

## Suivi thérapeutique des patients transplantés : dosage de quatre immunosuppresseurs en spectrométrie de masse en tandem : ciclosporine, tacrolimus, sirolimus et évérolimus

### Circonstances des traitements immunosuppresseurs

La ciclosporine, le tacrolimus, le sirolimus et l'évérolimus sont des immunosuppresseurs prescrits pour éviter le rejet du greffon dans le cadre :

- de transplantation d'organes (rein, cœur, foie, pancréas, poumon, intestin grêle)
- de greffe de moelle osseuse.

La ciclosporine peut être aussi indiquée dans le traitement :

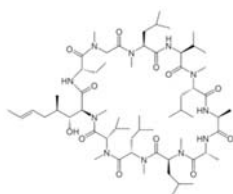
- de deuxième intention des syndromes néphrotiques corticodépendants et corticorésistants,
- des formes sévères de psoriasis et de dermatite atopique,
- des formes sévères de polyarthrite rhumatoïde et diverses maladies autoimmunes,
- de la rectocolite hémorragique en cas de non-réponse aux corticoïdes,
- de certaines uvéites postérieures ou moyennes non infectieuses,
- d'aplasies médullaires acquises sévères ne pouvant bénéficier d'une greffe de moelle.

### Mode d'action des médicaments

Ces quatre immunosuppresseurs peuvent se séparer en deux groupes distincts en fonction de leur mode d'action :

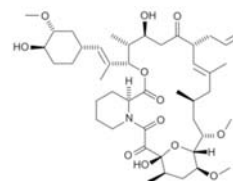
#### les inhibiteurs de la calcineurine :

- **ciclosporine (Sandimmun® et Néoral®)**



Extraite d'un champignon, la ciclosporine A est un polypeptide cyclique de 11 acides aminés, très hydrophobe. Introduite en 1984, la ciclosporine a été le premier immunosuppresseur efficace permettant des progrès considérables dans la transplantation. La ciclosporine est un inhibiteur du premier signal d'activation des lymphocytes T : elle inhibe la calcineurine, enzyme clé de la cascade de signalisation intracellulaire activée lors de la stimulation antigénique. Il en découle une diminution de production d'IL2 et un blocage des lymphocytes quiescents en phase G0 du cycle cellulaire.

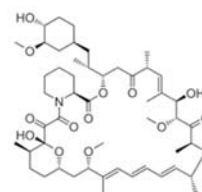
- **tacrolimus (Prograf® et Advagraf®)**



Antibiotique lipophile appartenant à la classe des macrolides, le tacrolimus fut introduit en thérapeutique en 1995. Comme la ciclosporine, mais par un mécanisme différent, le tacrolimus inhibe la calcineurine, conduisant à une inhibition calcium-dépendante du signal d'activation des lymphocytes T, empêchant ainsi la transcription d'une partie des gènes des lymphokines (interleukine-2 et 3 et interféron-gamma) et des récepteurs de l'interleukine-2.

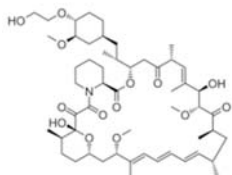
#### les inhibiteurs de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*)

- **sirolimus (Rapamune®)**



Le sirolimus inhibe aussi l'activation des lymphocytes T en bloquant la transduction des signaux intracellulaires tant

dépendante qu'indépendante du calcium. Il se lie à la protéine cytosolique spécifique FKBP-12 et le complexe inhibe l'activation de la cible de la rapamycine (*Target Of Rapamycine*) chez les mammifères (mTOR), kinase indispensable à la progression du cycle cellulaire.



■ **évérolimus (Certican®)**

L'évérolimus inhibe l'expansion clonale des lymphocytes T activés par l'antigène, médiée par l'interleukine-2 et l'interleukine-15. Il provoque un blocage des cellules au stade G1 de réplication de l'ADN. Il forme un complexe avec la protéine cytoplasmique FKBP-12 et se lie à la protéine régulatrice mTOR. La fonction de mTOR se trouve alors inhibée entraînant une baisse de la prolifération lymphocytaire et un arrêt du cycle cellulaire.

Les effets des deux médicaments sont synergiques avec ceux de la ciclosporine. Ces deux immunosuppresseurs sont métabolisés par le cytochrome P450 et interagissent avec les anticalcineurines. Ils sont utilisés dans la prévention du rejet aigu. Leurs propriétés antiprolifératives et antitumorales et leur absence de néphrotoxicité leur confèrent un avantage important en transplantation d'organe.

- infections fongiques (candidoses digestives, aspergilloses et cryptococcoses),
- infections à *Pneumocystis* entraînant des pneumopathies graves,
- Infections virales (CMV, EBV, hépatites B et C, BKvirus et herpes virus humain 8 pouvant induire des sarcomes de Kaposi)

Les tumeurs

Le traitement immunosuppresseur entraîne l'inhibition des fonctions des lymphocytes T chargés de détruire les cellules cancéreuses. Les syndromes lymphoprolifératifs sont les plus fréquents, surtout favorisés par l'EBV, ainsi que les cancers de la peau. Le risque augmente avec l'ancienneté de la transplantation et la durée du traitement immunosuppresseur.

Nécessité du suivi thérapeutique

Les immunosuppresseurs ont une marge thérapeutique étroite, possèdent une pharmacocinétique très variable et une efficacité difficile à évaluer. Les risques de sous-dosage ou de toxicité ne sont pas négligeables; aussi un suivi thérapeutique très régulier dès l'instauration du traitement est indispensable pour individualiser la posologie sur la base de la concentration sanguine individuelle résiduelle. Le prélèvement doit être effectué soit à distance de 12h de la prise précédente soit juste avant la prise suivante. Le suivi thérapeutique est instauré deux fois par semaine après la greffe et de façon très régulière en période d'entretien, quatre à cinq jours après toute adaptation de la posologie ou modification du protocole immunosuppresseur.

Les molécules de médicaments se répartissent largement dans les érythrocytes. Aussi, il est préférable d'effectuer les dosages dans le sang total plutôt que dans le plasma.

Toxicité, effets indésirables

Ciclosporine et tacrolimus

La principale limite à l'utilisation des inhibiteurs de la calcineurine est leur néphrotoxicité.

D'autres effets secondaires peuvent survenir, dépendant de la dose : hypertension artérielle, dyslipidémie, hirsutisme et hyperplasie gingivale pour la ciclosporine, alopecie pour le tacrolimus, diabète non insulino-dépendant, ostéoporose, hépatotoxicité, toxicité neurologique (tremblements, convulsions).

Sirolimus et évérolimus :

Les effets secondaires sont différents de ceux des inhibiteurs des calcineurines. Ils entraînent principalement une hypercholestérolémie et une hypertriglycéridémie, une thrombopénie, une anémie arégénérative. Ils ont une hépatotoxicité et peuvent donner, plus rarement, des pneumopathies interstitielles.

Complications liées à l'immunosuppression

Les infections

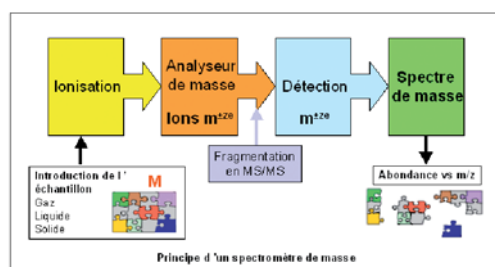
Les infections sont fréquentes dans plus de 80% des cas et fonction de la durée et de l'intensité de l'immunosuppression

- infections bactériennes, peu fréquentes,

Dosage des immunosuppresseurs par LCMSMS avec préparation automatisée

La chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem permet le dosage simultané, avec une grande sensibilité et spécificité, de plusieurs médicaments proches par leur structure moléculaire au sein d'un même échantillon biologique.

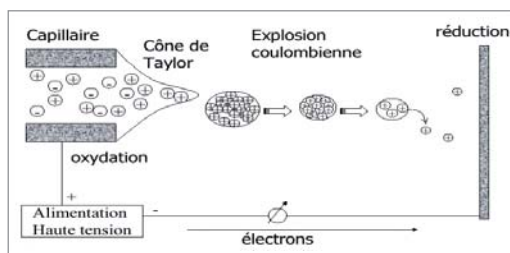
Principe de dosage



Le prélèvement de sang total requiert un prétraitement par précipitation des protéines suivie d'une centrifugation. Des étalons internes marqués isotopiquement sont ajoutés et vont permettre pour chaque paramètre de contrôler la fiabilité du dosage. Cette étape est robotisée sur un automate de préparation.

Le surnageant est ensuite injecté dans une colonne « trap » qui permet l'élimination des impuretés. Un système de vannes oriente l'extrait contenant les molécules d'intérêt concentrées, vers une colonne analytique qui va chromatographier les molécules à doser.

Les molécules vont enfin être dirigées vers le spectromètre de masse en tandem doté d'un électronebulisateur ou électrospray (ESI).

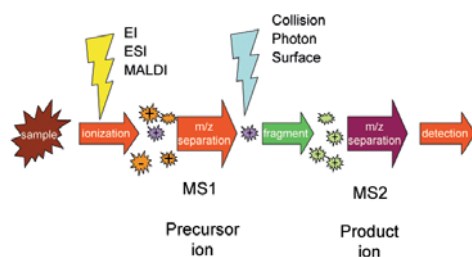


Le liquide est introduit dans la source par l'intermédiaire d'un fin capillaire et est soumis à un fort champ électrique ; sous l'action d'un gaz nébuliseur, il se transforme en un brouillard de fines gouttelettes hautement chargées. Les ions moléculaires ou « ions parents » ainsi formés vont passer dans le premier spectromètre de masse (MS1) et vont être séparés en fonction de leur masse et de leur charge.

Ils sont ensuite acheminés vers une cellule de collision contenant un gaz inerte où se produit une rupture de liaisons chimiques au sein des « ions parents ».

Ces fragments caractéristiques de la molécule à doser ou « ions produits » sont ensuite analysés dans le deuxième spectromètre de masse (MS2) en fonction du rapport entre leur masse et leur charge.

La mesure se fait par un mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) dans lequel les deux analyseurs sont fixés à des tensions constantes. Le second analyseur MS2 est focalisé sur l'« ion produit » assurant une grande sélectivité et une forte sensibilité au dosage.



### Caractéristiques de la technique :

- **une grande spécificité** : la spectrométrie de masse opère une sélection maximale de la molécule à doser et permet ainsi une identification et une quantification très spécifiques de la molécule mère alors que les techniques immunochimiques présentent des réactions croisées entre molécules de structure proche ou entre la molécule mère et ses métabolites ;
- **une grande sensibilité** : les seuils de quantification très bas de l'ordre du µg, permettent ainsi un dosage fiable à de très faibles concentrations. Les domaines de linéarité sont larges, superposables aux zones thérapeutiques efficaces, autorisant ainsi un dosage direct, sans dilution de l'échantillon, pour de fortes concentrations.

La spectrométrie de masse reste une technique délicate dans la mise au point et la validation de méthodes, dans la lecture des résultats et la maintenance de l'appareillage. Pour cela, elle nécessite une expertise et un personnel formé et expérimenté. Cependant, cette technologie s'adapte de plus en plus à l'exercice de la biologie médicale par la maniabilité et la robustesse des appareils. La spectrométrie de masse est ainsi devenue une technique incontournable pour bon nombre de dosages biologiques en grande série tels que ceux des immunosuppresseurs afin de fournir aux cliniciens des résultats d'analyses d'une grande fiabilité dans le suivi thérapeutique.