des droites de régression en fonction de la méthode statistique utilisée.....	61
Tableau 18 : ciclosporine - analyse statistique de l'influence des différentes caractéristiques de la population sur les résultats.....	62
Tableau 19 : ciclosporine - équation des droites de régression de Passing-Bablok en fonction du type de greffe	62
Tableau 20 : tacrolimus - répartition des patients en fonction du type de greffe.....	63
Tableau 21 : tacrolimus - équation des droites de régression en fonction de la méthode statistique utilisée.....	65
Tableau 22 : tacrolimus - analyse statistique de l'influence des différentes caractéristiques de la population sur les résultats.....	67
Tableau 23 : sirolimus - répartition des patients en fonction de leur service d'origine.....	68
Tableau 24 : sirolimus - équation des droites de régression en fonction de la méthode statistique utilisée.....	70
Tableau 25 : sirolimus - analyse statistique de l'influence des différentes caractéristiques de la population sur les résultats.....	71
Tableau 26 : évérolimus - équation des droites de régression en fonction de la méthode statistique utilisée.....	74
Tableau 27 : évérolimus - analyse statistique de l'influence des différentes caractéristiques de la population sur les résultats.....	75
Tableau 28 : ciclosporine - synthèse des résultats retrouvés dans la bibliographie.....	78
Tableau 29 : tacrolimus - synthèse des résultats retrouvés dans la bibliographie.....	81
Tableau 30 : sirolimus - synthèse des résultats retrouvés dans la bibliographie.....	82
Tableau 31 : évérolimus - synthèse des résultats retrouvés dans la bibliographie.....	85
Figure 1 : ciclosporine A - Formule chimique développée.....	14

Figure 2 : tacrolimus - Formule chimique développée.....	14
Figure 3 : sirolimus - Formule chimique développée.....	15
Figure 4 : évérolimus - Formule chimique développée.....	15
Figure 5 : Mécanisme d'action des immunosuppresseurs	16
Figure 6 : ciclosporine - concentration sanguine en fonction de la forme galénique.....	17
Figure 7 : ciclosporine - principaux sites de métabolisation	18
Figure 8 : tacrolimus - principaux sites de métabolisation.....	20
Figure 9 : sirolimus - principaux sites de métabolisation.....	21
Figure 10 : Chargement et purification de l'échantillon.....	45
Figure 11 : transfert de l'échantillon sur la colonne séparative.....	46
Figure 12 : séparation et détection.....	47
Figure 13 : chromatogramme d'un point de gamme (calibrateur n°3).....	48
Figure 14: représentation graphique d' Altman et Bland.....	51
Figure 15 : représentation d'Altman et Bland en pourcentages.....	51
Figure 16 : représentation d'Altman et Bland en valeurs absolues.....	52
Figure 17 : analyse de Passing et Bablok.....	54
Figure 18 : régression de Deming.....	56
Figure 19 : ciclosporine - représentation graphique de Altman et Bland : différence des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats	59
Figure 20 : ciclosporine - représentation graphique de Altman et Bland ; intervalle 0 à 200 ng/ml.....	59
Figure 21 : ciclosporine - représentation graphique de Altman et Bland : pourcentage relatif des différences des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats obtenus.....	60
Figure 22 : ciclosporine - comparaison des méthodes de dosage ; régression de Passing Bablok.....	61
Figure 23 : ciclosporine – intervalle 0 à 200 ng/ml - comparaison des méthodes de dosage ; régression de Passing Bablok.....	62
Figure 24 : ciclosporine - comparaison des régressions en fonction du sexe ; régression de Passing Bablok.....	63
Figure 25 : ciclosporine - comparaison des régressions en fonction du type de greffe ; régression de Passing Bablok.....	63
Figure 26 : tacrolimus - représentation graphique de Altman et Bland : différence des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats.....	65
Figure 27 : tacrolimus - représentation graphique de Altman et Bland : Pourcentage relatif différence des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats obtenus.....	65
Figure 28 : tacrolimus - comparaison des méthodes de dosage ; régression de Passing Bablok.....	66
Figure 29 : tacrolimus - comparaison des régressions en fonction du sexe ; régression de Passing Bablok.....	67
Figure 30 : tacrolimus - comparaison des régressions en fonction du type de greffe ; régression de Passing Bablok.....	67
Figure 31 : sirolimus - représentation graphique de Altman et Bland : différence des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats.....	70
Figure 32 : sirolimus - représentation graphique de Altman et Bland : Pourcentage de différence des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats.....	70
Figure 33 : sirolimus - comparaison des méthodes de dosage ; régression de Passing Bablok.....	71
Figure 34 : sirolimus- comparaison des régressions en fonction du sexe ; régression de Passing Bablok.....	72
Figure 35 : sirolimus - comparaison des régressions en fonction du type de greffe ; régression de Passing Bablok.....	72
Figure 36 : évérolimus - représentation graphique de Altman et Bland : différences des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats obtenus.....	73
Figure 37 : évérolimus - représentation graphique de Altman et Bland : Pourcentage relatif de différence des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats obtenus.....	74

Figure 38 : évérolimus - comparaison des méthodes de dosage ; régression de Passing Bablok....	75
Figure 39 : évérolimus - comparaison des régressions en fonction du sexe ; régression de Passing Bablok.....	76
Figure 40 : évérolimus - comparaison des régressions en fonction du type de greffe ; régression de Passing Bablok.....	75
Figure 41 : ciclosporine - représentation schématique de l'écart entre les techniques en fonction des concentrations mesurées.....	78

Liste des abréviations

^{125}I :	iode 125
ACMIA :	Antibody Conjugated Magnetic ImmunoAssay
ARN :	Acide RiboNucléique
AUC :	aire sous la courbe
AUC _{0-4h} :	aire sous la courbe des 4 premières heures suivant la prise
C ₀ :	concentration résiduelle
C ₂ :	concentration deux heures après la prise du médicament
CEDIA :	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique
CHU :	Centre Hospitalo-Universitaire
C _{max} :	concentration sanguine maximale
CMIA :	Chemiluminescent automated Assay
CYP3A4/5 :	cytochromes P450 3A4 et 3A5
ddl :	degrés de liberté
EDTA :	éthylène di-amine tétracétate
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMIT :	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique
ET :	écart type
FPIA :	Fluorescence Polarisation ImmunoAssay
HPLC :	chromatographie liquide haute performance
HPLC/UV :	chromatographie liquide haute performance avec détection en ultraviolet
HTA :	hypertension artérielle
IC :	intervalle de confiance
IC _{95%} :	intervalle de confiance à 95%
Il-2 :	interleukine 2
LC :	chromatographie liquide
LLE :	extraction liquide-liquide
md :	moyenne des différences,
mdr-1 :	multidrug resistance-1
MEIA :	Microparticle Enzyme-linked ImmunoAssay
MMF :	mycophénolate mofétil
MRM :	multiple reaction monitoring
MS :	spectrométrie de masse simple
MS-MS :	spectrométrie de masse en tandem
mTOR :	mammalian target of rapamycin
n :	nombre d'échantillon.
ng/ml :	nanogramme par millilitre
NS :	non significatif
OKT3 :	orthoclone OKT3
P-gp :	glycoprotéine P
r ² :	coefficient de corrélation linéaire
RIA :	RadioImmunoAssay

S : significatif
s²d : variance des différences
SAL : sérum antilymphocytaire
SD : Standard Deviation
SPE : extraction en phase solide
t_{calc} : test de Student
v/v : volume à volume

Introduction

Le dosage sanguin des immunosuppresseurs représente une grande part de l'activité du laboratoire de pharmacologie (tacrolimus, sirolimus, évérolimus) et du laboratoire de biochimie spécialisée (ciclosporine). Réalisés de manière quotidienne pour la ciclosporine et le tacrolimus, et tri-hebdomadaire pour le sirolimus et l'évérolimus, ces dosages sont une aide indispensable pour le suivi thérapeutique des patients transplantés aussi bien en néphrologie (greffe de rein), cardiologie (greffe de cœur et poumons) qu'en hématologie (allogreffe de moelle osseuse). Le suivi thérapeutique pharmacologique consiste en l'adaptation individuelle des posologies sur la base des concentrations sanguines du patient. La maîtrise du traitement immunosuppresseur est un élément majeur dans la prévention du rejet après transplantation d'organe. Les deux principaux buts du suivi sont de diminuer, d'une part le taux d'échec thérapeutique lié à une mauvaise observance ou à une dose insuffisante, d'autre part la fréquence des effets indésirables et/ou toxiques des médicaments.

D'abord cantonnée à des méthodes de dosages immunologiques, la détermination des concentrations sanguines médicamenteuses s'est aujourd'hui ouverte à des méthodes chromatographiques. A l'origine longues et peu sensibles, les méthodes chromatographiques permettent aujourd'hui de déterminer avec précision et rapidité les concentrations sanguines de telle sorte qu'elles peuvent à ce jour être utilisées comme méthodes de routine et remplacer les méthodes immunologiques.

Mais avant d'envisager le transfert d'une méthode immunologique vers une méthode chromatographique, celles-ci doivent être comparées sur des séries importantes de dosages de manière à étudier leur niveau d'équivalence dans le rendu des résultats.

Pharmacologie des immunosuppresseurs : (sirolimus, évérolimus, tacrolimus, ciclosporine)

Dès les premières expériences de transplantation d'organe chez l'Animal, il était apparu que le rejet était un obstacle majeur et que ce rejet dépendait du système immunitaire. Les premières tentatives d'immunosuppression pour transplantation d'organe (greffe rénale) chez l'homme, réalisées à Boston et à Paris en 1960 et 1962, ont consisté en une irradiation corporelle subtotale. Par la suite, commença l'ère de l'immunosuppression par des agents pharmacologiques. La première étape fut l'utilisation de l'azathioprine en 1963. Il fut observé dans ce contexte qu'après la survenue d'un rejet, l'adjonction de fortes doses de corticoïdes pouvait traiter le rejet et permettre chez certains patients une survie du greffon à long terme après diminution secondaire de l'immunosuppression. L'étape suivante fut l'utilisation de sérum antilymphocytaire (SAL) en transplantations hépatique et cardiaque en 1967 et 1968. Les transplantations étaient alors effectuées avec une immunosuppression utilisant l'association de SAL, de corticoïdes et d'azathioprine. La découverte en 1976 de la ciclosporine A révolutionna la transplantation. Ce médicament, le premier à inhiber *in vitro* la fonction des lymphocytes T, fut utilisé chez l'Homme en 1978. Le tacrolimus, un second médicament ayant un mécanisme d'action similaire, fut découvert à la fin des années 1980. Ces deux molécules appartiennent à la famille des anticalcineurines. Dans les années 1980, débuta également l'ère des anticorps monoclonaux avec l'utilisation de l'orthoclone OKT3 (OKT3). Parmi les anticorps monoclonaux utilisés à la phase aiguë du rejet de greffe figurent également le basilixumab et daclizumab qui sont des anticorps dirigés contre les récepteurs lymphocytaires de l'interleukine 2 (IL-2). Le mycophénolate mofétil (MMF) est à comparer à l'azathioprine puisqu'il s'agit également d'un inhibiteur du métabolisme des bases puriques. Les deux dernières molécules commercialisées font partie de la classe des inhibiteurs du signal de prolifération ; cette classe est représentée actuellement par le sirolimus et l'évérolimus (Haddad, 2004).

Dans le tableau 1 sont exposées les différentes molécules commercialisées à ce jour.

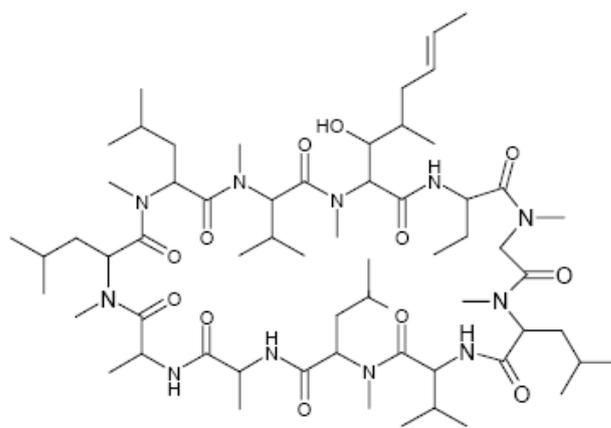
Classe thérapeutique	Principe actif	Nom commercial	Forme galénique	Dosage
Inhibiteurs de la calcineurine	ciclosporine	Sandimmun [®] , Neoral [®]	Solution buvale	100mg/ml
			Capsules	10mg
				25mg
				50mg
				100mg
			Solution injectable	50 mg/1ml
	250mg/5ml			
	tacrolimus	Prograf [®] Advagraf [®]	Gélules	0,5mg
1mg				
5mg				
Solution injectable	5mg/1ml			
Inhibiteurs de la mTOR	sirolimus	Rapamune [®]	Comprimés	1mg
				2mg
	Solution buvable	1mg/ml		
		évérolimus	Certican [®]	Comprimés
	0,25mg			
	0,5mg			
	0,75mg			
	Antimétabolites	azathioprine	Imurel [®]	Comprimés
50mg				
solution injectable				50mg
mycophénolate mofétil		Cellcept [®]	Comprimés	250mg
				500mg
			Suspension buvable	1g/5ml
			Solution injectable	500mg
mycophénolate de sodium		Myfortic [®]	Comprimés	180mg
	360mg			
Anticorps polyclonaux	Immunoglobulines anti-lymphocytaires	ATG-Fresenius [®] , Lymphoglobuline [®] ,	Solution injectable	100mg
		Thymoglobuline [®]	Solution injectable	25mg
Anticorps monoclonaux	muromonab-CD3	Orthoclone OKT3 [®]	Solution injectable	5mg
	basiliximab	Simulect [®]	Solution injectable	10mg
	daclizumab	Zenapax [®]	Solution injectable	25mg
Corticostéroïdes	prednisone	Cortancyl [®]	Comprimés	1, 5, 20 mg

Tableau 1 : immunosuppresseurs commercialisés (Vidal, 2008)

Seuls les inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine, tacrolimus) et les inhibiteurs de la mTOR (sirolimus, évérolimus) seront étudiés ici.

1 Formules chimiques

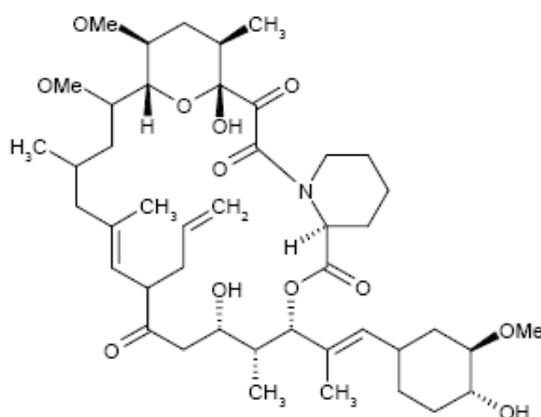
La ciclosporine A est un polypeptide (figure 1) d'origine fongique. Elle a été isolée en 1970 dans un champignon, le *Tylopoctadium inflatum* (Chast, 1995) à partir d'un échantillon de terre recueilli dans le cadre de recherche sur les antibiotiques.



Cyclosporine A

Figure 1 : ciclosporine A - Formule chimique développée

Le tacrolimus ou FK-506 a été isolé en 1984 dans un échantillon de sol du Japon. Le tacrolimus est un macrolide du genre des lactones (figure 2) synthétisé par une bactérie, *Streptomyces tsukubaensis*.



Tacrolimus

Figure 2 : tacrolimus - Formule chimique développée

Le sirolimus (figure 3) est un macrolide antibiotique, extrait de *Streptomyces hygroscopicus*. L'évérolimus (figure 4) est un analogue structural du sirolimus. Les deux molécules ne diffèrent que par un groupement 2-hydroxyéthyl.

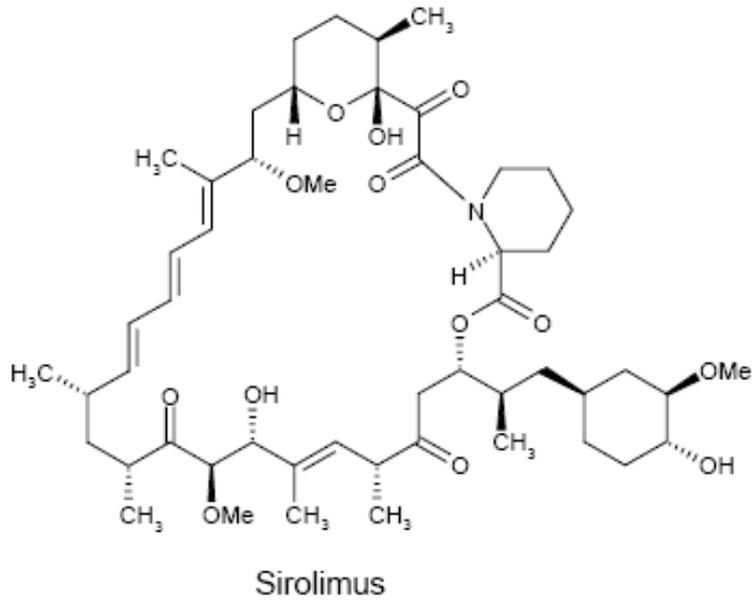


Figure 3 : sirolimus - Formule chimique développée

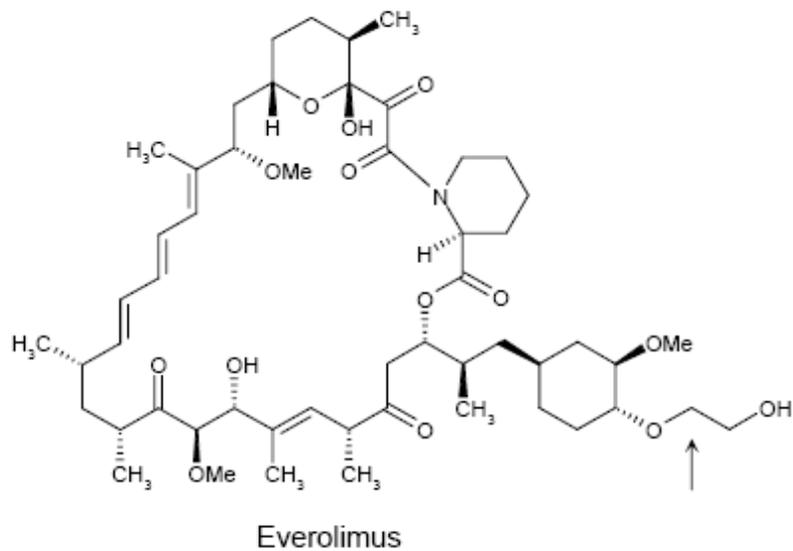


Figure 4 : évérolimus - Formule chimique développée

2 Mécanismes d'action

2.1 inhibiteurs de la calcineurine

Les anticalcineurines regroupent la ciclosporine et le tacrolimus dont le mécanisme d'action (Figure 5) commun conduit à inhiber la réponse lymphocytaire T faisant suite à une stimulation antigénique. La ciclosporine et le tacrolimus n'inhibent pas directement la calcineurine : leur activité inhibitrice nécessite une fixation préliminaire à une immunophiline, la cyclophiline (pour la ciclosporine) ou la FKBP12 (pour le tacrolimus). L'inhibition de la calcineurine par le complexe ciclosporine-cyclophiline ou tacrolimus-FKBP12 entraîne une diminution de la production de lymphokines principalement l'IL2 par les lymphocytes, limitant ainsi la prolifération des lymphocytes T.

2.2 inhibiteurs de la mTOR

Le sirolimus et l'évérolimus appartiennent à la classe des rapamycines. Leur action (Figure 5) nécessite au préalable une liaison à une immunophiline, la FKBP12. Ils agissent alors comme inhibiteurs du signal de prolifération en empêchant l'activation d'une kinase appelée mTOR (mammalian target of rapamycin) dont l'activité est indispensable à la progression du cycle cellulaire des lymphocytes. Son inhibition entraîne le blocage de plusieurs voies spécifiques de transduction des signaux. Le résultat est une inhibition de l'activation lymphocytaire secondaire à la stimulation par l'IL2, à l'origine d'une immunosuppression.

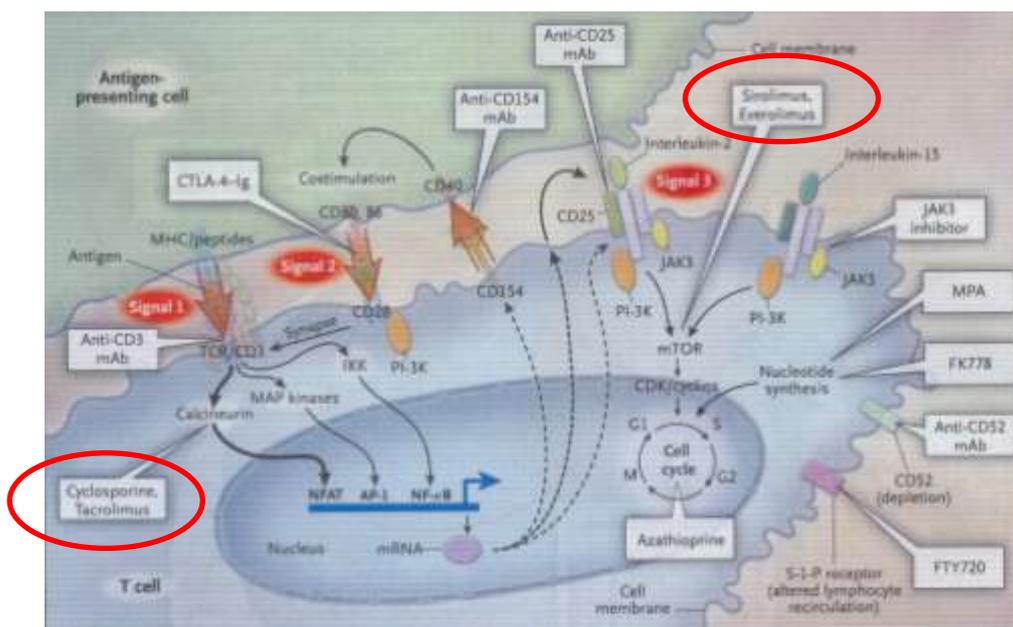


Figure 5 : mécanisme d'action des immunosuppresseurs (Holloran, 2004)

3 Pharmacocinétique

3.1 ciclosporine (absorption, distribution, métabolisme, élimination)

Absorption :

La première forme commercialisée de ciclosporine, le Sandimmun[®], était une préparation huileuse dont l'absorption intestinale était faible, dépendante de la bile et sujette à d'importantes variations. En 1995, a été commercialisée une autre forme galénique (micro-émulsion), Néoral[®], rendant le profil d'absorption de la ciclosporine peu dépendant des sels biliaires, des enzymes pancréatiques et de l'absorption d'aliments. La concentration sanguine maximale est atteinte plus rapidement (entre 1 à 2 heures après la prise) et la biodisponibilité est de 40% (figure 6).

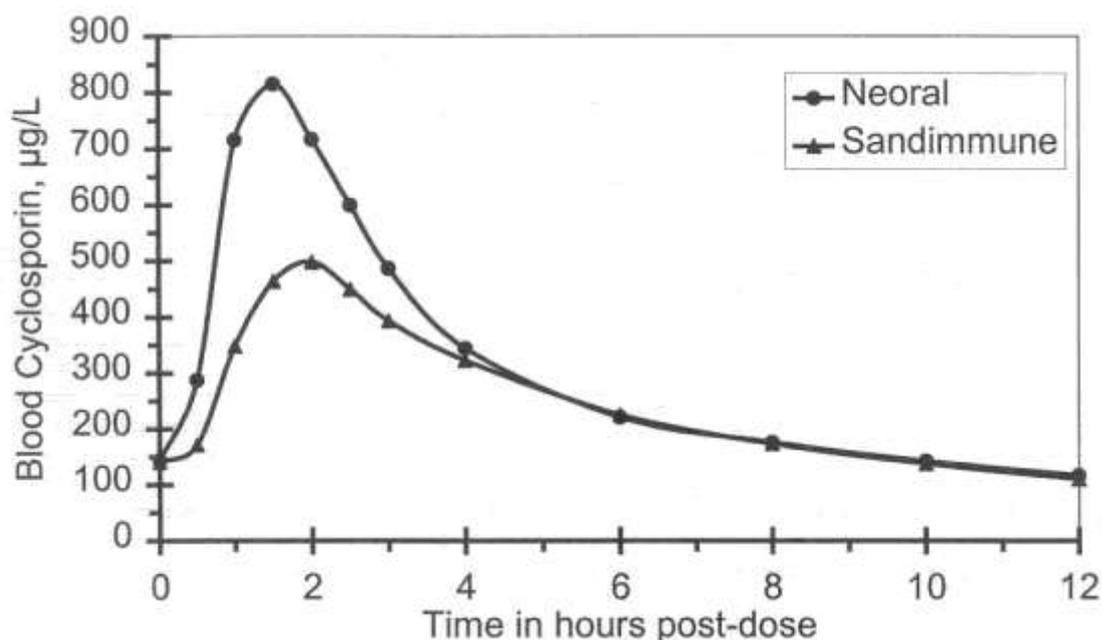


Figure 6 : ciclosporine - concentration sanguine en fonction de la forme galénique. (Jorga, 2004)

La solution buvable et les capsules de ce médicament (Néoral[®]) sont bioéquivalentes. La concentration sanguine maximale, obtenue entre 1 à 6 heures avec Sandimmun[®] est plus rapidement atteinte (C_{max} obtenue en 1 heure de moins) sous Néoral[®] (résumé des caractéristiques du produit, 2008). La biodisponibilité s'élève à 30-60% (Dunn, 2001).

Distribution :

La ciclosporine est distribuée, pour une grande part, dans l'espace extravasculaire. Son volume de distribution est estimé à 3 à 5 l/kg (Wong 2001). Dans le sang, la répartition est la suivante : 33-47 % dans le plasma, 10-20 % dans les leucocytes et 41-58 % dans les hématies. Dans le plasma, 90 % environ de la ciclosporine est liée aux protéines, principalement les lipoprotéines (Lemaire, 1982).

Métabolisme :

La ciclosporine est métabolisée à plus de 99% par les cytochromes P450 3A4 et 3A5 (CYP3A4/5) dans la paroi intestinale et au niveau hépatique. Plus de 30 métabolites différents sont formés par hydroxylation (AM1, AM9, AM19), déméthylation (AM4N) et cyclisation (AM1C) (figure 7). Certains métabolites sont actifs, le principal est l'AM1 avec une activité immunosuppressive correspondant à 10-20% de celle de la ciclosporine, suivi de l'AM9 et de l'AM4N (Kapturczak ; 2004).

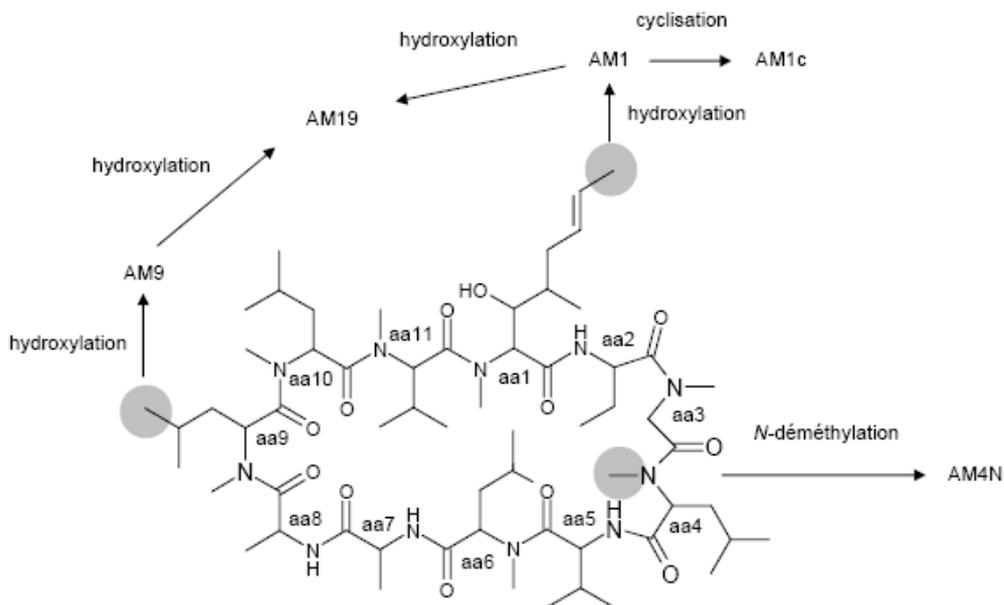


Figure 7 : ciclosporine - principaux sites de métabolisation

Élimination :

L'élimination est essentiellement biliaire avec seulement 6 % de la dose, après administration orale excrétés dans l'urine ; 0,1 % seulement est excrété dans l'urine sous forme de principe actif inchangé.

Après administration orale, l'élimination sanguine est biphasique avec une première phase alfa rapide (temps de demi-vie 1,2 heures), suivie d'une deuxième phase bêta plus longue de 8.4h (de 5 à 18 heures) (Wong, 2001).

3.2 tacrolimus (absorption, distribution, métabolisme, élimination)

Absorption :

L'absorption du tacrolimus est soumise à une grande variabilité interindividuelle ; les études chez l'Homme ont montré qu'il peut être absorbé à tous les niveaux du tractus gastro-intestinal. Après administration orale de gélules de tacrolimus, les concentrations sanguines maximales (C_{max}) de tacrolimus sont atteintes en 0.5 à 4 heures. Chez certains patients, le tacrolimus semble être absorbé de manière continue sur une période prolongée, conduisant à un profil d'absorption relativement plat. La biodisponibilité orale moyenne du tacrolimus est de 27 % (5 à 67%) (Undre, 1999 ; Regazzi 1999 ; Wong 2001)

Distribution :

Dans la circulation systémique, le tacrolimus est fortement lié aux érythrocytes, avec pour résultat un rapport de distribution des concentrations sang total/plasma d'environ 20 pour 1. Dans le plasma, le tacrolimus est fortement lié (> 98,8 %) aux protéines plasmatiques, essentiellement à l'albumine sérique et à l'alfa-1-glycoprotéine acide (Kapturczak et al; 2004).

Le tacrolimus est largement distribué dans l'organisme (Volume de distribution de 5 à 65 l/kg).

Métabolisme :

Le tacrolimus systémique est métabolisé à plus de 99% au niveau hépatique par les CYP3A4/5 (figure 8). Ces isoenzymes sont également présentes au niveau de la paroi intestinale et sont responsables d'une biotransformation présystémique d'environ 50% de la dose. Plusieurs métabolites ont été identifiés, mais un seul présente *in vitro* une activité immunosuppressive similaire à celle du tacrolimus (31-O-déméthyl-tacrolimus), les autres métabolites ne présentant qu'une activité immunosuppressive faible, voire nulle.

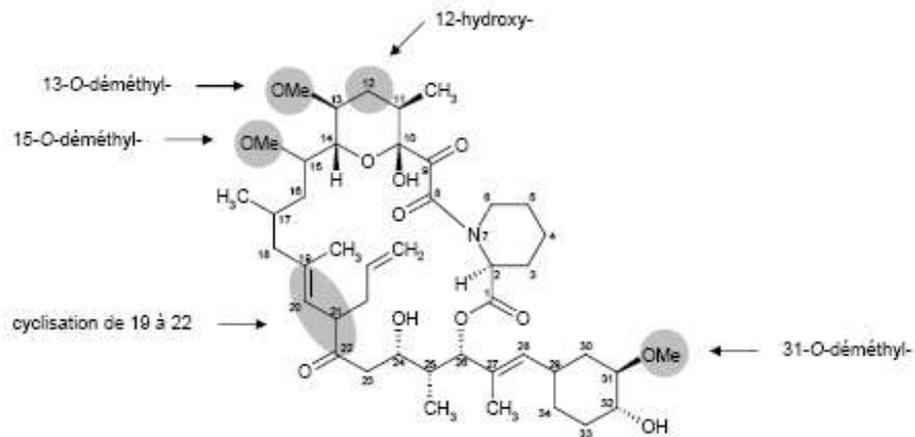


Figure 8 : tacrolimus - principaux sites de métabolisation

Elimination :

Après administration intraveineuse et orale de tacrolimus marqué au ^{14}C , la plupart de la radioactivité est éliminée dans les fèces. Environ 2 % de la radioactivité est éliminée dans les urines. Moins de 1 % du tacrolimus est retrouvé sous forme inchangée dans les urines et les fèces, indiquant que le tacrolimus est presque totalement métabolisé avant d'être éliminé principalement par voie biliaire (Venkataramanan, 1995). La demi-vie du tacrolimus est sujette à une grande variabilité, elle est de 8 à 15 h en moyenne (Venkataramanan, 1995).

3.3 sirolimus

Absorption :

Après administration orale, les concentrations sanguines maximales sont atteintes après 1 à 3 h (Zimmerman & Kahan, 1997). Chez des patients recevant simultanément de la ciclosporine microémulsion, la biodisponibilité du sirolimus est estimée à environ 15% en raison d'un important métabolisme intestinal et hépatique. Dans le sang complet, plus de 95% de la substance est distribuée dans les érythrocytes, 3% dans le plasma, 1% dans les lymphocytes et 1% dans les granulocytes (Trepanier et al, 1998 ; Yatscoff et al, 1995). Dans la fraction plasmatique, environ 2.5% se trouve sous forme libre, le reste étant lié aux protéines (40% aux lipoprotéines).

Métabolisme :

Le sirolimus est un substrat du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4). Le sirolimus est principalement métabolisé par O-déméthylation et/ou hydroxylation (figure 9). Sept métabolites principaux, incluant les dérivés hydroxylés, déméthylés et hydroxydéméthylés, sont identifiables dans le sang total. Le sirolimus est le composé principalement retrouvé dans le sang humain total et il contribue pour plus de 90 % à l'activité immunosuppressive.

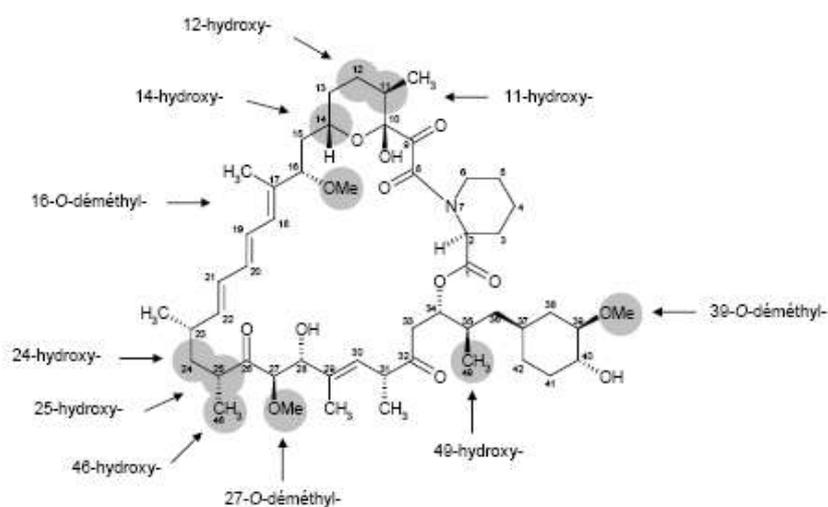


Figure 9 : sirolimus - principaux sites de métabolisation

Elimination :

Après l'administration d'une dose unique de sirolimus marqué au [¹⁴C] chez des volontaires sains, la majorité (91,1 %) de la radioactivité a été éliminée dans les fèces et seule une faible quantité (2,2 %) dans les urines. La demi-vie d'élimination est relativement longue, elle se situe aux alentours de 62 +/- 16 h (Zimmerman & Kahan, 1997).

3.4 évérolimus

Absorption :

L'évérolimus est absorbé rapidement avec des concentrations sanguines maximales atteintes après 1 à 2 h (Kirchner et al, 2000). La biodisponibilité est de 15%. Son volume de distribution est d'environ 1.5 l/kg et une liaison de plus de 75% aux érythrocytes a été rapportée (Kovarik et al, 2001).

Métabolisme :

Cet agent est métabolisé majoritairement par les CYP3A4/5, principalement par déméthylation et hydroxylation. Treize métabolites ont été mis en évidence à partir de microsomes hépatiques humains et une structure a été proposée pour onze d'entre eux. Il s'agit du 46-, 24-, 25-, 12-, 11-, 14- et 49-hydroxy-, du 39-*O*-, 27-*O*- et 16-*O*-déméthyl- ainsi que du 40-*O*-déhydroxyéthyl-évéroliumus, c'est à dire le sirolimus. La formation de ce dernier composé était une voie mineure et ne comptait que pour 5% de tous les métabolites, indiquant que l'évérolimus n'est pas un médicament précurseur du sirolimus. Les sites de métabolisation étaient similaires pour ces deux immunosuppresseurs, mais des différences ont été observées quant aux proportions des différents métabolites formés. Une quantité beaucoup plus faible de 39-*O*-déméthyl- a notamment été observée avec l'évérolimus, alors que ce métabolite était majoritaire pour le sirolimus.

Elimination :

La demi-vie d'élimination est estimée à 24 à 35 h (Neumayer et al, 1999). Les métabolites sont éliminés en majorité par la bile.

4 Suivi thérapeutique pharmacologique

La maîtrise du traitement immunosuppresseur est un élément majeur dans la prévention du rejet après transplantation d'organe. Le suivi thérapeutique consiste en l'adaptation individuelle des posologies sur la base des concentrations sanguines du patient. Sa justification tient au fait que la même dose d'un médicament ne produit pas les mêmes effets chez tous les patients traités et que des relations concentrations sanguines – efficacité ont été établies. Les deux principaux buts de ce suivi sont de diminuer d'une part le taux d'échec thérapeutique lié à une mauvaise observance ou à une dose insuffisante, et d'autre part la fréquence des effets indésirables et/ou toxiques des médicaments liés à une dose excessive.

L'apport du suivi thérapeutique en transplantation s'avère déterminant pour équilibrer les traitements et maîtriser la iatrogénie potentielle ainsi que les nombreuses interactions médicamenteuses.

Sirolimus, évérolimus, tacrolimus, et ciclosporine font l'objet d'une recommandation de suivi thérapeutique pharmacologique dans leur autorisation de mise sur le marché. Ils sont des candidats idéals pour le suivi thérapeutique pharmacologique :

- leur pharmacocinétique présente une grande variabilité intra- et inter-individuelle et leur métabolisation par le CYP 3A4 est susceptible de nombreuses interactions médicamenteuses.
- leur marge thérapeutique est étroite : les concentrations toxiques sont proches des concentrations efficaces. L'efficacité, ainsi que les effets indésirables sont le plus souvent corrélés à l'exposition du patient au médicament.

Cette exposition peut être évaluée, soit par la mesure de l'aire sous la courbe (AUC) des concentrations sanguines en fonction du temps, soit le plus souvent par la mesure de la concentration sanguine résiduelle (concentration sanguine mesurée juste avant la prise médicamenteuse). En effet, la mesure de l'AUC nécessite de réaliser une série de prélèvements sanguins après avoir administré le médicament au patient. Cette série de prélèvement permet de suivre la croissance puis la décroissance des concentrations sanguines de ce médicament en fonction du temps. Mais cette méthode nécessite beaucoup de prélèvements sanguins et impose de mobiliser le patient plusieurs heures. Elle est donc peu adaptée au suivi de routine des patients. L'exposition au traitement immunosuppresseur va cependant pouvoir être appréciée par différentes mesures de concentrations sanguines, telles que la mesure de la concentration résiduelle (C_0) ou de la mesure de la concentration deux heures après la prise du médicament (C_2) pour la ciclosporine.

4.1 ciclosporine

4.1.1 Paramètres à mesurer

Le suivi thérapeutique est traditionnellement effectué d'après la concentration résiduelle (C0) selon les recommandations initiales et en l'absence d'autres recommandations. Cependant, il est actuellement établi que la corrélation entre C0 et l'exposition totale au médicament n'est pas optimale. La mesure de la C2 permet de prédire l'aire sous la courbe des quatre premières heures suivant la prise (AUC_{0-4h}), elle-même considérée comme un bon reflet de l'exposition totale à la ciclosporine (Levy, 2001).

4.1.2 Relation exposition-réponse

Le suivi thérapeutique est justifié par une zone thérapeutique étroite, des variabilités intra- et interindividuelle importantes et par l'existence de relations concentration/effet et concentration/toxicité. Par ailleurs, les traitements associés sont à l'origine de nombreuses interactions médicamenteuses. Il est actuellement établi que la valeur prédictive du C₀ dans la survenue d'un rejet aigu et de néphrotoxicité est limitée (Kahan et al, 2002). L' AUC_{0-4h} est un marqueur pertinent du rejet aigu ou chronique (Levy et al, 2002).

4.1.3 Concentrations efficaces (Marquet, 2004)

Les concentrations efficaces vont dépendre de l'indication (greffe rénale, hépatique, moelle osseuse) (tableau 2), du délai post greffe (tableau 3), et du temps de prélèvement (C0, C2) (tableau 4).

Type de transplantation	Phase aiguë (ng/ml)	A long terme (ng/ml)
Cardiaque	250-350	1250-200
Hépatique	250-350	100-200
Rénale	150-300	75-150
Pulmonaire	220-320	140-220

Tableau 2 : ciclosporine - zone thérapeutique de la concentration résiduelle (C0) en fonction de l'indication

Délai post transplantation (jours)	Concentration cible (ng/ml)	Zone cible (ng/ml)
1 à 14	300	200-400
15 à 42	250	150-350
43 à 84	200	125-275
85 à 182	150	100-200
183 à 365	120	100-150
>365	100	75-150

Tableau 3 : ciclosporine - évaluation en fonction du temps écoulé depuis la greffe de la zone thérapeutique de la concentration résiduelle (C0) après transplantation rénale

Type de transplantation	Délai post greffe (mois)	Valeurs de C2 recommandées (ng/ml)	Zone cible (ng/ml)
Hépatique	0-6	1000	800-1200
	6-12	800	640-960
	>12	600	480-720
Rénale	1	1700	1360-2040
	2	1500	1200-1800
	3	1300	1040-1560
	4-6	1100	880-1320
	7-12	900	720-1080
	>12	800	640-960

Tableau 4 : ciclosporine - zone thérapeutique de la concentration à 2 heures en fonction du délai et de l'indication.

4.2 tacrolimus

4.2.1 Paramètres à mesurer

Tout comme la ciclosporine, le dosage de la concentration résiduelle (C_0) de tacrolimus est la pratique la plus courante. Plusieurs études montrent une bonne corrélation entre cette concentration et l'AUC (Kahan et al, 2002).

4.2.2 Relation exposition-réponse

Chez les patients transplantés, une bonne corrélation a été mise en évidence entre la concentration résiduelle (C_0), l'efficacité et la toxicité du tacrolimus. Des concentrations supérieures à 25ng/ml sont clairement associées avec une augmentation du risque de néphrotoxicité. Contrairement à la toxicité, la relation entre efficacité et concentration résiduelle est plus controversée (Kahan et al, 2002). Une corrélation positive entre de faibles concentrations plasmatiques dans la période post-transplantation immédiate et le rejet aigu a été mise en évidence (Undre et al, 1999).

4.2.3 Concentrations efficaces

En pratique clinique, les concentrations résiduelles sur sang total sont généralement comprises entre 5 à 20 ng/ml chez les transplantés hépatiques et 10 à 20 ng/ml chez les transplantés rénaux et cardiaques dans la période post-transplantation immédiate. Au cours du traitement d'entretien, les concentrations sanguines sont généralement comprises entre 5 à 15 ng/ml chez les transplantés hépatiques, rénaux et cardiaques.

4.3 sirolimus

4.3.1 Paramètres à mesurer

Pour le sirolimus, La mesure de la concentration résiduelle (C_0) est un bon reflet de l'AUC de ce médicament (Kahan et al, 2002).

4.3.2 Relation exposition-réponse

L'AUC et donc la concentration résiduelle sont aussi bien corrélées avec l'efficacité (diminution de la fréquence et de la sévérité des épisodes de rejet aigu) qu'avec la toxicité de la molécule (Kahan et al. 2000)

4.3.3 Concentrations efficaces

Le Résumé des Caractéristiques du Produit préconise les concentrations résiduelles suivantes (tableau 5) :

Type de transplantation	Période post-transplantation (mois)	Valeur cible de C_0 (ng/ml)	Commentaires
rénale	0-3	4 à 12	En association avec de la ciclosporine
	Après 3 mois	12 à 20	Réduction progressive puis l'arrêt de la ciclosporine

Tableau 5 : sirolimus - concentration cible de sirolimus après une greffe rénale

Les intervalles thérapeutiques sont définis en fonction des doses de ciclosporine associées (tableau 6).

Type de transplantation	Réduction des doses de ciclosporine	Valeur cible de C_0 (ng/ml)
rénale	30%	5 à 10
	60%	10 à 15
	100%	>20

Tableau 6 : sirolimus-concentration cible en fonction des doses de ciclosporine

Etant donnée la longue demi-vie de ce médicament (60 heures), les dosages doivent être réalisés cinq jours après l'adaptation de posologie.

4.4 évérolimus

4.4.1 Paramètres à mesurer

La mesure de la concentration résiduelle est un bon reflet de l'exposition totale de ce médicament.

4.4.2 Relation exposition-réponse :

Une relation a été établie (tableau 7) entre la concentration résiduelle moyenne d'évérolimus au cours des 6 premiers mois suivant la transplantation et l'incidence du rejet aigu confirmé par biopsie et des thrombocytopénies chez les patients transplantés rénaux et cardiaques (Kovarik et al, 2002 ; Kovarik et al, 2003 ; Starling et al, 2004)

Transplantation rénale :					
C ₀ (ng/ml)	<3,4	3,5-4,5	4,6-5,7	5,8-7,7	7,8-15,0
Absence de rejet	68 %	81 %	86 %	81 %	91 %
Thrombocytopénie ($< 100 \times 10^9/l$)	10 %	9 %	7 %	14 %	17 %

Transplantation cardiaque :					
C ₀ (ng/ml)	<3,5	3,6-5,3	5,4-7,3	7,4-10,2	10,3-21,8
Absence de rejet	65 %	69 %	80 %	85 %	85 %
Thrombocytopénie ($< 75 \times 10^9/l$)	5 %	5 %	6 %	8 %	9 %

Tableau 7 : évérolimus - efficacité et effet indésirable hématologique en fonction des concentrations sanguines

4.4.3 Concentrations efficaces

Les marges thérapeutiques recommandées se situent entre 3 et 8 ng/ml (C₀).

5 Effets indésirables

5.1 Inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine et tacrolimus)

5.1.1 Effets communs aux deux molécules

Les deux médicaments sont associés à une néphrotoxicité concentration-dépendante de deux types se manifestant par une insuffisance rénale aiguë, réversible, dose-dépendante, pouvant simuler une crise de rejet chez le transplanté rénal, puis par une néphrotoxicité chronique avec fibrose interstitielle.

L'hypertension, en partie secondaire à la toxicité rénale, est une conséquence fréquente de l'utilisation de cette classe de médicaments et serait moins importante sous tacrolimus.

Des troubles neurologiques, peuvent survenir le plus souvent en début de traitement. Ces derniers, plus fréquents et parfois plus graves avec le tacrolimus ; ils se manifestent sous forme de tremblements des extrémités, de paresthésies et plus rarement de crises convulsives (Bechstein, 2000).

Du fait de l'immunosuppression au long cours, les patients sont plus susceptibles de développer des syndromes lymphoprolifératifs et des tumeurs cutanées.

5.1.2 ciclosporine

- Hépatotoxicité : hépatites cholestatiques (rares et réversibles à l'arrêt du traitement)
- Troubles électrolytiques : hyperuricémie (45 à 80 %) avec possibilité de crises de goutte, hyperkaliémie
- Hirsutisme (30 %), gynécomastie (4%)
- Hyperplasie gingivale, vomissements, oedèmes du visage,

5.1.3 tacrolimus

- Hyperglycémie (40 %) voir diabète induit.
- Effets cardio-vasculaires : HTA (40 %), tachycardie, oedèmes, cas isolés d'insuffisance cardiaque
- Troubles électrolytiques : hyperuricémie, hyperkaliémie

5.2 Inhibiteurs de la mTOR (sirolimus et évérolimus)

En raison des similitudes au niveau de leur structure chimique et de leur mode d'action, les effets secondaires du sirolimus et de l'évérolimus sont assez comparables. Les plus fréquents sont des troubles du métabolisme lipidique (hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie) et des effets indésirables hématologiques (anémie, leucopénie, thrombopénie), concentration-dépendants et réversibles.

6 Interactions

6.1 Inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine et tacrolimus)

La ciclosporine et le tacrolimus sont métabolisés au niveau hépatique et intestinal par le CYP 3A4. Les inhibiteurs de ces enzymes augmentent donc les concentrations sanguines, alors que les inducteurs les diminuent. De même, au niveau des entérocytes, la ciclosporine et le tacrolimus sont des substrats de la P-gp, produit du gène mdr-1 (multidrug resistance-1) et responsable de l'efflux de nombreux xénobiotiques. Leur biodisponibilité peut donc être modifiée par toutes les substances interagissant avec la P-gp.

6.1.1 Les médicaments à l'origine d'une interaction pharmacocinétique

→ Par inhibition du métabolisme hépatique et donc augmentation des concentrations sériques.

L'inhibition enzymatique est un processus rapide (24 heures) qui débute dès que l'inhibiteur a atteint une concentration critique. Les conséquences de l'interaction apparaissent dans les trois à cinq jours suivant l'introduction de l'inhibiteur. La disparition de l'inhibition survient dès l'élimination de l'inhibiteur et dépend de sa demi-vie. Les principaux inhibiteurs enzymatiques sont :

- les macrolides (érythromycine, clarithromycine, josamycine, midécamycine ou roxithromycine).
- les antiprotéases (amprénavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir ou saquinavir) ;
- les antifongiques azolés (fluconazole, itraconazole ou kétoconazole) ;
- les antagonistes calciques (nicardipine, diltiazem ou vérapamil) ;
- l'amiodarone, la méthylprednisolone ;
- les inhibiteurs de la pompe à protons ;
- le jus de pamplemousse, qui lors d'une administration parentérale influence peu les concentrations sanguines, suggérant une interaction sur les enzymes intestinales.

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 la concentration sanguine à deux jours, puis de réadapter. De même, à l'arrêt de l'inhibiteur, il est conseillé de doubler la dose, de contrôler la concentration à deux jours, puis de réadapter.

→ Par induction du métabolisme hépatique et donc baisse des concentrations sériques.

L'induction enzymatique est un processus progressif. Il faut attendre quelques jours à quelques semaines pour que les concentrations plasmatiques de l'inducteur se situent dans une zone d'efficacité inductive, afin que la synthèse des enzymes hépatiques soit stimulée et que les

concentrations sanguines du médicament cible soient diminuées. Selon l'inducteur, le premier effet détectable débute à trois–sept jours et l'effet maximal est atteint en 2 à 3 semaines. L'induction enzymatique disparaît aussi progressivement en 2 à 4 semaines, selon la vitesse d'élimination de l'inducteur, la durée de vie des enzymes induites et la normalisation des concentrations sanguines du médicament cible. Les principaux inducteurs enzymatiques sont :

- les anticonvulsivants (carbamazépine, phénobarbital, fosphénytoïne, phénytoïne, primidone, topiramate ou felbamate) ;
- la rifampicine, la rifabutine, l'éfavirenz ou la névirapine ;
- les dérivés du millepertuis (*Hypericum perforatum*),

→ Par réduction de la biodisponibilité (diminution de l'absorption intestinale) : orlistat (Xénical[®]), octréotide, lanréotide ou certaines herbes médicinales comme le Saint-John's-Wort.

6.1.2 Les médicaments à l'origine d'une interaction pharmacodynamique

Il s'agit principalement d'une synergie des effets néphrotoxiques, à l'origine d'une augmentation secondaire des concentrations de ciclosporine, comme avec les aminosides, l'amphotéricine B, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (surtout chez le sujet âgé), le méthotrexate ou les diurétiques thiazidiques.

Il peut s'agir également d'une potentialisation des effets immunosuppresseurs, comme avec l'azathioprine, les substances cytotoxiques ou les globulines antilymphocytaires.

C'est le cas enfin de l'exacerbation de certains effets secondaires, comme la gingivopathie hypertrophique avec la nifédipine ou de l'hyperkaliémie avec les diurétiques épargneurs de potassium. La ciclosporine augmente les effets indésirables neuromusculaires de la colchicine et les effets secondaires (réduction de la tolérance aux glucides et manifestations cutanées au long cours) des corticoïdes, dont la prednisolone.

6.2 Inhibiteurs de la mTOR (sirolimus et évérolimus)

Le sirolimus et l'évérolimus sont eux aussi métabolisés par le CYP 3A4. Ils sont donc soumis, comme pour la ciclosporine et le tacrolimus, aux interactions par les inhibiteurs et inducteurs enzymatiques.

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. Elle peut être minimisée en

maintenant un délai de quatre heures entre les prises de chacun. Par ailleurs, le sirolimus et la ciclosporine peuvent cumuler leurs effets immunosuppresseurs et leur toxicité par interaction pharmacodynamique. Ainsi, l'hyperlipidémie et les troubles hématologiques rapportés sous sirolimus sont plus fréquents et plus marqués en association avec la ciclosporine. De même, la néphrotoxicité et l'hypertension associées à la ciclosporine sont exacerbées par l'administration de sirolimus. C'est pourquoi, l'association des deux médicaments n'est recommandée que pendant trois mois, la ciclosporine devant être progressivement arrêtée.

À l'arrêt de la ciclosporine, les concentrations de sirolimus diminuent, à moins d'augmenter la posologie du sirolimus (Mégabarne & Kontar, 2006).

Matériels et méthodes

1 Techniques de dosage des immunosuppresseurs.

Les immunosuppresseurs représentent des classes médicamenteuses pour lesquelles l'apport du suivi thérapeutique s'est révélé incontournable pour équilibrer les traitements et maîtriser la iatrogénie potentielle ainsi que les nombreuses interactions médicamenteuses. D'abord cantonnée à des méthodes de dosages immunologiques, la détermination des concentrations sanguines s'est aujourd'hui ouverte à des méthodes chromatographiques.

Les prélèvements :

Du fait de l'importante distribution de ces molécules dans les érythrocytes, le dosage est réalisé sur sang total. Le prélèvement (3ml en général) est recueilli à l'intérieur d'un tube collecteur contenant un anticoagulant (EDTA).

1.1 Techniques immunologiques :

Les immunodosages 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).

1.1.1 ciclosporine

De nombreux immunodosages utilisant des anticorps anti-ciclosporine sont commercialisés pour la mesure des concentrations sanguines de ciclosporine (tableau 8) :

Appellation	Méthode	Anticorps	Laboratoire
FPIA TDx mono	Fluorescence Polarisation ImmunoAssay	Monoclonaux	Abbott
FPIA AxSYM	Fluorescence Polarisation ImmunoAssay	Monoclonaux	Abbott
RIA CYCLO-Trac sp	RadioImmunoAssay	Monoclonaux	DiaSorin
Immunotech cyclosporin Direct RIA	RadioImmunoAssay	Monoclonaux	Immunotech
CEDIA PLUS	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique	Monoclonaux	Microgenics
EMIT	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique	Monoclonaux	Siemens
ACMIA	Antibody Conjugated Magnetic ImmunoAssay	Monoclonaux	Siemens

Tableau 8 : ciclosporine - méthodes immunologiques de dosage

Parmi ces techniques, deux ont été retirées du marché du fait du fort manque de sélectivité et d'une forte réactivité croisée avec les métabolites. Il s'agit du FPIA TDx poly (Abbott) qui utilise des anticorps polyclonaux reconnaissant la ciclosporine et ses métabolites et du RIA Cyclo-Trac-ns (Diasorin) qui utilise des anticorps monoclonaux non sélectifs. Les autres immunoessais dits "sélectifs" comportent néanmoins un certain degré de réactivité croisée, variable selon la technique.

La technique utilisée au CHU de Nantes est : RIA CYCLO-Trac sp (en gras dans le tableau)

Principe biologique de la méthode :

Le dosage radioimmunologique de la ciclosporine A est un dosage par compétition. Les échantillons à doser, les contrôles et les calibrateurs sont incubés dans des tubes recouverts d'anticorps monoclonaux. Le traceur (ciclosporine marqué à l'iode 125 (^{125}I)) est ensuite ajouté. Après incubation, le contenu des tubes est vidé par aspiration, puis la radioactivité est mesurée. La quantité de radioactivité est inversement proportionnelle à la concentration en ciclosporine A. Une courbe d'étalonnage est établie. Les valeurs inconnues sont déterminées par interpolation à l'aide de cette courbe.

1.1.2 tacrolimus :

Plusieurs techniques ont été développées pour le dosage du tacrolimus dans le sang (tableau 9).

Appellation	Méthode	Laboratoire
MEIA IMx II	Microparticle Enzyme-linked ImmunoAssay	Abbott®
EMIT	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique	Siemens®
ACMIA	Antibody Conjugated Magnetic ImmunoAssay	Siemens®
ELISA PRO-Trac II	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	DiaSorin®
CMIA Architect	Chemiluminescent automated Assay	Abbott®

Tableau 9 : tacrolimus - méthodes immunologiques de dosage

La technique utilisée au CHU de Nantes est la méthode MEIA IMx II. La technique est réalisée sur un automate de dosage : IMx (Abbott®) (en gras dans le tableau).

Principe biologique de la méthode :

Avant l'initialisation de la procédure de dosage automatisée sur l'IMx, une étape de prétraitement manuel est effectuée, au cours de laquelle l'échantillon de sang total est extrait à l'aide d'un réactif de précipitation, puis centrifugé. Le surnageant est transféré dans le puit échantillon.

Les réactifs et l'échantillon sont alors ajoutés par l'automate dans la cellule de réaction dans l'ordre suivant :

- Echantillon
- Microparticules recouvertes d'anticorps anti-tacrolimus
- Conjugué tacrolimus marqué à la phosphatase alcaline

Le tacrolimus et le conjugué entrent en compétition pour se lier aux microparticules et former des complexes. Une fraction aliquote du mélange réactionnel est alors transférée sur la matrice en fibre de verre. Les microparticules s'y lient de manière irréversible. La matrice est lavée pour éliminer les produits non liés.

Le substrat de la phosphatase alcaline (phosphate de méthyl-4-ombelliféryl) est ajouté sur la matrice, le produit fluorescent est alors mesuré. La quantité de fluorescence mesurée est inversement proportionnelle à la quantité de tacrolimus présent. Une courbe d'étalonnage est établie. Les valeurs inconnues sont déterminées par interpolation à l'aide de cette courbe.

1.1.3 sirolimus

Deux immunodosages sont à ce jour commercialisés (tableau 10) :

Appellation	Méthode	Laboratoire
MEIA IMx II	Microparticle Enzyme-linked ImmunoAssay	Abbott
CMIA Architect	Chemiluminescent automated ImmunoAssay	Abbott

Tableau 10 : sirolimus - méthodes immunologiques de dosage

Au CHU de Nantes, la technique utilisée est le dosage MEIA IMx II, basé sur la technologie immunoenzymatique microparticulaire (en gras dans le tableau).

Principe biologique de la méthode :

Avant l'initialisation de la procédure de dosage automatisée sur l'IMx, une étape de prétraitement manuel est effectuée, au cours de laquelle l'échantillon de sang total est extrait à l'aide d'un réactif de précipitation, puis centrifugé. Le surnageant est transféré dans le puit échantillon.

Les réactifs et l'échantillon sont alors ajoutés par l'automate dans la cellule de réaction dans l'ordre suivant :

- Echantillon
- Microparticules recouvertes d'anticorps
- Conjugué sirolimus marqué à la phosphatase alcaline

Le sirolimus et le conjugué entrent en compétition pour se lier aux microparticules et former des complexes. Une fraction aliquote du mélange réactionnel est alors transférée sur la matrice en fibre de verre. Les microparticules s'y lient de manière irréversible. La matrice est lavée pour éliminer les produits non liés. Le substrat (phosphate de méthyl-4-ombelliféryl) est ajouté sur la matrice, le produit fluorescent est alors mesuré. La quantité de fluorescence mesurée est inversement proportionnelle à la quantité de sirolimus présent. Une courbe d'étalonnage est établie. Les valeurs inconnues sont déterminées par interpolation à l'aide de cette courbe.

1.1.4 évérolimus

Un seul immunodosage (tableau 11) est actuellement disponible pour le dosage sanguin de l'évérolimus, il s'agit d'une technique FPIA réalisée sur l'automate TDxFLx (Abbott®)

Appellation	Méthode	Laboratoire
INNOFLUOR CERTICAN	Fluorescence Polarization ImmunoAssay	Seradyn

Tableau 11 : évérolimus - méthode immunologique de dosage

Principe biologique de la méthode :

Avant de procéder au dosage automatique, une étape de prétraitement de l'échantillon doit être réalisée : précipitation de l'échantillon à l'aide de méthanol et du réactif précipitant puis centrifugation. Le surnageant est alors transféré dans la cupule réactionnelle de l'appareil.

Le système de dosage INNOFLUOR® CERTICAN®, dosage immunologique par polarisation de fluorescence (FPIA), repose sur le principe de compétition. L'évérolimus (l'antigène) présent dans l'échantillon entre en compétition avec l'évérolimus marqué à la fluorescéine (traceur). La révélation du complexe antigène-anticorps est basée sur la différence de rotation de la lumière induite par la forme libre ou liée de la molécule marquée. À l'état libre, la molécule marquée tourne librement et rapidement induisant une polarisation faible. Lorsqu'il n'y a pas de molécule à doser, la molécule marquée se fixe sur l'anticorps, formant une grosse molécule à rotation faible, induisant une polarisation élevée de la lumière incidente.

1.2 Techniques chromatographiques :

1.2.1 ciclosporine

1.2.1.1 HPLC/UV

De nombreuses méthodes HPLC/UV ont été développées pour le dosage de la ciclosporine depuis 1981. La sensibilité de cette technique est suffisante pour quantifier cette molécule dans le sang total en raison de la présence de concentrations relativement élevées (100 à 1500 ng/ml selon le moment de prélèvement). Certaines méthodes permettent également de quantifier les principaux métabolites. La préparation des échantillons est réalisée principalement par extraction en phase solide (SPE) off-line et également par extraction liquide/liquide ou injection directe de l'échantillon après une simple précipitation des protéines. Les limites de quantification se situent entre 15-100 ng/ml et les temps de séparation chromatographique entre 6 et 60 minutes. La large amplitude des concentrations sanguines de ciclosporine peut conduire à des problèmes de linéarité. La plupart des méthodes n'étendaient pas leur intervalle de dosage aux hautes concentrations, c'est à dire à celles rencontrées lors des prélèvements effectués à C₂ ce qui nécessite une dilution de certains échantillons (Sawchuk & cartier, 1981 ; Khoschorur et al, 1997 ; Brozmanova et al, 2000).

1.2.1.2 LC/MS et LC/MS-MS

Une meilleure sélectivité ainsi qu'une limite de quantification plus basse sont obtenues à l'aide de méthodes par LC-MS et surtout LC-MS/MS. La simplification des préparations d'échantillon et les temps de séparation chromatographique raccourcis permettent une utilisation en routine de ces techniques. De telles méthodes ont été développées pour le dosage de la ciclosporine dans le sang complet, incluant dans certains cas les métabolites principaux, avec des techniques de préparation de l'échantillon par SPE off-line, extraction liquide-liquide (LLE) off-line ou injection directe. Les limites de quantification se situent entre 1 et 10 ng/ml et les temps d'analyse entre 2 et 20 minutes (Magni et al, 2001 ; Vollenbroeker et al, 2005 ; Zhou et al, 2001 ; Taylor et al, 1998 ; Salm et al, 2005 ; Keevil et al, 2002).

1.2.2 tacrolimus

1.2.2.1 Méthode HPLC/UV

Le tacrolimus ne possède pas de chromophore, il n'est par conséquent pas possible de le quantifier à l'aide d'une méthode par HPLC-UV.

1.2.2.2 HPLC/Fluorimétrie

Une méthode de chromatographie liquide a été proposée comprenant une étape d'extraction et de dérivation avec une limite de quantification de 3ng/ml ; technique longue, de sensibilité insuffisante, non adaptée au dosage quotidien de cette molécule (Beysens et al, 1994).

1.2.2.3 LC/MS

En raison des faibles concentrations sanguines résiduelles (5 à 20 ng/ml), le dosage du tacrolimus nécessite une méthode permettant d'atteindre des limites de quantification assez basses, qui peuvent être atteintes par la LC-MS. Plusieurs méthodes sont disponibles avec la possibilité de quantifier les métabolites dans certains cas.

Des préparations de l'échantillon par SPE off-line manuelles ou automatisées ont été utilisées. Les limites de quantification atteintes sont proches de 0.25ng/ml (Gonschior et al, 1995 ; Lensmeyer & Poquette, 2001 ; Chistians et al, 1992).

1.2.2.4 LC/MS-MS

Plusieurs méthodes de dosage par LC-MS/MS ont été développées avec des techniques de préparation de l'échantillon variées : extraction liquide/liquide, extraction en phase solide off-line et on-line des constituants. Les temps de séparation chromatographique vont de 1.5 à 4 minutes. Les limites de quantification sont de l'ordre de 0.1 à 0.2 ng/ml (Alak et al 1997 ; Zhang et al, 1997; Chen et al, 2006; Taylor et al, 1997).

1.2.3 sirolimus

1.2.3.1 HPLC/UV

De très nombreuses méthodes par HPLC/UV ont été développées pour le dosage sanguin du sirolimus. Les faibles concentrations sanguines résiduelles (5 à 20 ng/ml) et la sensibilité relativement limitée de la HPLC/UV, impliquent un processus d'extraction souvent complexe. Des techniques de préparation de l'échantillon par extraction liquide/liquide ou extraction en phase solide ont été utilisées. Les volumes d'échantillons requis pour ces méthodes étaient assez élevés (0.5 à 2 ml) et les temps d'élutions relativement longs (10 à 35 minutes). Les limites de quantification étaient satisfaisantes (1 à 2.5 ng/ml) (Yatscoff et al 1992 ; Napoli & Kahan, 1994 ; Holt et al, 2000 ; Campanero et al, 2004 ; Cattaneo *et al*, 2002).

1.2.3.2 LC/MS

La mise au point de techniques par LC/MS présente l'intérêt d'une plus grande sélectivité et la possibilité d'atteindre des limites de quantification plus basses (0.25 ng/ml), tout en utilisant des volumes d'échantillons plus faibles (100 µl). Les préparations d'échantillons peuvent être simplifiées (SPE off-line ou on-line) et les temps d'analyse raccourcis (6 à 12 minutes). Une quantification des quatre métabolites principaux du sirolimus est également possible avec ces méthodes (Streit et al, 1996 ; Kirchner et al, 2001).

1.2.3.3 LC/MS-MS

Plusieurs méthodes par LC-MS/MS existent également avec les techniques de préparation de l'échantillon suivante : liquide/liquide, SPE off-line, un système à commutation de colonnes et une injection directe. Les temps de séparation chromatographique sont compris entre 2.5 à 10 minutes et les limites de quantification sont de 0.25 à 1 ng/ml (Pieri et al, 2005 ; Voseger et al, 2002 ; Wallemacq et al, 2003).

1.2.4 évérolimus

1.2.4.1 HPLC/UV

D'introduction plus récente en clinique, seules deux méthodes par HPLC/UV ont été publiées pour le dosage de l'évérolimus, l'une avec une préparation de l'échantillon en extraction liquide/liquide et l'autre par SPE off-line. Les durées d'analyse vont de 13 à 15 minutes et les limites de quantification de 1 à 2 ng/ml. (Boudennaia &, Napoli, 2005 ; Balbelli et al, 2005)

1.2.4.2 LC/MS et LC/MS-MS

Le couplage de la chromatographie liquide à un spectromètre de masse convient mieux à ce dosage en raison des très faibles concentrations sanguines mesurées (3 à 8 ng/ml). Quelques méthodes de ce type ont été développées avec une préparation de l'échantillon par SPE off-line ou injection directe. Les temps de séparation chromatographique vont de 2.8 à 16 minutes et les limites de quantification sont comprises entre 0.1 et 1 ng/ml (Segarra et al, 1998 ; Salm et al, 2002 ; Korecka et al, 2006)

1.2.5 La technique chromatographique utilisée au CHU de Nantes pour le dosage des immunosuppresseurs.

Le dosage chromatographique simultané des immunosuppresseurs (sirolimus, tacrolimus évérolimus, ciclosporine) est réalisé en LC/MS-MS avec SPE on-line après une étape de déprotéinisation manuelle des échantillons (Koal et al, 2004).

Les prélèvements sont recueillis sur tube EDTA. Le dosage est réalisé sur sang total. En effet, les immunosuppresseurs sont quantifiés dans le sang total, en raison d'une grande distribution dans les érythrocytes. Du point de vue analytique, les concentrations plus élevées rencontrées dans le sang total que dans le plasma permettent une quantification plus aisée.

1.2.5.1 Préparation des échantillons (patients, gamme et contrôle)

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. La composition de ce réactif de précipitation est la suivante : Méthanol + Sulfate de Zinc 0,04 M. Ce réactif contient en outre les étalons internes : Desméthoxyrapamycine (50ng/ml) Ascomycine (20ng/ml) et Ciclosporine D (200ng/ml) .

La procédure de préparation de l'échantillon est la suivante :

- Dans un tube Eppendorf® de 2 ml, placer 100 µl de sang complet et ajouter 200 µl du mélange méthanol/ZnSO₄ 0,04 M, puis vortexer 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 15 minutes à 15000 tour par minutes.
- Transférer environ 150 µl de surnageant dans un flacon d'injection prévu pour l'analyse par LC/MS-MS.

1.2.5.2 Extraction On-line et chromatographie

Cette technique nécessite des vannes de commutation et deux pompes de chromatographie.

Les étapes suivantes se succèdent :

- Chargement et purification de l'échantillon sur la colonne d'extraction.
- Transfert de l'échantillon sur la colonne séparative

-Séparation et détection

→Chargement et purification de l'échantillon sur la colonne d'extraction (figure 10).

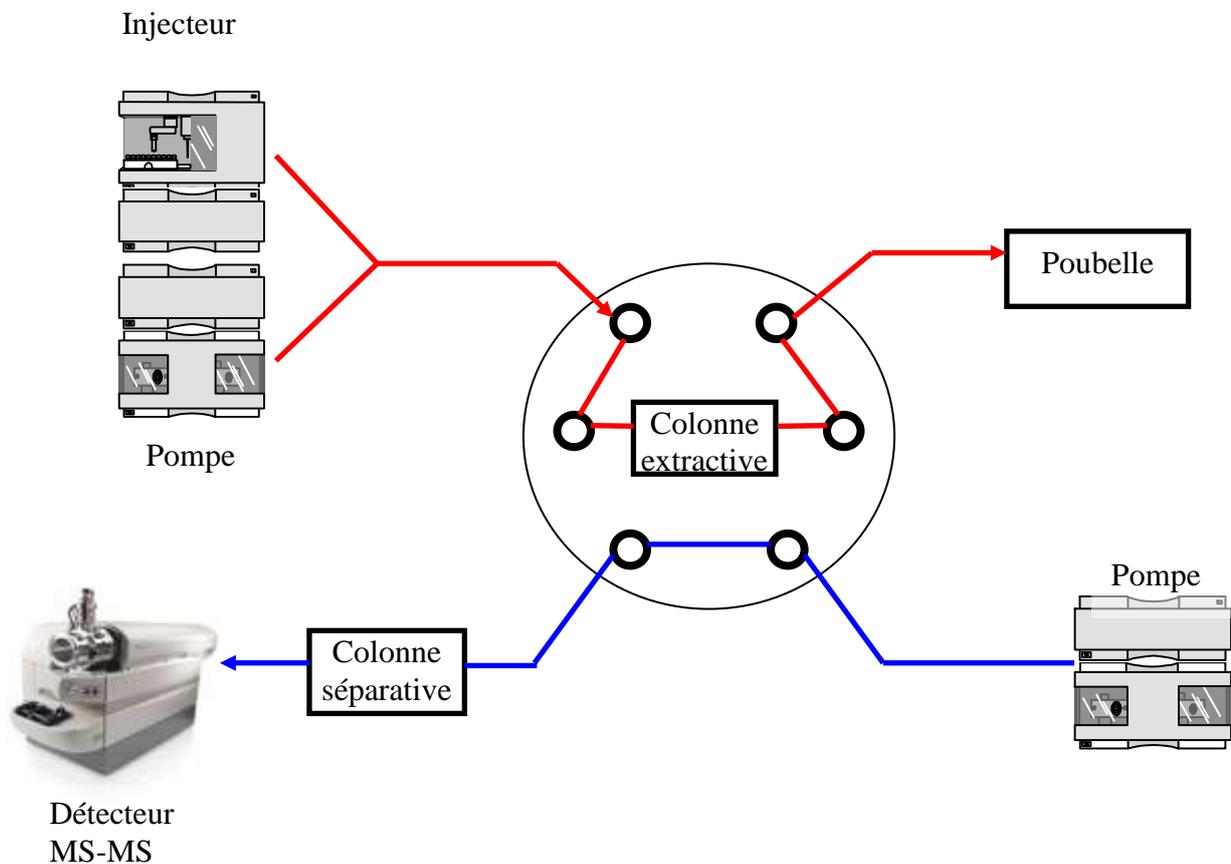


Figure 10 : Chargement et purification de l'échantillon

Le chargement et la purification de l'échantillon se font sur une colonne préparative : POROS R1/20 μ m 2.1x30mm (Applied Biosystems[®]). La première étape consiste en un lavage de l'échantillon. Cette colonne présente une forte rétention des substances hydrophiles et lipophiles. De plus, l'association de la granulométrie importante de la colonne (20 μ m) et le fort débit de la phase mobile (2700 μ l/min) permettent l'élution des grosses biomolécules, des minéraux et la rétention des substances à quantifier.

En résumé : après injection de l'échantillon (25 μ l), 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 (ligne rouge).

Pendant cette étape a lieu également l'équilibrage de la colonne analytique (ligne bleue).

Cette première étape dure 1 minute et 12 secondes. La composition de la phase mobile est : méthanol/eau 90/10 (v/v).

→ Transfert de l'échantillon sur la colonne séparative (figure 11).

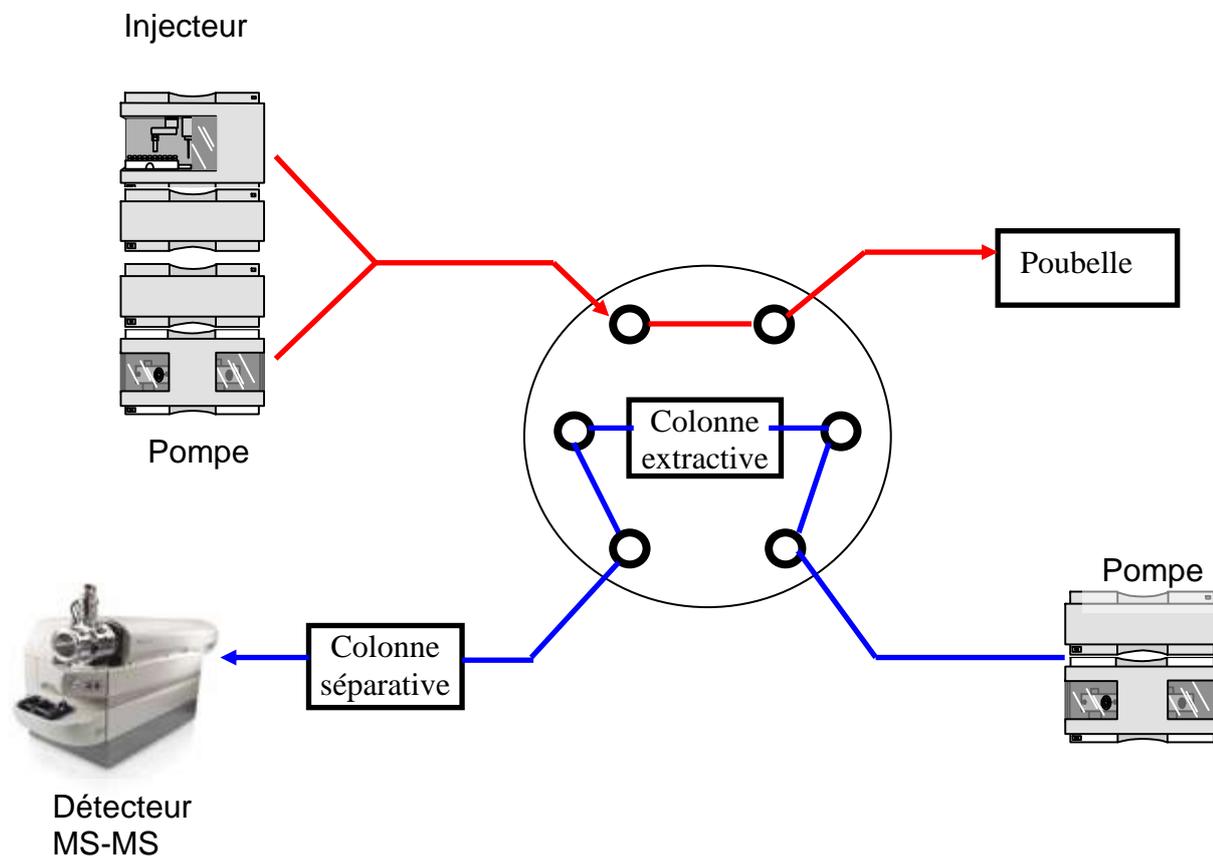


Figure 11 : transfert de l'échantillon sur la colonne séparative

Après la phase de purification de l'échantillon, la vanne de commutation, permet d'éluer les composés de la colonne préparative vers la colonne analytique (LUNA Phenyl hexyl 5 μ m, 2x50mm Phenomenex[®]). Ce transfert est effectué à contre-courant (back-flush) en mode isocratique. La phase mobile est composée de méthanol (97%) et d'un tampon acétate d'ammonium (3%). Le débit utilisé est de 300 μ l/min. Cette étape dure 2 minutes.

En résumé, après changement de configuration du système, les analytes sont transférés en flux inverse de la colonne d'extraction sur la colonne analytique.

→ Séparation et détection (figure 12)

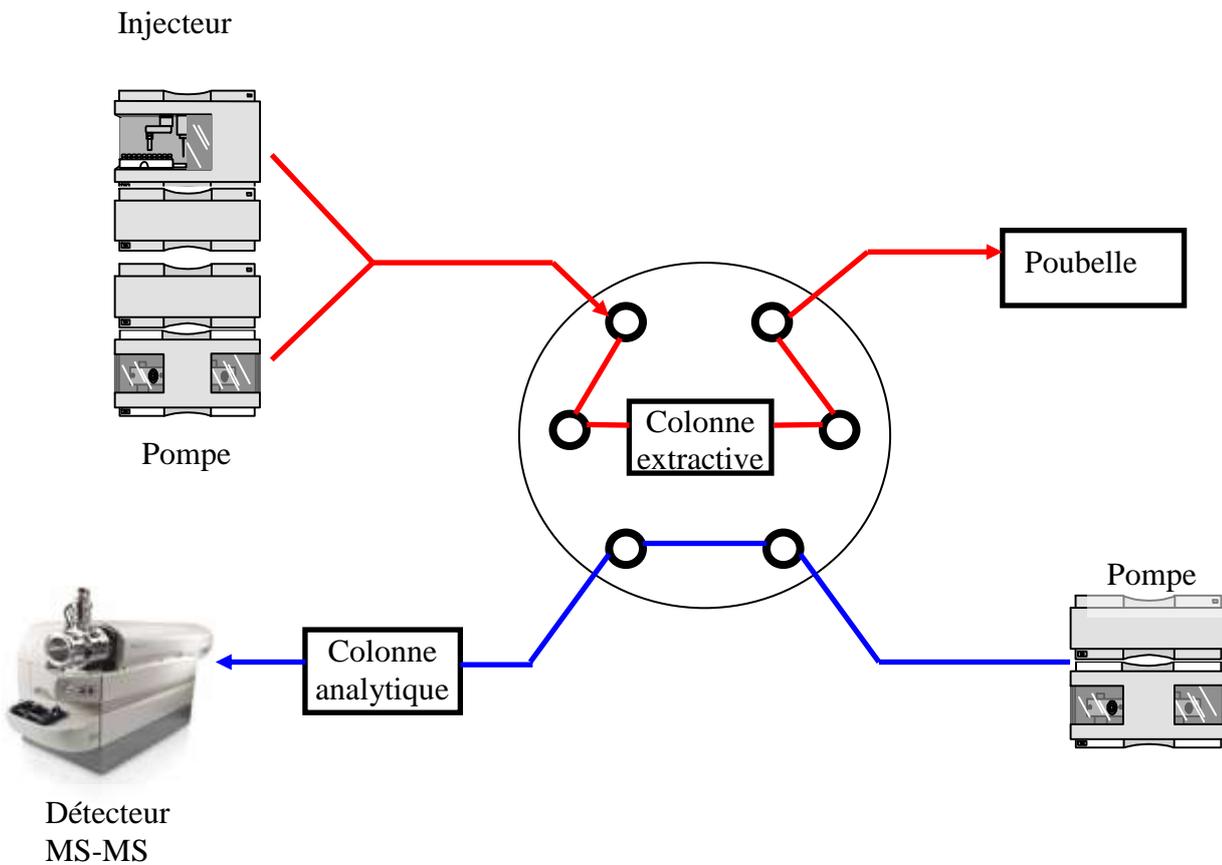


Figure 12 : séparation et détection.

Après retour du système dans sa configuration de départ, les analytes sont séparés, sur la colonne analytique, et transférés vers le spectromètre de masse. Pendant ce temps, la colonne d'extraction est lavée et rééquilibrée.

La détection est effectuée à l'aide du spectromètre de masse Applied Biosystems® 3200 QTRAP constitué d'une source électrospray couplée à un analyseur à triple quadripôles en série et utilisé en mode MRM.

Les temps de rétention et les transitions du spectromètre de masse sont (tableau 12) :

	Molécules	Temps de rétention (en minutes)	Transitions du spectromètre de masse
Analytes	sirolimus	2.48	931.6/864.6
	évérolimus	2.47	975.5/908.4
	tacrolimus	2.43	821.4/768.2
	ciclosporine A	2.61	1202.7/425.2
Etalons internes	desmethoxyrapamycine	2.48	901.5/816.4
	ascomycine	2.40	809.5/756.6
	ciclosporine D	2.66	1216.7/425.2

Tableau 12 : temps de rétention et transition des molécules.

La durée totale de l'analyse est de 5 minutes.

Pour chaque analyte une gamme et des contrôles sont préparés. Gamme et contrôle sont fournis par Chromsystem®. Sept points de gamme et quatre contrôles sont préparés avec chaque série de dosage (tableau 13).

Le chromatogramme obtenu est le suivant (figure 13) :

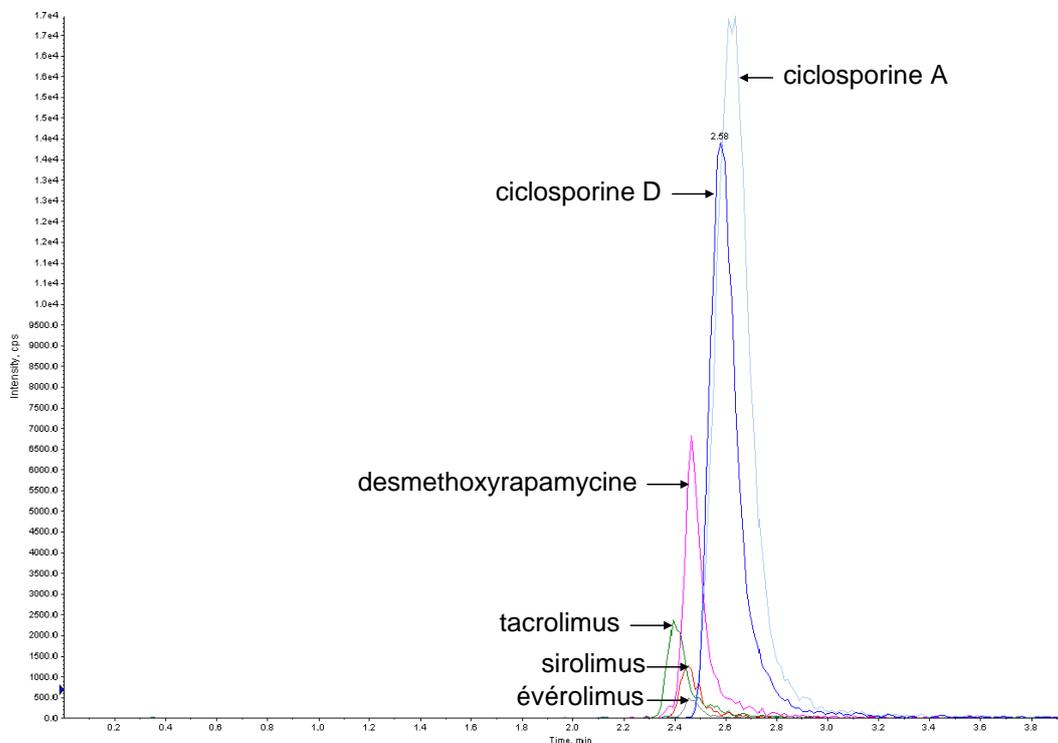


Figure 12 : chromatogramme d'un point de gamme (calibrateur n°3)

		Analyte	Etalon interne	Concentration (ng/ml)
gamme	Calibrateur 0	Ciclosporine A	Ciclosporine D	2,5
	Calibrateur 1			47,1
	Calibrateur 2			116
	Calibrateur 3			266
	Calibrateur 4			471
	Calibrateur 5			721
	Calibrateur 6			1743
	Calibrateur 0	Tacrolimus	Ascomycine	0
	Calibrateur 1			2,3
	Calibrateur 2			6,3
	Calibrateur 3			11,4
	Calibrateur 4			17,7
	Calibrateur 5			24,6
	Calibrateur 6			44
	Calibrateur 0	Sirolimus	Desmethoxy- rapamycine	0
	Calibrateur 1			2,4
	Calibrateur 2			6,7
	Calibrateur 3			12,4
	Calibrateur 4			19,7
	Calibrateur 5			29
	Calibrateur 6			48
	Calibrateur 0	Evérolimus	Desmethoxy- rapamycine	0
	Calibrateur 1			2,2
	Calibrateur 2			6,1
Calibrateur 3	11,7			
Calibrateur 4	18,1			
Calibrateur 5	24,2			
Calibrateur 6	44,1			
Contrôle	Contrôle I	Ciclosporine A	Ciclosporine D	104
	Contrôle II			254
	Contrôle III			513
	Contrôle IV			1731
	Contrôle I	Tacrolimus	Ascomycine	2,85
	Contrôle II			7,4
	Contrôle III			16,3
	Contrôle IV			36,6
	Contrôle I	Tirolimus	Desmethoxy- sirolimus	3,19
	Contrôle II			10,47
	Contrôle III			21,1
	Contrôle IV			41,8
	Contrôle I	Evérolimus	Desmethoxy- sirolimus	3,04
	Contrôle II			5,06
	Contrôle III			10,4
	Contrôle IV			35,6

Tableau 13 : concentration des calibrateurs et contrôles en fonction des molécules (coffret Chromsystem®)

2 Analyse statistique

La régression permet d'étudier l'association entre deux variables quantitatives, en étudiant les variations de l'une en fonction des valeurs de l'autre. Diverses méthodes ont été développées, la plus courante est celle des moindres carrés. Mais cette dernière n'est pas la méthode de choix pour comparer deux méthodes de mesures sur un même échantillon. En effet, celle-ci part du principe que l'erreur sur la variable x est nulle et qu'il existe seulement une erreur sur la variable y, ce qui n'est pas le cas dans nos analyses ; le coefficient de corrélation mesure l'intensité de la concordance contre l'hypothèse nulle de non-relation. Quand on compare deux mesures de la même chose, il y a forcément une relation entre ces deux mesures, si bien que l'hypothèse nulle de non relation n'a pas de sens.

D'autre part, la corrélation dépend de la dispersion des données de l'échantillon ; la présence d'une valeur extrême peut conduire à une forte corrélation, même si il y a beaucoup de dispersion entre les observations restantes (Stanton, 1998).

Pour remédier à ces problèmes, des méthodes graphiques et statistiques ont été développées et publiées.

2.1 Méthode graphique : méthode de Altman et Bland (Bland & Altman, 1986).

La méthode d'évaluation de la concordance de Bland et Altman (Bland & Altman, 1986 ; Journois, 2004) consiste à réaliser un graphique comportant en ordonnée la différence (ou le pourcentage de différence) entre les valeurs obtenues par les deux techniques A et B (soit A-B) et en abscisse la moyenne des deux valeurs obtenues par ces deux techniques, soit $(A+B)/2$ (figure 14). Cette moyenne représente une estimation acceptable au plan technique en l'absence de connaissance préalable du biais existant entre les deux séries de données. Cette approche confère le même poids à la technique A et à la technique B.

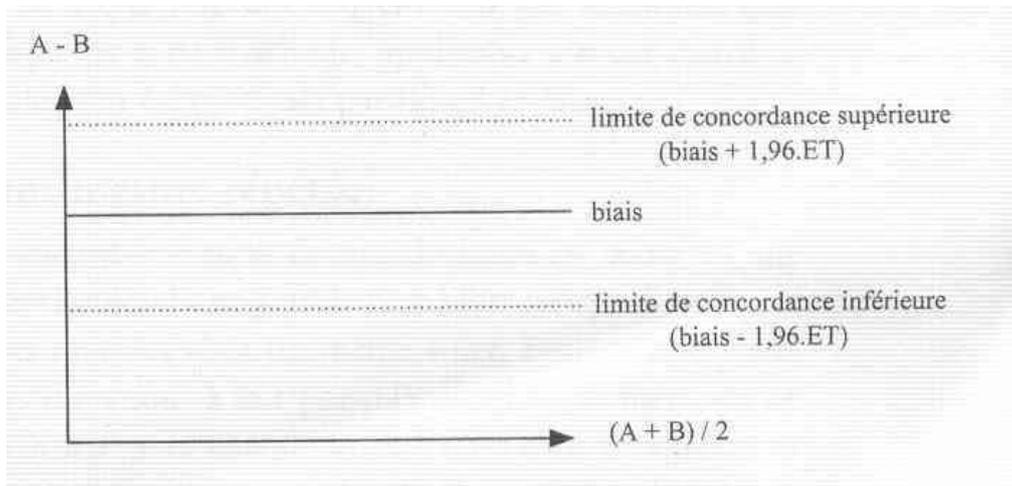


Figure 14 : représentation graphique d'Altman et Bland

Le biais est la moyenne des différences, il représente la moyenne de l'écart systématique d'une série de valeur par rapport à l'autre. L'écart type (ET ou SD pour Standard Deviation) des différences est calculé et va permettre de définir les deux seuils de limite de concordance (biais +/- 1.96 x ET). Les limites de concordance supérieures et inférieures sont tracées sur le graphique (ici en pointillés). Elles correspondent approximativement à deux écarts types par rapport à la moyenne. Elles englobent l'intervalle dans lequel sont comprises 95% des différences sous l'hypothèse que leur distribution suive une loi normale (figure 15 et 16).

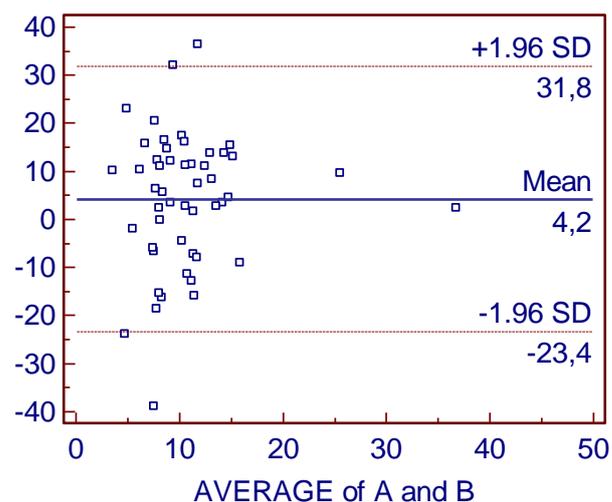


Figure 15 : représentation d'Altman et Bland en pourcentages

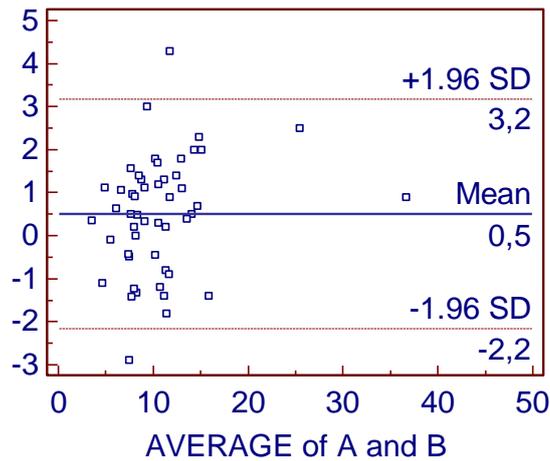


Figure 16 : représentation d'Altman et Bland en valeurs absolues

L'analyse visuelle de la répartition du nuage de points apporte des informations. Il arrive que le graphe réalisé adopte un aspect en "V" couché, dans un sens ou dans l'autre. Cet aspect traduit une variation du biais avec la croissance ou décroissance des valeurs.

2.2 Méthodes statistiques

2.2.1 Test t de Student sur séries appariées

La moyenne des différences, en raison de l'appariement des données, peut être comparée à 0 au moyen d'un test de Student. Ce test permet de détecter une éventuelle différence systématique entre deux méthodes de mesure.

$$t_{\text{calc}} = \frac{m_d}{\sqrt{\frac{S_d^2}{n}}}$$

Avec :

- m_d : moyenne des différences
- S_d^2 : variance des différences
- n : nombre d'échantillons.

La valeur obtenue est à comparer à la valeur seuil à $n-1$ degrés de liberté (ddl) pour le risque α de la table de Student (c'est-à-dire, en pratique, pour $n > 30$, 1.96 pour $\alpha = 5\%$). De plus si le nombre de mesures (n) est supérieur à 30, ce test ne requiert aucune condition d'application particulière.

2.2.2 Analyse de Passing-Bablok (Passing & Bablok, 1983)

L'analyse de Passing et Bablok (Fuhrman & Chouaid, 2004) se base sur le principe qu'une erreur est présente sur x et y , contrairement à la régression linéaire qui part du principe que l'erreur sur la variable x est nulle et qu'il existe seulement une erreur sur la variable y . Il s'agit d'une méthode non paramétrique. 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 (IC) à 95% est ensuite calculé pour la pente et pour l'ordonnée à l'origine permettant de mettre en évidence respectivement la présence d'un biais proportionnel et constant sur ces deux paramètres (figure 17).

Cette analyse permet d'expliquer l'éventuelle différence significative trouvée au moyen de la méthode précédente.

Elle présente aussi l'intérêt d'une bonne immunité aux données extrêmes. Un test statistique (Cusum test) est 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.

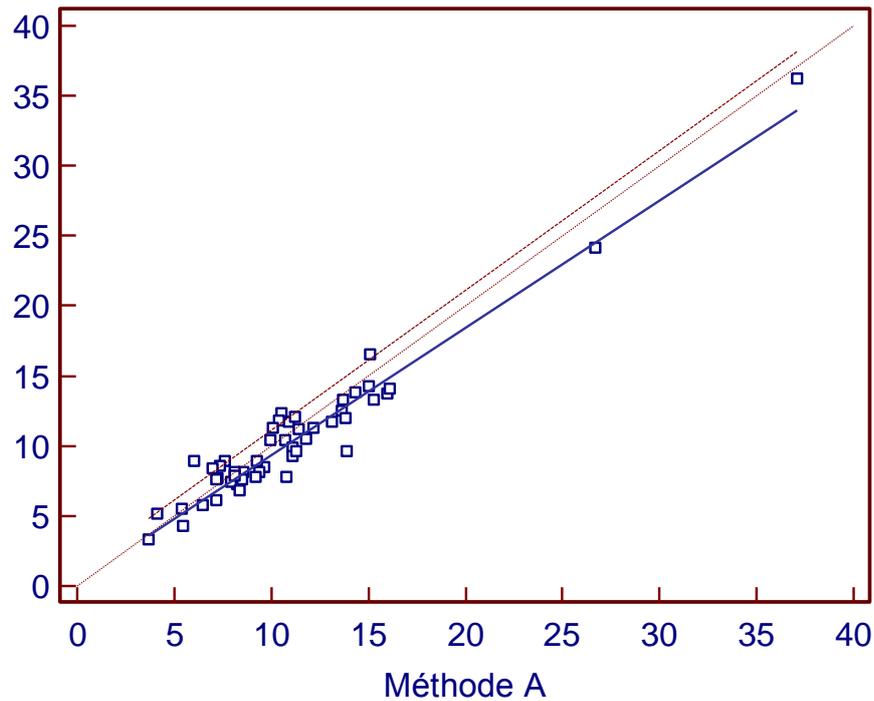


Figure 17 : L'analyse de Passing et Bablok (Exemple : $y=1.03x+0.35$) a permis de déterminer la linéarité de la relation entre les deux méthodes (cusum test, $p < 0,1$), avec une droite de pente 1.03 (IC95% : [0,96 - 1,09] et d'ordonnée à l'origine de 0.35 (IC 95% : [-0,18 - 0,80]).

2.2.3 Test t de Student sur séries appariées dans les sous populations.

La recherche d'une éventuelle influence, sur les résultats, du sexe des patients ou du type de greffe est effectuée en comparant les écarts de mesures obtenus avec les deux techniques. La significativité de cet écart est testée au moyen d'un test de Student.

$$t_{\text{calc}} = \frac{|d_1 - d_2|}{\frac{Sd1}{\sqrt{n1}} + \frac{Sd2}{\sqrt{n2}}}$$

Avec :

- d : Différence moyenne entre les 2 techniques
- s_d : écart-type des différences
- n : nombre d'échantillons

La valeur obtenue est à comparer à la valeur seuil pour le risque α de la loi normale centrée réduite (c'est-à-dire, en pratique, pour $n > 30$, 1.96 pour $\alpha = 5\%$).

Le résultat du test de Student (t_{calc}) de la différence entre les sous populations est soit significatif (S) soit non significatif (NS), au risque $\alpha = 5\%$ (tableau 14).

		n	d	s_d	t_{calc}	p	S-NS
Sexe	Femme	77	-0,49	1,64	0,19	0,78	NS
	Homme	117	-0,55	1,4			

Tableau 14 : influence du sexe, Méthode A versus méthode B

$$t_{\text{calc}} = \frac{|-0.49 - (-0.55)|}{\frac{1.64}{\sqrt{77}} + \frac{1.4}{\sqrt{117}}} = 0.19$$

Résultat : $t_{\text{calc}} < 0.96$, la différence observée entre les deux méthodes dans les deux groupes n'est pas significative (NS)

2.2.4 La régression de Deming et la régression linéaire par les moindres carrés.

Ces deux méthodes de calcul sont utilisées dans le but de comparer les résultats obtenus à ceux de la littérature.

2.2.4.1 Régression de Deming

La régression de Deming (figure 18) prend en compte la variabilité des deux méthodes en introduisant un paramètre supplémentaire, le rapport des deux variances analytiques. Toutefois, elle suppose que les erreurs de mesures suivent une distribution normale. Tout comme l'analyse de Passing et Bablok, le calcul de l'intervalle de confiance à 95% de la pente et de l'ordonnée à l'origine permet de vérifier s'il existe ou non des différences significatives entre les méthodes.

Cette méthode sera utilisée uniquement pour comparer les résultats obtenus à ceux trouvés dans la littérature utilisant cette même méthode d'analyse statistique.

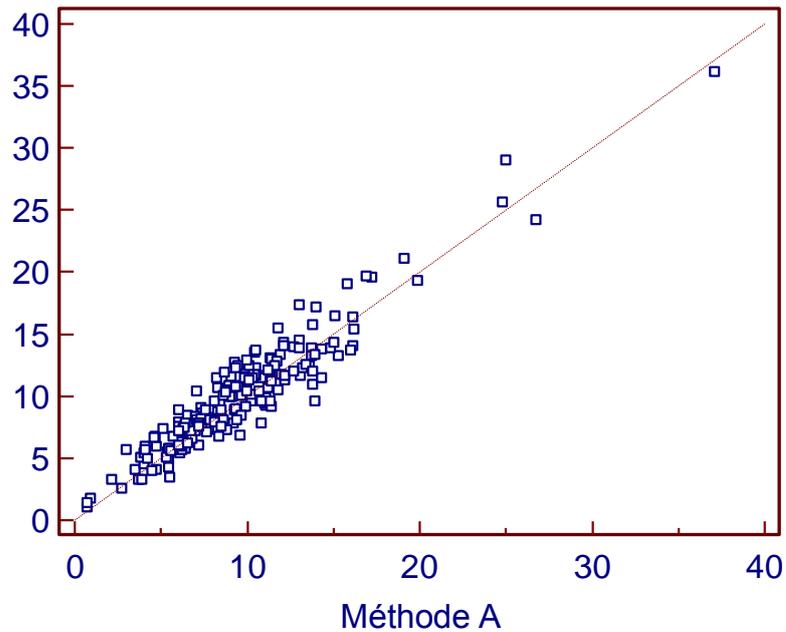


Figure 18 : régression de Deming - Exemple : $y=1.01x + 0.4$; Droite de pente de 1.01 (IC95% : 0,9468 à 1,0770), d'ordonnée à l'origine de 0.4 (IC 95% : de -0,1630 à 0,9722).
 En rouge : droite d'équivalence : $y=x$

2.2.4.2 La régression linéaire simple ou méthode des moindres carrés

Dans un premier temps, la régression linéaire simple cherche à matérialiser le fait que les points expérimentaux sont approximativement alignés. Elle le fait en identifiant la "meilleure droite" passant au travers du nuage de points. Cette droite, dite "Droite des Moindres Carrés" sera caractérisée par une pente b et une ordonnée à l'origine a . La méthode des moindres carrés consiste à déterminer une estimation des valeurs a et b et à quantifier la validité de cette relation grâce au coefficient de corrélation linéaire. L'hypothèse de base est que les écarts des points à l'alignement parfait sont dus à des erreurs de mesure aléatoires sur y (les valeurs de x étant fixes et connues avec certitude) et que, sans ces erreurs, les points seraient exactement alignés sur une droite (inconnue) : la droite de régression. Le coefficient de corrélation linéaire mesuré renseigne sur la validité de la relation entre x et y .

Résultats

1 ciclosporine

1.1 Population

214 dosages ont été réalisés chez 155 patients (1 à 5 dosages par patient). La moyenne d'âge de ces patients est de 49.5 +/- 18.8 ans (minimum : 1 an, maximum 80 ans). La population est constituée de 66% d'hommes.

Ce traitement est prescrit chez 29% des patients en traitement préventif du rejet de greffe rénale (tableau 15), les autres indications sont présentées dans le tableau suivant :

	service						autres
	néphrologie		unité de transplantation thoracique			Hématologie	
	rein	rein pancréas	cœur	cœur poumons	poumons	allogreffe	
Nombre de patients	45	8	35	6	12	40	9
(%)	29%	5%	23%	4%	8%	26%	6%

Tableau 15 : ciclosporine - répartition des patients en fonction de leur service d'origine

1.2 Résultats de la comparaison de méthodes

Les méthodes comparées sont la méthode immunologique : RIA (ciclosporine direct RIA Kit (Immunotech[®])) et la LC/MS-MS.

La représentation graphique d'Altman et Bland (figure 19) montre une augmentation de la différence quand les valeurs augmentent. La différence moyenne entre les deux techniques (LC/MS-MS – RIA) est de +12.5 ng/ml. Cette différence est significativement différente de 0 (p<0.0001). La méthode chromatographique donne statistiquement des résultats supérieurs à ceux de la méthode immunologique.

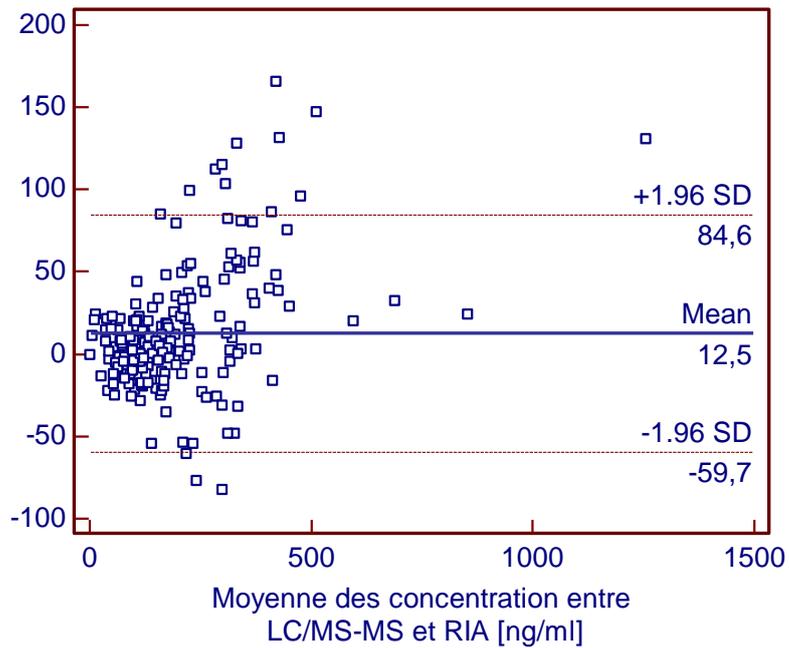


Figure 19 : cyclosporine - représentation graphique de Altman et Bland : différence des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats

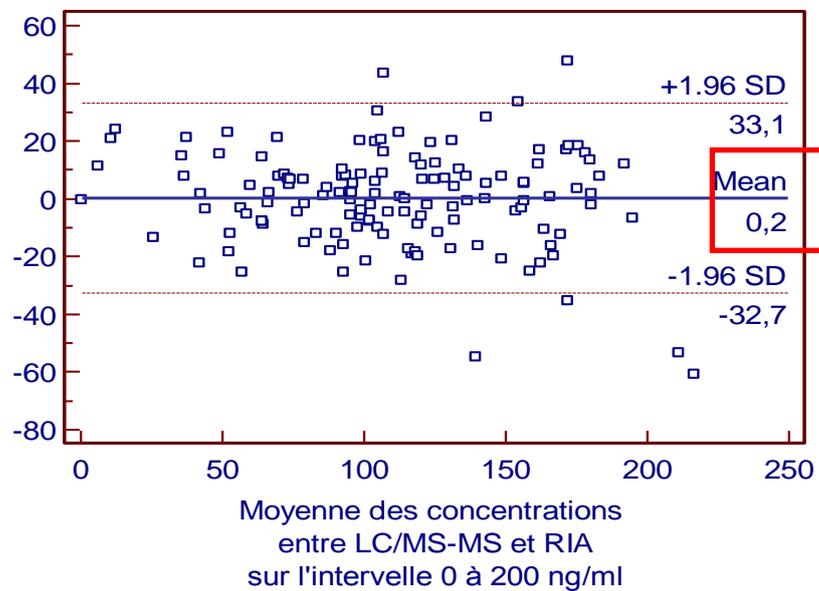


Figure 20 : cyclosporine - représentation graphique de Altman et Bland ; intervalle 0 à 200 ng/ml

L'analyse des valeurs sur l'intervalle de 0 à 200 ng/ml (n=137 soit 65% des valeurs) montre un biais moyen de 0.2 ng/ml. Sur cet intervalle, il n'existe pas de différence statistique entre les deux méthodes (figure 20 et tableau 16).

Intervalle	Nombre de dosages	Pourcentage de différence	différence moyenne [ng/ml]	Ecart type de la différence	t de Student	Différence Significative (S) ou non significative (NS)
0 à 200 ng/ml	137	0,40%	0,2	17,9	0,1	NS
200 à 1500 ng/ml	77	11%	35,7	49,1	6,38	S
0 à 1500 ng/ml	214	3,90%	12,5	36,8	4,97	S

Tableau 16 : ciclosporine - différence entre les méthodes en fonction des intervalles de concentration mesurées

Les pourcentages des différences varient de -55% à +60 % avec un biais moyen de 3.9% (intervalle de confiance à 95% : -30.5 à +38.3%) (figure 21).

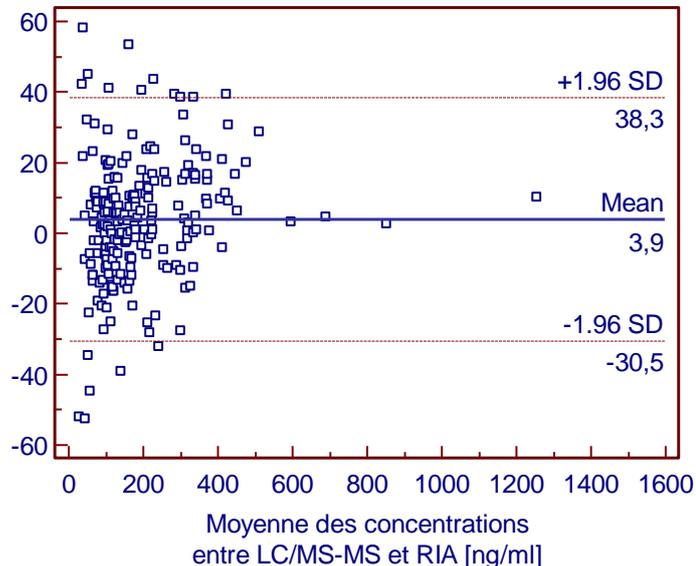


Figure 21 : ciclosporine - représentation graphique de Altman et Bland : pourcentage relatif de différence entre les 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats obtenus.

Sur l'ensemble des données, l'analyse de Passing et Bablok (figure 22) 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 0.91 (IC95% de 0.87 à 0.94) et d'ordonnée à l'origine de 7.26 (IC 95% de 3 à 12.57). Les intervalles de confiance de la pente et de l'ordonnée à l'origine diffèrent respectivement de 0 et de 1 de manière statistique. Il existe un biais proportionnel et constant entre ces deux méthodes. La droite de régression est en-dessous de la droite d'équivalence ($y=x$).

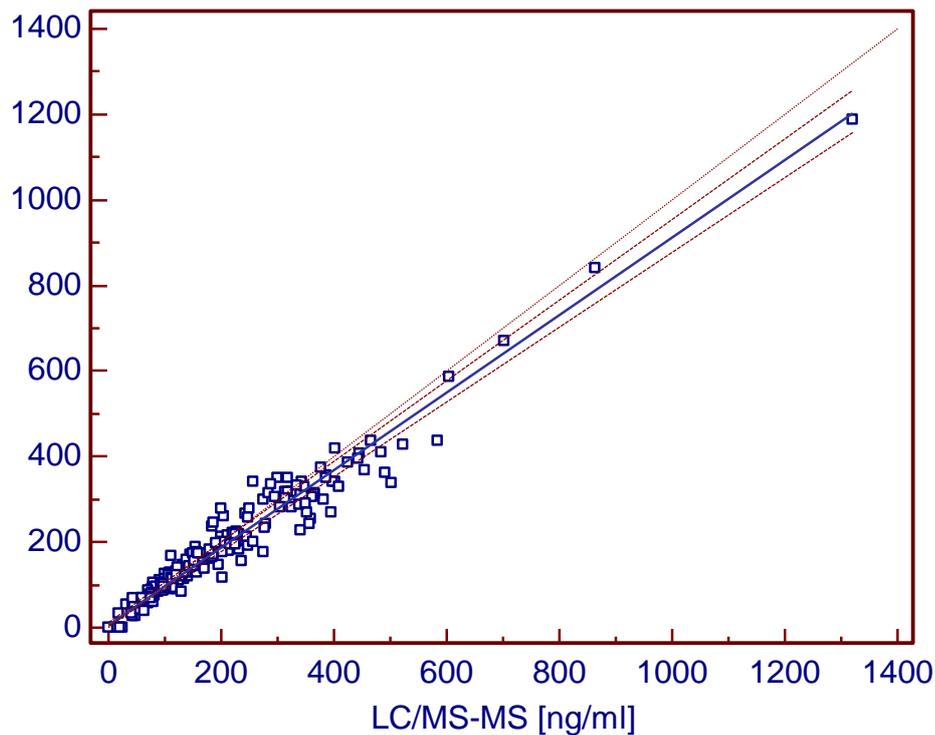


Figure 22 : ciclosporine - comparaison des méthodes de dosage ; régression de Passing Bablok

Sur l'intervalle allant de 0 à 200 ng/ml (figure 23) où il n'existe pas de différence statistique entre les 2 techniques, la droite de régression est : $y=1.01x - 2.82$; (IC95% de a : 0.95 à 1.08 ; IC95% de b : -10 à 4.5), c'est-à-dire proche de la droite d'équivalence ($y=x$).

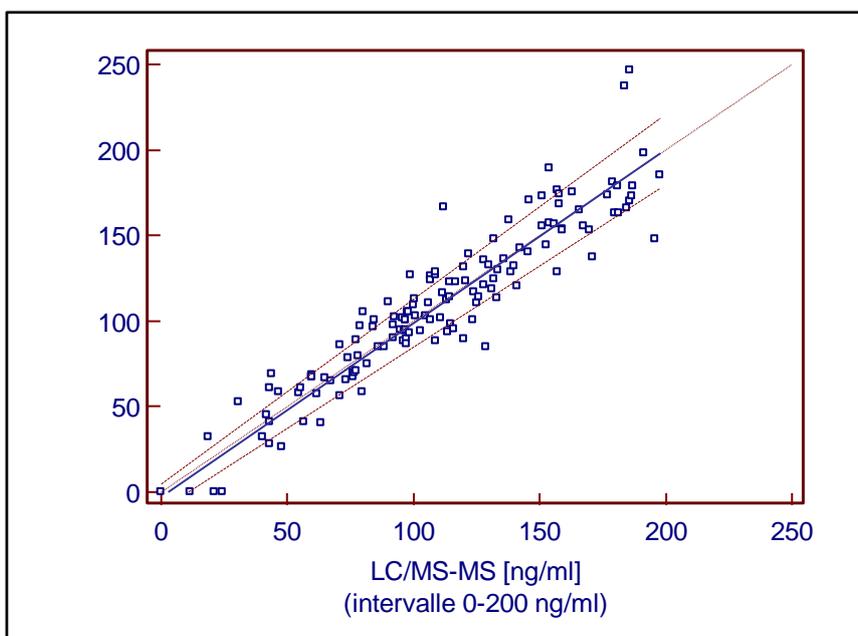


Figure 23 : ciclosporine - intervalle 0 à 200 ng/ml - comparaison des méthodes de dosage ; régression de Passing Bablok

Les différentes méthodes de régression fournissent les résultats suivants (tableau 17) :

y=RIA	x=LC/MS-MS		
Méthode	Moindres carrés	Passing Bablok	Deming
a	0,87	0,91	0,89
b	13,47	7,26	9,36
r ²	0,95		
IC95% de a		0,87 à 0,94	0,85 à 0,92
IC95% de b		3 à 12,57	3,9 à 14,8

Tableau 17 : ciclosporine - équation des droites de régression en fonction de la méthode statistique utilisée

1.3 Influence du sexe et du type de greffe

L'analyse des caractéristiques (tableau 18) de la population (sexe, type de greffe) sur la régression (figures 24 et 25) ne montre pas d'influence du sexe des patients sur la corrélation entre les deux méthodes. Le type de greffe semble lui jouer un rôle ; chez les patients d'hématologie (allogreffe), l'écart entre les deux méthodes est statistiquement supérieur à celui observé chez les autres patients. Les équations des droites de régression en fonction du type de greffe sont données dans le tableau 19.

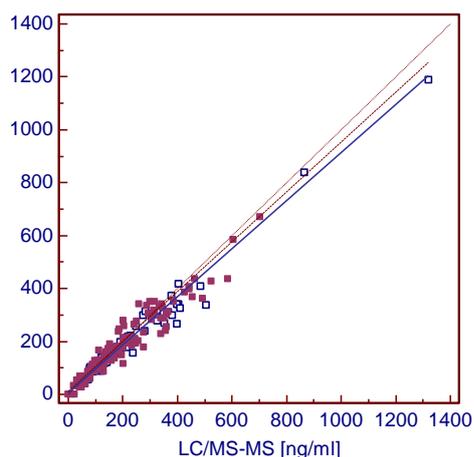


Figure 24 : cyclosporine - comparaison des régressions en fonction du sexe ; régression de Passing Bablok

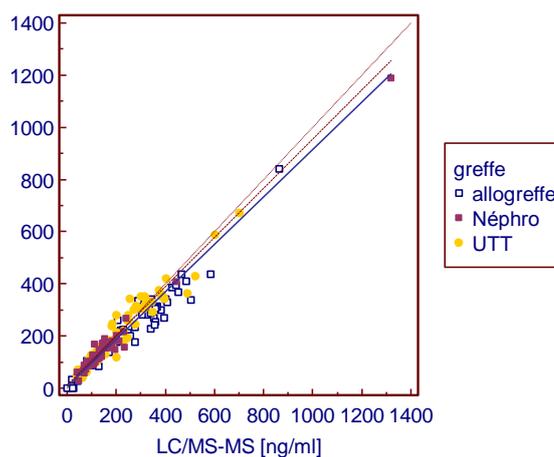


Figure 25 : cyclosporine - comparaison des régressions en fonction du type de greffe ; régression de Passing Bablok

		n	d	sd		tcalc	p	S-NS	
Ensemble des dosages		214	12,46	36,8					
	Sexe	Homme	147	9,95	35	Homme VS Femme	1,51	0,13	NS
		Femme	67	18	38				
Greffe	rein+rein-pancréas	58	4,4	26	rein VS allogreffe	4,23	< 0,0001	S	
	Allogreffe	69	31,6	42,7	rein VS thoracique	0,289	0,77	NS	
	Thoracique	80	2,9	32,8	allogreffe VS thoracique	4,6	< 0,0001	S	

Tableau 18 : cyclosporine - analyse statistique de l'influence des différentes caractéristiques de la population sur les résultats.

y=RIA	Ensemble des patients	type de greffe		
x=LC/MS-MS		Néphrologie (rein ou rein + pancréas)	Thorax (Cœur, Cœur + poumons, poumons)	Hématologie (allogreffe)
y=ax + b				
nombre de dosages	214	58	79	69
Coefficient a	0,91	0,92	0,96	0,84
IC95% de a	0,87 à 0,94	0,86 à 1,03	0,91 à 1,02	0,78 à 0,87
Coefficient b	7,25	6,65	5,42	4,57
IC95% de b	3 à 12,57	-8,26 à 15,17	-3,17 à 12,64	-3,88 à 14,4
Moyenne des concentrations	200	154,07	195,4	236,4
écart-type	155	166,41	134,8	156

Tableau 19 : cyclosporine - équation des droites de régression de Passing-Bablok en fonction du type de greffe

2 tacrolimus

2.1 Population

194 dosages ont été réalisés chez 133 patients (1 à 6 dosages par patient). La moyenne d'âge de ces patients est de 47,11 +/- 17.93 ans (minimum : 8 ans, maximum 79 ans). La population est constituée de 60% d'hommes.

Ce médicament est prescrit chez 67 % des patients en traitement préventif du rejet de greffe rénale, les autres indications sont présentées dans le tableau suivant (tableau 20) :

	service					
	néphrologie		unité de transplantation thoracique			autres
	rein	rein pancréas	cœur	cœur poumon	poumon	
Nombre de patients (%)	89 (67%)	19 (14%)	7 (5%)	6 (5%)	4 (3%)	8 (6%)

Tableau 20 : tacrolimus - répartition des patients en fonction du type de greffe

2.2 Résultats de la comparaison de méthodes

Les méthodes comparées sont la méthode immunologique (MEIA IMx II (Abbott[®])) et la LC/MS-MS.

La représentation graphique d'Altman et Bland (figure 26) ne montre pas d'augmentation de la différence quand les valeurs augmentent. La différence moyenne entre les deux techniques (LC/MS-MS – MEIA) est de -0.5 ng/ml. Cette différence est significativement différente de 0 ($p < 0.0001$). La méthode chromatographique donne statistiquement des résultats inférieurs à ceux de la méthode immunologique.

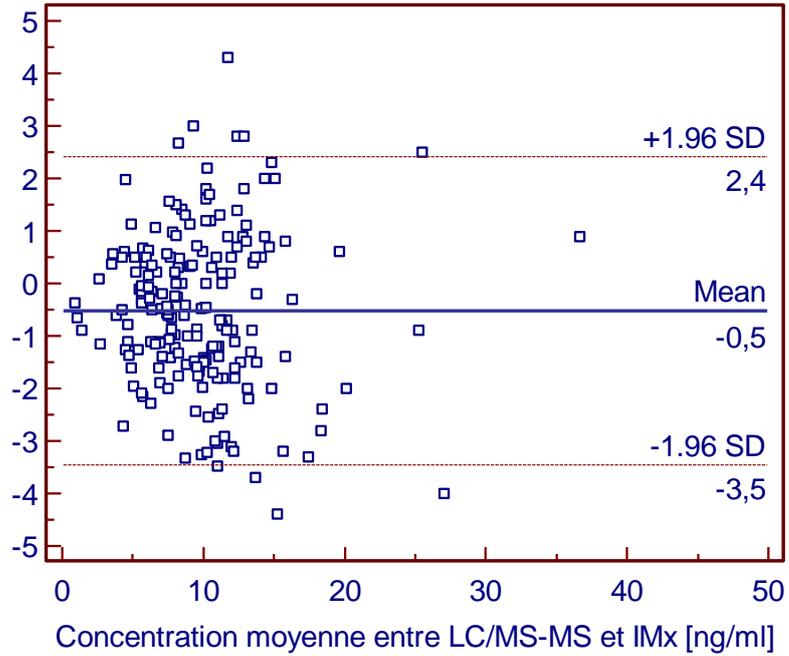


Figure 26 : tacrolimus - représentation graphique de Altman et Bland : différence des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats obtenus.

Les pourcentages de différence varient de -65% à + 40 % avec un biais moyen de -6.5 % (figure 27).

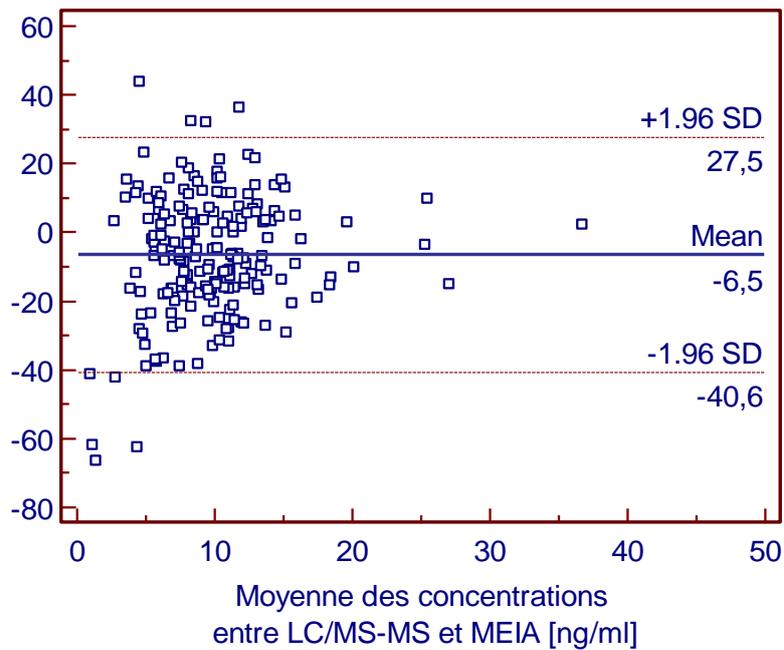


Figure 27 : tacrolimus - représentation graphique de Altman et Bland : pourcentage relatif de différence des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats obtenus.

L'analyse de Passing et Bablok (figure 28) a permis de déterminer que la relation existant entre les deux méthodes était linéaire (cusum test, $p < 0,1$), avec une droite de pente 1.03 (IC95% de 0.96 à 1.09) et d'ordonnée à l'origine 0,36 (IC 95% de -0.18 à 1.09) (figure 28). Les intervalles de confiance de ces deux paramètres englobant respectivement 1 et 0, il n'existe pas de biais proportionnel et constant entre les deux méthodes.

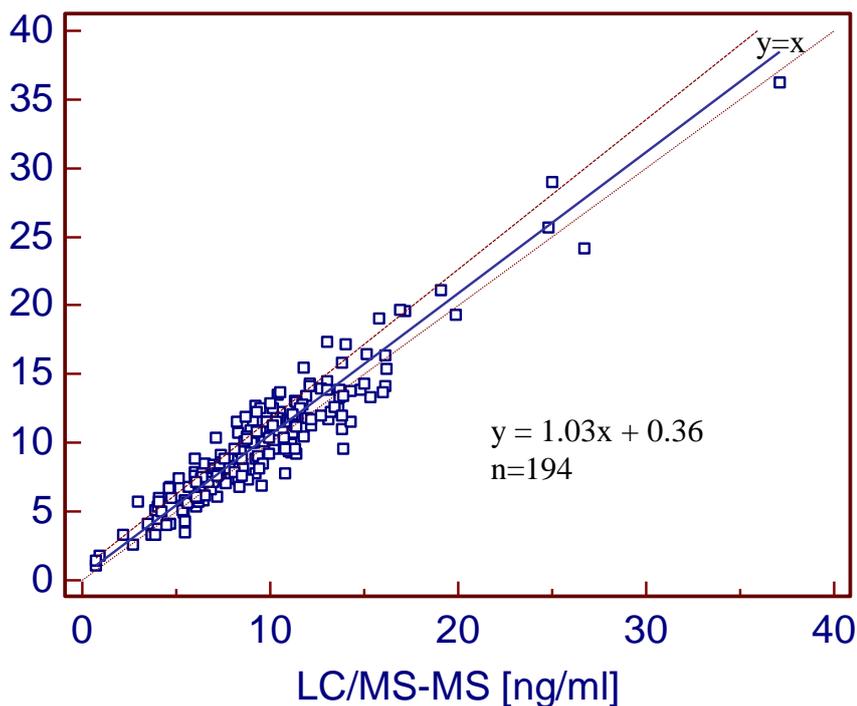


Figure 28 : tacrolimus - comparaison des méthodes de dosage ; régression de Passing Bablok

Les différentes méthodes de régression donnent les résultats suivants (tableau 21) :

y=MEIA	x=LC/MS-MS		
Méthode	Moindres carrés	Passing Bablok	Deming
a	0,96	1,02	1,0142
b	0,9	0,36	0,383
r²	0,89		
IC95% de a		0,96 à 1,09	0,95 à 1,08
IC95% de b		-0,18 à 0,8	-0,19 à 0,96

Tableau 21 : tacrolimus - équation des droites de régression en fonction de la méthode statistique utilisée

2.3 Influence du sexe et du type de greffe

L'analyse des caractéristiques de la population (sexe, type de greffe) sur la régression (figures 29 et 30 et tableau 22) ne montre pas d'influence d'un de ces paramètres sur les valeurs de la droite de régression.

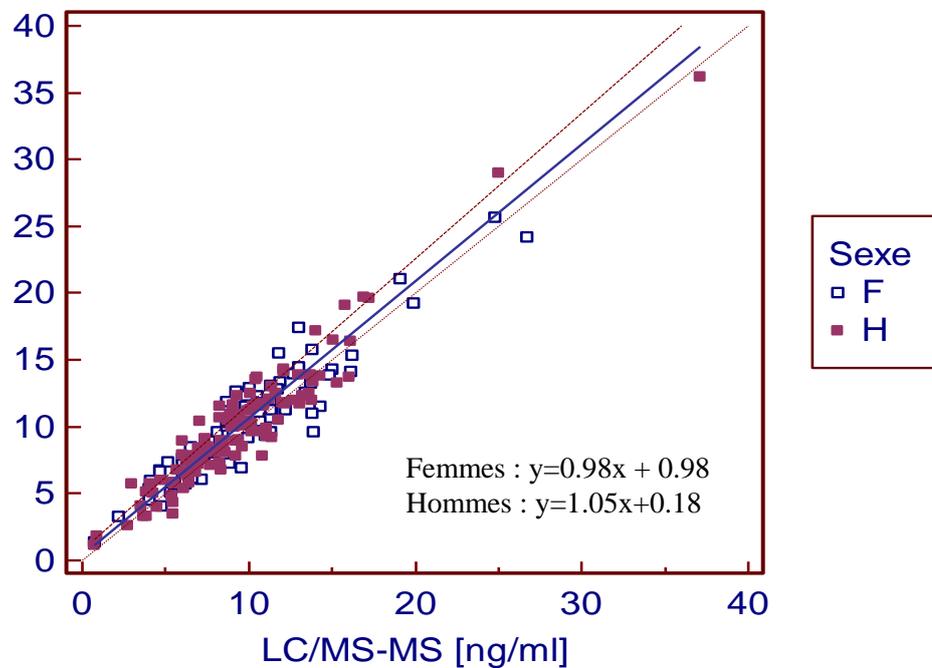


Figure 29 : tacrolimus - comparaison des régressions en fonction du sexe ; régression de Passing Bablok

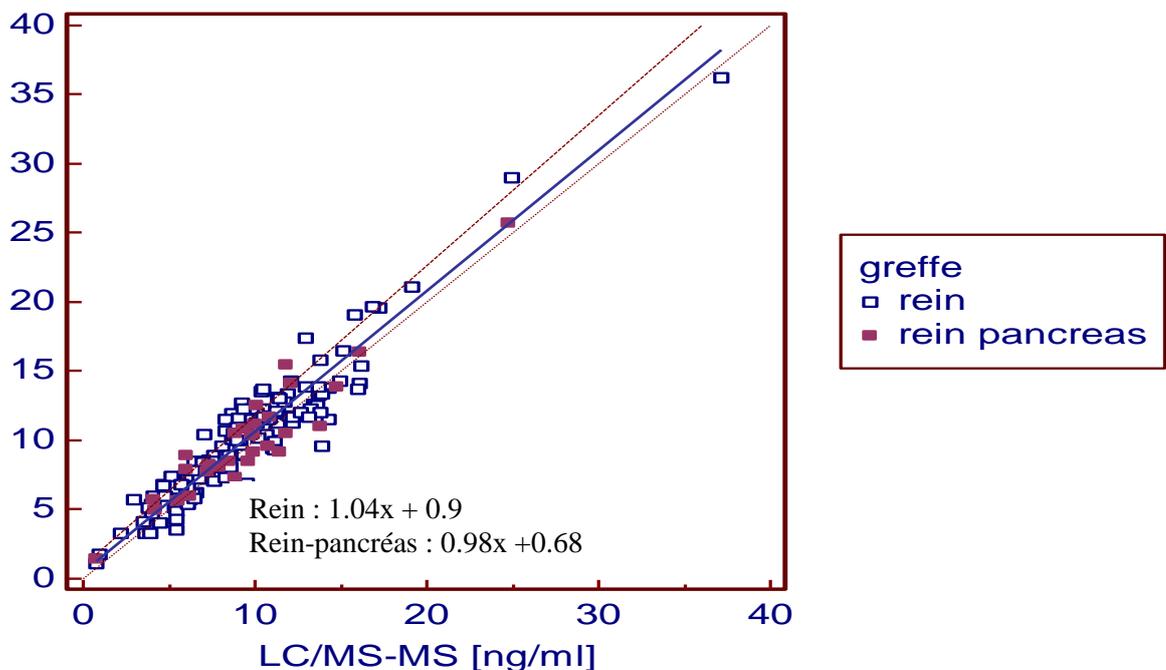


Figure 30 : tacrolimus – comparaison des régressions en fonction du type de greffe ; régression de Passing Bablok

		n	d	sd	tcalc	p	S-NS
ensemble		194	-0,51	1,5			
Sexe	Femme	77	-0,49	1,64	0,273	0,78	NS
	Homme	117	-0,55	1,4			
Greffe	rein	129	-0,66	1,5	0,758	0,45	NS
	rein pancréas	30	-0,43	1,48			

Tableau 22 : tacrolimus - analyse statistique de l'influence des différentes caractéristiques de la population sur les résultats.

3 sirolimus

3.1 Population

209 dosages ont été réalisés chez 89 patients (1 à 6 dosages par patient). La moyenne d'âge de ces patients est de 50 ± 15.62 ans (minimum : 16 ans, maximum : 79 ans). La population est constituée de 65% d'hommes.

Ce médicament est prescrit chez 60 % des patients en traitement préventif du rejet de greffe rénale, les autres indications sont présentées dans le tableau 23 :

	service					
	néphrologie		unité de transplantation thoracique			autres
	rein	rein pancréas	cœur	cœur poumon	poumon	
Nombre de patients (%)	51 (60%)	17 (20%)	6 (7%)	1 (1%)	1 (1%)	9 (11%)

Tableau 23 : sirolimus - répartition des patients en fonction de leur service d'origine

3.2 Résultats de la comparaison de méthodes

Les méthodes comparées sont la méthode immunologique (MEIA IMx II (Abbott®)) et la LC/MS-MS.

La représentation graphique d'Altman et Bland (figure 31) ne montre pas d'augmentation de la différence entre les deux méthodes lorsque les valeurs augmentent. La différence moyenne entre les 2 techniques (LC/MS-MS – MEIA) est de +2 ng/ml. Cette différence est significativement différente de 0 ($p < 0.0001$).

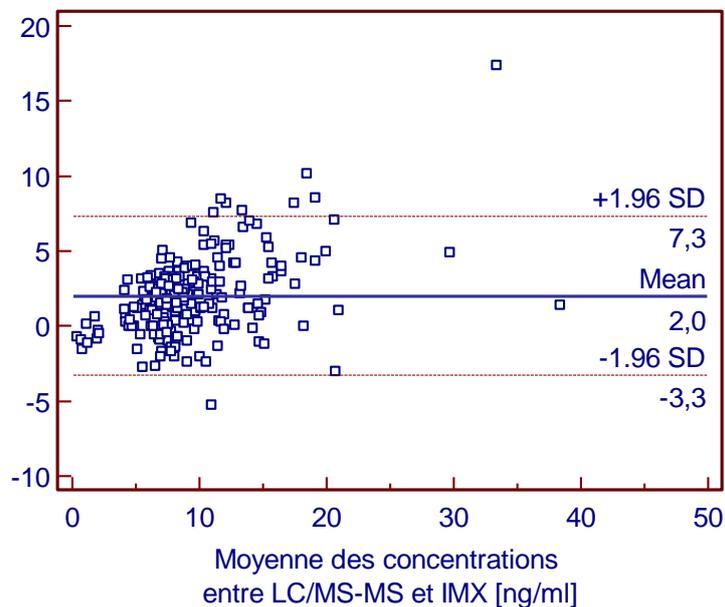


Figure 31 : sirolimus - représentation graphique de Altman et Bland : différence des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats.

Les pourcentages de différence (figure 32) varient de -50% à +74% avec un biais moyen de +20.1% (intervalle de confiance : -28.6% à 68.8%)

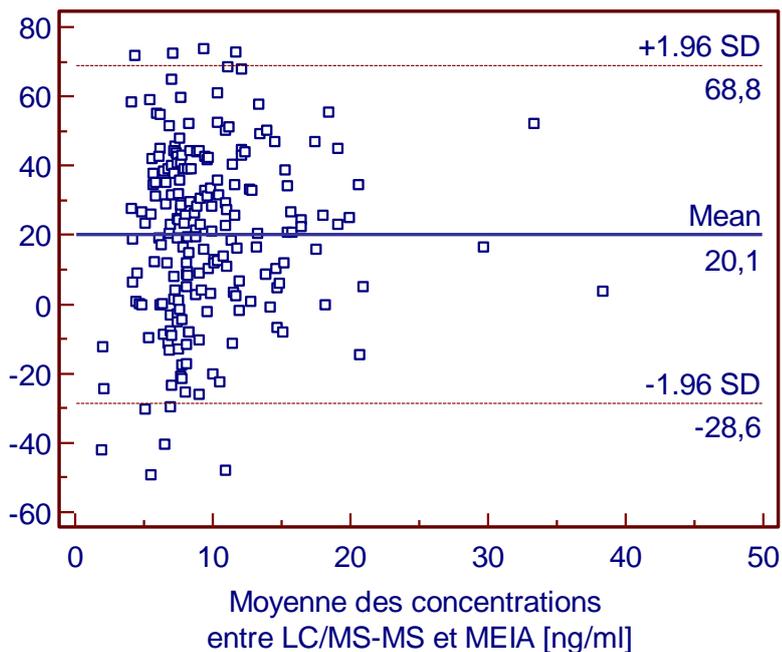


Figure 32 : sirolimus - représentation graphique de Altman et Bland : pourcentage relatif de différence entre les 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats.

L'analyse de Passing et Bablok (figure 33) a permis de déterminer que la relation existant entre les deux méthodes était linéaire (cusum test, $p < 0,1$), avec une droite de pente 0.76 (IC95% de 0.69 à 0.83) et d'ordonnée à l'origine de 0,39 (IC 95% de -0.27 à 1.03). L'intervalles de confiance de l'ordonnée à l'origine englobe le 0, mais celui de la pente n'englobe pas le 1 : il existe donc un biais proportionnel et constant entre les deux méthodes.

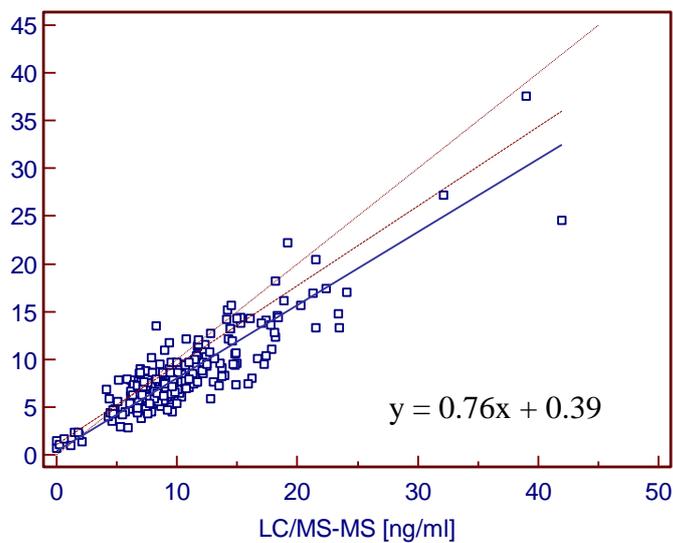


Figure 33 : sirolimus - comparaison des méthodes de dosage ; régression de Passing Bablok

Les différentes méthodes de régression donnent les résultats suivants (tableau 24) :

y=IMx	x=LC/MS-MS		
Methode	Moindres carrés	Passing Bablok	Deming
a	0,7	0,76	0,78
b	1,16	0,39	0,4
r²	0,78		
IC95% de a		0,69 to 0,83	-0,56 à 1,36
IC95% de b		- 0,275 à 1,03	0,68 à 0,88

Tableau 24 : sirolimus - équation des droites de régression en fonction de la méthode statistique utilisée

3.3 Influence du sexe et du type de greffe

L'analyse des caractéristiques de la population (sexe, type de greffe) sur la régression (figure 34 et 35 et tableau 25) ne montre pas d'influence d'un de ces paramètres sur les valeurs de la droite de régression.

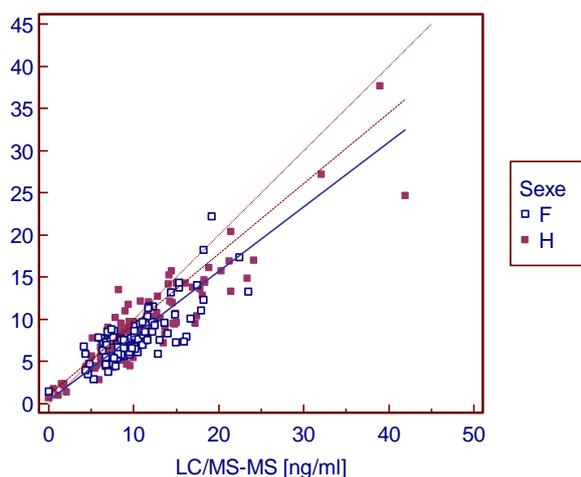


Figure 34 : sirolimus – comparaison des régressions en fonction du sexe ; régression de Passing Bablok

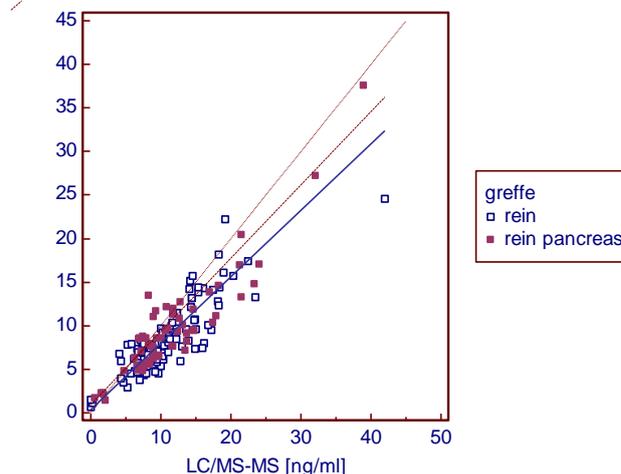


Figure 35 : sirolimus - comparaison des régressions en fonction du type de greffe ; régression de Passing Bablok

		n	d	sd		tcalc	p	S-NS
ensemble		208	2	2,69				
Sexe	Homme	122	1,89	2,08	Homme VS Femme	0,813	0,42	NS
	Femme	87	2,15	2,53				
Greffe	rein	102	2,9	2,43	rein VS rein pancreas	2,2	0,03	S
	rein pancréas	61	2	2,7	rein VS thoracique	4,4	<0,0001	S
	Thoracique	35	0,92	1,69	Rein pancréas VS thoracique	2,1	0,03	S

Tableau 25 : sirolimus - analyse statistique de l'influence des différentes caractéristiques de la population sur les résultats.

4 évérolimus

4.1 Population

136 dosages ont été réalisés pour 49 patients (1 à 9 dosages par patient). La moyenne d'âge de ces patients est de 55.04 +/- 14.06 ans. La population est constituée de 75% d'hommes.

Ce médicament est prescrit chez 47 % des patients en prévention du rejet dans le cadre d'une greffe rénale, et pour 53% de patients dans le cadre d'une greffe cardiaque.

4.2 Résultats de la comparaison de méthodes

Les méthodes comparées sont la méthode immunologique (FPIA Innofluor Certican (Seradyn®)) et la LC/MS-MS.

La représentation graphique d'Altman et Bland (figure 36) ne montre pas de variation de l'écart entre les deux méthodes lorsque les valeurs augmentent. La différence moyenne entre les deux techniques (LC/MS-MS – FPIA) est de -0.8 ng/ml. Cette différence est statistiquement différente de 0 ($p < 0.0001$). La méthode chromatographique donne statistiquement des résultats inférieurs à ceux de la méthode immunologique.

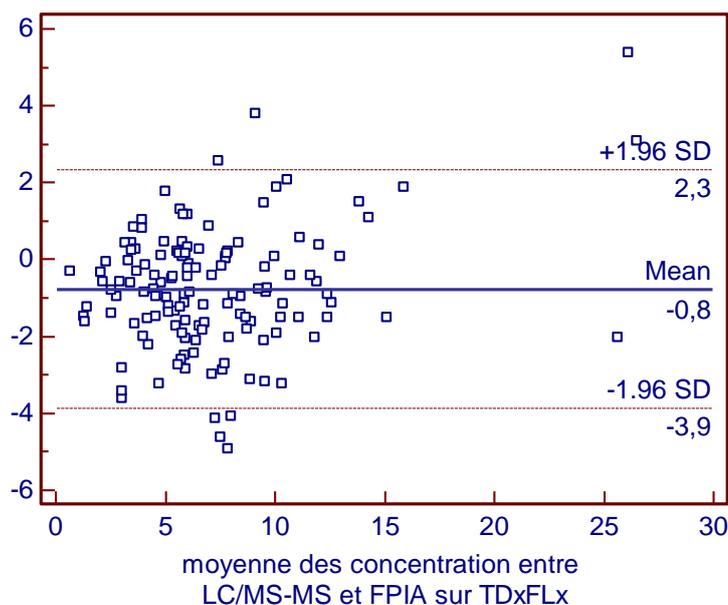


Figure 36 : évérolimus - représentation graphique de Altman et Bland : pourcentage relatif de différence entre les 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats obtenus.

Les pourcentages de différence varient de -120% à +41% avec en moyenne un biais de -16.6% (intervalle de confiance : -74.4% à 41.2%). (figure 37)

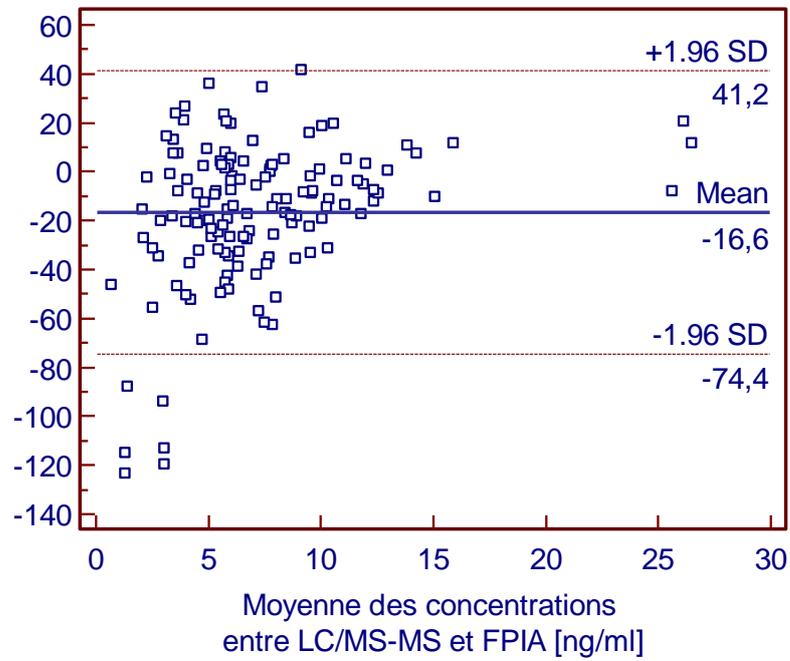


Figure 37 : évérolimus - représentation graphique de Altman et Bland : Pourcentage relatif de différence entre des 2 méthodes en fonction de la moyenne des résultats obtenus.

L'analyse de Passing et Bablok (figure 38) a permis de déterminer que la relation existant entre les deux méthodes était linéaire (cusum test, $p < 0,1$), avec une droite de pente 0.98 (IC95% de 0.90 à 1.06) et d'ordonnée à l'origine 0,92 (IC 95% de 0.45 à 1.40). Le coefficient de la droite est comparable à 1 mais l'intervalle de confiance de l'ordonnée à l'origine n'englobe pas le 0 : il existe donc un biais proportionnel et constant entre les deux méthodes. Ces résultats confirment les précédents ; il faut en moyenne ajouter 0.92 ng/ml aux résultats de la LC/MS-MS pour obtenir ceux de la FPIA.

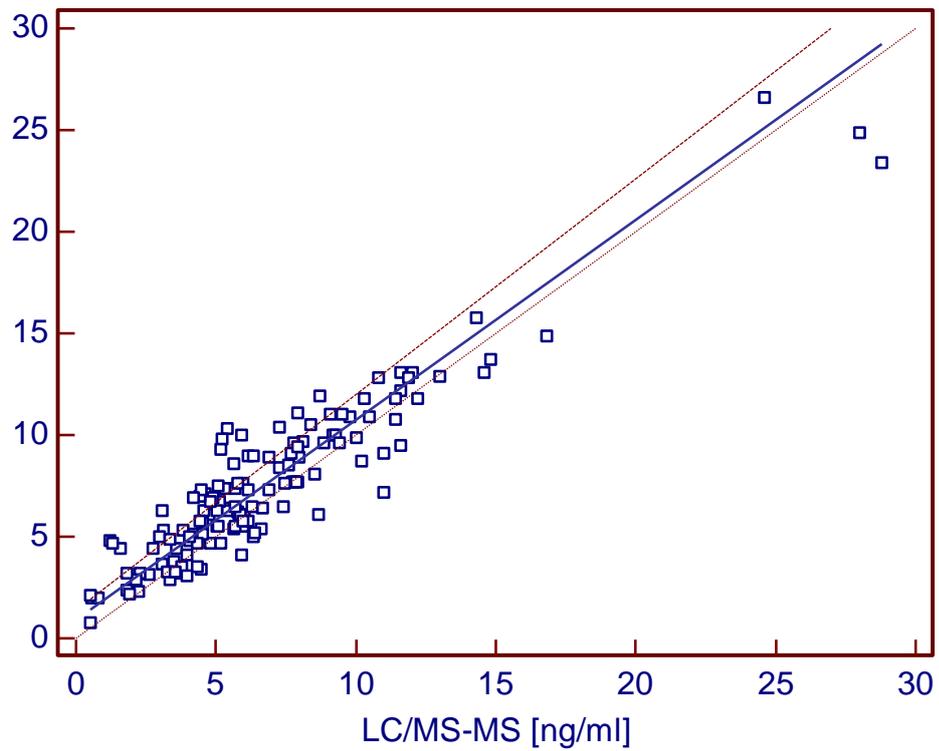


Figure 38 : évérolimus - comparaison des méthodes de dosage ; régression de Passing Bablok

Les différentes méthodes de régression donnent les résultats suivants (tableau 26).

y=FPIA	x=LC/MS-MS	y=ax + b	
Methode	Moindres carrés	Passing Bablok	Deming
a	0,85	0,98	0,91
b	1,77	0,93	1,37
r²	0,87		
IC95% de a		0,9 à 1,06	0,8 à 1,02
IC95% de b		0,44 à 1,4	0,69 à 2,05

Tableau 26 : évérolimus - équation des droites de régression en fonction de la méthode statistique utilisée

4.3 influence du sexe et du type de greffe

L'analyse des caractéristiques de la population (sexe, type de greffe) sur la régression (figure 39 et 40) ne montre pas d'influence d'un de ces paramètres sur les valeurs de la droite de régression (Tableau 27).

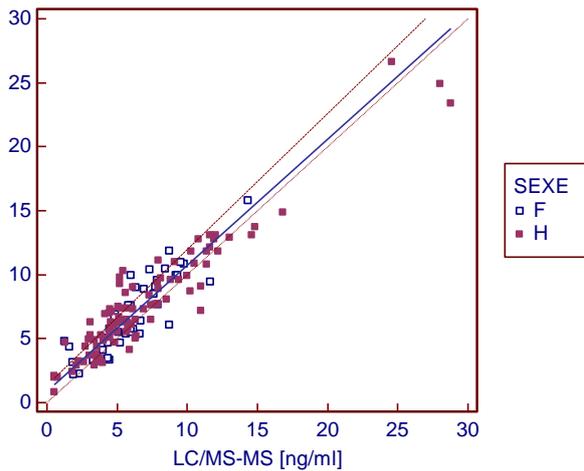


Figure 39 : évérolimus – comparaison des régressions en fonction du sexe ; régression de Passing Bablok

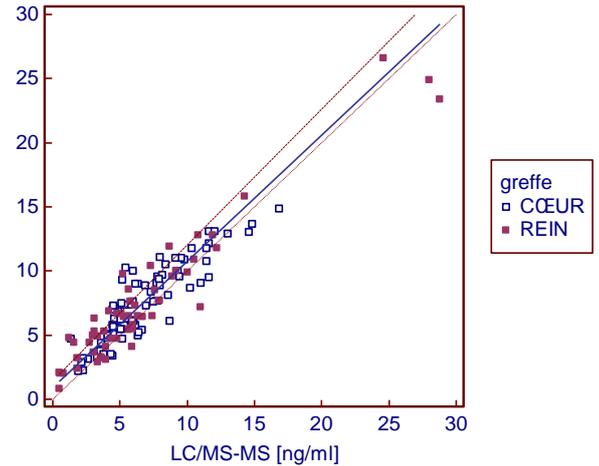


Figure 40 : évérolimus - comparaison régression en fonction du type de greffe ; régression de Passing Bablok

		n	d	sd	tcalc	p	S / NS
ensemble		136	-0,76	1,58			
Sexe	Homme	92	-0,72	1,65	-0,03	0,97	NS
	Femme	31	-0,73	1,42			
Greffe	rein	56	-0,73	1,75	0,163	0,87	NS
	cœur	80	-0,78	1,46			

Tableau 27 : évérolimus - analyse statistique de l'influence des différentes caractéristiques de la population sur les résultats.

Discussion

1 ciclosporine

La méthode chromatographique donne, sur l'ensemble des résultats, des valeurs plus fortes que la méthode immunologique ; la droite de régression $y_{(RIA)}=0.91x_{(LC/MS-MS)}+7.26$ a une pente inférieure à celle de la droite d'équivalence ($y=x$). Une très forte variabilité interindividuelle des résultats est observée (-55% à +60%).

Sur la zone des concentrations comprises entre 0 et 200 ng/ml, les deux méthodes peuvent être considérées comme équivalentes. La différence entre les deux techniques augmente quand les concentrations augmentent.

L'augmentation de l'écart entre les deux techniques peut être expliquée par un défaut de linéarité de la méthode radio-immunologique ; quand les concentrations augmentent, celle-ci aurait tendance à donner des résultats plus faibles que la méthode chromatographique (figure 41).

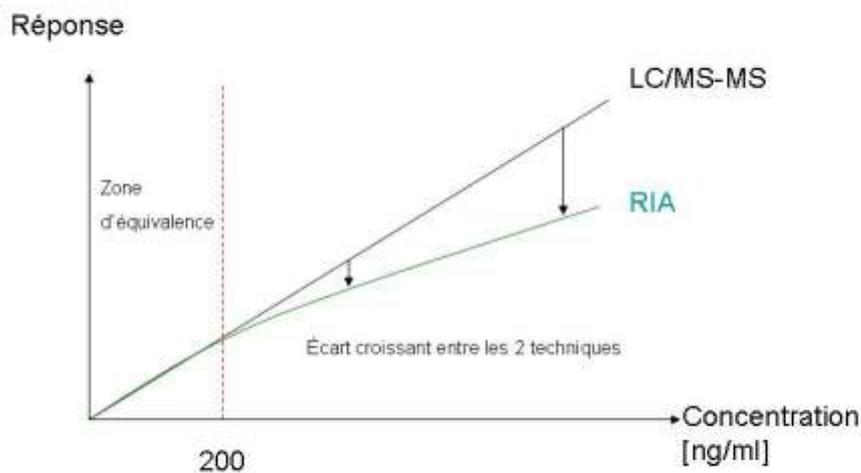


Figure 41 : ciclosporine - représentation schématisée de l'écart entre les techniques en fonction des concentrations mesurées.

Aucune référence bibliographique n'a été retrouvée faisant l'objet de comparaison de ces deux techniques spécifiques ; nos résultats ne peuvent être comparés à la littérature. D'autres comparaisons ont été publiées (tableau 28). Les résultats montrent le plus souvent une surestimation des résultats par la méthode immunologique par rapport à la méthode chromatographique.

Cette surestimation est expliquée, d'une part, par le manque de spécificité des anticorps. Concernant la RIA, une étude rapporte (Murthy et al, 1998) que le pourcentage de réactivité croisée avec les métabolites est faible (moins de 5% de réactivité croisée) et très inférieur à celui constaté avec les autres techniques immunologiques.

Il existe, d'autre part, en spectrométrie de masse, une dégradation possible d'un des métabolites de la ciclosporine (AM19) en ciclosporine D, à l'intérieur de la source du spectromètre (Taylor et al, 2005). Cette transformation en ciclosporine D, *in situ*, augmenterait l'aire de l'étalon interne et ainsi diminuerait la valeur du rapport ciclosporine A / ciclosporine D et donc la concentration mesurée. Nos résultats chromatographiques, supérieurs en moyenne aux résultats de la RIA suggèrent que l'influence de ce phénomène sur nos résultats demeure limitée.

Référence bibliographique	Brozmanova et al, 2000	Zhou et al, 2001	Keevil et al, 2002	Taylor et al, 1998	Butch & Fukuchi, 2004	Ansermot et al, 2008
Technique A	HPLC-UV	LC/MS	LC/MS-MS	LC/MS-MS	LC	LC/MS-MS
Technique B	RIA		EMIT	LC/UV	CEDIA	EMIT
Etalon interne	Cyclosporine D	NR	Cyclosporine D	Dihydrocyclosporin C	NR	Cyclosporine D
Nombre de dosages	458	9	180	90	592	38
Type de greffe	rein	NR	Cœur poumon	NR	NR	Rein, foie, cœur, poumon, allogreffe
Coefficient a	0,967	0,9091	0,914	0,988	1,08	1,14
Coefficient b	-2,6918	114,42	5,67	10	22,8	14,1
Coefficient de corrélation r²	0,9618	0,9666		0,992	0,95	0,957
IC95% de a			+/- 0,027			1,09 à 1,2
IC95% de b			+/- 4,1			4,6 à 24,4
Méthode statistique	moindres carrés	moindres carrés	Passing Bablok	moindres carrés	moindres carrés	Deming

Tableau 28 : ciclosporine - synthèse des résultats retrouvés dans la bibliographie

Il n'a pas été retrouvé d'influence du sexe sur la régression, par contre le type de greffe influence la régression et plus particulièrement l'allogreffe donne des résultats inférieurs à ceux trouvés avec les autres types de greffe.

La moyenne des concentrations (tableau 19) chez les patients allogreffés est de 236.4 ng/ml. Cette moyenne est supérieure à celle des autres populations (greffe rénale : 166 ng/ml, transplantation thoracique : 164 ng/ml). Les patients d'hématologie se situent préférentiellement dans les valeurs hautes des concentrations, là même où, les deux techniques présentent le plus de différence. La différence observée serait donc due aux fortes concentrations cibles dans cette population de patients.

2 tacrolimus

La méthode chromatographique donne sur l'ensemble des résultats équivalents à ceux de la méthode immunologique MEIA. Une forte variabilité interindividuelle est toutefois retrouvée avec des pourcentages allant de -65% à +40%.

Les analyses statistiques effectuées donnent des résultats contradictoires : la moyenne des différences entre les deux méthodes (-0.5ng/ml) est statistiquement différente de 0, indiquant que la méthode chromatographique donne en moyenne des résultats légèrement plus faibles que la méthode immunologique. Cette différence n'est pas retrouvée de manière significative par l'analyse non-paramétrique de Passing Bablok. L'utilisation d'une méthode non paramétrique est moins sensible pour mettre en évidence une différence, mais elle donne des résultats plus robustes, c'est-à-dire avec plus de sécurité. La différence moyenne étant faible entre les deux méthodes de dosage, la moindre sensibilité de la méthode non paramétrique peut expliquer qu'aucune différence n'ait été mise en évidence par l'analyse de Passing Bablok. En conclusion, il est mis en évidence une tendance pour la méthode chromatographique à donner des résultats plus faibles que ceux obtenus avec la méthode immunologique. Ce résultat peut être expliqué par la plus grande spécificité de la méthode chromatographique.

Aucune influence sur les résultats du sexe ou du type de greffe n'a été retrouvée.

De nombreux essais comparatifs de méthodes de dosage du tacrolimus ont été publiés (tableau 29). Les résultats montrent le plus souvent une surestimation des résultats par la méthode immunologique de 9% (Gonshior et al, 1995) à 15% (Cogill et al, 1998)) conformément à nos résultats.

référence bibliographique	Cogill et al, 1998	Lensmeyer & Poquette, 2001	Gonshior et al, 1995	Zhang, 1997
Technique chromatographique	LC/MS-MS	LC/MS	LC/MS	LC/MS-MS
Technique immunologique	MEIA II	MEIA II	MEIA II	MEIA II
Etalon interne	FR900520	Ascomycin	32-O- Acetyltacrolimus	Ascomycin
Nombre de dosages	229	156	75	95
Type de greffe	cœur et rein	foie et rein	foie et rein	foie et rein
Coefficient a	1,16	1,098	1,09	1,03
Coefficient b	-0,00561	0,054	0,52	-0,084
r ²		0,968	0,915	0,933
IC95% de a	+/- 0,0184			
IC95% de b	+/- 0,163			
Méthode statistique	Krouwer Rabinovitz	moindres carrés	moindres carrés	moindres carrés

Tableau 29 : tacrolimus - synthèse des résultats retrouvés dans la bibliographie

3 sirolimus

La méthode chromatographique donne, sur l'ensemble des résultats, des valeurs plus fortes que la méthode immunologique ; la droite de régression a une pente inférieure à celle de la droite d'équivalence. Une très forte variabilité interindividuelle des résultats est observée (-50 à +74%).

Les résultats publiés de comparaison de méthodes de dosage (technique immunologique versus chromatographique) mettent en évidence, soit l'équivalence des deux techniques (Pini et al, 2006), soit une surestimation des résultats par la méthode immunologique (Zochowska et al, 2006 : 10.4%, Holt et al, 2005 : 21.6%) (tableau 30). La surestimation est généralement attribuée au manque de spécificité des anticorps.

Une seule publication (Pieri et al, 2007) rapporte des résultats comparables à ceux obtenus dans notre étude à savoir une sous-estimation des résultats par la méthode immunologique. L'hypothèse est que cette sous-estimation serait due à une meilleure précision de mesure du sirolimus par la méthode chromatographique et à une très grande variabilité des réponses de la méthode immunologique, et ce, plus particulièrement dans les valeurs basses.

référence bibliographique	Zochowska et al, 2006	Pieri et al, 2007	Morris et al, 2006	Bargnoux et al , 2006	Fillé et al, 2005
technique chromatographique	LC/UV	LC/MS-MS	LC/MS ²	LC/MS	LC/MS-MS
Technique immunologique	MEIA	MEIA	MEIA	MEIA	MEIA
Etalon interne	NR	32-O-Desmethoxy-rapamycin	NR	NR	Ascomycin
n	42	52	116	98	153
Type de greffe	rein	rein	rein	rein	rein et foie
Coefficient a	1,0365	0,727	1,3	1,0166	1,15
Coefficient b	0,383	1,33	1,3	0,912	0,2
r ²	0,939	0,8526	0,967	0,8708	
IC95% de a	NR	NR	NR	NR	NR
IC95% de b	NR	NR	NR	NR	NR
méthode statistique	moindres carrés	Pearson	Deming	moindres carrés	Passing Bablok

Tableau 30 : sirolimus - synthèse des résultats retrouvés dans la bibliographie

Aucune influence du sexe sur les résultats n'a été retrouvée. Le type de greffe semble quant à lui jouer un rôle. La taille des effectifs étant limitée, ces résultats seront à confirmer sur des populations plus importantes.

4 évérolimus

La méthode chromatographique donne sur l'ensemble des résultats inférieurs à ceux de la méthode immunologique FPIA sur FLxTDx[®]. L'ordonnée à l'origine de cette droite diffère statistiquement de 0.

Une forte variabilité interindividuelle est toutefois retrouvée avec des pourcentages allant de -40% à +120% avec un biais moyen de -16.6%. De tels écarts sont ceux habituellement rencontrés quand sont comparées ces deux méthodes (Salm et al, 2006 : -24.4%, Baldelli et al, 2006 : -24.3%).

La différence entre les deux méthodes tend à diminuer quand les concentrations augmentent. Ce phénomène est décrit dans la littérature par plusieurs auteurs (Baldelli et al, 2006 ; Salm et al, 2006). Une explication de cette tendance serait une plus grande précision de la méthode immunologique quand les concentrations augmentent (Salm et al, 2006) : le dosage immunologique (FPIA) repose sur le principe de compétition. A faibles concentrations, des interférences entre anticorps et métabolites sont possibles, quand les concentrations d'évérolimus augmentent, le rapport évérolimus sur métabolites diminue, et un maximum de molécule mère peut se fixer sur les anticorps de FPIA.

Aucune influence du sexe ou du type de greffe (rein ou cœur) sur les résultats n'a été retrouvée. Une analyse de vingt et un cofacteurs (Salm et al, 2006) tels que age, sexe, durée post transplantation, association à la ciclosporine..., dans une population de patients greffés rénaux, n'a retrouvé l'influence d'aucun d'entre eux sur la régression.

Ce résultat peut être expliqué par la plus grande spécificité de la méthode chromatographique permettant notamment de séparer la molécule d'évérolimus de ses métabolites. Nos résultats sont cohérents avec ceux de la littérature qui montrent le plus souvent une surestimation des résultats par la méthode immunologique (tableau 31).

Référence bibliographique	Baldelli et al, 2006	Salm et al, 2006	Khoschsorur et al, 2007	Engelmayer et al, 2005
Technique HPLC	LC/UV	LC/MS ²	LC/UV	LC/MS ²
Technique immunologique	Innofluor	Innofluor	Innofluor	Innofluor
Etalon interne	32-O-Desmethoxy-rapamycin	SDZ 223-756	NR	NR
Nombre de dosages	113	333	165	101
type de greffe	cœur	rein	rein cœur	NR
Coefficient a	1,22	1,19	1,11	1,027
Coefficient b	0,28	0,51	0,378	0,591
r ²	0,8313		0,8229	0,94
IC95% de a	1,1078 à 1,3339	1,16 à 1,22	1,039 à 1,2	NR
IC95% de b	-0,2286 à 0,7886	0,3 à 0,72	-0,08 à 0,807	NR
Méthode statistique	Deming	Deming	Passing Bablok	Passing Bablok

Tableau 31 : évérolimus - synthèse des résultats retrouvés dans la bibliographie

5 discussion générale

5.1 Avantages de la LC/MS-MS

→ La LC/MS-MS est la technique de référence :

L'utilisation d'un spectromètre de masse en tandem comme détecteur apporte la spécificité et la sensibilité nécessaires aux dosages des immunosuppresseurs :

-la grande spécificité permet de réduire au maximum l'étape de chromatographie. En effet, les inconvénients de la co-élution des molécules sont résolus par le choix de transitions de masse hautement caractéristiques de la ou des molécules à doser. Le risque d'interférence est quasi nul. Les interférences, avec les immunodosages sont des problèmes insidieux et imprévisibles pouvant avoir de graves conséquences cliniques en sur- ou sous-estimant la concentration sanguine réelle. Plusieurs cas sont rapportés dans la littérature : chez un patient suivi sur plusieurs mois (13 prélèvements), les concentrations de ciclosporine A par ACMIA sont de 68 % (35-108 %) plus élevées que celles obtenues en LC-MS/MS ou l'EMIT (Pouwels *et al.* 2004).

-la sensibilité de l'appareil autorise la simplification des procédures d'extraction. Une simple déprotéinisation de l'échantillon est suffisante dans le domaine des concentrations mesurées (0 à 50ng/ml pour tacrolimus, sirolimus et évérolimus et de 0 à 1500mg/ml pour la ciclosporine). Aucune étape de (re-)concentration de l'échantillon supplémentaire n'est nécessaire.

→ Centralisation des analyses : le dosage immunologique est réalisable pour les 4 molécules mais avec l'utilisation de techniques différentes (MEIA, FPIA, RIA...). Ces différentes techniques vont nécessiter, d'une part l'acquisition de matériel et de coffrets réactifs différents pour chaque méthode et d'autre part, un pré-traitement de l'échantillon, lui aussi, spécifique à chaque technique.

Notre technique de dosage permet de passer outre tous ces inconvénients ; une même technique permet le dosage simultané des quatre molécules :

- une seule gamme de calibration est réalisée : la gestion des réactifs se trouve très simplifiée.

- tous les échantillons sont pré-traités de la même manière : simple déprotéinisation par du méthanol/sulfate de Zinc puis centrifugation.

- toutes les analyses sont effectuées au sein du même laboratoire

- arrêt de l'utilisation d'isotopes radioactifs pour le dosage de la ciclosporine (RIA)

→ Technique plus souple : les échantillons peuvent être analysés au fur et à mesure de leur arrivée, contrairement aux dosages du tacrolimus en MEIA par exemple où les prélèvements doivent être regroupés de manière à être traités par séries. De plus, en cas d'erreur de demande du service (par exemple une demande de dosage de sirolimus à la place d'évérolimus), l'analyse n'est pas à refaire, le dosage des quatre molécules est fait simultanément.

5.2 Inconvénients de la LC/MS-MS :

→ L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem requiert un personnel très qualifié. Il s'agit d'un matériel très sensible devant être manipulé, entretenu et calibré avec beaucoup d'exigence de manière à obtenir des résultats reproductibles et justes.

→ L'achat d'une LC/MS-MS est un investissement très important (290 000 euros TTC en 2008). Cet achat est rendu possible par les économies réalisées sur les réactifs d'immunoanalyse. L'amortissement d'un tel matériel est ainsi possible sur cinq ans.

5.3 Conséquences du passage des méthodes immunologiques vers la méthode chromatographique

Elles sont de trois ordres :

→ La réorganisation des postes de travail pour les techniciens permettant un rendu des résultats des dosages de sirolimus et évérolimus plus rapide (analyses réalisées quotidiennement et non plus trois fois par semaine).

→ Une confiance accrue dans la qualité du résultat du dosage (sensibilité et spécificité améliorées). La contrepartie de cette amélioration de la qualité du dosage est une augmentation limitée du délai dans le rendu des résultats du tacrolimus estimée à une heure pour les derniers prélèvements reçus du fait du temps de passage chromatographique incompressible de 5 minutes par échantillon.

→ L'achat nécessaire d'un appareil « en miroir ». Ce deuxième appareil permet d'effectuer les dosages six jours par semaine et d'avoir une solution de remplacement en cas de panne ou de maintenance d'un des deux appareils.

Conclusion

Le suivi thérapeutique pharmacologique est un outil indispensable pour le suivi des patients transplantés et traités par des immunosuppresseurs. De nombreuses techniques immunologiques et chromatographiques ont été développées pour le dosage sanguin de ces molécules. La méthode chromatographique utilisée au sein de notre laboratoire permet de répondre à toutes les exigences du suivi thérapeutique pharmacologique (rapidité, exactitude, sensibilité...).

Nos études de comparaison de méthodes ont permis le transfert de la technique immunologique vers la technique chromatographique pour le sirolimus et l'évérolimus et d'envisager à court terme celui du tacrolimus. Pour ce qui est du dosage de la ciclosporine en LC/MS-MS, des études supplémentaires seront nécessaires pour mener à bien le transfert de méthode de dosage. En effet, le problème de linéarité sur l'ensemble de la gamme pour cette molécule doit être mieux cerné et explicité. De plus, l'importante augmentation d'activité apportée par ce dosage au sein du laboratoire (analyse actuellement effectuée dans le laboratoire de biochimie spécialisée) ne pourra être envisagée sans une réorganisation des postes de travail et l'achat d'un préparateur automatisé d'échantillons.

Bibliographie

- Alak AM, Moy S, Cook M, Lizak P, Niggebiugge A, Menard S, Chilton A. An HPLC/MS/MS assay for tacrolimus in patient blood samples. Correlation with results of an ELISA assay. *J Pharm Biomed Anal* 1997;16:7-13.
- Ansermot N, Fathi M, Veuthey JL, Desmeules J, Rudaz S, Hochstrasser D. Simultaneous quantification of cyclosporine, tacrolimus, sirolimus and everolimus in whole blood by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2008 Jun;41(9):728-35.
- Baldelli S, Crippa A, Gabrieli R, Fiocchi R, Perico N, Merlini S, Ottomano C, Cattaneo D. Comparison of the Innofluor certican assay with HPLC-UV for the determination of everolimus concentrations in heart transplantation. *Clin Biochem*. 2006 Dec;39(12):1152-9. Epub 2006 Sep 14.
- Baldelli S, Murgia S, Merlini S, Zenoni S, Perico N, Remuzzi G, Cattaneo D. High performance liquid chromatography with ultraviolet detection for therapeutic drug monitoring of everolimus. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;816:99-105.
- Bargnoux AS, Bonardet A, Chong G, Garrigue V, Deleuze S, Dupuy AM, Mourad G, Cristol JP. Evaluation of an immunoassay (Abbott-IMX Analyzer) allowing routine determination of sirolimus: comparison with LC-MS method. *Transplant Proc*. 2006 Sep;38(7):2352-3.
- Bechstein WO. Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl Int* 2000;13:313-26.
- Beysens A.J., Beuman G.H., Vander Heijden J.J., Hoogtanders K.E.J., Steijger O.M, Lingeman H. Determination of tacrolimus (FK-506) in whole-blood using liquid-chromatography and fluorescence detection, *Chromatographia* 39 (1994), pp. 490–496.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986 Feb 8;1(8476):307-10.
- Boudennaia TY, Napoli KL. Validation of a practical liquid chromatography with ultraviolet detection method for quantification of whole-blood everolimus in a clinical TDM laboratory. *Ther Drug Monit* 2005;27:171-7.
- 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. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;749:93-100.
- Butch AW, Fukuchi AM. Analytical performance of the CEDIA cyclosporine PLUS whole blood immunoassay. *J Anal Toxicol*. 2004 Apr 28(3):204-10.
- Campanero MA, Cardenas E, Sadaba B, Garcia-Quetglas E, Munoz-Juarez MJ, Gil-Aldea I, et al. Therapeutic drug monitoring for sirolimus in whole blood of organ transplants by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr A* 2004;1031:265-73.
- Cattaneo D, Perico N, Gaspari F. Assessment of sirolimus concentrations in whole blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;774:187-94.
- Chast F. Histoire contemporaine des médicaments. La Découverte;1995.
- Chen YL, Hirabayashi H, Akhtar S, Pelzer M, Kobayashi M. Simultaneous determination of three isomeric metabolites of tacrolimus (FK506) in human whole blood and plasma using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006;830:330-41.

- Christians U, Braun F, Schmidt M, Kosian N, Schiebel HM, Ernst L, et al. Specific and sensitive measurement of FK506 and its metabolites in blood and urine of liver-graft recipients. *Clin Chem* 1992;38:2025-32.
- Cogill JL, Taylor PJ, Westley IS, Morris RG, Lynch SV, Johnson AG. Evaluation of the tacrolimus II microparticle enzyme immunoassay (MEIA II) in liver and renal transplant recipients. *Clin Chem*. 1998 Sep;44(9):1942-6
- 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)1 in organ transplantation. *Drugs* 2001;61:1957-2016.
- Engelmayer J, Engelmayer U, Streit F, Arabshahi L, Armstrong V.W, Ollerich M. Comparison of the Seradyn Innofluor Certican Assay on TDxFLx system with LC/MS-MS. *Ther Drug Monit* (27-2) april 2005
- Fillée C, Mourad M, Squifflet JP, Malaise J, Lerut J, Reding R, Borghgraef P, Vanbinst R, Wallemacq PE Evaluation of a new immunoassay to measure sirolimus blood concentrations compared to a tandem mass-spectrometric chromatographic analysis. *Transplant Proc*. 2005 Jul-Aug;37(6):2890-1.
- Fuhrman C, Chouaïd C. Concordance de deux variables : les approches numériques. *Rev Mal Respir* 2004 ; 21 : 123-125
- 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.
- Haddad E. Avolution des concepts de l'immunosuppression dans le cadre de la transplantation d'organe. *Arch. Ped*. 2004 ; 11 : 532-534
- Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2004 Dec 23;351(26):2715-29
- Holt DW, Lee T, Johnston A. Measurement of sirolimus in whole blood using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Clin Ther* 2000;22 Suppl B:B38-48.
- Holt DW, Moreton M, Laamanen K, Johnston A. A microparticle enzyme immunoassay to measure sirolimus. *Transplant Proc*. 2005 Jan-Feb;37(1):182-4.
- Jorga A, Holt DW, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine. *Transplant Proc*. 2004 Mar;36(2 Suppl):396S-403S.
- Journois D. concordance de deux variables : l'approche graphique. *Rev Mal Respir* 2004 ; 21 : 127-130
- Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther* 2002;24:330-50;
- Kahan BD, Napoli KL, Kelly PA, Podbielski J, Hussein I, Urbauer DL, Katz SH, Van Buren CT. Therapeutic drug monitoring of sirolimus: correlations with efficacy and toxicity. *Clin Transplant*. 2000 Apr;14(2):97-109.
- Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B.: Pharmacology of calcineurin antagonists *Transplant Proc*. 2004 Mar;36(2 Suppl):25S-32S.
- 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* 2002;48:69-76.

- Khoschsorur G, Fruehwirth F, Zelzer S, Stettin M, Halwachs-Baumann G. Comparison of fluorescent polarization immunoassay (FPIA) versus HPLC to measure everolimus blood concentrations in clinical transplantation. *Clin Chim Acta*. 2007 May 1;380(1-2):217-21.
- Khoschsorur G, Semmelrock HJ, Rodl S, Auer T, Petek W, Iberer F, Tscheliessnigg KH. Rapid, sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of cyclosporin A and its metabolites M1, M17 and M21. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;690:367-72.
- Kirchner GI, Jacobsen W, Deters M, Christians U, Nashan B, Winkler M, et al. Fast quantification method for siroli and its major metabolites. *Transplant Proc* 2001;33:1091-2.
- Kirchner GI, Winkler M, Mueller L, Vidal C, Jacobsen W, Franzke A, 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.
- Koal T, Deters M, Casetta B, Kaefer V. Simultaneous determination of four immunosuppressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2004 ; 805 :215-222
- Korecka M, Solari SG, Shaw LM. Sensitive, high throughput HPLC-MS/MS method with on-line sample clean-up for everolimus measurement. *Ther Drug Monit* 2006;28:484-90.
- Kovarik JM, Eisen H, Dorent R, Mancini D, Vigano M, Rouilly M, et al. Everolimus in de novo cardiac transplantation: pharmacokinetics, therapeutic range, and influence on cyclosporine exposure. *J Heart Lung Transplant* 2003;22:1117-25.
- 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* 2001;70:247-54.
- Kovarik JM, Kahan BD, Kaplan B, Lorber M, Winkler M, Rouilly M, et al. Longitudinal assessment of everolimus in de novo renal transplant recipients over the first posttransplant year: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and influence on cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:48-56.
- Kovarik JM, Kaplan B, Tedesco Silva H, Kahan BD, Dantal J, Vitko S, et al. Exposure response relationships for everolimus in de novo kidney transplantation: defining a therapeutic range. *Transplantation* 2002;73:920-5.
- Lemaire M, Tillement JP. Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood. *J Pharm Pharmacol* 1982;34:715-8.
- Lensmeyer GL, Poquette MA. Therapeutic monitoring of tacrolimus concentrations in blood: semi-automated extraction and liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2001;23:239-49.
- Levy G, Thervet E, Lake J, Uchida K; Consensus on Neoral C(2): Expert Review in Transplantation (CONCERT) Group. Patient management by Neoral C(2) monitoring: an international consensus statement. *Transplantation*. 2002 May 15;73(9 Suppl):S12-8.
- Levy G. C2 monitoring strategy for optimising immunosuppression from the Reoral formulation. *Biodrugs* 2001 ; 15(5) : 279-290
- Magni F, Pereira S, Leoni M, Grisenti G, Galli Kienle M. Quantitation of cyclosporin A in whole blood by liquid chromatography/stable isotope dilution electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2001;36:670-6.
- Megabarne B, Kontar L. Interactions médicamenteuses à redouter avec les immunosuppresseurs. *Réanimation* 2006 ; 15 : 303-309

- Morris RG, Salm P, Taylor PJ, Wicks FA, Theodossi A. Comparison of the reintroduced MEIA assay with HPLC-MS/MS for the determination of whole-blood sirolimus from transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2006 Apr;28(2):164-8.
- Murthy JN, Yatscoff RW, Soldin SJ. Cyclosporine metabolite cross-reactivity in different cyclosporine assays. *Clin Biochem.* 1998 Apr;31(3):159-63.
- Napoli KL, Kahan BD. Sample clean-up and high-performance liquid chromatographic techniques for measurement of whole blood rapamycin concentrations. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994;654:111-20.
- Neumayer HH, Paradis K, Korn A, Jean C, Fritsche L, Budde K, et al. Entry-into-human study with the novel immunosuppressant SDZ RAD in stable renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:694-703.
- Passing H, Bablok. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983 Nov;21(11):709-20.
- Pieri M, Capone D, Gentile A, Miraglia N, Leo E, Federico S, Basile V, Acampora A. Immunoassay determination of rapamycin: reliability of the method with respect to liquid chromatography mass spectrometric quantification. *Clin Transplant.* 2007 Sep-Oct;21(5):633-7.
- Pieri M, Miraglia N, Castiglia L, Genovese G, Basilicata P, Simonelli A, Acampora A. Determination of rapamycin: quantification of the sodiated species by an ion trap mass spectrometer as an alternative to the ammoniated complex analysis by triple quadrupole. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:3042-50.
- Pini LA, Gallesi D, Brovia D, Bertolini A, Pinetti D, Ruggieri V, Pisa S, Poppi B, Nives Castellana C. Switching from HPLC/UV to MEIA for whole blood sirolimus quantitation: comparison of methods. *J Clin Lab Anal.* 2006;20(6):239-44
- Pouwels C. et al Positive interference due to a plasma component causes overestimation of whole blood cyclosporine concentrations measured with dimension ACMIA cyclosporine assay. *Clin. Chem.* 2004 Vol 50, N°6, supplA134.
- Regazzi MB, Rinaldi M, Molinaro M, Pellegrini C, Calvi M, Arbustini E, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus in heart transplant recipients. *Ther Drug Monit* 1999;21:2-7.
- Salm P, Taylor PJ, Lynch SV, Pillans PI. Quantification and stability of everolimus (SDZ RAD) in human blood by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;772:283-90.
- Salm P, Taylor PJ, Lynch SV, Warnholtz CR, Pillans PI. A rapid HPLC-mass spectrometry cyclosporin method suitable for current monitoring practices. *Clin Biochem* 2005;38:667-73.
- Sawchuk RJ, Cartier LL. Liquid-chromatographic determination of cyclosporin A in blood and plasma. *Clin Chem* 1981;27:1368-71.
- Segarra I, Brazelton TR, Guterman N, Hausen B, Jacobsen W, Morris RE, 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 Biomed Sci Appl* 1998;720:179-87.
- Starling RC, Hare JM, Hauptman P, McCurry KR, Mayer HW, Kovarik JM, Schmidli H. Therapeutic drug monitoring for everolimus in heart transplant recipients based on exposure-effect modeling. *Am J Transplant.* 2004 Dec;4(12):2126-31.

- Streit F, Christians U, Schiebel HM, Napoli KL, Ernst L, Linck A, 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.
- Taylor PJ, Brown SR, Cooper DP, Salm P, Morris MR, Pillans PI, Lynch SV. Evaluation of 3 internal standards for the measurement of cyclosporin by HPLC-mass spectrometry. *Clin Chem*. 2005 Oct;51(10):1890-3.
- Taylor PJ, Hogan NS, Lynch SV, Johnson AG, Pond SM. Improved therapeutic drug monitoring of tacrolimus (FK506) by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1997;43:2189-90.
- Taylor PJ, Jones CE, Martin PT, Lynch SV, Johnson AG, Pond SM. Microscale high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for cyclosporin A in blood. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;705:289-94.
- Trepanier DJ, Gallant H, Legatt DF, Yatscoff RW. *Clin Biochem*. 1998 Jul;31(5):345-51. Rapamycin: distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigations: an update.
- Undre NA, Stevenson P, Schafer A. Pharmacokinetics of tacrolimus: clinically relevant aspects. *Transplant Proc* 1999;31:21S-4S.
- Undre NA, van Hooff J, Christiaans M, Vanrenterghem Y, Donck J, Heeman U, Kohnle M, Zanker B, Land W, Morales JM, Andrés A, Schäfer A, Stevenson P Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc*. 1999 Feb-Mar;31(1-2):296-8.
- Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, Starzl T. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet*. 1995 Dec;29(6):404-30.
- Vogeser M, Fleischer C, Meiser B, Groetzner J, Spohrer U, Seidel D. Quantification of sirolimus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using on-line solid phase extraction. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:40-5.
- Vollenbroeker B, Koch JH, Fobker M, Suwelack B, Hohage H, Muller U. Determination of cyclosporine and its metabolites in blood via HPLC-MS and correlation to clinically important parameters. *Transplant Proc* 2005;37:1741-4.
- Wallemacq PE, Vanbinst R, Asta S, Cooper DP. High-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of sirolimus in whole blood. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:921-5.
- Wong SH. Therapeutic drug monitoring for immunosuppressants. *Clin Chim Acta* 2001;313:241-53.
- Yatscoff RW, Boeckx R, Holt DW, Kahan BD, LeGatt DF, Sehgal S, Soldin SJ, Napoli K, Stiller C. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring of rapamycin: report of the consensus panel. *Ther Drug Monit*. 1995 Dec;17(6):676-80.
- Yatscoff RW, Faraci C, Bolingbroke P. Measurement of rapamycin in whole blood using reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 1992;14:138-41.
- Yatscoff RW, Wang P, Chan K, Hicks D, Zimmerman J. Rapamycin: distribution, pharmacokinetics, and therapeutic range investigations. *Ther Drug Monit*. 1995 Dec;17(6):666-71.
- 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, Tan D, Theng J, Lim L, Liu YP, Lam KW. Optimized analytical method for cyclosporin A by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 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 May;37(5):405-15.
- Zochowska D, Bartłomiejczyk I, Kamińska A, Senatorski G, Paczek L. High-performance liquid chromatography versus immunoassay for the measurement of sirolimus: comparison of two methods. *Transplant Proc.* 2006 Jan-Feb;38(1):78-80.

Nom – Prénoms : DESLANDES Guillaume, Jean-Pierre

Titre du mémoire – thèse : Comparaison de méthodes de dosage des médicaments immunosuppresseurs (ciclosporine, tacrolimus, sirolimus et évérolimus) sur sang total : chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem versus immunodosage.

Résumé du mémoire – thèse :

Le suivi thérapeutique pharmacologie est un outil indispensable pour le suivi des patients transplantés, en effet la maîtrise du traitement immunosuppresseur est un élément majeur dans la prévention du rejet après transplantation d'organe. Différents types de méthodes sont disponibles pour le dosage sanguin de ces médicaments, aussi bien selon des techniques immunologiques que chromatographiques. Plus sensibles et spécifiques, les méthodes chromatographiques tendent à remplacer les méthodes immunologiques. Cependant, avant d'envisager le transfert d'une méthode immunologique vers une méthode chromatographique, celles-ci doivent être comparées. Des dosages sanguins de ciclosporine, tacrolimus, sirolimus ou évérolimus ont été effectués selon les deux méthodes. L'analyse des résultats obtenus montre une bonne corrélation entre les techniques avec, selon les molécules, une plus ou moins grande dispersion des résultats et ce plus particulièrement sur les faibles valeurs. Nos études de comparaison de méthodes ont permis le transfert de la technique immunologique vers la technique chromatographique pour le sirolimus et l'évérolimus et d'envisager à court terme celui du tacrolimus puis celui de la ciclosporine.

Mots clés :

IMMUNOSUPPRESSEURS, TACROLIMUS, SIROLIMUS, LC/MS-MS, SUIVI THERAPEUTIQUE.

Président :

-M. Alain PINEAU, Professeur de Toxicologie - Faculté de Pharmacie - Nantes

Membres du Jury :

-Mme Pascale JOLLIET, Professeur de Pharmacologie - Faculté de Médecine - Nantes

-M. Yves MAURAS, Professeur de Toxicologie - Faculté de Pharmacie - Angers

-M. Eric DAILLY, Maître de Conférence de Pharmacologie - Faculté de Médecine - Nantes

-Mme Dominique NAVAS, Praticien Hospitalier Pharmacien – CHU de Nantes

-Mme Muriel COURANT-MENANTEAU, Assistant Spécialiste Pharmacien – CHU de Nantes

Adresse de l'auteur :

DESLANDES Guillaume

11, rue du Coteau

44000 Nantes