

Article original / Original article

Influence des immunosuppresseurs co-administrés au mycophénolate mofétil lors du dosage de l'acide mycophénolique par technique immuno-enzymatique

Influence of immunosuppressants co-administered with mycophenolate mofetil during mycophenolic acid dosage by the enzyme-multiplied immunoassay technique

Peggy Gandia^{1,2*}, Faten Koraïchi¹, Nassim Kamar³, Lionel Rostaing³, Quentin Chalret du Rieu¹, Michel Lavit¹, Georges Houin¹

¹ Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie Clinique, Hôpital Purpan, Institut Fédératif de Biologie, 330 avenue de Grande-Bretagne, TSA 40031, 31059 Toulouse Cedex 09, France

² Laboratoire de Pharmacocinétique, EA3035, 29-24 rue du Pont Saint-Pierre, 31000 Toulouse, France

³ Service de Néphrologie, Dialyse et Transplantation d'organes, Hôpital Rangueil, 1 avenue du Pr Jean Poulhès, TSA 50032, 31059 Toulouse Cedex, France

Résumé – Objectifs : Le mycophénolate mofétil (MMF) est une prodrogue de l'acide mycophénolique (AMP). Ce dernier est un immunosuppresseur dont le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) est devenu pratique courante après des greffes rénales, hépatiques et cardiaques. L'objectif de cette étude a été de comparer deux méthodes de dosage de l'AMP (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique : EMIT vs la chromatographie liquide couplée à un détecteur UV : CL-UV) en fonction du traitement immunosuppresseur co-administré. **Méthode :** Cent vingt-trois échantillons issus de 58 patients adultes transplantés rénaux ont été analysés selon les deux méthodes. Dix-huit patients ont reçu du MMF associé à la ciclosporine tandis que 40 ont reçu du MMF associé au bélatcept. **Résultats :** Indépendamment du traitement immunosuppresseur co-administré, les concentrations d'AMP ont été sous-estimées par la méthode EMIT par rapport à la méthode CL-UV avec un biais de $-0,829$ mg/mL soit une sous-estimation de 8,86 %. Une sous-estimation des concentrations d'AMP a été retrouvée dans le groupe traité par bélatcept avec un biais de $-1,06$ % correspondant à une sous-estimation de 9,9 %, contrairement au groupe traité par ciclosporine. **Conclusion :** La méthode EMIT n'est pas un outil suffisamment spécifique pour le suivi thérapeutique pharmacologique de l'acide mycophénolique dont le faible index thérapeutique ne tolère pas cette limite analytique. On lui préférera une méthode chromatographique (CL-UV ou mieux la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse CL-SM/SM).

Mots clés : Acide mycophénolique, bélatcept, ciclosporine, EMIT, CL-UV

Abstract – Objectives: Mycophenolate mofetil (MMF) acts as a prodrug of the immunosuppressant mycophenolic acid (MPA). Therapeutic drug monitoring of MPA has become a common practice in renal-, hepatic- and cardiac-transplant patients. The objective of this study was to compare two methods used for the determination of MPA concentration (Enzyme-multiplied immunoassay technique: EMIT vs. Liquid chromatography-UV detection: LC-UV) according to the co-administered immunosuppressant treatment. **Method:** One hundred and twenty-three samples from 58 adult kidney transplant recipients were analysed with both techniques. Eighteen patients received MMF co-administered with cyclosporine while 40 patients received MMF associated with belatacept. **Results:** Independently of the co-administered treatment, the MPA concentrations were underestimated by the EMIT method when compared with LC-UV results with a bias of -0.829 mg/L (8.86%). This underestimation was observed in the belatacept co-treated group with a bias of -1.06 mg/L (9.9%), while it was absent in the cyclosporine co-treated group. **Conclusion:** The EMIT method is not a specific enough tool for the therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil (MMF). Since MPA has a narrow

* Correspondance : gandia.p@chu-toulouse.fr

therapeutic index, such an analytical limit is not acceptable for the determination of its plasma levels in clinical use. Thus, chromatographic methods such as LC-UV or LC-MS/MS are currently preferred.

Key words: Mycophenolic acid, belatacept, cyclosporine, EMIT and LC-UV

Reçu le 4 juin 2011, accepté après modifications le 22 septembre 2011

Publication en ligne le 17 octobre 2011

1 Introduction

Le mycophénolate mofétil (MMF) est un immunosuppresseur largement utilisé pour la prophylaxie des rejets de greffe rénale, hépatique et cardiaque, chez l'adulte et l'enfant. Il est consensuellement associé à un anticalcineurine (ciclosporine ou tacrolimus) et aux corticostéroïdes [1].

Après administration orale, le MMF est rapidement et complètement résorbé puis hydrolysé en son métabolite actif, l'acide mycophénolique (AMP). L'activité immunosuppressive de l'AMP résulte d'une inhibition non-compétitive, sélective et réversible de l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH). Cette dernière est l'enzyme clé de la synthèse *de novo* de guanosine triphosphate (GTP) à partir de l'inosine monophosphate (IMP). Cette voie de synthèse est indispensable à l'activité et la prolifération des lymphocytes B et T dépourvus de voie de sauvetage. Ainsi, l'AMP en se fixant sur l'IMPDH dans les lymphocytes activés, entraîne une déplétion intracellulaire de GTP conduisant à l'arrêt de la synthèse de l'ADN et donc à un blocage de la prolifération des lymphocytes en phase G1/S du cycle cellulaire [2–4].

Le MMF à la dose de 2 g/j s'est révélé efficace dans la prévention du rejet de greffe et l'allongement de la survie du greffon et du patient [5]. Cependant, le traitement par MMF est associé à une fréquence élevée de troubles gastro-intestinaux et hématologiques à l'origine de réductions de doses ou d'interruptions thérapeutiques chez 42 à 72 % des patients [6]. Si les réductions de dose ont permis d'améliorer la tolérance au traitement, ils ont toutefois exposé les patients à un risque plus élevé de rejet dans la première année post-greffe rénale par rapport aux patients chez lesquels le schéma posologique initial était maintenu (23,3 % contre 3,7 %, $P < 0,0001$) [6]. Les réductions posologiques ainsi réalisées ont significativement diminué la survie du greffon à trois ans (76,3 % contre 88,3 %, $p = 0,003$) et posé la question des fondements de l'adaptation posologique du MMF, lequel doit permettre d'améliorer la tolérance sans pour autant compromettre l'efficacité du traitement.

Si l'adaptation de posologie du MMF en fonction du poids s'est révélée inappropriée [7], de nombreuses études pharmacocinétiques ont montré une corrélation entre les concentrations plasmatiques totales en AMP (c'est-à-dire la somme de la forme liée à l'albumine et de la forme libre) et l'efficacité du MMF en transplantation. Des expositions basses en AMP augmentent significativement le risque de rejet chez les transplantés rénaux [5]. Une aire sous la courbe des concentrations plasmatiques totales en fonction du temps (ASC_{0-12}) comprises entre 30 et

60 mg/L h est associée à une moindre incidence de rejet [8]. Cependant, au sein d'un groupe de patients recevant la même dose de MMF, certains n'atteignent pas cette cible et l' ASC_{0-12} de l'AMP peut varier d'un facteur allant de 1 à 10 [8]. Ainsi, les études menées chez les patients transplantés montrent que le MMF se caractérise par : (i) une relation concentration plasmatique totale-efficacité thérapeutique ; (ii) l'absence de corrélation dose-concentration plasmatique totale ; (iii) une importante variabilité interindividuelle des concentrations plasmatiques totales.

Ces caractéristiques ont justifié le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) de l'AMP en transplantation [9]. Ce suivi s'inscrit dans l'amélioration de la prise en charge du patient transplanté. Il repose sur un ajustement individuel des doses de MMF en fonction des concentrations plasmatiques totales de l'AMP [10].

De nombreuses méthodes analytiques automatisées ont été utilisées pour le suivi thérapeutique pharmacologique de l'AMP, telles que l'immunoanalyse (EMIT : *Enzyme Multiplied Immunoassay Technique* [11,12] ; CEDIA : *Cloned Enzyme Donor ImmunoAssay* [13, 14]) ou les méthodes enzymatiques (IMPDH : *Inosine MonoPhosphate DesHydrogenase* [15, 16]). La plus évaluée reste la méthode EMIT. Cependant, de nombreux auteurs ont montré que cette méthode surestimait les concentrations d'AMP par rapport à celles obtenues par CL-UV, de 12 % selon Vogl *et al.* [17], 11 % selon Hosotsubo *et al.* [4], 18,8 % selon Beal *et al.* [18] et jusqu'à 35 % selon Irtan *et al.* [3]. Cette surestimation serait due à une réaction croisée entre les anticorps de détection utilisés dans la méthode EMIT et l'AMP-acyl-glucuronate (AMPaG), métabolite actif de l'AMP [19]. C'est la raison pour laquelle la méthode de référence est actuellement la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (CL-SM/SM) [20].

La ciclosporine fréquemment co-administrée au MMF et aux corticoïdes chez les patients transplantés rénaux, est associée à une néphrotoxicité à long terme qui aboutit à une réduction de la survie du greffon/patient, ainsi qu'à une augmentation de la morbidité et la mortalité d'origine cardiovasculaire [21]. Aussi, de nouvelles stratégies thérapeutiques incluant des molécules non néphrotoxiques et comportant un moindre risque cardiovasculaire sont à l'essai. Récemment, une association MMF/belatacept (LEA29Y) a été évaluée en greffe rénale [22]. Le belatacept est une protéine recombinante administrée par voie intraveineuse qui inhibe l'étape du second signal d'activation des lymphocytes T. Cette étape fait intervenir, entre autres, une voie de signalisation impliquant l'immunoglobuline CD28

constitutivement exprimée par les lymphocytes T. L'interaction de cette dernière avec les antigènes de surface CD80 et CD86 exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes, conduit à l'activation complète des lymphocytes T [23]. Le bélatacept exerce son effet immunosuppresseur en bloquant l'interaction entre les antigènes CD80/CD86 et la molécule CD28 [24].

En vue d'évaluer l'effet néphroprotecteur, le risque cardiovasculaire et l'efficacité immunosuppressive du bélatacept après une greffe rénale, deux essais cliniques de phase III (les études BENEFIT) ont été menés chez des patients adultes [21,22,25]. Dans ces deux études, les patients ont reçu du MMF, des corticostéroïdes et une thérapie d'induction par basiliximab, soit associés au bélatacept, soit à la ciclosporine dans le service de Néphrologie, dialyse et transplantation d'organes du CHU de Toulouse où l'évaluation de l'ASC de l'AMP fait partie du suivi habituel des transplantés rénaux. Le dosage de l'AMP dans les échantillons plasmatiques devait être réalisé selon la technique EMIT. Suite à un changement non programmé de la méthode analytique en cours de protocole, un certain nombre d'échantillons plasmatiques ont été analysés par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV. Afin d'homogénéiser les résultats rendus, les deux méthodes analytiques ont été comparées selon l'immunosuppresseur co-administré (ciclosporine *versus* bélatacept) et l'objectif de notre étude a été d'évaluer l'impact du bélatacept sur la concentration d'AMP dosé selon la technique EMIT. À ce jour, la co-administration de la ciclosporine au MMF n'a pas été rapportée comme étant un élément interférant lors d'un dosage de l'AMP par technique EMIT [3,4,17].

2 Matériels et méthodes

2.1 Méthode EMIT

La méthode EMIT est une technique utilisée au Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicologie Clinique (LPTC) de l'Institut Fédératif de Biologie du CHU de Purpan-Toulouse. La méthode EMIT a été initialement utilisée pour le STP de l'AMP puis progressivement abandonnée au profit d'une technique chromatographique (CL-UV) bien plus sensible et surtout spécifique. Avant son utilisation en routine au LPTC, la technique EMIT avait été validée selon les recommandations de la *Food and Drug Administration* (FDA) [26].

Dans le cadre de notre étude, le dosage des échantillons plasmatiques de patients a été réalisé sur l'automate Roche COBAS-MIRA® (Bâle, Suisse) avec les réactifs du fabricant et selon ses recommandations. Le kit Emit® 2000 Mycophenolic Acid Assay fourni par Dade Behring (Milton Keynes, Angleterre) est composé de deux réactifs. Le réactif 1 contient des anticorps monoclonaux de souris anti-AMP (4,1 µg/mL) dans une matrice eau/BSA (Bovine Serum Albumin), du glucose-6-phosphate (22 mM), du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD ; 36 mM) et des conservateurs. Le réactif 2 contient de l'AMP conjugué à la glucose-6-phosphate

déshydrogénase d'origine bactérienne à une concentration de 0,34 U/mL dans une matrice eau/lactoglobuline bovine et des conservateurs. Les échantillons plasmatiques de patients n'ont subi aucune étape de pré-traitement et ont été analysés à l'aide d'une gamme d'étalonnage validée par trois niveaux de contrôles de qualité (CQ), selon les recommandations de la FDA [26]. Les calibrateurs Emit® 2000 (0 ; 0,5 ; 2 ; 5 ; 10 ; 15 µg/mL) ainsi que les CQ Emit® 2000 (1 ; 7,5 ; 12 µg/mL) ont été fournis par Dade Behring.

2.2 Méthode CL-UV

Le dosage de l'AMP par chromatographie liquide est une technique utilisée au LPTC depuis plusieurs années. Cette méthode modifiée s'appuie sur les travaux publiés par Hosotsubo *et al.* [27] et Volg *et al.* [17]. L'étalon interne utilisé est le thiopental (SIGMA, France). L'extraction de l'AMP est réalisée en phase organique avec du dichlorométhane (SCHAR-LAU, Espagne) acidifié par une solution d'acide chlorhydrique HCl 1M. Après évaporation de la phase organique, le résidu sec est repris dans la phase mobile (acétonitrile/tampon formate d'ammonium pH = 3 ; 50/50). Cette dernière est injectée à un débit de 1 mL/min. La séparation des composés est réalisée à l'aide d'une pré-colonne Ultrasep® C18 (BISCHOFF, France) et d'une colonne ProntoSil® 120-5-C18 (BISCHOFF, France), à température ambiante. La détection de l'AMP est réalisée à 254 nm. Le temps d'acquisition est de 12 min et le temps de rétention relatif est de 0,81. Cette méthode est actuellement employée pour le STP de l'AMP aussi bien en routine que pour les protocoles de recherche clinique. Avant son utilisation en routine, cette méthode chromatographique avait été validée selon les recommandations de la FDA [26]. Les courbes de calibrations ont été linéaires pour une gamme de concentrations comprises entre 0,25 mg/L et 30 mg/L. Le coefficient de corrélation a été systématiquement supérieur à 0,998 et a été en moyenne de 0,9990 ($n = 5$). Les concentrations recalculées des points de gamme ont systématiquement présenté une inexactitude inférieure à $\pm 15\%$ et à $\pm 20\%$ pour la limite de quantification. Lors de l'étude de la répétabilité, trois niveaux de contrôle de qualité (bas, moyen et haut) ont été analysés cinq fois à l'aide d'une gamme d'étalonnage validée par l'inexactitude des points de gamme recalculés (inexactitude comprise entre $-5,0\%$ et $4,3\%$). Pour les niveaux de CQ bas et haut, l'inexactitude moyenne a été inférieure à $\pm 15\%$. Pour le niveau moyen, l'inexactitude a été inférieure à $\pm 20\%$. Lors de l'étude de la fidélité intermédiaire, cinq séries d'analyses ont été réalisées au cours de cinq journées différentes, chacune comprenant une gamme d'étalonnage et chaque niveau de CQ en double. Les valeurs moyennes de chaque point de gamme ont été calculées sur l'ensemble des cinq séries. L'inexactitude moyenne des points de gamme a été comprise entre $-5,0\%$ et $4,3\%$ et la précision entre $0,6\%$ et $7,7\%$. Pour les trois niveaux de contrôles de qualité (bas, moyen, haut), l'inexactitude moyenne a été respectivement de $-10,2\%$, $-16,4\%$ et $-13,8\%$. La précision a été respectivement de $7,8\%$, $4,3\%$ et $4,5\%$.

Les échantillons plasmatiques de patients (le plus souvent des cinétiques comportant trois temps de prélèvement : T 20 min, T 60 min et T 180 min ; et des résiduelles T 0) ont été analysés dès leur arrivée au LPTC soit trois à quatre heures après que le prélèvement sanguin ait été réalisé. Dans le cas où les prélèvements n'ont pas pu être analysés le jour même, ils ont été conservés à +4 °C sur une durée maximale de 12 heures. Après analyse, ces mêmes échantillons ont été immédiatement congelés à -20 °C pour être ultérieurement analysés selon la technique EMIT. La durée de conservation des échantillons congelés a été variable, comprise entre un mois et un an (plus de 80 % des échantillons ont été conservés à -20 °C plus de six mois avant analyse).

2.3 Analyses statistiques

Chaque échantillon sanguin a été dosé par les deux méthodes (EMIT et CL-UV). La concordance entre les résultats ainsi obtenus a été évaluée par la méthode graphique de Bland et Altman [28] et les erreurs systématiques ont été déterminées par la régression de Passing et Bablok [29]. Les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel MedCalc® Statistical software version 11.4, indépendamment puis selon le traitement immunosuppresseur co-administré (ciclosporine ou béclatacept). Le graphe de Bland Altman représente en ordonnée la différence entre les valeurs obtenues selon les deux méthodes (EMIT - CL-UV) et en abscisse la moyenne de ces valeurs ((EMIT + CL-UV)/2). Lorsque la dispersion des points n'est pas uniforme, les différences sont proportionnelles aux moyennes [30]. En revanche, si la répartition des points est uniforme, l'écart entre les couples de points est indépendant de la valeur moyenne [30]. On évalue alors le biais (moyenne des différences) ainsi que les limites de concordance entre les deux méthodes, qui correspondent au biais $\pm 1,96 \times$ écart type [28]. Cette concordance est d'autant plus forte que les limites de l'intervalle sont étroites [31]. Toutefois, cette évaluation reste subjective car il revient au praticien de fixer les limites de concordance qui sont acceptables en clinique [31]. Par ailleurs, lorsque l'IC_{95%} du biais est supérieur ou inférieur à zéro, il existe respectivement une surestimation ou une sous-estimation liée à la méthode évaluée (EMIT) par rapport à la méthode de référence (CL-UV). Dans ces cas, il existe une erreur systématique entre les résultats des deux méthodes [32]. Afin d'évaluer cette erreur, une régression de Passing et Bablok [29] est effectuée, avec en ordonnée les résultats liés à la méthode évaluée et en abscisse ceux liés à la méthode de référence. La régression de Passing et Bablok donne une équation de la droite de régression de la forme $y = ax + b$, où a (pente de la droite de régression) correspond à l'erreur systématique proportionnelle et b (ordonnée à l'origine) correspond à l'erreur systématique constante. Lorsqu'il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les résultats des deux méthodes (c'est-à-dire que les méthodes donnent des résultats équivalents), a est proche de 1 avec un IC_{95%} incluant la valeur 1, et b est proche de 0 avec un IC_{95%}

incluant la valeur 0. En revanche, si l'IC_{95%} de la pente de régression de Passing et Bablok n'inclut pas la valeur 1, il existe une erreur systématique proportionnelle. De même, si l'IC_{95%} de l'ordonnée à l'origine n'inclut pas le 0, il existe une erreur systématique constante [32].

3 Résultats

3.1 Comparaison des concentrations d'AMP déterminées selon les méthodes EMIT et CL-UV indépendamment du traitement immunosuppresseur co-administré

La comparaison des résultats des 123 échantillons, issus de 58 patients dont 40 étaient traités par MMF + béclatacept et 18 par MMF + ciclosporine, montre que la méthode enzymatique EMIT sous-estime les concentrations d'AMP par rapport à la méthode chromatographique CL-UV avec un biais significatif de -0,829 mg/L (IC_{95%} du biais : [-1,617 ; -0,040] mg/L) (figure 1a) soit une sous-estimation de 8,86 %, une erreur systématique proportionnelle de 0,854 et une erreur systématique constante de 0,727 mg/L (figure 1b). La concordance entre les deux méthodes est établie dans un intervalle compris entre -9,490 et 7,833 mg/L (figure 1a).

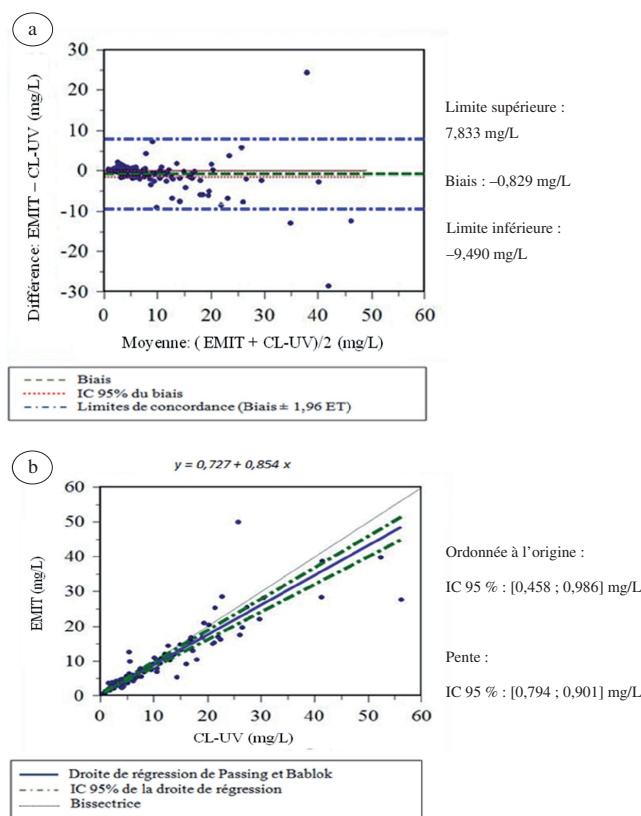


Fig. 1. Concordance entre les concentrations d'AMP déterminées par EMIT et CL-UV sur des prélèvements provenant de patients co-traités par béclatacept ou ciclosporine ($n = 123$): (a) graphe de Bland Altman ; (b) graphe de Passing et Bablok.

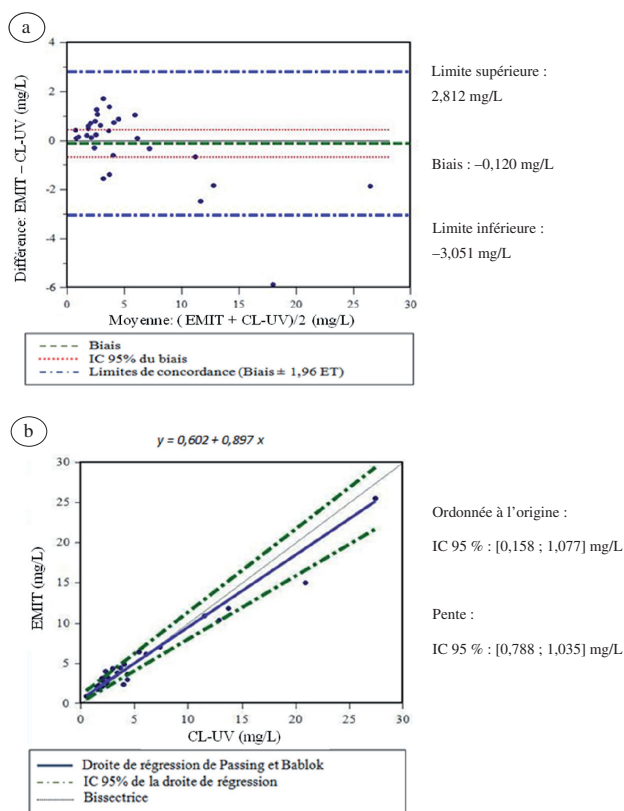


Fig. 2. Concordance entre les concentrations d'AMP déterminées par EMIT et CL-UV sur des prélèvements provenant de patients co-traités par la ciclosporine ($n = 30$) : (a) graphe de Bland Altman ; (b) graphe de Passing et Bablock.

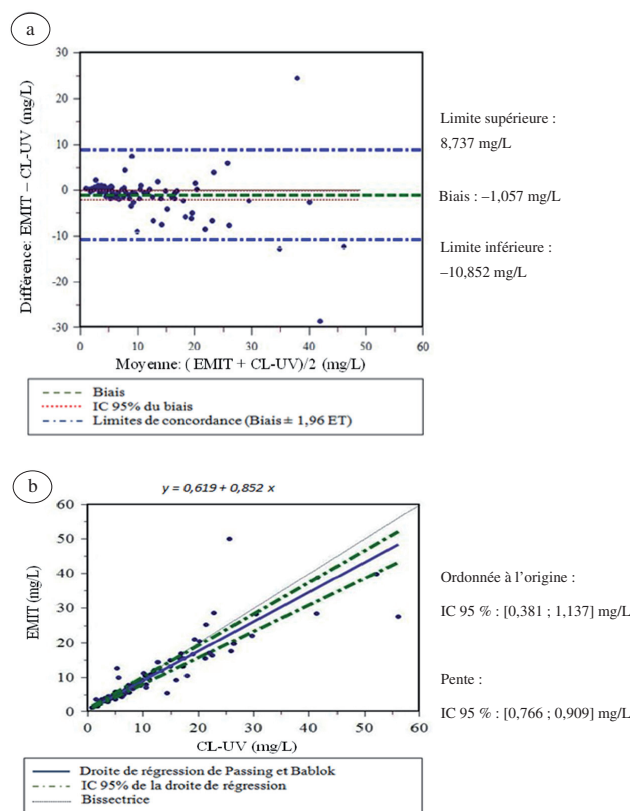


Fig. 3. Concordance entre les concentrations d'AMP déterminées par EMIT et CL-UV sur des prélèvements provenant de patients co-traités par le bélatcept ($n = 93$) : (a) graphe de Bland Altman ; (b) graphe de Passing et Bablock.

3.2 Comparaison des concentrations d'AMP déterminées selon les méthodes EMIT et CL-UV en fonction du traitement immunosuppresseur co-administré

3.3.1 Prélèvements provenant de patients traités par MMF et ciclosporine ($n = 30$)

La méthode graphique de Bland Altman ainsi que la régression de Passing et Bablock montrent qu'il n'y a pas de biais significatif (IC_{95%} du biais : [-0,678 ; 0,439] mg/L) ni d'erreur systématique entre les résultats obtenus par les méthodes EMIT et CL-UV (figures 2a, 2b). L'intervalle de concordance entre les deux méthodes est compris entre -3,060 et 2,812 mg/L (figure 2a).

3.4.2 Prélèvements provenant de patients traités par MMF et bélatcept ($n = 93$)

La méthode EMIT sous-estime les concentrations d'AMP par rapport à la méthode CL-UV avec un biais significatif de -1,06 mg/L (IC_{95%} du biais : [-2,089 ; -0,028] mg/L) (figure 3a) correspondant à une sous-estimation de 9,9 % et une erreur systématique proportionnelle de 0,852 (figure 3b). L'intervalle de concordance entre les deux méthodes est compris entre -10,852 et 8,797 mg/L (figure 1a).

4 Discussion

Les résultats de notre étude ont montré une concordance entre les deux méthodes, sans surestimation des concentrations en AMP par la technique EMIT, lorsque les patients ont reçu du MMF et de la ciclosporine. À l'inverse, lorsque les patients ont reçu du MMF et du bélatcept, la méthode EMIT a sous-estimé avec une erreur systématique proportionnelle de 0,852 les concentrations d'AMP par rapport à celles déterminées par CL-UV.

Ces résultats ne sont pas totalement en accord avec ceux précédemment publiés et obtenus à partir de prélèvements issus d'enfants transplantés rénaux traités par MMF, ciclosporine, corticostéroïdes et thérapie d'induction (thymoglobuline puis basiliximab) [3], de patients adultes transplantés cardiaques traités par MMF associé à la ciclosporine et aux corticostéroïdes [17], ou de patients adultes transplantés rénaux sous MMF, corticostéroïdes et anticalcineurine (ciclosporine ou tacrolimus) [4]. Les échantillons sanguins ont été centrifugés et le plasma ainsi obtenu a été congelé jusqu'au jour du dosage réalisé selon les deux méthodes (CL-UV et EMIT). Dans ces études, la méthode EMIT a surestimé respectivement les résultats de 35 %, 12 % et 11 %. Cette surestimation serait liée à la présence,

bien que très faible, du métabolite AMPaG [19]. En effet, le métabolisme de l'AMP conduit principalement au conjugué inactif AMP-7-O-glucuronate (AMPG) [33]. Ce dernier est retrouvé dans le plasma à des concentrations 50 fois supérieures à celles de l'AMP [33] et subit un cycle entéro-hépatique conduisant à un 2^e pic d'AMP 6 à 12 h après l'administration du MMF [33–36]. De nombreux métabolites minoritaires ont été identifiés tels que l'AMPaG (métabolite actif) [2,34], l'AMP-7-O-glucoside (AMPGI ; métabolite inactif) [37], ainsi que l'AMP-acyl-glucoside (AMPaGI), le 6-O-desméthyl-AMP, le 6-O-desméthyl-AMP-phényl-glucuronate et le 6-O-desméthyl-AMP-acyl-glucuronate dont l'activité respective n'a fait l'objet d'aucune publication. Dans le cadre de notre étude, les prélèvements ont été réalisés entre 10 jours et 1 an post-greffe, avec plus de 95 % des échantillons prélevés après le 3^e mois de la greffe. Cet élément suggère une reprise de la fonction rénale chez la quasi-totalité des patients prélevés. Toutefois, l'absence de renseignements cliniques plus spécifiques (en particulier la clairance de la créatinine) ne permet pas d'exclure une forte variabilité des concentrations circulantes en métabolites et tout particulièrement en AMPaG.

L'hypothèse d'une dégradation de l'AMP, au cours du temps lors de la conservation des échantillons plasmatiques à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou lors de leur décongélation, a rapidement été écartée car la stabilité des contrôles de qualité (CQ) préparés dans du plasma vierge à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a montré une perte maximale de 8 % (indépendamment du niveau de concentration testé) sur 1 an, durée maximale de conservation des échantillons plasmatiques avant analyse selon la méthode EMIT. Cette perte a été déterminée au LPTC sur les CQ congelés et analysés selon la méthode CL-UV.

La sous-estimation systématique proportionnelle observée avec la méthode EMIT pour les échantillons issus de patients traités par MMF et bélatcept pourrait s'expliquer par un phénomène de compétition entre le bélatcept et les anticorps monoclonaux présents dans le réactif n° 2 du kit de dosage mis à disposition par le fournisseur. Le bélatcept est une protéine de fusion soluble constituée du domaine extracellulaire modifié de l'antigène 4 cytotoxique humain associé au lymphocyte T (CTLA-4) lié à la partie Fc d'une immunoglobuline G1 humaine (IgG1) [24]. D'après la structure du bélatcept, plusieurs mécanismes susceptibles d'induire un encombrement stérique empêchant la fixation de l'anticorps monoclonal du réactif n° 2 sur l'AMP sont envisageables tels qu'une interaction entre (1) la partie Fc du bélatcept ou (2) l'antigène CTLA-4, et l'AMP. Pour valider l'hypothèse de l'interférence analytique due au bélatcept, il serait nécessaire de tester des échantillons plasmatiques d'AMP en présence de concentrations croissantes de bélatcept. Ceci ne pourra être réalisé que lorsque le bélatcept sera commercialisé.

En conclusion, ce travail a permis de mettre en évidence une interférence analytique lors du dosage de l'AMP par technique EMIT, en présence du bélatcept. Cette interférence témoigne une fois de plus de la complexité des techniques EMIT avec des interférences analytiques susceptibles de varier selon le traitement immunosuppresseur co-administré. Ces résultats

préliminaires devront bien évidemment être réévalués à l'aide d'une méthode de référence telle que la CL-SM/SM, en tenant compte tout particulièrement de la fonction rénale des patients sélectionnés.

Conflits d'intérêts. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts.

Références

1. Mele TS, Halloran PF. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. *Immunopharmacology*. 2000; 47(2-3): 215–245.
2. Westley IS, Sallustio BC, Morris RG. Validation of high-performance liquid chromatography method for the measurement of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in plasma. *Clin Biochem*. 2005; 38(9): 824–829.
3. Irtan S, Azougagh S, Monchaud C, Popon M, Baudouin V, Jacqz-Aigrain E. Comparison of high-performance liquid chromatography and enzyme-multiplied immunoassay technique to monitor mycophenolic acid in paediatric renal recipients. *Pediatr Nephrol*. 2008; 23(10): 1859–1865.
4. Hosotsubo H, Takahara S, Imamura R, Kyakuno M, Tanaka T, Yazawa K, Hanafusa T, Matsumiya K, Nonomura N, Okuyama A, Sugimoto H. Analytic validation of the enzyme multiplied immunoassay technique for the determination of mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatographic assay. *Ther Drug Monit*. 2001; 23(6): 669–674.
5. Van Hest RM, Van Gelder T, Vulto AG, Mathot RA. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*. 2005; 44(10): 1083–1096.
6. Pelletier RP, Akin B, Henry ML, Bumgardner GL, Elkhammas EA, Rajab A, Ferguson RM. The impact of mycophenolate mofetil dosing patterns on clinical outcome after renal transplantation. *Clin Transplant*. 2003; 17(3): 200–205.
7. Borrows R, Chusney G, James A, Stichbury J, Van Tromp J, Cairns T, Griffith M, Hakim N, McLean A, Palmer A, Papalois V, Taube D. Determinants of mycophenolic acid levels after renal transplantation. *Ther Drug Monit*. 2005; 27(4): 442–450.
8. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*. 2007; 46(1): 13–58.
9. Cox VC, Ensom MH. Mycophenolate mofetil for solid organ transplantation: does the evidence support the need for clinical pharmacokinetic monitoring? *Ther Drug Monit*. 2003; 25(2): 137–157.
10. Prémaud A, Le Meur Y, Debord J, Szlag JC, Rousseau A, Hoizey G, Toupance O, Marquet P. Maximum *a posteriori* bayesian estimation of mycophenolic acid pharmacokinetics in renal transplant recipients at different postgrafting periods. *Ther Drug Monit*. 2005; 27(3): 354–361.
11. Van Gelder T, Silva HT, de Fijter H, Budde K, Kuypers D, Mamelok RD, Armstrong VW, Oellerich M. How delayed graft function impacts exposure to mycophenolic acid in patients after renal transplantation. *Ther Drug Monit*. 2011; 33(2): 155–164.

12. Prémaud A, Rousseau A, Picard N, Marquet P. Determination of mycophenolic acid plasma levels in renal transplant recipients co-administered sirolimus: comparison of an enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 2006; 28(2): 274–277.
13. Shipkova M, Schütz E, Besenthal I, Fraunberger P, Wieland E. Investigation of the crossreactivity of mycophenolic acid glucuronid metabolites and of Mycophenolate mofetil in the Cedia MPA assay. *Ther Drug Monit.* 2010; 32(1): 79–85.
14. Westley IS, Taylor PJ, Salm P, Morris RG. Cloned enzyme donor immunoassay tacrolimus assay compared with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and microparticle enzyme immunoassay in liver and renal transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2007; 29(5): 584–591.
15. Marquet P, Saint-Marcoux F, Prémaud A, Sauvage FL, Jaqz-Aigrain E, Knoop C, Lebranchu Y, Tiberi M, Domke I, Debord J. Performance of the new mycophenolate assay based on IMPDH enzymatic activity for pharmacokinetic investigations and setup of Bayesian estimators in different populations of allograft recipients. *Ther Drug Monit.* 2009; 31(4): 443–450.
16. Blanchet B, Taieb F, Conti F, Abbas H, Seydi I, Harcouet L, Dauphin A, Calmus Y, Tod M. Comparison of a new enzymatic assay with a high-performance liquid chromatography/ultraviolet detection method for therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in adult liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2008; 14(12): 1745–1751.
17. Vogl M, Weigel G, Seebacher G, Griesmacher A, Laufer G, Müller MM. Evaluation of the EMIT Mycophenolic Acid Assay from Dade Behring. *Ther Drug Monit.* 1999; 21(6): 638–643.
18. Beal JL, Jones CE, Taylor PJ, Tett SE. Evaluation of an immunoassay (EMIT) for mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatography assay. *Ther Drug Monit.* 1998; 20(6): 685–690.
19. Shipkova M, Schütz E, Armstrong VW, Niedmann PD, Wieland E, Oellerich M. Overestimation of mycophenolic acid by EMIT correlates with MPA metabolite. *Transplant Proc.* 1999; 31(1-2): 1135–1137.
20. Shen B, Li S, Zhang Y, Yuan X, Fan Y, Liu Z, Hu Q, Yu C. Determination of total, free and saliva mycophenolic acid with a LC-MS/MS method: application to pharmacokinetic study in healthy volunteers and renal transplant patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2009; 50(3): 515–521.
21. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, Rostaing L, Bresnahan B, Darji P, Massari P, Mondragon-Ramirez GA, Agarwal M, Di Russo G, Lin CS, Garg P, Larsen CP. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant.* 2010; 10: 535–546.
22. Larsen CP, Grinyó J, Medina-Pestana J, Vanrenterghem Y, Vincenti F, Breshahan B, Campistol JM, Florman S, Rial Mdel C, Kamar N, Block A, Di Russo G, Lin CS, Garg P, Charpentier B. Belatacept-based regimens versus a cyclosporine A-based regimen in kidney transplant recipients: 2-years results from the BENEFIT and BENEFIT-EXT studies. *Transplantation.* 2010; 90(12): 1528–1535.
23. Latek R, Fleener C, Lamian V, Kulbokas E 3rd, Davis PM, Suchard SJ, Curran M, Vincenti F, Townsend R. Assessment of belatacept-mediated costimulation blockade through evaluation of CD80/86-receptor saturation. *Transplantation.* 2009; 87(6): 926–933.
24. Węclawiak H, Kamar N, Ould-Mohamed A, Cardeau-Desangles I, Rostaing L. Biological agents in kidney transplantation: belatacept is entering the field. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10(10): 1501–1508.
25. Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, Vincenti F, Garcia VD, Campistol J, Rial Mdel C, Florman S, Block A, Di Russo G, Xing J, Garg P, Grinyó J. A phase III study of belatacept versus cyclosporine in kidney transplants from extended criteria donors (BENEFIT-EXT study). *Am J Transplant.* 2010; 10: 547–557.
26. Guidance for industry. Bioanalytical method validation. U.S. Department of health and human services/Food and drug administration/Center for drug evaluation and research (CDER)/Center for veterinary medicine (CVM). May 2001. Document consulté sur le site <http://www.fda.gov/cvm> le 18/04/2011.
27. Hosotsubo H, Takahara S, Kokado Y, Permpongkosol S, Wang JD, Tanaka T, Matsumiya K, Kitamura M, Okuyama A, Sugimoto H. Rapid and simultaneous determination of mycophenolic acid and its glucuronide conjugate in human plasma by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography using isocratic elution. *J chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001; 753(2): 315–320.
28. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986; 1: 307–310.
29. Passing H, Bablok W. 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; 21: 709–720.
30. Manuel du logiciel statEL[®] Statistical software. Document consulté sur le site http://adscience.eu/statistical_software/version_overview le 18/04/2011.
31. Journois D. Concordance between two variables: graphical approach (Bland and Altman's method). *Rev Mal Resp.* 2004; 21: 127–130.
32. Manuel du logiciel MedCalc[®]. Document consulté sur le site www.medcalc.be le 18/04/2011.
33. Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet.* 1998; 34(6): 429–455.
34. Sam WJ, Akhlaghi F, Rosenbaum SE. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid and its 2 glucuronidated metabolites in kidney transplant recipients. *J Clin Pharmacol.* 2009; 49(2): 185–195.
35. Kuhn J, Prante C, Kleesiek K, Götting C. Measurement of mycophenolic acid and its glucuronide using a novel rapid liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry assay. *Clin Biochem.* 2009; 42(1-2): 83–90.
36. Naesens M, de Looor H, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. The impact of renal allograft function on exposure and elimination of mycophenolic acid (MPA) and its metabolite MPA 7-O-glucuronide. *Transplantation.* 2007; 84(3): 362–373.
37. Schütz E, Shipkova M, Armstrong VW, Niedmann PD, Weber L, Tönshoff B, Pethig K, Wahlers T, Braun F, Ringe B, Oellerich M. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: comparison of HPLC and immunoassay reveals new MPA metabolites. *Transplant Proc.* 1998; 30: 1185–1187.