



HAL
open science

Développement et validation d'une méthode de dosage de l'Entécavir : application pour l'étude de l'observance au traitement chez des patients chroniquement infectés par le virus de l'hépatite B

Guillaume Chovelon

► **To cite this version:**

Guillaume Chovelon. Développement et validation d'une méthode de dosage de l'Entécavir : application pour l'étude de l'observance au traitement chez des patients chroniquement infectés par le virus de l'hépatite B. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01254609

HAL Id: dumas-01254609

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01254609v1>

Submitted on 12 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE MÉTHODE DE
DOSAGE DE L'ENTÉCAVIR. APPLICATION POUR L'ÉTUDE DE
L'OBSERVANCE AU TRAITEMENT CHEZ DES PATIENTS
CHRONIQUEMENT INFECTÉS PAR LE VIRUS DE L'HÉPATITE B**

MÉMOIRE du diplôme D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE DIPLÔME
D'ÉTAT

Travail effectué au sein du laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie,
Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble,
Sous la direction de Madame le Pr Françoise STANKE-LABESQUE

Guillaume CHOVELON

Né le 30 mars 1987 à Grenoble (38)

Thèse soutenue publiquement à la faculté de Pharmacie de Grenoble* le 22 juin 2014

DEVANT UN JURY COMPOSÉ DE :

Monsieur le Professeur Patrice FAURE, président du jury

Madame le Professeur Françoise STANKE-LABESQUE

Madame le Docteur Marie-Noëlle HILLERET

Monsieur Jean-François JOURDIL

**La faculté de pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : M. le Pr. Christophe RIBUOT

Vice-doyen et Directrice des Etudes : Mme Delphine ALDEBERT

Année 2014-2015

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM_UMR SNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCHE	Pierrick	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX, TIMC-IMAG
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	DELETRAZ-DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128) UCB

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

DOMAINE DE LA MERCI
 38706 LA TRONCHE CEDEX – France
 TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
 FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	DURMORT-MEUNIER	Claire	D1	I.B.S
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	IRTSV
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF-CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX, TIMC-IMAG
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PERES	Basile	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr

MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
PAST	TROUILLER	Patrice	D5	-
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	WOESSIDJEWE	Denis	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

**** D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT) »**

D2 : Département « Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département « Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)

D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche Institut
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
et de Cognition et Ontogénèse »
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogénèse
IPB :
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MCU : Maîtres de Conférences des Universités
MCU-PH : Maîtres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeurs des Universités
PU-PH : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR : Unité Mixte de Recherche
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

Remerciements

A Monsieur le Professeur Patrice Faure, Président du jury

Pour avoir accepté de juger ce travail et me faire l'honneur de présider mon jury. Recevez ici ma reconnaissance et l'expression de mon profond respect.

A Madame le Professeur Françoise Stanke-Labesque, Directrice de Thèse

Pour m'avoir proposé ce travail de thèse. Merci pour votre rigueur et votre encadrement durant toute cette période mais aussi durant ma formation d'interne au laboratoire de pharmacologie. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Marie-Noëlle Hilleret

Pour avoir accepté de juger ce travail en tant que clinicien, et m'avoir fourni les données de patients. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur Jean-François Jourdil

Pour tout ce que tu m'as appris sur la chromatographie et la spectrométrie de masse. Merci pour ton aide et tes conseils durant cette thèse, depuis les premières extractions SPE jusqu'à la rédaction de ce travail. Trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de ma sincère sympathie.

A toute l'équipe du laboratoire de Pharmacologie-toxicologie du CHU de Grenoble et notamment les personnes qui ont contribué à ce travail : Karine, Aurélie, Cécile et le Dr Mireille Bartoli. A toutes les personnes rencontrées durant mon internat, notamment mes co-internes.

A Marie

Merci pour ton soutien indéfectible et ta compréhension. Merci d'avoir fait tout ce que tu pouvais pour m'accompagner durant cette année particulière...

Merci pour la famille que nous avons fondée.

A Louis

Mon trésor. Merci pour ta joie de vivre et celle que tu me donnes quotidiennement.

A ma famille

Merci pour votre soutien et votre aide durant toutes ces années. Merci pour les liens forts qui nous unissent.

A ma belle-famille

Merci pour votre affection et votre accueil ainsi que votre soutien.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	08
INTRODUCTION.....	09
PREMIÈRE PARTIE : RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....	12
I. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	13
1. <i>Réactifs.....</i>	<i>13</i>
2. <i>Solutions mères, standards de calibration et CQI.....</i>	<i>13</i>
3. <i>Traitement des échantillons par extraction en phase solide (SPE)</i>	<i>14</i>
4. <i>Dosage par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....</i>	<i>15</i>
4.1 <i>Conditions chromatographiques.....</i>	<i>15</i>
4.2 <i>Détection par spectrométrie de masse en tandem.....</i>	<i>16</i>
5. <i>Validation de méthode.....</i>	<i>17</i>
6. <i>Analyse de plasmas humains</i>	<i>17</i>
II. RÉSULTATS.....	18
1. <i>Chromatogrammes</i>	<i>18</i>
2. <i>Répétabilité et reproductibilité.....</i>	<i>18</i>
3. <i>Limite de détection, limites basses et hautes de quantification.....</i>	<i>18</i>
4. <i>Linéarité.....</i>	<i>19</i>
5. <i>Effet matrice.....</i>	<i>19</i>
6. <i>Contamination inter-échantillons.....</i>	<i>19</i>
7. <i>Intégrité de dilution.....</i>	<i>20</i>
8. <i>Coefficient d'extraction.....</i>	<i>20</i>
9. <i>Stabilité.....</i>	<i>20</i>
III. DOCUMENT SH FORM 43 DU COFRAC.....	20
IV. APPLICATION DE LA MÉTHODE DANS UNE ÉTUDE CLINIQUE.....	38
V. DISCUSSION.....	38
DEUXIÈME PARTIE : ARTICLE ORIGINAL EN ANGLAIS.....	40
CONCLUSION.....	67
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	69

LISTE DES ABRÉVIATIONS

VHB : Virus de l'Hépatite B

TDV : Ténofovir

EV : Entécavir

AdhepB : Adhésion des patients porteurs chroniques de l'hépatite B au traitement par analogues nucléosidiques ou nucléotidiques en région Rhône Alpes

CE50 : Concentration Efficace 50

SPE : Solid Phase Extraction

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HILIC : Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

SI : Standard Interne

MeOH : Méthanol

CAN : Acétonitrile

CQI : Contrôle de Qualité Interne

HPLC-MS/MS : chromatographie liquide haute performance couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem

MRM : Multi Reaction Monitoring

LOD : Limit Of Detection

LLOQ-ULOQ : Lower/Upper Limit Of Quantification

CV : Coefficients de Variation

C_{max} : Concentration Maximale

Sd : Standard deviation

INTRODUCTION

L'hépatite B est une pathologie extrêmement fréquente, puisqu'un tiers de la population mondiale présente des marqueurs sérologiques d'infection passée ou présente au Virus de l'hépatite B (VHB)[1].

Les traitements les plus récents de cette maladie sont le Ténofovir (TDF) et l'Entécavir (EV). Le TDF a une pharmacocinétique bien connue et décrite par de nombreuses publications, chez le patient mono-infecté par le Virus de l'Immunodéficience Humaine[2], le volontaire sain[3,4], et le patient atteint de l'hépatite B [5]. A l'inverse, la pharmacocinétique de l'EV chez le patient atteint de l'hépatite B est peu décrite [6].

Ce travail a porté sur une étude ancillaire du protocole clinique AdhepB (Adhésion des patients porteurs chroniques de l'hépatite B au traitement par analogues nucléosidiques ou nucléotidiques en région Rhône Alpes, numéro DRCI : 1202, numéro Afssaps : 2012-A00056-37) dont l'investigateur principal est le Dr Marie-Noelle Hilleret. L'objectif principal de ce protocole était d'évaluer le taux d'adhésion thérapeutique des patients porteurs d'une hépatite virale chronique B et traités par analogues nucléosidiques ou nucléotidiques à 12 mois de suivi. Le critère de jugement principal était un score composite d'adhésion basé sur un score compris entre 0 et 2 (inclus) sur l'échelle de Morisky adaptée (annexe 1), une dispensation pharmaceutique correspondant à la prescription de 80 % du traitement et une mesure d'adhésion (par Echelle Visuelle Analogique) supérieure à 7 à la visite à M12, ainsi que par des dosages pharmacologiques.

Le présent travail a porté sur la mise au point d'une méthode de dosage de l'EV. Cette molécule est très puissante, puisqu'elle inhibe la synthèse de l'ADN du VHB à une concentration Efficace 50 (CE50) de 1.11 µg/L dans les cellules hépatiques humaines HepG2 infectées par le VHB de type sauvage [7], ce qui implique que les posologies quotidiennes

administrées (0,5 et 1 mg/ jour) sont faibles. Sa biodisponibilité est estimée supérieure à 70 % [7] et son volume de distribution est de 115 L [8]. En conséquent, les concentrations plasmatiques mesurées sont faibles (entre 50 et 5000 ng/L). Il a donc été nécessaire de mettre au point une méthode analytique suffisamment sensible. Cette méthode a consisté :

- en une Extraction en Phase solide (SPE) préliminaire (cartouches waters Oasis HLB 1 cc), qui a permis de purifier l'échantillon et de le concentrer (gain de sensibilité).

- en une phase de séparation des composés de l'échantillon concentré par chromatographie liquide haute performance (HPLC). L'Entécavir étant une molécule polaire ($\log P = -0.5$ [9], structure représentée en Figure 1), l'utilisation de colonnes HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) a permis l'emploi de fortes proportions de solvant organique (acétonitrile) pour décrocher les molécules d'Entecavir de la phase stationnaire de la colonne.

- en une détection par spectrométrie de masse en tandem avec une ionisation par un électrospray dont la qualité a été améliorée par l'emploi d'un solvant organique, qui a facilité la nébulisation des composés d'intérêt.

Nous nous sommes intéressés à l'observance des patients, en comparant les concentrations mesurées ainsi que les délais entre la prise du médicament et le prélèvement, entre les patients observants et non-observants selon le score de l'échelle de Morisky adaptée. Nous avons pu déterminer le profil pharmacocinétique de l'EV chez les patients atteints de l'hépatite B et traités de façon chronique. Ces premiers résultats pourront servir de base pour des études futures de pharmacocinétique de population, afin de décrire la pharmacocinétique de l'Entécavir et sa variabilité inter-individuelle (dans le but de pouvoir éventuellement adapter individuellement les posologies).

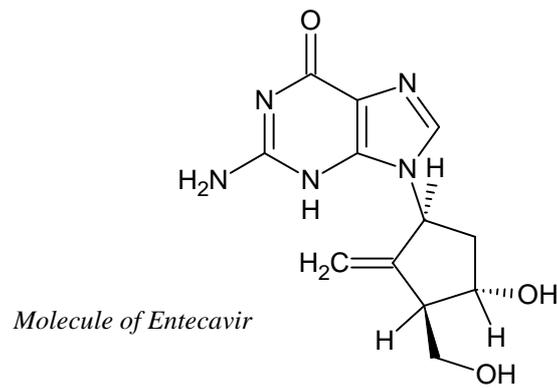


Figure 1 : structure de l'Entecavir

Dans le cadre de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale, il a été nécessaire d'effectuer une validation de la méthode de dosage de l'Entécavir, selon la norme ISO 15189 relative aux laboratoires de biologie médicale. Une validation de méthode complète (évaluation de la répétabilité, reproductibilité, spécificité, effet matrice...) a donc été réalisée, et la deuxième partie de cette thèse est constituée du document SH FORM 43 qui représente le dossier de validation de méthode quantitative (portée B) de l'EV. Ce dernier permettra au laboratoire de pharmacologie du CHU de Grenoble d'être accrédité par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) pour cette analyse biologique.

Enfin, cette description d'une méthode analytique pour le dosage de l'EV dans le plasma de patients atteints de l'hépatite B a fait l'objet d'un article scientifique en cours de soumission, qui constitue la troisième partie de cette thèse.

PREMIÈRE PARTIE :
RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

I. Matériel et méthodes

1. Réactifs

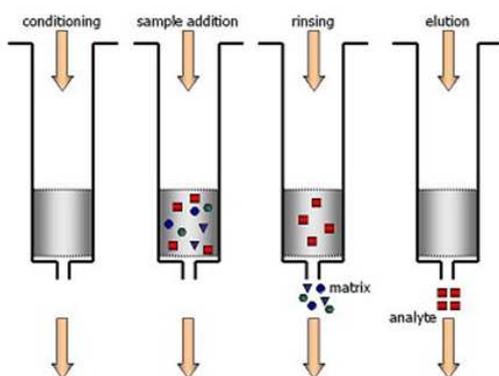
L'Entécavir (EV) et le standard interne (SI) (EV $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$) proviennent d'Alsachim, Illkirch Graffenstaden, France. Le méthanol (MeOH) de grade HPLC, l'acétonitrile (ACN) et l'acide acétique (pureté > 99%) proviennent de Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France). L'acétate d'ammonium de grade HPLC provient de Prolabo (Paris, France). L'eau ultra pure (résistivité $\geq 18.0 \text{ M}\Omega/\text{cm}$) est obtenue en utilisant un distributeur Milli-Q Plus (Millipore, Molsheim, France). Les tubes en Polypropylène de 2 millilitres (mL) pour centrifugation, les tubes de 2 mL avec restriction de 200 microlitres (μL) et les embouts de pipettes sont fournis respectivement par Eppendorf (Le Pecq, France), Interchim (Montluçon, France) et Gilson (Middletown, WI, USA). Les plasmas vierges proviennent de l'Etablissement Français du Sang (Grenoble, France).

2. Solutions mères, standards de calibration et contrôles internes de qualité

La solution mère d'EV $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$ (1 mg/mL) est préparée dans l'acétonitrile. Deux solutions mères (une pour la calibration et une pour les contrôles de qualité interne) d'EV (1 mg/mL) sont préparées dans l'eau. Les standards de calibration sont préparés aux concentrations 50, 100, 200, 500, 1000, 5000, 10000 ng/L, ainsi que trois niveaux de contrôles de qualité interne (CQI) : 150, 750 et 3000 ng/L, en utilisant les mêmes plasmas. Les standards de Calibration et les CQI sont ensuite stockés à -20°C .

3. Traitement des échantillons par extraction en phase solide (SPE)

La SPE est une technique rapide et efficace dont le principe est simple : après adsorption des composés à extraire sur une phase stationnaire contenue dans une cartouche (préalablement conditionnée), on lave la cartouche ce qui permet d'éliminer des impuretés. Puis on récupère les composés d'intérêt lors de l'élution. Cette technique permet de concentrer les composés à doser et de les purifier, ce qui augmente la sensibilité et la spécificité du dosage.



<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=61>

110 μL de plasma et 220 μL de SI (1000 ng/L) sont mélangés dans des tubes Eppendorf. 300 μL de ce mélange sont déposés sur une colonne SPE (waters Oasis HLB 1 cc) qui est pré conditionnée avec 900 μL de MeOH suivi de 900 μL d'eau. La colonne SPE est ensuite lavée avec 2.3 mL d'eau et séchée sous vide. La cartouche est finalement éluee par deux fois 150 μL de MeOH et les éluats sont collectés dans des tubes en polypropylène. Les échantillons sont ensuite évaporés sous azote, à une température inférieure à 40°C. Finalement les échantillons secs sont reconstitués avec 50 μL d'un mélange H₂O/ACN 50/50 et 5 μL sont injectés dans le système HPLC connecté à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS).

4. Dosage par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Du fait de la forte polarité de l'EV une chromatographie à interactions hydrophiles est utilisée.

La HILIC [10] présente l'intérêt d'utiliser une phase mobile majoritairement organique contenant de l'eau comme éluant fort. L'eau forme une couche polaire semi-immobilisée dans laquelle les analytes polaires vont interagir plus efficacement à la surface de la phase stationnaire.

On génère ainsi de fortes rétention pour les composés polaires qui d'ordinaire ne sont pas retenus en chromatographie à polarité de phase inversée. Enfin l'emploi d'une forte proportion de solvant organique facilite l'ionisation de des composés, ce qui apporte un gain de sensibilité au dosage.

4.1. Conditions chromatographiques

Dans notre méthode, le système de chromatographie liquide comporte un système de pompage haute pression, un injecteur automatique ainsi qu'un four colonne (Ultimate 3000 RS, Dionex Thermo Scientific, Germering, Germany). La colonne chromatographique utilisée est un modèle Macherey Nagel Nucleodur HILIC, 3 μm , 2 mm \times 125 mm (Düren, Germany).

La phase mobile est constituée d'acétate d'ammonium 20 mM, au PH 5, (phase mobile A) et d'acétonitrile (phase mobile B). Les composés sont chromatographiés par un gradient d'éluant à un débit de 0.600 mL/min. De 0 à 3.5 min la proportion de phase mobile B diminue linéairement de 98 à 20%. Cet état est maintenu durant 0.5 min, puis le système revient aux conditions initiales de 4 à 9.5 min. L'injecteur automatique et le four de la colonne sont respectivement thermostatés à 4 et 60°C.

4.2. Détection par spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par la mesure de leur rapport masse/charge (m/z) [11]. Elle comporte :

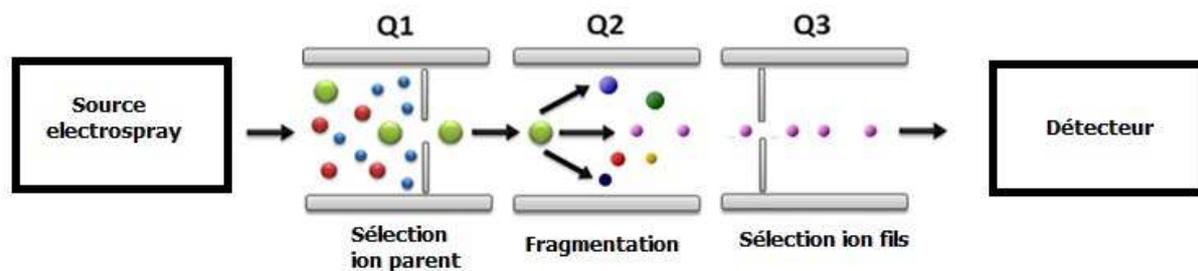
- une source d'ionisation electrospray: à la sortie de la colonne chromatographique et à pression atmosphérique, l'effluent liquide qui véhicule les analytes est dirigé dans un capillaire métallique (électrode) soumis à une très haute tension (plusieurs milliers de volts). Il se forme alors à l'extrémité de l'électrode un spray ; le liquide est nébulisé (formation de microgouttelettes) et les composés ionisés (ajout ou retrait d'une ou plusieurs charges en fonction de la polarité de la tension). L'électrospray est une ionisation douce car les composés ne sont pas fragmentés. Ils conservent leurs états moléculaires : $[m+H]^+$ en ionisation positive, $[m-H]^-$ en ionisation négative.
- des analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z : nous utilisons ici des analyseurs quadripolaires. Les quadripôles sont constitués d'au moins quatre électrodes parallèles qui sur lesquelles sont appliqués un champ électromagnétique. Lorsque que plusieurs quadripôles sont en série, on parle de spectrométrie de masse en tandem. : le premier quadripôle sélectionne un ion précurseur selon son rapport m/z (ici l'EV protoné). Puis une fragmentation de cet ion a lieu dans le deuxième quadripôle, appelé cellule de collision. Cette chambre est traversée en continue par un gaz (azote ou argon). La collision entre l'ion précurseur et le gaz provoque la formation d'ions secondaires (ions fils), qui seront à leur tour sélectionnés selon leur rapport m/z dans le troisième quadripôle. Ainsi on obtient une transition ion père/ion fils qui permet d'obtenir une très bonne spécificité lors de l'analyse. Ce mode de balayage qui consiste à isoler un ion parent puis un seul de ses ions fils est appelé multiple reaction monitoring (MRM).
- un détecteur de type électromultiplicateur qui permet de compter les ions obtenus et de générer un signal électrique dont l'intensité est proportionnelle au nombre d'ions qui lui parviennent.

Un système informatique est ensuite nécessaire pour traiter et exploiter le signal obtenu.

Dans notre expérience, les mesures sont réalisées sur un spectromètre de masse API 4000 (Sciex, Toronto, Canada) équipé d'une source d'ionisation turbo V[®]. L'ionisation était obtenue en mode électrospray positif à +5500 V, avec les paramètres suivants : gaz de

nébulisation à 50, gaz auxiliaire à 60 psi, température de la source à 600°C, et gaz de collision à 30 psi.

La quantification est réalisée en mode MRM, en utilisant deux transitions ioniques pour l'EV (une pour la quantification : m/z 278.2/152.1 et une pour la confirmation m/z 278.2/135.5) et une transition pour le SI : m/z 282.2/156.1.



5. Validation de méthode

La méthode est validée selon les recommandations du guide de validation de méthodes bio analytiques de la Food and Drug Administration (FDA) [12] et les exigences du Comité Français d'Accréditation (COFRAC). Les paramètres suivants ont donc été vérifiés : spécificité, sélectivité, courbe de calibration, précision et biais (répétabilité et reproductibilité), limite de détection (LOD), limites basses et hautes de quantification (LLOQ et ULOQ), contamination inter échantillons, effet matrice, intégrité de dilution et stabilité (étude bibliographique) et analyse des risques.

6. Analyse de plasmas humains

Les plasmas de patients mono infectés par le VHB et inclus dans l'essai clinique AdHepB (numéro Afssaps : 2012-A00056-37) sont étudiés. L'observance des patients est évaluée par le score obtenu sur l'échelle adaptée de Morisky (Annexe 1). Un échantillon de plasma était prélevé dans un tube de 5mL contenant de l'héparinate de lithium comme agent anticoagulant. Pour chaque échantillon le délai entre l'heure de la prise orale d'EV et l'heure à laquelle était

effectué le prélèvement est noté. Les échantillons étaient prélevés 6, 12 et 18 mois après le début du traitement par EV. Tous les échantillons sont centrifugés pendant 10 min à 2000 g et 10°C et les plasmas stockés à -20°C en attendant d'être analysés.

II. Résultats

1. Chromatogrammes

Les chromatogrammes d'échantillons doubles blancs, blanc, d'un CQI moyen (750 ng/L) et d'un patient traité par EV et quantifié à 267 ng/mL sont représentés dans la figure 1.

Le temps de rétention est de 2.46 min pour l'EV.

Le signal de détection de l'EV est inférieur à la limite basse de quantification (LLOQ) dans les échantillons blancs. Ces résultats suggèrent l'absence de composés endogènes significatifs co-élus avec l'EV et le SI, et que notre méthode présente une bonne spécificité et sélectivité sur chaque transition ionique.

2. Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité est évaluée sur les 3 niveaux de CQI (n=6). Les CV et biais sont compris respectivement entre 0.67 et 3.83 %, et entre 3.83 et 7.45 %. La reproductibilité est évaluée sur les 3 niveaux de CQI (n=6). Les CV et biais sont compris respectivement entre 3.06 et 6.41 %, et entre 4.57 et 5.79 %.

3. Limite de détection (LOD), limites basses et hautes de quantification (LLOQ and ULOQ):

La LOD est obtenue à 10 ng/L.

La LLOQ et l'ULOQ sont respectivement de 50 (CV : 7.01 % ; biais : -1.9 %) and 10 000 ng/L (CV : 0.68 % ; biais : -0.2 %).

4. *Linéarité*

La linéarité de la courbe de calibration est évaluée en utilisant une régression linéaire pondérée en $1/x$ pour le ratio EV sur EV $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$, versus les concentrations théoriques. Elle est décrite par l'équation suivante : $y = 0.571 \pm 0.04$ (coefficient de corrélation 0.99994 ± 0.00005 , $n=6$). La courbe de calibration est linéaire entre 50 à 10 000 ng/L. Les biais des concentrations mesurées varient de -4.5 à 3.5 %.

5. *Effet matrice*

Il y avait un effet matrice (suppression du signal de l'ordre de 30 % pour CQI bas et CQI haut). Cependant la superposition de 6 signaux MRM d'EV, d'un signal d'EV $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$, et d'un pic chromatographique d'EV, montre que les signaux MRM continus mesurés sur l'EV et l'IS sont comparables. Les perturbations subites au cours de l'analyse par l'EV sont bien compensées par celles de l'IS (figure 2). Cet effet matrice mesuré ne perturbe donc pas notre méthode de dosage.

6. *Contamination inter-échantillons*

Le pourcentage de contamination inter échantillons est quasi nul (0.01 %).

7. Intégrité de dilution

Nos résultats montrent une intégrité de la dilution au $\frac{1}{2}$ d'un échantillon à 15 000 ng/L (CV : 2.08 % ; biais : 10.1 %) et de la dilution au $\frac{1}{5}$ d'un échantillon à 25 000 ng/L (CV : 0.96 % ; biais : 14.13 %).

8. Coefficient d'extraction

Les coefficients d'extraction étaient respectivement de 73.79 % et 83.31 % (CV : 6.5 % et 7.3 %), pour les CQI bas et haut, indiquant une perte acceptable du composé d'intérêt lors de l'extraction des échantillons.

9. Stabilité

L'étude bibliographique montre que la stabilité de l'EV dans le plasma et dans une solution de méthanol est compatible avec notre pratique au laboratoire.

III. Document SH FORM 43 du COFRAC

Cette méthode analytique a été mise en place au laboratoire de pharmacologie-toxicologie du CHU de Grenoble. Elle fait partie de la portée d'accréditation du laboratoire, afin qu'elle puisse être utilisable en pratique quotidienne ou dans le cadre de protocoles cliniques. Le document SH FORM 43 qui suit répond aux différentes exigences du COFRAC, qui impose aux laboratoires de biologie médicale des objectifs de performances, de qualité et de compétences selon la norme internationale ISO 15189.

	Laboratoire de Biologie Médicale UM de Pharmacologie et Toxicologie - DBTP	Référence : GBAQ.ANA-FOR-004
	DOSSIER DE VALIDATION DE METHODE QUANTITATIVE	
Date d'application : 15.09.2014 Version : 1 Nombre de pages : 23		Rédigé par : G. Chovelon Vérifié par : JF. Jourdil Approuvé par : F Stanke

UM de Pharmacologie-Toxicologie - DBTP

Portée : A B
Examen : routine spécialisé

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE : Entecavir – ABSciex API 4000 (V26070909)
--

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analytes/Mesurandes :	Entécavir
Principe de la Mesure :	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)
Méthode de mesure :	Quantification en mode de balayage MRM établie avec régression calculée par rapport de surfaces de pics chromatographiques : analyte sur étalon interne.
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	Plasma
Type de récipient, Additifs (tubes, ...) :	Héparinate de lithium
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Centrifugation 10 min, 2000 g
Unités :	ng/L
Intervalles de référence :	<p>Fourchettes thérapeutiques variables en fonction du temps de prélèvement, des interactions médicamenteuses et des associations.</p> <p>Entécavir (<i>références : résumé des caractéristiques du produit</i>)</p> <p>A l'état d'équilibre :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 0.1 mg/jour : C_{max} = 0.60 ng/mL AUC_T = 2.51 ng·h/mL. - 0.5 mg/jour : C_{max} = 4.23 ng/mL AUC_T = 14.78 ng·h/mL. - 1 mg/jour : C_{max} = 8.24 ng/mL

	AUC _T = 26.38 ng·h/mL.
Marquage CE (Oui/Non) :	Non
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	Non
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	<ul style="list-style-type: none"> - Chromatographie liquide : Ultimate 3000, Thermo Scientific - Spectrométrie de masse: SCIex – API 4000 - Colonne chromatographique : Macherey Nagel, Nucleodur HILIC 3 µm (2.1 mm x 150 mm)
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	<p>. Molécules</p> <ul style="list-style-type: none"> - Entécavir en poudre – REF : Alsachim C2077 - Entécavir ¹³C₃ ¹⁵N en poudre – REF: Alsachim C878 (étalon interne) <p>. Solvants (références en fonction de l'appel d'offre en cours):</p> <ul style="list-style-type: none"> - Méthanol (>99%) - Acétonitrile (>99%) - Acide acétique glacial (99.9-100.5%) - Acétate d'ammonium (>98%) - Eau ultrapure Milli Q[®]
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique (matériel critique):	Solutions mères d'entécavir et d'entécavir ¹³ C ₃ ¹⁵ N
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	<ul style="list-style-type: none"> - Calibration avant chaque série - Calibrants maison : 7 points + 1 blanc 0, 50, 100, 200, 500, 1000, 5000, 10 000 ng/L - Courbe de calibration régression linéaire pondérée en 1/x

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) habilité(s) ayant réalisé la vérification de méthode :	Guillaume Chovelon (interne en Biologie), Jean-François JOURDIL (ingénieur), Cécile Girard (technicienne), Karine SCALABRINO (technicienne)
Procédure de validation :	GBAQ.ANA-PRO-004 (v1)
Procédure de gestion de la portée flexible :	GBAQ.QUA-PRO-005 (v2)
Période d'évaluation :	[Janvier 2013 – Septembre 2014]
Date de mise en service :	Octobre 2014
Autorisation de mise en service par :	Pr Françoise Stanke, biologiste responsable médical de l'UM de Pharmacologie et Toxicologie, DBTP.

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
PRE ANALYTIQUE		
Conformité d'identité et de prélèvement	Etiquetage du tube Bon de prescription	<ul style="list-style-type: none"> - Habilitation du personnel préleveur - Manuel de prélèvement - Module de formation en ligne
Conformité d'identité et de prélèvement	Vérification du tube de prélèvement et conformité avec le bon de prescription	<ul style="list-style-type: none"> - Habilitation du personnel en charge du pré analytique (RCP.ORG-PRO-009) - Manuel de prélèvement - Procédure de gestion des non-conformités préanalytiques (GBAQ.PRE-PRO-006) - Procédure de gestion des différents types de non-conformités au sein du LBM (GBAQ-GRE-PRO-004)
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Plasma Nature de l'anticoagulant : Héparinate de lithium	<ul style="list-style-type: none"> - Manuel de prélèvement et catalogue des analyses du CHUG - Procédure générale de la réception des prélèvements à la RCP (RCP.ORG-PRO-002) - Procédure de gestion des non-conformités (GBAQ.PRE-PRO-006) - Gestion des réclamations et non conformités au sein du LBM du CHU de Grenoble (GBAQ.GRI-PRO-002) - Organisation de l'UM de pharmacologie et toxicologie (PHT.ORG-PRO-001) - Procédure de gestion du transport des échantillons - Suivi des températures des enceintes froides par le logiciel Sirius
	Condition de prélèvement : Avant la prise du traitement, de préférence une fois l'état d'équilibre atteint.	Manuel de prélèvement et catalogue des analyses du CHUG
	Volume de remplissage : 4 mL (optimal) 1 mL (minimal)	Manuel de prélèvement et catalogue des analyses du CHUG
	Conditions d'acheminement ; Délai inférieur à 72 h T°C de 15 à 25 °C Conditions de stockage pré-analytique : +4°C	Manuel de prélèvement et catalogue des analyses du CHUG

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Prétraitement de l'échantillon : centrifugation	- Centrifugation standard : 10 min à 2 000 g. - Aliquotage en tube polypropylène avant congélation.	Procédure d'entretien courant d'une centrifugeuse de laboratoire (GBAQ.EMT-PRO-001).
Prétraitement de l'échantillon : dilution	N/A	N/A
Prétraitement de l'échantillon : étiquetage du tube secondaire	Identification de l'aliquot à la réception du tube primaire.	- Procédure PVS (MOP : PCB.BIC-MOP-006, organisation des postes de travail : PCB.BIC-PRO-007) - Traitement des tubes un par un avec une étiquette secondaire générée par le SGL

Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Compétences du personnel	Matrice de compétence dans le bureau des cadres
	Habilitations : - des techniciens - des biologistes	- Matrice des habilitations (GBAQ.GRH-FOR-002) - Fiches de poste de la PCB du DBTP : PCB.BIC-FDP-002, PCB.BIC-FDP-003, PCB.BIC-FDP-007. - Fiches de postes Pharmacologie-Toxicologie : PHT.GRH-FDP-001 à 027. - Fiche habilitation individuelle (PCB.BIC-FOR-020 et PHT.GRH-FOR-005 à 020) - Fiche de poste validation biologique en pharmacologie-toxicologie (PHT.GRH-FDP-020).
Conditions ambiantes requises (ex : Température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Conditions de fonctionnement de l'analyseur : - Température de la pièce [15 – 25]°C avec variations $\pm 2^{\circ}\text{C}$ - Electricité	- Suivi des températures de pièce. - Onduleur, circuit secouru.
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	Réactifs internes	- Gestion des températures des enceintes par SIRIUS - SAPANET : Logiciel de gestion des commandes et des stocks (PHT.DIV-PRO-012) - Mode opératoire de fabrication des gammes de calibration et contrôles de qualité internes

		maison (PHT.DIV-MOP-003).
Matériau de référence :	Poudres certifiées et solutions mères	Péréemption des poudres et solutions mères gérée par le technicien référent.
Equipements : Exigences métrologiques	<ul style="list-style-type: none"> - Qualité de l'eau: eau ultrapure Milli Q[®] (type 1 i.e. résistivité > 18 MΩ.cm) - Qualité des solvants et produits chimiques: utiliser une qualité compatible avec la détection par spectrométrie de masse. Attention, tout changement de fournisseur peut impacter la qualité de l'analyse - Centrifugation des échantillons sanguins après précipitation des protéines - Maintenance de l'appareillage - Pipettes vérifiées et calibrées au moins une fois par an - Balances de précision vérifiées une fois par an 	<ul style="list-style-type: none"> - Vérification/maintenance préventive annuelle de l'équipement de purification d'eau (Milli-Q[®] - Millipore, Molsheim, France). - Vérification et tests de chaque produit lors d'un changement de référence : procédure de gestion des commandes de réactifs, consommables, contrôles de qualité interne et calibrants (PHT.DIV-PRO-012) - Procédure d'entretien courant d'une centrifugeuse de laboratoire (GBAQ.EMT-PRO-001). - Utilisation et maintenance des API 3200 et API 3200 QTRAP: PHT.EQU-PRO-002 et PHT.EQU-PRO-003 - Contrôle et maintenance des pipettes opérés par une personne habilitée (BIOMED.BIO-MOP-001 et BIOMED.BIO-PRO-001 et BIOMED.BIO-FOR-006) - Vérification/maintenance préventive annuelle des balances de précision.
ANALYTIQUE		
Instrument	Conditions analytiques	Cf. partie conditions analytiques en fin de ce document
CIQ	Gestion des CIQ	<ul style="list-style-type: none"> - Suivi des CIQ sur le logiciel dédié URT - Procédures de gestion des CIQ (PHT.QUA-PRO-005 / PHT.QUA-PRO-001)
ID des tubes d'analyse	Erreur d'identification	- Numérotation conjointe du bon de prescription avec le tube

	Inversion de patient	-Vérification des identités sur les tubes, les tubes secondaires, les vials à chaque étape -Vérifier le positionnement des tubes d'élution / ordre de distribution des prélèvements -Vérification du positionnement des vials par rapport à la séquence
Vérification technique	- Gamme - CIQ - Aire de l'étalon interne - Valeur patient	Procédure de vérification technique (PHT.QUA-PRO-002)
POST ANALYTIQUE		
Saisie des résultats dans les SGL	Saisie manuelle par le technicien	Vérification lors de la validation par le biologiste selon la procédure de validation biologique (PHT .QUA-PRO-004)
Compte-rendu de résultats	Interprétation biologique des résultats	- Procédure de validation biologique (PHT .QUA-PRO-004) - Commentaires pour la validation biologique de l'entécavir.

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Répétabilité:

3 niveaux de contrôles de qualité internes (CIQ) réalisés à partir de plasmas vierges surchargés avec une solution mère différente de celle utilisée pour la gamme de calibration. Le nombre de tests pour ce paramètre est limité à N=6 pour des raisons de coût des réactifs.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) limite ¹	Conclusion
CIQ 1	6	161,17	6,18	3,83%	± 20	Conforme
CIQ 2	6	790,17	12,51	1,58%	± 15	Conforme
CIQ 3	6	3115,00	20,74	0,67%	± 15	Conforme

Conclusion : La méthode satisfait aux exigences de la norme NF 15189 et des recommandations de la Food and Drug Administration (FDA) pour le test de répétabilité.

Fidélité intermédiaire :

3 niveaux de contrôles de qualité internes (CIQ) réalisés à partir de plasmas vierges surchargés avec une solution mère différente de celle utilisée pour la gamme de calibration. Le nombre de tests pour ce paramètre est limité à N=6 pour des raisons de coût des réactifs.

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) ¹	Conclusion
CIQ 1	6	157,86	10,12	6,41%	± 20	Conforme
CIQ 2	6	793,43	38,13	4,81%	± 15	Conforme
CIQ 3	6	3137,14	95,87	3,06%	± 15	Conforme

Conclusion : La méthode satisfait aux exigences de la norme NF 15189 et des recommandations de la Food and Drug Administration (FDA) pour le test de fidélité intermédiaire.

¹ U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.htm> (23.04.08), 2001.

Justesse (approche de la) : Applicable Non applicable

Type : CIQ ou surcharge CIQ externalisé Echange inter-laboratoire

Calculs réalisés à partir de 3 niveaux de contrôles de qualité internes maison obtenus par surcharges plasmatiques avec une solution mère d'entécavir différente de celle de la gamme de calibration (autre pesée de poudre du produit pur).

Echantillons	Nombre (N)	Valeur cible (ng/L)	Moyenne Mesurée (ng/L)	Biais (%)	Biais (%) limite	Conclusion
CIQ 1 (répétabilité)	6	150	161,17	7.45	± 20	Conforme
CIQ 2 (répétabilité)	6	750	790,17	5.36	± 15	Conforme
CIQ 3 (répétabilité)	6	3000	3115,00	3.83	± 15	Conforme
CIQ 1 (Fidélité intermédiaire)	6	150	157,86	5.24	± 20	Conforme
CIQ 2 (Fidélité intermédiaire)	6	750	793,43	5.79	± 15	Conforme
CIQ 3 (Fidélité intermédiaire)	6	3000	3137,14	4.57	± 15	Conforme

Exactitude : Applicable Non applicable

A ce jour et à notre connaissance, il n'existe pas de programme de contrôle de qualité externe (EEQ) disponible sur le marché.

Incertitudes de mesure : Applicable Non applicable

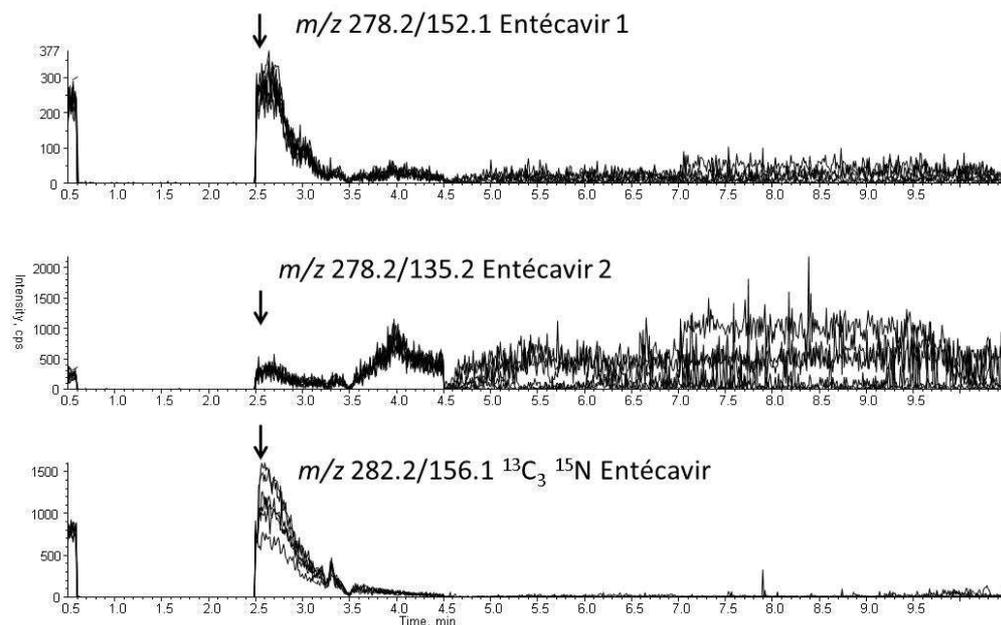
En l'absence de programme de contrôle de qualité externes, nous limiterons le calcul de l'incertitude de mesure en intégrant seulement la composante tirée du test de reproductibilité sur les CIQ = $(2 \times \sqrt{\text{variance}})/\text{moyenne} \%$.

	Niveaux CIQ (ng/L)		
	150	750	3000
Incertitude élargie U_c %	12.8%	9.6%	6.1%

Spécificité

6 échantillons de plasmas différents non surchargés sont extraits sans étalon interne (blancs-blancs) et analysés.

Ci-dessous, les superpositions de 6 chromatogrammes pour les transitions de quantification de l'entécavir avec leurs temps de rétention correspondant.



Conclusion : les superpositions des 6 transitions MRM des 6 blanc-blancs sur les transitions ioniques de l'entécavir présentent des bruits de fond négligeables à comparer des signaux mesurés aux niveaux des limites inférieures de quantification.

Contamination inter-échantillon

Calculs établis selon la méthode COFRAC (SH-GTA 04) avec n=3.

Moyenne G7 (concentration haute ng/L)	Moyenne G1 (concentration basse, 1 ^{ère} valeur ng/L)	Moyenne G1 (concentration basse, 3 ^{ème} valeur ng/L)
10188.9	50.4	50.7
Pourcentage contamination :	0.01%	

Conclusion : La méthode satisfait aux exigences de l'analyse en matière de contamination inter échantillon : le passage d'un échantillon fortement concentré n'altère pas la justesse calculée sur un échantillon consécutif à basse concentration.

Limites de quantification :

Les limites de quantifications sont calculées à partir des Biais et CV obtenus pour la fidélité intermédiaire. La limite inférieure de quantification (LLOQ) correspond au premier point de la gamme de calibration. La limite supérieure de quantification (ULOQ) correspond au dernier point de la gamme de calibration.

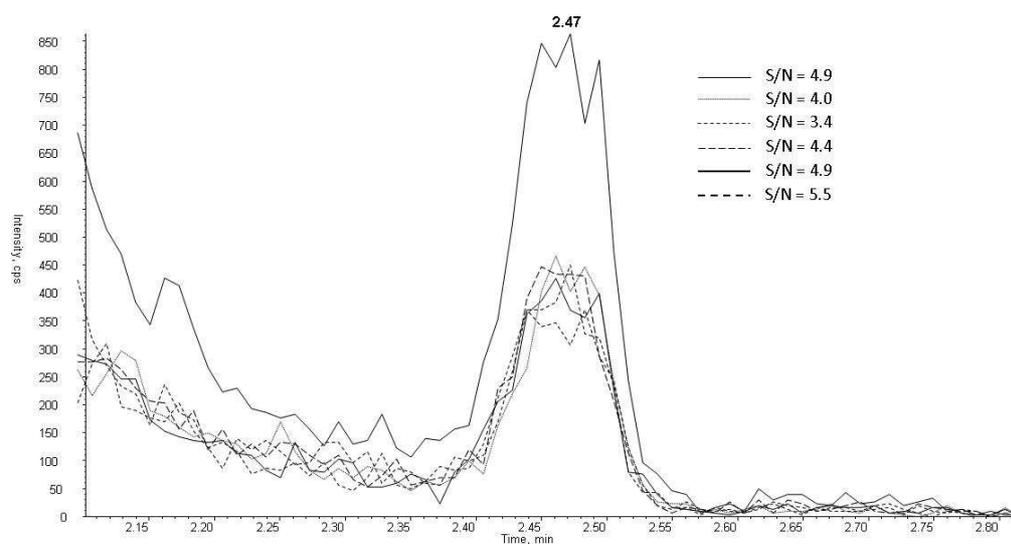
Au regard des recommandations de la FDA², ces limites sont considérées comme valides dès lors que les biais et CV soient inférieurs ou égales à 20% pour la LLOQ et inférieurs ou égales à 15% pour la ULOQ.

La LLOQ doit d'autre part vérifier un rapport signal sur bruit (S/N) supérieur à 10.

Echantillons	Nombre (N)	Valeur cible (ng/L)	Moyenne Mesurée (ng/L)	Biais (%)	CV (%)	Biais et CV (%) limites	Conclusion
LLOQ	6	50	47.7	- 4.6	5.2	± 20	Conforme
ULOQ	6	10 000	9971.7	- 0.3	0.6	± 15	Conforme

² U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fn1.htm> (23.04.08), 2001.

Ci-dessous, la superposition de 6 signaux MRM de l'entécavir à la LLOQ (50 ng/L) générant un rapport $S/N_{\text{moyen}} = 4.5$.



Conclusion : les limites basses et les limites hautes de quantification répondent aux recommandations.

Limites de Détection :

La limite de détection (LOD) est déterminée selon les recommandations de la FDA³ et comme étant le niveau de concentration dont le rapport signal sur bruit est supérieur ou égal à 3.

Dans le cadre du suivi thérapeutique pharmacologique, et au regard de la problématique clinique de l'entécavir, la LOD est fixée au niveau de la LLOQ (25 µg/L). Les rapports $S/N > 3$ sont ainsi satisfaits (cf. rapports S/N déterminés pour les LLOQ).

Conclusion : la limite de détection établie au niveau de la limite basse de quantification répond aux recommandations.

³ U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.htm> (23.04.08), 2001.

Détermination de la linéarité (n=6):

La linéarité est vérifiée sur chacun des niveaux de la gamme de calibration utilisés lors du test de reproductibilité.

Concentration théorique (ng/L)	Exactitude des calibrants (%), coefficient de corrélation, pente									Valeur limite
	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6	Moyenne	CV	Biais	
50	47.6	49.0	51.2	49.0	43.6	53.8	49.0	7.01 %	-1.9%	≤ 20 %
100	97.7	106.	93.6	97.3	104.	92	98.4	5.65 %	-1.6%	≤ 15 %
200	188	194.	196.	196.	214.	200	198	4.43 %	-1.0%	≤ 15 %
500	491	502.	521.	523.	514.	503	509	2.44 %	1.8%	≤ 15 %
1000	1170	992.	1030.	1030.	989.	996	1034.5	6.66 %	3.5%	≤ 15 %
5000	4960	4950	4970	5010	5040	3720	4775.0	10.85 %	-4.5%	≤ 15 %
10000	9900	10100	10000	9950	9950	10000	9983.3	0.68 %	-0.2%	≤ 15 %
R²	0.9997	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.9842	0.01 %	-1.6%	>0.99

Conclusion : la linéarité est vérifiée comme reproductible sur l'étendue de la gamme de calibration.

Intégrité de dilution :

A deux niveaux de concentration (n=6) supérieurs à la ULOQ, des dilutions au demi et au cinquième sont évaluées :

Echantillons	Facteur de dilution	Nombre (N)	Valeur cible (ng/L)	Moyenne Mesurée (ng/L)	Biais (%)	CV (%)	Biais (%) limite	Conclusion
15 000	1/2	6	15 000	16516,67	10,11	2.08	± 15	Conforme
25 000	1/5	6	25000	28533,33	14.13	0.96	± 15	Conforme

Conclusion : Il est possible, après dilution, de pratiquer des analyses sur des échantillons dont la concentration en entécavir est comprise entre 10 000 et 25 000 ng/L.

Rendement d'extraction :

Echantillons	Nombre (N)	Valeur cible (ng/L)	Moyenne du rendement (%)	CV (%)	Rendement limite (%)	CV limite (%)	Conclusion
CIQ 1	6	150	73.79 %	6.5	> 50	< 20	Conforme
CIQ 3	6	3000	83.31 %	7.3	> 50	< 20	Conforme

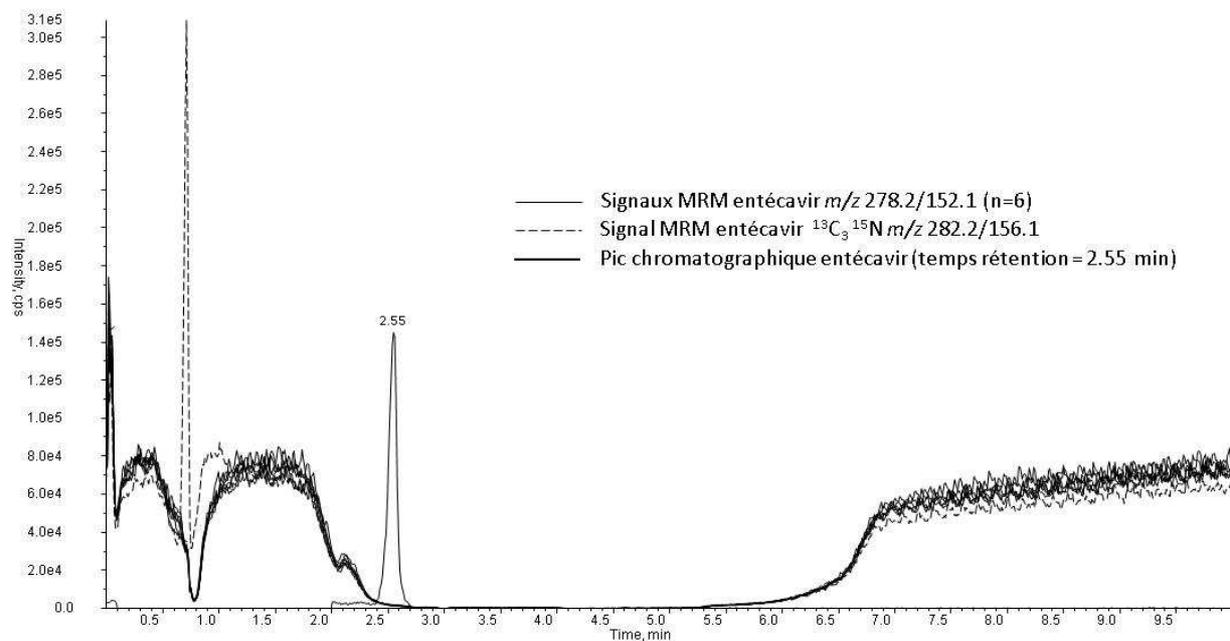
Conclusion : Rendement d'extraction reproductible et supérieur à la limite de tolérance (REF >50%)

Effet matrice :**Effet matrice quantitatif**

A deux niveaux de CIQ, rapport des concentrations mesurées entre des échantillons vierges (n=6) extraits puis surchargés (n=6) et des échantillons (n=6) surchargés directement dans le solvant utilisé en post-extraction (H₂O).

Echantillons	Nombre (N)	Valeur cible (ng/L)	Moyenne Effet matrice (%)	CV (%)	Effet matrice limite (%)	CV limite (%)	Conclusion
CQ 1	6	150	77.13	20.5			
CQ 3	6	3000	69.66	35.5			

Effet matrice Qualitatif : test de suppression ionique.



Conclusion : l'effet matrice quantitatif qui avoisine les 30% n'est pas pénalisant car la LLOQ est atteinte de façon reproductible. De plus, le test de suppression ionique montre qu'au niveau du temps de rétention de l'entécavir, les signaux MRM sont relativement stable, écartant des potentiels changements de valeur de signal.

Etudes de stabilité :

Etude de stabilité réalisée à partir d'une revue de la littérature

Résultats	Entécavir dans le plasma		
	Résultat	Concentration (ng/L)	CV (%)
Congélation/décongélation :	3 cycles de -10/-20/-30°C → RT ⁽³⁾	150	4,9 ⁽³⁾
		16 000	5,3 ⁽³⁾
	4 cycles de -20°C → RT ⁽²⁾	Absence de données	
	5 cycles de -20°C → RT ⁽²⁾	Absence de données	
-70°C	49j ⁽²⁾	Absence de données	
-20°C	14j ⁽¹⁾	15	5.9
		10 000	- 6.3
	42j ⁽²⁾	Absence de données	
-10 °C	65j ⁽³⁾	150	3.3
		16 000	5.6
T°C ambiante	19h ⁽³⁾	150	5
		16 000	4.4
	22h15min ⁽²⁾	Absence de données	
	120h ⁽¹⁾	Absence de données	
Réinjection vial	121h15min ⁽³⁾	Absence de données	

Résultats	Entecavir en solution		
	Résultat	Concentration (ng/L)	CV (%)
-20°C	> 1an ⁽¹⁾	Absence de données	
1-8°C	47j ⁽²⁾	Absence de données	
T°C ambiante	19h ⁽²⁾	Absence de données	

⁽¹⁾ D. Zhang et al. / Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 49 (2009) 1027–1033

⁽²⁾ Denny Yifei Liu, Erika Hess, Determination of Entecavir in Human Plasma using LC/MS/MS

⁽³⁾ B.R. Challa et al. / J. Chromatogr. B 879 (2011) 769–776

Conditions analytiques :

Préparation de l'échantillon : Extraction en phase solide : colonnes OASIS® HLB 1cc.

. Conditionnement : 900 µL méthanol puis 900 µL eau ultrapure.

. Dépôt : 300 µL de solution intermédiaire (110 µL échantillon + 220 µL solution d'étalon interne 1000 pg/mL).

. Lavage : 2300 µL eau ultrapure.

. Elution : 2 fois 150 µL de méthanol.

. Evaporer à sec sous azote.

. Reprise par 50 µL H₂O/acétonitrile 50/50.

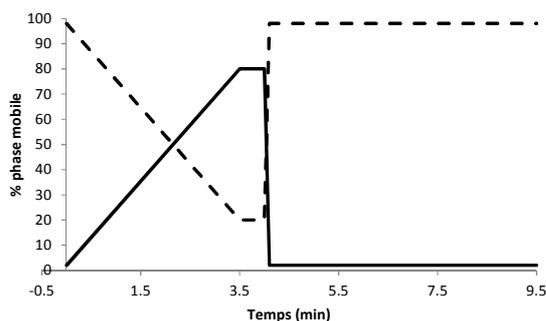
Chromatographie (Thermo Dionex Ultmate 3000):

. **Gradient analytique en chromatographie (Macherey Nagel HILIC 150x2.1, 3 µm).**

Composition phase mobile A : Tampon acétate d'ammonium 20mM, pH 5 (à l'acide acétique glacial).

Composition phase mobile B : Acétonitrile.

. **Gradient :**



. **Injecteur** : thermostaté à 4°C. Injection 5 µL.

. **Four colonne** : 60°C

Détection : spectrométrie de masse en tandem (ABSciex API 4000) – électrospray positif

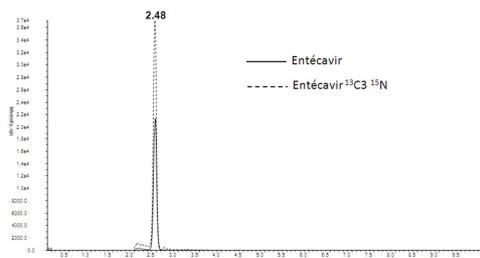
. **Paramètres sources :**

Gaz de collision	10 psi
Gaz rideau	30 psi
Ion source Gas 1	50 psi
Ion source Gas 2	60 psi
Tension	5 500 V
Température	600°C

. **Paramètres produits :**

Analyte	Q1 m/z	Q3 m/z	Dwell time (ms)	DP (V)	EP (V)	CE (V)°	CXP (V)
Entécavir 1	278,2	152,1	300	61	10	25	12
Entécavir 2	278,2	135,2	40	61	10	49	12
Entécavir ¹³ C ₃ ¹⁵ N	282,2	156,1	300	61	10	25	12

Chromatogramme type :



Comparaison de méthode :

La quantification (Beste, Burkhardt, & Kaefer, 2012) de l'entécavir est une méthode originale du laboratoire qui ne comporte pas de méthode de référence sur laquelle se comparer. Aucun échange inter laboratoire n'a été effectué à ce jour.

Conclusion générale :

La méthode de dosage de l'entécavir dans le plasma par HPLC-MS/MS répondant aux exigences recommandées est considérée comme validée et opérationnelle.

Date : 13.04.2015

Biologiste : Stanke Françoise

Visa :

IV. Application de la méthode dans une étude clinique

Dans le cadre de notre étude, 80 échantillons plasmatiques de 36 patients chroniquement infectés par le VHB et traités par EV ont été recueillis. Le tableau 4 décrit la population étudiée.

Notre étude a permis la description du profil pharmacocinétique de l'EV chez les patients mono-infectés par le VHB de façon chronique (figure 3). La concentration plasmatique en EV des 80 échantillons était comprise entre 56 à 5950 ng/L, ce qui est dans la zone de linéarité de notre courbe de calibration.

Une concentration maximale (C_{max}) moyenne de 3182 ng/L a ainsi pu être déterminée. Malgré le peu d'échantillons de patients non-observants selon l'échelle modifiée de Morisky (6 sur 80), une tendance ($p=0.06$) à la diminution des concentrations résiduelles moyennes a été observée chez les patients non-observants (360 ng/L, écart type (Sd)=177 ng/L, n=4) par rapport aux patients observants (598 ng/L, Sd=275 ng/L, n=45).

Enfin, aucun patient n'avait une concentration plasmatique d'EV indétectable.

V. Discussion

Nous avons mis en place une méthode analytique simple pour la quantification plasmatique de l'EV chez les patients infectés de façon chronique par le VHB et traités par ce médicament. Cette méthode comporte un prétraitement de l'échantillon par SPE, puis une phase de séparation des composés par HPLC HILIC associée à une détection en spectrométrie de masse en tandem. Nous avons décrit une méthode robuste qui a démontré sa sensibilité, sa spécificité, sa reproductibilité et sa répétabilité, ainsi que l'absence de contamination inter échantillons. De plus pour chacun des paramètres étudiés, les CV obtenus étaient la plupart du temps beaucoup plus bas que les CV exigés (entre 0.67 et 7.01 % pour des CV attendus

inférieurs à 15 ou 20 % selon le CQI employé). Notre méthode de dosage est donc utilisable en pratique courante pour le suivi thérapeutique et pharmacologique, ainsi que pour le dosage de l'EV chez les patients inclus dans des essais cliniques.

Aucun patient n'avait une concentration plasmatique d'EV indétectable. Au regard de la longue demi-vie de l'EV (environ 24h), ces résultats suggèrent que certains patients identifiés selon nos critères comme « non-observants » ne le sont que ponctuellement, sur de courtes durées. Le dosage pharmacologique de l'EV plasmatique, dans le suivi de l'observance au traitement, semble donc utile pour identifier les patients interrompant leur traitement sur des périodes supérieures à 7 jours.

Dans une étude récente[13] une faible observance n'a pas pu être significativement associée à la survenue de blips, bien que les patients présentant un épisode de blip aient trois fois plus de risques d'être non-observants que les patients sans blips.

Dans notre étude, 5 patients sur 36 (14%) étaient non-observants, ce qui est conforme avec les données d'une précédente étude (15% de patients non observants parmi ceux présentant un blip) et 5,6% de patients non observants parmi ceux ne présentant pas de blips) [13].

Il serait donc intéressant d'étudier l'association entre l'observance et la survenue de ces blips lors d'études futures incluant davantage de patients. Par ailleurs notre étude peut sous-estimer la proportion de patients non-observants, puisque l'observance des patients est évaluée en tenant compte uniquement de leurs réponses au questionnaire adapté de Morisky.

Enfin les populations de ses deux études étaient différentes, puisque 12% des patients présentant un blip avaient une concentration plasmatique d'EV indétectable (aucun patient dans notre étude).

DEUXIÈME PARTIE :

ARTICLE ORIGINAL EN ANGLAIS

Quantitation of entecavir in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Application for the study of treatment adherence in patients chronically infected with hepatitis B

Guillaume Chovelon¹, Jean-Francois Jourdil¹, Marie Noelle Hilleret¹, Francoise Stanke-Labesque^{2,3}

¹Centre Hospitalier Universitaire Grenoble, Hôpital Albert Michalon, F-38043 Grenoble, France

²Univ. Grenoble Alpes, F-38041 Grenoble, France

³INSERM U1042, HP2, F-38041 Grenoble, France

Corresponding author:

Pr Françoise Stanke-Labesque,

CHU, Hôpital Albert Michalon, Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, CS10217, F-38043 Grenoble Cedex 9, France. INSERM U1042

Tel: 33.4.76.76.54.92

Fax: 33.4.76.76.89.38

E-mail: FStanke@chu-grenoble.fr

Abstract

Entecavir is a nucleoside analog, available for the treatment of chronic hepatitis B. Because of its low daily dosing (0.5 or 1 mg d⁻¹) and large volume of distribution, its concentrations in plasma patients are low.

We report a method suitable for the quantitation of entecavir in plasma from patients chronically infected with hepatitis B virus (HBV). This method combines a solid-phase extraction (SPE) sample preparation followed by a hydrophilic interaction liquid chromatography -tandem mass spectrometry to ensure good retention, high sensitivity and specificity.

Our method shows good accuracy and precision for within-day (bias between 3.83 % and 7.45%, Coefficients of variations (CV) between 0.67 % and 3.83% respectively) and between-day (bias between 4.57 % and 5.79%, CV between 3.06 and 6.41% respectively) quantitations.

The limit of detection was 10 ng L⁻¹. The lower and upper limit of quantification were 50 ng L⁻¹ (CV: 7.01 %) and 10 000 ng L⁻¹ (CV: 0.68 %) respectively. The calibration was linear over the concentration range of 50 ng L⁻¹ to 10 000 ng L⁻¹. There was no significant matrix effect, no inter-sample carryover (the percentage of contamination was 0.01%), a satisfying extraction efficiency (between 73.79% and 83.31% with a CV <15%) and a good integrity dilution.

The performance of this method is in accordance with the national and international guidelines and is compatible with daily laboratory practice. This method can be useful for the quantitation of entecavir in patients chronically infected with HBV enrolled in clinical trials or in whom treatment observance is needed to be checked.

Keywords: Entecavir; Solid phase extraction, Hydrophilic interaction liquid chromatography;
Tandem mass spectrometry; Pharmacokinetic; Observance

1. Introduction

Approximately one third of the world population has serological evidence of past or present infection with hepatitis B virus (HBV) and 350 million persons worldwide are chronically infected. The natural history of chronic HBV infection is highly variable, ranging from a low viremic inactive carrier state to a progressive chronic hepatitis which may evolve to cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1].

Several drugs are available for the treatment of chronic hepatitis B including conventional interferon alpha, pegylated interferon alpha and nucleotide analogues (NUCs). Among the NUCs available, lamivudine, telbivudine, and emtricitabine belong to the L-nucleoside class, adefovir and tenofovir belong to the acyclic nucleoside phosphonates and entecavir (EV) belongs to 2-deoxyguanosine carbocyclic analogue class [2]. In order to inhibit the HBV polymerase activities, EV must be triphosphorylated [3]. EV is a potent HBV replication inhibitor for which the recommended oral daily dosage ranges from 0.5 or 1.0 mg/day. The estimated bioavailability of EV is around 70 % [4] and its volume of distribution is estimated to 115 liters/hour [5] leading to low concentrations of EV in plasma. Plasma pharmacokinetic of EV in HBV-infected patients has been poorly described, at least in part with respect to the extremely low limit of quantification that is required (ng L^{-1}) and the difficulties to manage a suitable chromatographic retention due to the high level of polarity of this compound ($\log P = -0.5$ [6]). In order to manage these difficulties, several experiments have been described. Most of them have used a solid phase extraction step to improve the sensibility of the analytical method. This sample preparation technique allowed good extraction and clean-up (by removing most of the matrix interferences and by enhancing electrospray ionization (ESI) yield) and at the same time, and enabled to enrich the samples after an evaporation step [7]. In addition, to generate a satisfying chromatographic retention of EV, the literature reports two different ways. The first one deals with using high pH mobile phase (pH around 10 using

ammonium hydroxide or ammonium bicarbonate) that allows to maintain the primary amine function of EV in its molecular state, and thereby to enhance its retention, to improve its peak shape and to increase positive ESI-MS/MS response [8,9]. The second one is the use of Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) that generates a good chromatography of EV. HILIC is a variant of normal phase chromatography which allows the retention of polar compounds with high percentage of organic solvent such as methanol (MeOH) or acetonitrile (CAN). This technology allows good peak shapes, good retention factors which avoid coelutions with endogenous interfering compounds and also enhances the ESI-MS/MS signal[7,10]. Therefore, the present study was performed to develop a selective and reproducible analytical method by LC-MS/MS for the quantitation of EV in plasma that is suitable for the description of EV pharmacokinetics in clinical studies performed in HBV-infected patients treated with EV 0.5 or 1 mg d⁻¹.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

EV and Internal standard (IS) entecavir ¹³C₃ ¹⁵N (EV ¹³C₃ ¹⁵N) were purchased from Alsachim, Illkirch Graffenstaden, France.

HPLC-grade MeOH, CAN and acetic acid (purity > 99%) were purchased from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France), HPLC-grade ammonium acetate was provided by Prolabo (Paris, France). Ultrapure water (H₂O) with resistivity ≥18.0 MΩ.cm was obtained using a Milli-Q Plus (Millipore, Molsheim, France). Polypropylene 2-milliliters (mL) centrifuge tubes, 2-mL tubes with 200-microliters (μL) restrictor screw cap vials, and pipette tips were purchased from Eppendorf (Le Pecq, France), Interchim (Montluçon, France) and Gilson

(Middletown, WI, USA), respectively. Drug-free plasma from volunteers was provided by Etablissement Français du Sang (Grenoble, France).

2.2. Preparation of working solutions, calibration standards, and internal quality controls

Standard stock solution of EV $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$ (1 g L^{-1}) was prepared in acetonitrile. Two standard stock solutions (one for calibration and one for internal quality control) of EV (1 g L^{-1}) were prepared in water. From EV $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$ stock solution, working solutions at $10\,000 \text{ ng L}^{-1}$ and 1000 ng L^{-1} were prepared by dilutions in water. From EV stock solution, working solutions at $10\,000$ and 1000 ng mL^{-1} were also prepared by dilutions in water. From these solutions, a 6 level-calibration curve and 3 levels of internal quality controls (IQC) were prepared by spiking blank plasma: 50, 100, 200, 500, 1000, 5000, 10000 ng L^{-1} for the calibration curve and 150, 750 and 3000 ng L^{-1} for the IQCs. All these spiked plasma samples were then stored at -20°C .

2.3. Sample pretreatment

110 μL of plasma were taken in Eppendorf tubes and mixed with 220 μL of IS (1000 ng L^{-1}). 300 μL of this mixture were loaded into SPE cartridges (waters Oasis HLB 1 cc) which were preconditioned with 900 μL methanol followed by 900 μL water. Then the SPE cartridges were washed with 2.3 mL of water and dried under vacuum. The cartridges were then eluted twice with 300 μL of methanol (150 μL each time) and the samples were collected in polypropylene tubes. All the samples were evaporated using nitrogen gas at less than 40°C temperature. Subsequently, all the dried samples were reconstituted with 50 μL of $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 50/50 and 5 μL were injected into the HPLC system connected to the tandem mass spectrometer.

2.4. Instrumentation

2.4.1. Chromatographic conditions

The LC system includes an Ultimate 3000 RS quaternary pump, an autosampler and a column compartment (Ultimate 3000 RS, Dionex Thermo Scientific, Germering, Germany). Chromatographic separation was achieved on a HILIC analytical column (Macherey Nagel Nucleodur HILIC, 3 μm , 2 mm \times 125 mm, Düren, Germany).

The mobile phases consisted of 20 mM ammonium acetate downed to pH 5 with acetic acid (A mobile phase) and CAN (B mobile phase). Components were eluted using gradient-elution at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. From 0 to 3.5 min the amount of B mobile phase linearly decreased from 98 to 20%. This state was maintained for 0.5 min and then the system was switched to the initial equilibration conditions from 4 to 9.5 min. The autosampler and column oven were maintained at 4 and 60°C respectively.

2.4.2. Mass spectrometric conditions

Measurements were performed on an API 4000 tandem mass spectrometer (Sciex, Toronto, Canada) equipped with a turbo V[®] ion source. Ion source was operated in positive mode with an electrospray potential of +5500 V and the following parameters: turbo heater gas at 60 psi, nebulizer gas at 50 psi, ion source temperature at 600°C, and curtain gas at 30 psi.

Quantification was achieved in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, following two ion transitions for EV (one for quantitation m/z 278.2/152.1 and one for confirmation m/z 278.2/135.2) and one ion transition for IS m/z 282.2/156.1. The MRM settings are listed in Table 1.

2.5. Method validation

The assay validation was performed to meet the acceptance criteria according to the FDA guidelines for validation of bioanalytical methods [11]. The assay was validated in terms of specificity, selectivity, calibration model, precision and accuracy (intra- and inter-day), lower limit of detection (LLOD) lower and upper limit of quantitation (LLOQ and ULOQ), recovery from spiked human plasma samples, matrix effect, sample dilution and stability (bibliographic study).

2.5.1. Within- and between-day precision and accuracy

Within- and between-day accuracy (bias) and precision were examined by replicate analyses ($n = 6$) of the 3 levels of the IQC (low, medium and high). The low level of the IQC was 3 times higher than the first level of the calibration curve. Inter-day accuracy and precision were assessed with the same IQCs by injections ($n = 6$) of the same IQCs within 6 various days and by several analysts, and were calculated as the percentage deviation of the average calculated concentration from the nominal concentration. Precision was expressed as the percentage of coefficient of variation (CV %). The acceptance limits were <15% for precision and within $\pm 15\%$ of the nominal value for accuracy, except for the low level of the IQC for which <20% for precision and within $\pm 20\%$ of the nominal value for accuracy were accepted.

2.5.2. Selectivity

The selectivity of the method was determined by six different human blank plasma samples, which were pretreated and analyzed to test the potential interferences of endogenous compounds co-eluting with the analyte and the IS. Chromatographic peaks of the analyte and the IS were identified on both their retention times and MRM responses. The detection signal of EV in blank samples had to be below LLOQ.

2.5.3. Lower Limit of detection, lower and upper limit of quantitation

The lower limit of detection (LLOD) was determined as the lowest concentration with signal-to-noise ratio (S/N) superior or equal to three. The lower limit of quantitation (LLOQ) and the upper limit of quantification (ULOQ) were respectively determined as the lowest and highest concentrations of the calibration curve.

The acceptance limits for LLOQ and ULOQ were respectively <20% and <15% for precision and within $\pm 20\%$ and $\pm 15\%$ of the nominal value for accuracy.

2.5.4. Linearity

The calibration model (linearity) was examined by choosing a suitable regression model and the appropriate weighting factor to compensate for heteroscedasticity. Each calibration point was evaluated in replicates (n=6) with the objectives bias not exceeding $\pm 15\%$ except for the LLOQ ($\pm 20\%$).

2.5.5. Matrix effect

2.5.5.1. Quantitative matrix effect

The plasma-related matrix effect was quantified using the ratio of concentrations between blank samples spiked after the SPE procedure and non-extracted samples which were prepared with proper dilution of EV in the same diluent used for reconstitution after SPE (H₂O/CAN 50:50).

Experiments were performed at two levels, 150 ng L⁻¹ and 3000 ng L⁻¹ (n=6), with six different plasma lots. The acceptable precisions (CV %) were $\leq 20\%$ for 150 ng L⁻¹ and 15% for 3000 ng L⁻¹.

2.5.5.2. Qualitative matrix effect

Qualitative matrix effect was studied by analyzing ion suppression and/or enhancement phenomenon. Extracted blank plasma samples were injected into the LC system while a methanolic solution containing EV and IS (each at 200 ng L⁻¹) was continuously post-column infused in the ionization source through a tee.

2.5.6. Inter-sample carryover

Intersample carryover was studied to measure the persistence of analytes from one injection to another: a sample corresponding to the ULOQ (high level = H) was analyzed 3 times consecutively (H1, H2, H3, and the mean \bar{H} calculated). A sample corresponding to the LLOQ (low level = L) was then analyzed 3 times (L1, L2, L3). The percentages of contamination were calculated as follows:

$$\text{Contamination (\%)} = \frac{(L1 - L3)}{\bar{H}} * 100$$

2.5.7. Dilution integrity

We evaluated dilution integrity at 2 levels above the ULOQ (15 000 and 25 000 ng L⁻¹) at dilutions ¹/₂ and ¹/₅ (n=6). The bias should be < 15%.

2.5.8. Extraction recovery

Extraction recovery was determined at two levels of IQC (150 and 3000 ng L⁻¹) using the ratio between normally extracted samples (n=6) and double blank samples extracted and then spiked (n=6). The extraction recovery should be greater than 50 %, reproducible and should provide a signal sufficient to reach the LLOQ

2.5.9. Sample stability

A bibliographic study was done in order to ensure good storage conditions of the stock and working solutions of EV and IS but also of spiked plasmas. Analytical conditions (EV and IS behavior in the autosampler) were also evaluated.

2.5.10. Analysis of human plasma samples

Eighty plasma samples obtained from 36 HBV-monoinfected patients enrolled in the clinical trial AdHeB (number Afssaps: 2012-A00056-37) were analyzed in the present study. Blood samples were collected at 6, 12 and/or 18 months after the beginning of EV treatment. The observance of patients was evaluated with adapted Morisky scale at each period[12].

A 5mL blood sample was collected into vacutainer containing lithium heparinate as anticoagulant agent. All the samples were centrifuged at 2000 g at 10°C for 10 min and stored at below – 20°C until sample analysis.

For each sample, the time interval between blood handling and oral EV intake was noted.

3. Results and discussion

3.1. Chromatograms

Representative chromatograms of a double blank sample, a blank, a medium level internal quality control (750 ng L⁻¹) and a sample from a patient treated with EV and quantified at 267 ng L⁻¹ are presented in Fig1. The retention time was 2.46 min for EV (Fig.1 B).

The detection signal of EV is below the LOQ in a blank sample (Fig 1 A) and the very weak signals for EV and IS in a double blank (Fig 1 B) showed that, in the absence of the compounds of interest, there is no interfering signal both on a spiked sample (Fig 1 C) and on a plasma from a patient treated with EV (Fig 1 D).

3.2 Intra- and inter-day precision and accuracy

Within-day and between-day precision and accuracy for the 3 levels of IQC samples are shown in Table 2. All calculated concentrations were within the ranges of the FDA guidance.

3.3 Limit of detection (LOD), Lower (LLOQ) and upper limits of quantitation ULOQ:

The LOD was determined at 10 ng L⁻¹.

The LLOQ and ULOQ were 50 (CV = 7.01%) and 10 000 ng L⁻¹ (CV = 0.68%) respectively.

Both of them satisfied the FDA guidance.

3.4 Linearity

Linearity was evaluated using least-squares linear regression fitted by $1/x$ of EV to EV $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$ ratio versus theoretical concentrations and described by an equation of slope = 0.571 ± 0.04 (correlation coefficient 0.99994 ± 0.00005 , $n=6$).

3.5 Matrix effect

The quantitative matrix effect determined from 6 different plasma matrices was 73% and 70% for 150 and 3 000 ng L^{-1} respectively. These values indicated that there was an influence on the MS response due to substances/interferences in the extract (i.e. 29% ion suppression).

The overlay of six EV MRM signals and EV $^{13}\text{C}_3^{15}\text{N}$ MRM signal showed that around the retention time of EV and its IS, the MRM signals are decreased compared to those observed at the beginning and the end of the chromatogram. However, the MRM signals remained stable (no apparent slope observable) during the elution of EV and IS discarding the possibilities of signal drifts or shifts (Fig.2).

3.6 Inter-sample carryover

The percentage of contamination was 0.01%, suggesting the absence of inter-sample contamination and excluding the possibility of an over estimation of a low EV level measured just after an overdosed sample.

3.7 Dilution integrity

Applying a dilution factor of $1/2$ was associated with a bias of 10.1 % and a CV of 2.08 % for the target concentration of 15 000 ng L^{-1} . Applying a dilution factor of $1/5$ was associated with a bias of 14.1 % and a CV of 0.96 % for the target concentration of 25 000 ng L^{-1} .

3.8 Extraction recovery

The extraction efficiency was between 73.79% and 83.31% with a CV <15%, indicating an acceptable loss of compounds during the sample extraction. These values were not a concern because the quantitation threshold (LLOQ) was reached and the variability was acceptable.

3.9 Stability

The bibliographic study demonstrated that EV stability in plasma and in methanolic solutions was compatible with our laboratory practice (Table 3) dealing with extemporaneous analysis just after the sample extraction process.

3.10 Application to human plasma samples, clinical study

The demographic and biological data of the patients in whom EV plasma concentrations were measured are presented in Table 4.

The concentrations of EV in patient samples ranged from 56 to 5950 ng L⁻¹ and were within the calibration curve. This work also enabled the description of the pharmacokinetic profile of EV in patients with chronic hepatitis B (fig.3), and the determination of a mean maximum concentration (C_{max}) of 3182 ng L⁻¹ (standard deviation (Sd) : 1738 ng L⁻¹) . No patient had a plasma concentration of EV undetectable. A trend towards a decrease on the through EV concentration was observed in non-observant (mean = 360 ng L⁻¹, Sd = 177 ng L⁻¹, n=4) vs observant patients (mean = 598 ng L⁻¹, Sd = 275 ng L⁻¹, n=45). In view of the long half-life of EV (about 24 hours), these results suggest that some patients identified by our criteria as "non-observant" failed to take their treatment only occasionally.

Conclusion

We report a simple LC-MS/MS method suitable for the quantitation of EV of chronically infected HVB patients. This method includes a SPE step and a HILIC-MS/MS analytical method to ensure high sensitivity and specificity.

Our study describes the pharmacokinetic profile of EV in HBV mono-infected patients, in whom the observance was checked by the adapted Morisky scale. Thus our protocol is compatible with routine activities in therapeutic drug monitoring or measurement of EV plasma concentrations in patients enrolled in clinical trials.

References

- [1] European Association for the Study of the Liver, EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B, *J. Hepatol.* 50 (2009) 227–242. doi:10.1016/j.jhep.2008.10.001.
- [2] A.S.F. Lok, B.J. McMahon, Chronic hepatitis B, 2007. doi:10.1002/hep.21513.
- [3] G. Yamanaka, T. Wilson, S. Innaimo, G.S. Bisacchi, P. Egli, J.K. Rinehart, et al., Metabolic studies on BMS-200475, a new antiviral compound active against hepatitis B virus, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 190–193.
- [4] Résumé des caractéristiques du produit Baraclude, (n.d.) 1–74.
- [5] M. Zhu, M. Bifano, X. Xu, Y. Wang, F. Lacreata, D. Grasela, et al., Lack of an effect of human immunodeficiency virus coinfection on the pharmacokinetics of entecavir in hepatitis B virus-infected patients, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 2836–2841. doi:10.1128/AAC.01366-07.
- [6] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Entecavir>, (2015).
- [7] H. Vlčková, J. Janák, T. Gottvald, F. Trejtnar, P. Solich, L. Nováková, How to address the sample preparation of hydrophilic compounds: Determination of entecavir in plasma and plasma ultrafiltrate with novel extraction sorbents, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 377–344. doi:10.1016/j.jpba.2013.08.034.
- [8] B.R. Challa, B.Z. Awen, B.R. Chandu, S. Rihanaparveen, LC-ESI-MS/MS method for the quantification of entecavir in human plasma and its application to bioequivalence study, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 769–776. doi:10.1016/j.jchromb.2011.02.023.

- [9] D. Zhang, Y. Fu, J.P. Gale, A.F. Aubry, M.E. Arnold, A sensitive method for the determination of entecavir at picogram per milliliter level in human plasma by solid phase extraction and high-pH LC-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 1027–1033. doi:10.1016/j.jpba.2009.02.003.
- [10] L. Nováková, T. Gottvald, H. Vlčková, F. Trejtnar, J. Mandíková, P. Solich, Highly sensitive fast determination of entecavir in rat urine by means of hydrophilic interaction chromatography-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1259 (2012) 237–243. doi:10.1016/j.chroma.2012.03.078.
- [11] Food and Drug Administration, Draft Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2013.
- [12] D.E. Morisky, L.W. Green, D.M. Levine, Concurrent and predictive validity of a self-reported measure of medication adherence, *Med. Care.* 24 (1986) 67–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3945130> (accessed December 11, 2014).
- [13] E.H. Denny Yifei Liu, Determination of Entecavir in Human Plasma using LC/MS/MS, *Sci. Discip. Sci. Ingenuity. Web* [Www.tandemlabs.com](http://www.tandemlabs.com). (2014).

Table 1: MRM transitions, voltage setting declustering potential (DP), entrance potential (EP), collision energy (CE), and collision cell exit potential (CXP) for entecavir and Entecavir $^{13}\text{C}_3$ ^{15}N .

Analyte	Q1 <i>m/z</i>	Q3 <i>m/z</i>	Dwell time (ms)	DP (V)	EP (V)	CE (V) ^o	CXP (V)
Entecavir	<u>278,2</u>	<u>152,1</u>	300	61	10	25	12
	278.2	135.2	40	61	10	49	12
Entecavir $^{13}\text{C}_3$ ^{15}N	282.2	156.1	300	61	10	25	12

The collision gas (CAD) was set to 10 psi. Dwell times were set automatically by the Scheduled MRM mode of the software to obtain at least 15 points per peak. Underlined ions were used as quantifiers.

Table 2: Within-day and between-day precision (expressed as coefficients of variation) and accuracy (expressed as % bias) of entecavir quantitation

Nominal concentration (ng L ⁻¹)	Within-day precision and accuracy (n=6)			Between-day precision and accuracy (n=6)		
	Mean concentration (ng L ⁻¹)	CV (%)	Bias (%)	Mean concentration (ng L ⁻¹)	CV (%)	Bias (%)
150	161.17	3.83	7.45	157.86	6.41	5.24
750	790.17	1.58	5.36	793.43	4.81	5.79
3000	3115	0.67	3.83	3137.14	3.06	4.57

Table 3: Stability of Entecavir after freezing/thawing cycles and storage under different conditions: a literature review.

Results	Entecavir in plasma			Entecavir in solution		
	Results	Concentration (ng L ⁻¹)	CV (%)	Résultats	Concentration (ng L ⁻¹)	CV (%)
Freezing/thawing :	3 cycles from -10/-20/-30°C → RT ⁽⁷⁾	150	4,9 ⁽⁷⁾			
		16 000	5,3 ⁽⁷⁾			
	4 cycles from -20°C → RT ⁽¹³⁾		Data not shown		N/A	
	5 cycles from -20°C → RT ⁽¹³⁾		Data not shown			
-70°C	49 days ⁽¹³⁾		Data not shown		N/A	
-20°C	14 days ⁽⁹⁾	15	5.9			
		10 000	- 6.3	> 1 year ⁽⁹⁾		Data not shown
	42 days ⁽¹³⁾		Data not shown			
-10 °C	65 days ⁷⁾	150	3.3			
		16 000	5.6		N/A	
1-8°C		N/A		47 days ⁽¹³⁾		Data not shown
Room T°C	19h ⁽⁷⁾	150	5			
		16 000	4.4	19h ⁽¹³⁾		Data not shown
	22h15min ⁽¹³⁾		Data not shown			
	120h ⁽⁹⁾		Data not shown			
Reinjection vial	121h15min ⁽⁷⁾		Data not shown		N/A	

Table 4: Demographic and biological data of the patients; Data are presented as medians (10th-90th percentiles). Abbreviations: Body Mass Index (BMI); Aspartate aminotransferase (ASAT); Alanine aminotransferase (ALAT); Clearance CKD-EPI (Cl CKD-EPI).

	Patients (n=36)
Age (year)	48 (30-67)
Men (n,%)	26 (72)
BMI (Kg m ²)	26 (20-30)
Fibrosis	1 (1-2)
ASAT (IU L-1)	21 (13-33)
ALAT (IU L-1)	31 (20-50)
Cl CKD-EPI (ml min ⁻¹ 1.73 m ⁻²)	104 (81-127)
Adapted Morisky Scale score (arbitrary units)	1 (0-2)

Legends of the figures

Fig.1: Representative chromatograms of a double blank sample (A), a blank (B), a median level internal quality control (750 ng L^{-1}) (C), a sample from a patient treated with EV and quantified at 267 ng L^{-1} (D)

Fig.2 : Post-column infusion chromatograms depicting the matrix effects (ion suppression/enhancement) from 6 different blank plasma samples extracted by solid phase (overlay of 6 signals of each post-column infused compound – gray signals), following direct infusion of entecavir and its internal standards (single bold black signal representing a typical ion current among the ten initially obtained).

Fig.3: Concentration–time profile of entecavir in HBV mono infected patients treated with EV for at least 6 months and in whom the observance was confirmed.

Fig.1

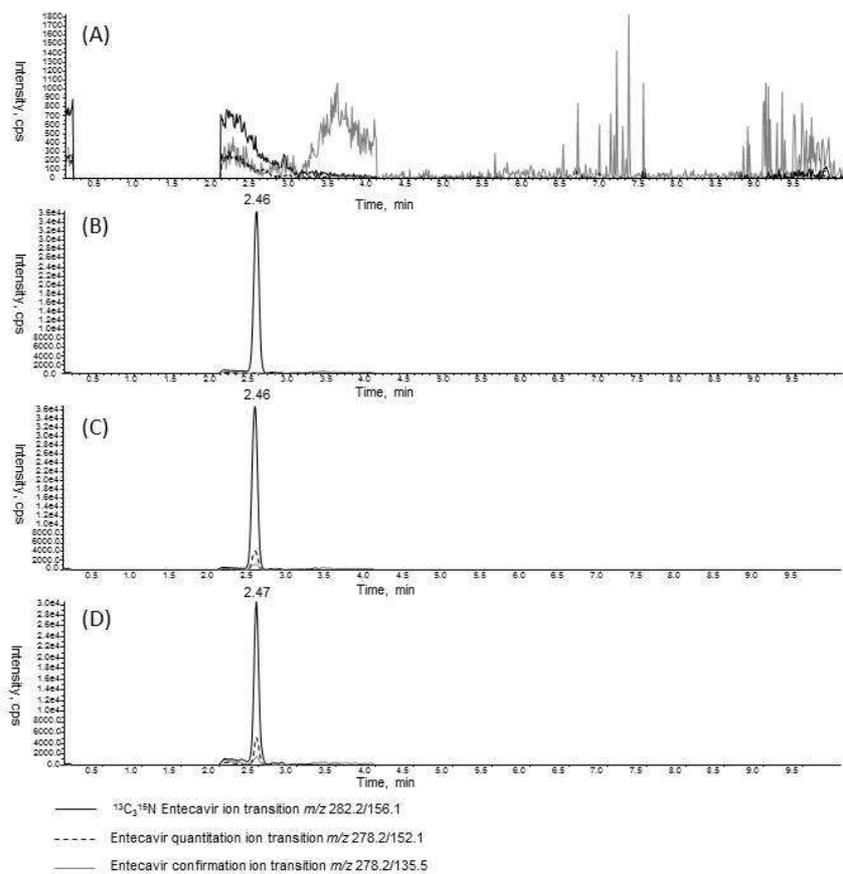


Fig.2

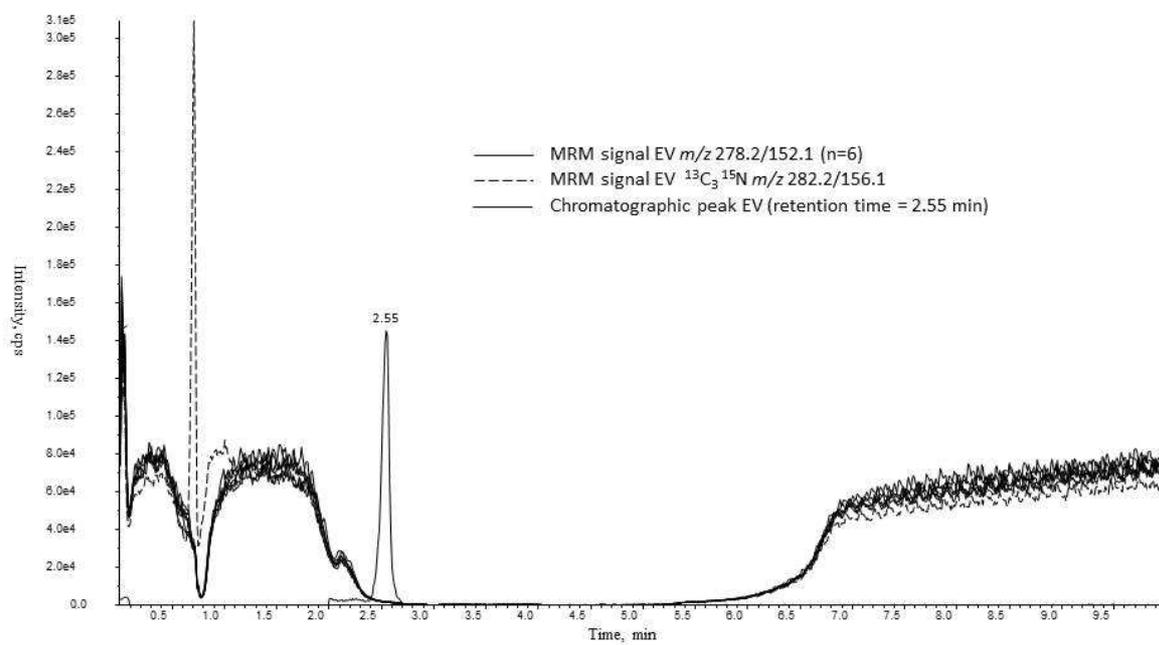
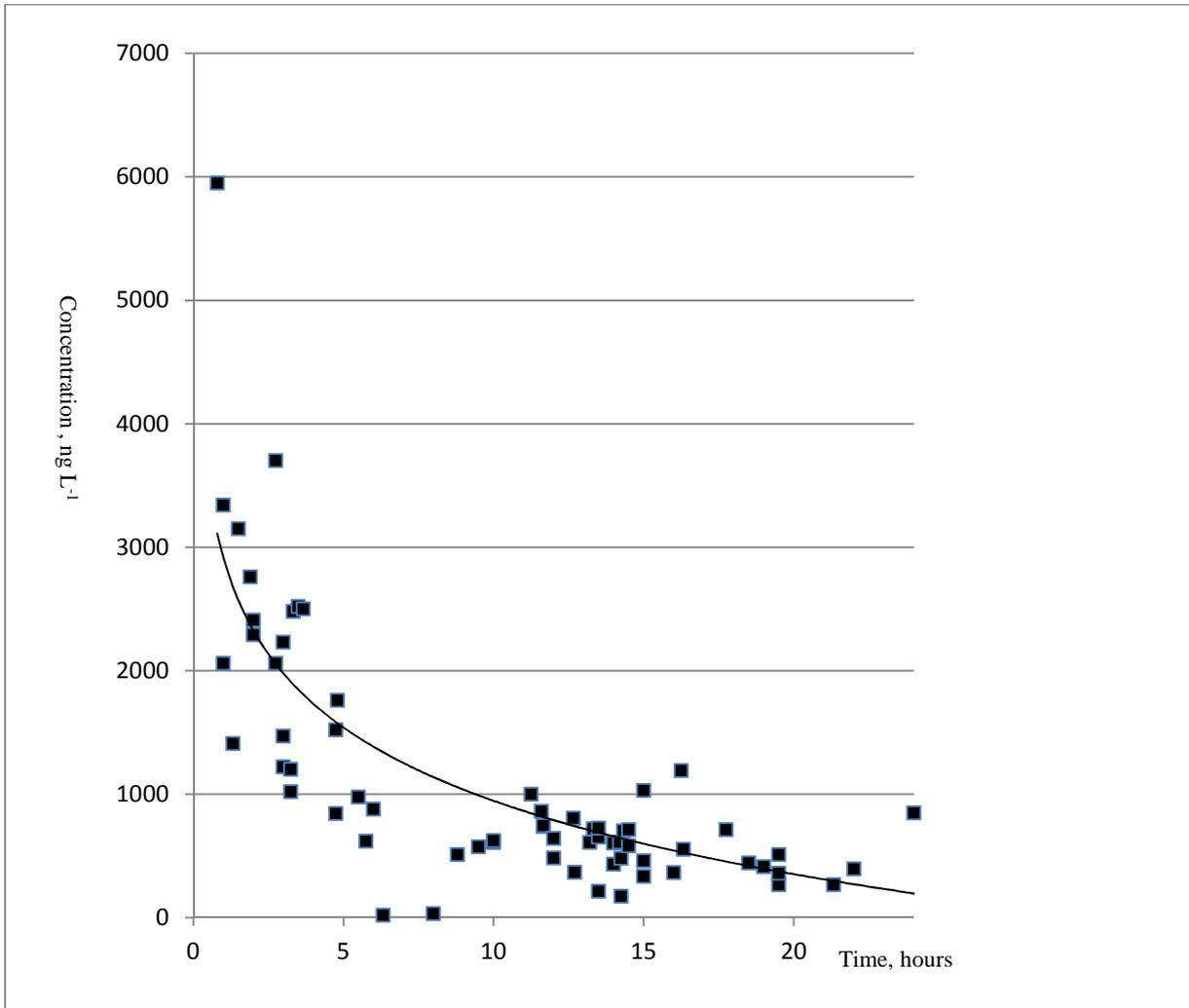


Fig.3



ANNEXE 1

QUESTIONNAIRE D'EVALUATION DE L'OBSERVANCE Questionnaire adapté de Morisky-Green

Date :

COMMENT RÉPONDRE : Les questions qui suivent portent sur votre connaissance de vos médicaments et votre santé, telle que vous la ressentez. Ces informations nous permettront de mieux identifier les contraintes liées à votre traitement.

Ce questionnaire comprend 1 page.

1. Ce matin, avez-vous oublié de prendre vos médicaments ? Oui Non

2. Depuis la dernière consultation, avez-vous été en panne de médicaments ? Oui Non

3. Vous est-il arrivé de prendre votre traitement avec du retard par rapport à l'heure habituelle ? Oui Non

4. Vous est-il arrivé de ne pas prendre votre traitement parce que certains jours votre mémoire vous fait défaut ? Oui Non

5. Vous est-il arrivé de ne pas prendre votre traitement parce que certains jours vous avez l'impression que votre traitement vous fait plus de mal que de bien ? Oui Non

6. Pensez-vous que vous avez trop de comprimés à prendre ? Oui Non

D'après Girerd et al. Presse Med 2001 Jun 16-23;30(21):1044-8.

CONCLUSION

THÈSE SOUTENUE PAR : Guillaume CHOVELON

TITRE : Développement et validation d'une méthode de dosage de l'Entécavir. Application pour l'étude de l'observance au traitement chez des patients chroniquement infectés par le virus de l'hépatite B

RÉSUMÉ :

L'hépatite B représente l'un des principaux problèmes de santé publique dans le monde. Environ 1/3 de la population mondiale a des marqueurs sérologiques témoignant de l'existence d'une infection ancienne ou d'une infection chronique par le virus de l'hépatite B.

L'Entécavir est un analogue nucléosidique utilisé dans le traitement de l'hépatite chronique B.

C'est un antiviral très puissant ($CE_{50} = 1.11 \mu\text{g/L}$ dans les cellules hépatiques humaines) dont la posologie est faible (0,5 ou 1mg/ jour), ainsi que ses concentrations plasmatiques (entre 50 et 5000 ng/L).

L'objectif de ce travail a été de mettre au point une technique analytique fiable et robuste, et capable de détecter de faibles concentrations plasmatiques d'Entécavir. Il s'est inscrit dans le cadre d'une étude ancillaire du protocole clinique AdhepB, ayant pour objectif principal l'évaluation de l'observance au traitement chez des patients chroniquement infectés par le virus de l'hépatite B.

Nous avons développé une méthode comprenant une première étape d'extraction en phase solide, suivie d'un dosage par chromatographie liquide haute performance HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Les principales performances de notre méthode de dosage sont :

- Répétabilité : Coefficients de Variation (CV) entre 0.67 et 3.83%
- Reproductibilité : CV entre 3.06 et 6.41%
- Pourcentage de contamination : 0.01%
- Limites de quantification et de linéarité : entre 50 et 10 000 ng/L
- Intégrité de dilutions au 1/2 et 1/5 : CV entre 0.96 et 2.08%

Cette méthode analytique de dosage mise au point au laboratoire de pharmacologie du CHU de Grenoble répond aux objectifs de performances selon la norme internationale ISO 15189, qui spécifie les exigences de qualité et de compétence propres aux laboratoires de biologie médicale.

Sur 80 échantillons plasmatiques de patients monoinfectés par le VHB et traités par Entécavir, seulement 6 concernaient des patients non-observants selon l'échelle modifiée de Morisky. Une tendance ($p=0.06$) à la diminution des concentrations résiduelles moyennes était observée chez les patients non-observants (360 ng/L) par rapport aux patients observants (598 ng/L).

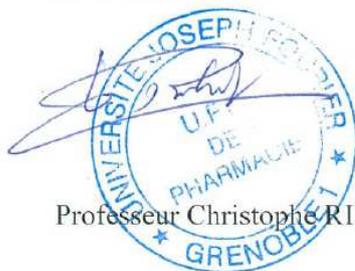
Aucun patient n'avait une concentration plasmatique d'Entécavir indétectable. Au regard de la longue demi-vie de l'Entécavir (environ 24h), ces résultats suggèrent que certains patients identifiés selon nos critères comme « non-observants » ne le sont que ponctuellement.

Ce travail a aussi permis la description du profil pharmacocinétique de l'Entécavir chez les patients atteints de l'hépatite B et traités de façon chronique, ainsi que la détermination d'une concentration maximale (C_{max}) moyenne de 3182 ng/L.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

A Grenoble, le 8 juin 2015

LE DOYEN



Professeur Christophe RIBUOT

LE PRESIDENT DE LA THESE

Département de Biochimie,
 Toxicologie et Pharmacologie
 Responsable Pr Patrice FAURE
 Pôle de Biologie - CHU de Grenoble
 CS 10217 - 38043 GRENOBLE CÉDEX 9
 Tel. 04 76 76 54 84 - Tel. 04 76 76 56 64
 Professeur Patrice Faure

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] European Association for the Study of the Liver, EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B, *J. Hepatol.* 50 (2009) 227–242. doi:10.1016/j.jhep.2008.10.001.
- [2] B. Kearney, J. Flaherty, J. Shah, Tenofovir disoproxil fumarate Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics, *Clin. Pharmacokinet.* 43 (2004) 595–612. <http://link.springer.com/article/10.2165/00003088-200443090-00003>.
- [3] A. Chaturvedula, M.J. Fossler, C.W. Hendrix, Estimation of tenofovir's population pharmacokinetic parameters without reliable dosing histories and application to tracing dosing history using simulation strategies, *J. Clin. Pharmacol.* 54 (2014) 150–160. doi:10.1002/jcph.221.
- [4] C. Lu, Y. Jia, L. Chen, Y. Ding, J. Yang, M. Chen, et al., Pharmacokinetics and food interaction of a novel prodrug of tenofovir, tenofovir dipivoxil fumarate, in healthy volunteers, *J. Clin. Pharm. Ther.* 38 (2013) 136–140. doi:10.1111/jcpt.12023.
- [5] K. Agarwal, S.K. Fung, T.T. Nguyen, W. Cheng, E. Sicard, S.D. Ryder, et al., Twenty-eight day safety, antiviral activity, and pharmacokinetics of tenofovir alafenamide for treatment of chronic hepatitis B infection, *J. Hepatol.* 62 (2015) 533–540. doi:10.1016/j.jhep.2014.10.035.
- [6] A. Marengo, D. Bitetto, A. D'Avolio, A. Ciancio, C. Fabris, M. Marietti, et al., Clinical and virological response to entecavir in HBV-related chronic hepatitis or cirrhosis: Data from the clinical practice in a single-centre cohort, *Antivir. Ther.* 18 (2013) 87–94. doi:10.3851/IMP2284.

- [7] Résumé des caractéristiques du produit Baraclude, (n.d.) 1–74.
- [8] M. Zhu, M. Bifano, X. Xu, Y. Wang, F. Lacreata, D. Grasela, et al., Lack of an effect of human immunodeficiency virus coinfection on the pharmacokinetics of entecavir in hepatitis B virus-infected patients, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 2836–2841. doi:10.1128/AAC.01366-07.
- [9] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Entecavir>, (2015).
- [10] A. ALPERT, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds., *J. Chromatogr. A.* 499 (1990) 177–196.
- [11] P. Marquet, Théorie et instrumentation des techniques de LC-MS et LC-MS / MS applicables à la toxicologie LC-MS and LC-MS / MS theory and instruments applicable to toxicology, *Ann. Toxicol. Anal.* XVII, n°1 (2005).
- [12] Food and Drug Administration, Draft Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, 2013.
- [13] A. MONTCHAUD, Fréquence et signification des blips au cours du traitement de l'hépatite B par analogues de deuxième génération. Thèse de doctorat en médecine., Université Joseph Fourier, Grenoble, 2014.