



**HAL**  
open science

**Validation d'une méthode de dosage du Vémurafénib par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à partir d'une goutte de sang séché (DBS) : application dans une cohorte pédiatrique atteinte d'histiocytose langerhansienne**

Céline Mory

► **To cite this version:**

Céline Mory. Validation d'une méthode de dosage du Vémurafénib par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à partir d'une goutte de sang séché (DBS) : application dans une cohorte pédiatrique atteinte d'histiocytose langerhansienne. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03216574

**HAL Id: dumas-03216574**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03216574>**

Submitted on 4 May 2021

**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.

**UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE**  
**UFR SANTE – Département PHARMACIE**

Année 2019-2020

N°

**Mémoire**  
**pour le DIPLOME de DES de Biologie médicale**

Présentée et soutenue le 29 Avril 2020

par

**Céline MORY**

Née le 09/11/1990 à Vendôme

**Validation d'une méthode de dosage du Vémurafénib  
par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de  
masse en tandem (LC-MS/MS) à partir  
d'une goutte de sang séché (DBS)**

**Application dans une cohorte pédiatrique atteinte  
d'histiocytose langerhansienne**

Président et Co-directeur :

Professeur Loïc FAVENNEC

Directeur de thèse :

Professeur Jean-Claude ALVAREZ

Membres du jury :

Docteur Islam Amine LARABI

Docteur Fabien LAMOUREUX

Docteur Jean DONADIEU

Docteur Julien WILLS



## **Remerciements :**

### **À Monsieur le Professeur Jean-Claude Alvarez,**

Je vous remercie pour votre accueil au sein du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de Garches, pour votre encadrement, pour votre dynamisme et pour vos retours et suggestions qui m'ont permis de progresser au cours de ce projet et de mon internat. Soyez assuré de ma reconnaissance.

### **À Monsieur le Professeur Loic Favennec,**

Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites de présider cette thèse, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

### **À monsieur le Docteur Jean Donadieu,**

Je vous remercie de l'intérêt que vous portez à ce projet et c'est un honneur de vous compter parmi les membres du jury.

### **À Monsieur le Docteur Fabien Lamoureux,**

Je suis sensible à ta présence dans ce jury de thèse, je garde un excellent souvenir de mon année passée dans le laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Rouen. Je te remercie pour ta disponibilité, ta bonne humeur, ton soutien et tes précieux conseils.

### **À Monsieur le Docteur Islam Amine Larabi,**

Je te remercie pour ta disponibilité, pour ta confiance et tes relectures. Tu m'as fait partager tes compétences et tes précieux conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Je garde un excellent souvenir de ton encadrement.

### **À monsieur le Docteur Julien Wils,**

Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail et d'avoir accepté de siéger parmi les membres du jury.

Je tiens également à remercier Laure Girard, étudiante en Master 2 au laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de Garches, sans qui ce travail n'aurait pas été aussi complet. Je te remercie pour ton aide précieuse et ta motivation. Je garde un excellent souvenir de notre collaboration.

À l'ensemble des biologistes, ingénieurs et techniciens des laboratoires de Pharmacologie et Toxicologie du CHU de Rouen, Limoges et Garches pour leur contribution, leur disponibilité et leur soutien pendant ces années d'internat. À Laurent pour ta disponibilité, ta bonne humeur et ta passion pour « Les Robins des Bois ».

Et enfin, MERCI ....

### **À mes parents**

A vous qui avez toujours su me donner tout ce dont j'avais besoin, à vous qui m'avez toujours encouragée et soutenue dans tous mes projets. Vous êtes ma source de motivation et vous m'avez donné la force et le courage tout au long de ces études. Merci d'avoir cru en moi, merci pour votre amour, pour votre soutien, de me régaler encore et toujours avec vos bons petits plats et pour tout ce que vous faites chaque jour pour Seb et moi.

### **À ma famille**

À mes grands-parents, à Véro pour ta bienveillance, tes précieux conseils et tes mots touchants qui m'ont toujours poussée à continuer, à mon frère, Seb, qui pense que je fais du bénévolat depuis dix ans. A vous tous, merci pour votre amour et merci de m'épauler dans chacun de mes choix et de m'apporter tout l'équilibre dont j'ai besoin.

### **À mes amis, à mes coloc, à mes co-internes, à Boris...**

À nos week end, à nos soirées, à nos voyages, à nos pleurs, à nos rires, à nos fous rires  
À vous qui avez supporté mon foutoir, mes tests culinaires, mes alarmes de réveil incessantes....

Vous êtes indispensables à mon bonheur et quelle chance j'ai de vous avoir à mes côtés

Merci pour l'énergie et la joie de vivre que vous m'apportez chaque jour

Merci pour votre soutien et vos encouragements sans faille

Merci pour tous ces moments passés

Merci pour votre tendresse

Merci pour tout...

**« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »**

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

-----

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Loïc FAVENNEC**  
**Professeur Agnès LIARD**  
**Professeur Guillaume SAVOYE**

I - MEDECINE

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mr Frédéric <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle <b>APTER</b>	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc <b>BASTE</b>	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal <b>BENHAMOU</b>	HCN	Médecine interne
Mr Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
Mme Sophie <b>CANDON</b>	HCN	Immunologie
Mr François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b>	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas <b>CORNU</b>	HCN	Urologie
Mr Antoine <b>CUVELIER</b>	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan <b>DARMONI</b>	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mr Stéphane <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>	CHB	Cancérologie

Mr Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean <b>DOUCET</b>	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CHB	Radiothérapie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b> ( <i>sumombre</i> )	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Dominique <b>GUERROT</b>	HCN	Néphrologie
Mr Olivier <b>GUILLIN</b>	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Claude <b>HOUDAYER</b>	HCN	Génétique
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra <b>LAMIA</b>	Havre	Pneumologie
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HCN	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HCN	Médecine interne
Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie



Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Benoit <b>MISSET</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
Mr Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan <b>PREVOST</b>	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace <b>ROMAN</b> ( <i>disponibilité</i> )	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu <b>SALAUN</b>	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépto-gastrologie
Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian <b>SCHWARZ</b>	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Hervé <b>TILLY</b> ( <i>sumombre</i> )	CHB	Hématologie et transfusion
M. Gilles <b>TOURNEL</b>	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier <b>TROST</b>	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CHB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric <b>VERIN</b>	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>	HC	Rhumatologie
Mme Marie-Laure <b>WELTER</b>	HCN	Physiologie

#### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate <b>ACHAMRAH</b>	HCN	Nutrition
Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Emmanuel <b>BESNIER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mme Valérie <b>BRIDOUX HUYBRECHTS</b>	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Neurophysiologie
Mr Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
Mr Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
Mr Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent <b>MARGUET</b>	HCN	Histologie
Mme Chloé <b>MELCHIOR</b>	HCN	Gastroentérologie
Mr Thomas <b>MOUREZ (détachement)</b>	HCN	Virologie
Mr Gaël <b>NICOLAS</b>	UFR	Génétique
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia <b>ROLLIN</b>	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie
Mr David <b>WALLON</b>	HCN	Neurologie
Mr Julien <b>WILS</b>	HCN	Pharmacologie

#### PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry <b>WABLE</b>	UFR	Communication
Mme Mélanie <b>AUVRAY-HAMEL</b>	UFR	Anglais

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Jérémy <b>BELLIEN</b> (PU-PH)	Pharmacologie
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
Mr Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Abdelhakim <b>EL OMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre <b>GOULLE</b> (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mr Thomas <b>CASTANHEIRO-MATIAS</b>	Chimie Organique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Camille <b>CHARBONNIER (LE CLEZIO)</b>	Statistiques
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mme Dominique <b>DUTERTE- BOUCHER</b>	Pharmacologie
Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla <b>EL GHARBI-HAMZA</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique

Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Hong LU	Biologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

#### **PROFESSEURS ASSOCIES**

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mme Caroline BERTOUX	Pharmacie

#### **PAU-PH**

M. Mikaël DAOUPHARS	
---------------------	--

#### **PROFESSEUR CERTIFIE**

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
---------------------	---------

#### **ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES**

Mme Alice MOISAN	Virologie
M. Henri GONDÉ	Pharmacie

#### **ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

M. Abdel MOUHAJIR	Parasitologie
M. Maxime GRAND	Bactériologie

#### **ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT**

Mme Ramla SALHI	Pharmacognosie
-----------------	----------------

<b>LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES</b>
---

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
Mr Abdelham <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation et économie de la santé
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Abdelhakim <b>EL OMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie organique
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mr Rémi <b>VARIN</b>	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

## SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



<b>RESUME .....</b>	<b>16</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS .....</b>	<b>17</b>
<b>INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX .....</b>	<b>19</b>
<b>CHAPITRE 1 - INTRODUCTION .....</b>	<b>21</b>
<b>1 Contexte et généralités .....</b>	<b>21</b>
<b>2 Le micro-échantillonnage .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Historique .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Prélèvement des échantillons sur buvard .....</b>	<b>25</b>
2.2.1 Prélèvement non volumétrique .....	25
2.2.2 Prélèvement volumétrique .....	26
2.2.2.1 Le micro-prélèvement capillaire .....	27
2.2.2.2 Le micro-prélèvement volumétrique absorbant .....	28
2.2.3 Sélection du papier buvard .....	29
2.2.4 Volume d'échantillon .....	30
2.2.5 Facteurs influençant la reproductibilité des DBS .....	31
2.2.5.1 L'effet « hématocrite » .....	31
2.2.5.2 L'effet « volcan » .....	32
2.2.5.3 L'effet « volume » .....	33
2.2.6 Processus de séchage et de conservation .....	34
<b>2.3 Préparation des échantillons .....</b>	<b>34</b>
<b>2.4 Avantages des techniques de micro-échantillonnage .....</b>	<b>36</b>
<b>2.5 Limites des techniques de micro-échantillonnage .....</b>	<b>39</b>
<b>2.6 Applications .....</b>	<b>41</b>
2.6.1 Études précliniques .....	41
2.6.2 Dopage .....	42
2.6.3 Toxicologie .....	43
2.6.4 Le suivi thérapeutique pharmacologique .....	45
<b>3 Le suivi thérapeutique pharmacologique du Vémurafénib dans l'histiocytose langerhansienne de l'enfant .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Généralités sur l'histiocytose à cellules de Langerhans .....</b>	<b>48</b>
3.1.1 Classification et physiopathologie .....	48
3.1.2 Manifestations cliniques .....	49
3.1.3 Pronostics .....	50
3.1.4 Les Stratégies thérapeutiques .....	50
3.1.4.1 Les thérapies non ciblées .....	50
3.1.4.2 Les thérapies ciblées .....	51

<b>3.2</b>	<b>Place des thérapies ciblées dans le traitement de l'HL : Exemple du vémurafénib .....</b>	<b>52</b>
3.2.1	Généralités .....	52
3.2.2	Mécanisme d'action : .....	53
3.2.3	Posologie .....	54
3.2.4	Pharmacocinétique .....	54
3.2.5	Pharmacogénétique .....	55
3.2.6	Preuve d'efficacité .....	56
3.2.7	Effets indésirables et toxicité .....	57
3.2.8	Suivi thérapeutique pharmacologique .....	58
3.2.9	Méthodes de dosage du vémurafénib .....	60
<b>CHAPITRE 2 – Validation d'une méthode de dosage du vémurafénib par LC-MS/MS à partir d'une goutte de sang séché (DBS) .....</b>		<b>63</b>
<b>1</b>	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>63</b>
1.1	Produits chimiques et matériaux .....	63
1.2	Solutions mères, standards de calibration et contrôles de qualité .....	64
1.3	Préparation des échantillons .....	64
1.4	Conditions analytiques de la méthode LC-MS/MS .....	65
1.5	Validation de la méthode .....	66
1.6	Application au suivi thérapeutique pharmacologique du VMF dans une cohorte d'enfants atteints d'histiocytose langerhansienne .....	71
<b>2</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>73</b>
2.1	Optimisation de la méthode de prétraitement .....	73
2.2	Validation de méthode .....	74
2.3	Application au suivi thérapeutique pharmacologique du VMF dans une cohorte d'enfants atteints d'histiocytose langerhansienne .....	79
<b>3</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>85</b>
<b>4</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>93</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>103</b>



## RESUME

Ces dernières années, l'intérêt des méthodes de micro-échantillonnage sous forme de sang séché sur buvard (DBS : Dried Blood Spot) a gagné en popularité dans les communautés biomédicales. L'absence d'approche simple et universelle pour surmonter les problèmes liés à la qualité du prélèvement et à l'absence de volume précis recueillis ont été des obstacles majeurs à sa mise en œuvre généralisée, jusqu'au développement récent de dispositifs de micro-échantillonnages volumétriques. La découverte de l'implication des mutations BRAF dans l'histiocytose langerhansienne (HL) représente une avancée majeure et a permis une amélioration thérapeutique considérable grâce à l'utilisation des thérapies ciblant la voie des MAPK comme le vémurafénib (VMF). Le manque de données pharmacocinétiques dans cette population et la nécessité d'un suivi thérapeutique pharmacologique (STP) justifient le développement d'une méthode de dosage adaptée. L'objectif de cette étude a été la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du VMF par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à partir de DBS prélevés à l'aide de dispositifs volumétriques. La méthode a ensuite été appliquée au dosage du VMF dans une cohorte d'enfants atteints d'HL (n=8) afin de comparer et corrélérer les concentrations obtenues aux concentrations plasmatiques. Avec un prétraitement minimaliste et rapide de l'échantillon, la linéarité a été validée sur un intervalle de 1 à 100 µg/mL avec une justesse et une fidélité satisfaisante (biais et CV <20%). Le VMF sur DBS semble stable à des températures extrêmes (-20°C ou 60°C) pendant une semaine encourageant la possibilité de transferts des dispositifs par voie postale. Au total, dix paires d'échantillons (plasma et DBS) ont été obtenues et ont permis de calculer les concentrations plasmatiques à partir de l'analyse réalisée sur DBS. Le modèle de prédiction des concentrations plasmatiques de VMF à partir des DBS est satisfaisant et encourage à réaliser le STP en routine sur DBS. Ce mode de prélèvement est une alternative intéressante à l'analyse de sang veineux traditionnel et devient un outil majeur pour améliorer l'accès au STP dans des pays où le dosage n'est pas réalisé. La méthode analytique est adaptée aux cibles thérapeutiques d'adultes atteints de mélanomes et encourage le développement de ces méthodes à d'autres inhibiteurs de tyrosine kinase.

## LISTE DES ABBREVIATIONS

6-MAM : 6-Monoacétylmorphine

ABC : ATP Binding Cassette

ACN : Acétonitrile

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMA : Agence Mondiale Antidopage

ARN : Acide Ribonucléique

AUC : Areae Under the Curve

CEC : Carcinomes épidermoïdes cutanés

CLSI : Clinical and Laboratory Standard Institute

CQ : Contrôle de qualité

CV : Coefficient de variation

CYP450 : Cytochrome P450

DAS : Disease Activity Score

DBS : Dried Blood Spot

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DUS : Dried Urine Spot

ECD : Erdheim-Chester Disease

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EI : Etalon interne

EIC : Effets indésirables cutanés

EMA : European Medicines Agency

ESI : Electrospray ionisation

FDA : Food and Drug Administration

HL : Histiocytose Langerhansienne

Ht : Hématocrite

IATDMCT : International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology

ITK : Inhibiteurs de Tyrosine Kinase

LC-MS/MS : Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry

LC-UV : Liquid Chromatography UV

LDD : Limite de détection

LDQ : Limite de quantification

MAP : Mitogen Activated Protein

MeOH : Méthanol

MS/MS : tandem Mass Spectrometry

SC : Standard calibration

SRM : Selected Reaction Monitoring

TBME : méthyl tert-butyl éther

THC : Tétrahydrocannabinol

VAMS : Volumetric Absorptive Microsampling

## INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Nombre d'articles relatifs aux analyses DBS trouvés dans PubMed .....	25
Figure 2 : Schéma de la procédure d'analyse DBS non volumétrique .....	26
Figure 3 : Schéma de la procédure d'analyse DBS volumétrique .....	27
Figure 4 : Exemples des dispositifs de prélèvement DBS.....	28
Figure 5 : Dispositif de micro-échantillonnage volumétrique par absorption VAMS.....	29
Figure 6 : Boxplots illustrant la distribution des valeurs d'hématocrite (Ht) par population de patients.....	31
Figure 7: Exemple de DBS à deux niveaux d'Ht associés au volume minimal requis et maximal autorisé.....	33
Figure 8 : Fréquences relatives de l'activation des mutations de kinases dans l'HL.....	49
Figure 9 : Structure chimique du vémurafénib.....	52
Figure 10 : Le mécanisme d'action du vémurafénib et les effets de signalisation.....	53
Figure 11 : Evolution de l'HL réfractaire après 8 semaines de traitement par VMF .....	57
Figure 12 : Concentrations observées avant et après adaptation de posologie du VMF chez un patient pédiatrique .....	59
Figure 13 : Effet de la sonication sur le rendement de récupération du VMF .....	73
Figure 14 : Chromatogrammes du VMF et de son EI .....	74
Figure 15 : Linéarité de la gamme de VMF testée entre 0,1 et 200 µg/mL .....	75
Figure 16 : Taux de recouvrement (%) du VMF à partir de DBS mesurés à différents niveaux d'Ht.....	77
Figure 17 : Etude de stabilité du VMF dans les DBS dans différentes conditions de temps et de températures .....	78
Figure 18 : Chromatogramme du VMF mesuré dans un DBS de patient.....	80
Figure 19 : Dysfonctionnements observés lors du contrôle visuel de deux échantillons DBS.	81
Figure 20 : Reproductibilité des résultats de dosage de VMF sur DBS (n=40) .....	81

Figure 21 : Moyenne des concentrations de VMF mesurées à partir d'échantillons plasmatiques et DBS.....	82
Figure 22 : Corrélation et pente de régression pondérée de Deming entre la moyenne des concentrations de VMF plasmatiques observées et celles calculées à partir des DBS .....	83
Figure 23 : Graphique Bland-Altman comparant les méthodes d'analyses des concentrations plasmatiques mesurées et calculées.....	84



Tableau 1 : Comparatif de l'échantillonnage conventionnel et des techniques alternatives de micro-échantillonnage.....	39
Tableau 2 : Temps de rétention et paramètres de détection du VMF et de son EI .....	66
Tableau 3 : Justesse et fidélité intra-jours et inter-jours évaluées avec les DBS .....	76
Tableau 4 : Rendement d'extraction et effet matrice du VMF dans les DBS, le sang total et le plasma.....	76
Tableau 5 : Concentrations de VMF mesurées à partir des DBS (n= 4) et d'échantillons de plasma (n=2) .....	79
Tableau 6 : Concentrations plasmatiques de VMF mesurées versus concentrations plasmatiques calculées à partir des DBS .....	83

# CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

## 1 Contexte et généralités

A travers les analyses biologiques, les laboratoires de pharmacologie et toxicologie assurent le diagnostic et le suivi dans divers domaines comme la recherche d'intoxications médicamenteuse, l'addictologie, la toxicologie judiciaire (expertises médico-légales, recherche de stupéfiants) et environnementale (pesticides) ou encore la pharmacocinétique à travers le dosage, l'optimisation de protocoles thérapeutiques et le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) des médicaments et de leurs métabolites.

Les analyses biologiques se différencient en deux catégories qui se succèdent : l'analyse qualitative d'un échantillon permet de déterminer la nature des constituants et l'analyse quantitative permet d'en déterminer les concentrations. Ainsi, développer des méthodes qualitatives et quantitatives fiables et robustes adaptées aux différents types de matrices est un objectif fondamental.

Les progrès de la chimie analytique, liés à l'amélioration des techniques et des instruments analytiques, permettent de répondre aujourd'hui aux attentes des analyses biomédicales. Au début des années 1970, l'émergence de la chromatographie moderne avec l'apparition de la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) a considérablement élargi le champ de la technique en chimie analytique. Au fil des années, la technique HPLC a été optimisée par la découverte de phases stationnaires permettant d'assurer une séparation efficace de différents composés, à partir de mélanges complexes. Parallèlement, la création du premier spectromètre de masse (SM) au début du XX<sup>ème</sup> siècle a contribué au développement de techniques de détection permettant d'atteindre des performances considérables en termes de sensibilité, de résolution et de précision. Le couplage chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS : Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry) s'est imposé ces dernières années comme la technique analytique de choix pour l'étude d'échantillons issus de matrices biologiques.

La démarche de ces analyses comporte trois phases :

- 1) La phase pré-analytique comprend le prélèvement et la préparation de l'échantillon à l'analyse qui fait appel à des méthodes de purification, de précipitation des protéines, d'extraction en phase liquide-liquide (LLE : Liquid-Liquid Extraction), d'extraction en phase liquide-solide (SPE : Solid-Phase Extraction) ou encore de dérivatisation. L'objectif est d'isoler au maximum les composés d'intérêt à partir de matrices complexes. Le choix du type de prétraitement de l'échantillon dépend notamment de la quantité d'analytes recherchés, de la concentration ciblée, de la présence de substances interférentes et de la sensibilité de l'appareillage utilisé (Bush, 2012).
  
- 2) La phase analytique permet la détection et la quantification des composés d'intérêt à travers différentes techniques dont les plus fréquemment utilisées sont les méthodes immuno-enzymatiques et les méthodes séparatives telle que la chromatographie liquide couplée à une détection en spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Ces techniques se différencient notamment par leurs spécificités, leurs sensibilités, leurs complexités et leurs rapidités d'analyse. Toutefois, les méthodes LC-MS/MS sont considérées comme les techniques de référence, étant plus spécifiques et permettant d'atteindre des limites de détection très faibles de par leur sensibilité de plus en plus améliorée.
  
- 3) La phase post-analytique repose sur le traitement des données acquises lors de l'étape précédente et la validation technico-biologique en assurant la fiabilité du résultat et sa conformité à travers des règles de qualité. A la suite de la validation analytique du résultat, l'interprétation clinique est basée sur la littérature scientifique, des renseignements cliniques liés au patient (contexte clinique, comorbidités) et des renseignements thérapeutiques relatif au traitement (date d'initiation, date et heure de la dernière prise du médicament, traitement concomitant, date et heure du prélèvement).

Sous l'influence d'arrêtés relatifs à la bonne exécution des analyses biomédicales (GBEA) et l'élaboration de « procédures qualités » rendu obligatoires pour l'obtention d'accréditations par le Cofrac (Comité Français d'Accréditation), les domaines analytiques et post-analytiques se sont nettement améliorées. Cependant de nombreux dysfonctionnements élémentaires peuvent survenir durant l'étape pré-analytique, qui représente la majorité du temps alloué à la démarche analytique. Selon la littérature, la proportion d'erreurs pré-analytiques représenteraient jusqu'à deux tiers des erreurs totales détectées (Bush, 2012).

En outre, le prélèvement d'échantillons inapproprié ou les facteurs environnementaux peuvent affecter la stabilité des analytes d'intérêts. Cette stabilité dépend de plusieurs facteurs comme le tube primaire utilisé, le volume de remplissage ainsi que la durée et la température de stockage. Les changements *in vitro*, ne reflétant pas les conditions physiologiques du patient, pourraient entraîner des modifications de concentrations des molécules d'intérêt. Certaines populations de patients, notamment les enfants et les personnes âgées, peuvent présenter des difficultés supplémentaires pour l'obtention d'un échantillon conforme. Le choix du type d'échantillonnage est donc crucial et conditionne la conformité du prélèvement avant l'étape d'analyse au laboratoire.

Le prélèvement d'échantillons de sang par ponction veineuse est la procédure la plus couramment utilisée en santé humaine dès lors que l'on veut s'intéresser au sang. Les normes actuelles pour le prélèvement de sang exigent de recueillir un volume de sang de l'ordre du millilitre (les tubes classiques contiennent généralement un volume compris entre 5 et 7 mL), par voie intraveineuse à l'aide d'une aiguille hypodermique. Le sang frais recueilli immédiatement après le prélèvement est dénommé « sang total » et se compose d'un liquide biologique, le plasma, contenant toutes les cellules sanguines. En fonction des analyses, différents tubes de collecte de sang, avec ou sans anticoagulants, peuvent être utilisés. Une fois l'échantillon recueilli, il est rapidement acheminé au laboratoire dans des conditions appropriées, nécessitant souvent une réfrigération (à +4°C) ou une congélation (à -20°C) tout au long du trajet. Le sang total n'étant pas stable, une centrifugation à l'arrivée au laboratoire est indispensable pour obtenir le plasma qui confère souvent une meilleure stabilité aux analytes d'intérêts.



Avec des milliards de prélèvements chaque année, le prélèvement sanguin conventionnel par ponction veineuse n'a guère évolué. Bien qu'il reste le mode de prélèvement le plus utilisé pour la quantification de composés, ce processus de collecte d'échantillons biologiques présente certains inconvénients liés 1) à la difficulté d'obtenir un volume suffisant, notamment dans la population pédiatrique, 2) au type de tube de collecte employé qui conditionnent souvent la stabilité des analytes d'intérêts, 3) à la nécessité d'une réfrigération (+4°C) ou d'une congélation (-20°C) pour le transfert de plasma ou de sang total, et finalement 4) aux coûts générés par l'emploi de ce mode de prélèvement.

Ainsi, ces dernières années, l'intérêt des méthodes de micro-échantillonnage a gagné en popularité dans les communautés biomédicales et pharmaceutiques.

## 2 Le micro-échantillonnage

### 2.1 Historique

L'utilisation des gouttes de sang séché sur papier buvard, appelé DBS pour « Dried Blood Spots », a été décrite pour la première fois en 1913 par Bang, afin d'estimer la concentration du glucose dans le sang (Bang et al., 1913). Pour évoquer ces gouttes de sang séché sur buvard, l'acronyme anglais « DBS » est couramment utilisé et sera employé tout au long de cette thèse.

Dans les années 1960, le professeur Robert Guthrie a développé un test de détection de la phénylcétonurie chez les nourrissons. Il a décrit pour la première fois un test de dépistage rapide et économique qui consiste à analyser la concentration de phénylalanine dans une goutte de sang prélevée au talon du nouveau-né et conservée sur buvard (Guthrie and Susi, 1963).

A la suite de cette découverte, le dépistage néonatal a été introduit en France dans les années 1970 devenant une action de santé publique. Destiné à tous les nouveau-nés, le test dit « de Guthrie » est proposé aux parents afin de dépister cinq maladies graves, souvent génétiques : la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie, l'hyperplasie congénitale des surrénales, la mucoviscidose et la drépanocytose.

En outre, l'expérience acquise a facilité le développement d'applications basées sur l'analyse de DBS, dans d'autres domaines (figure 1). A ce jour, de nombreuses méthodes ont été développées et présentent un potentiel d'utilisation en pharmacologie, en toxicologie et en pharmacogénétique.

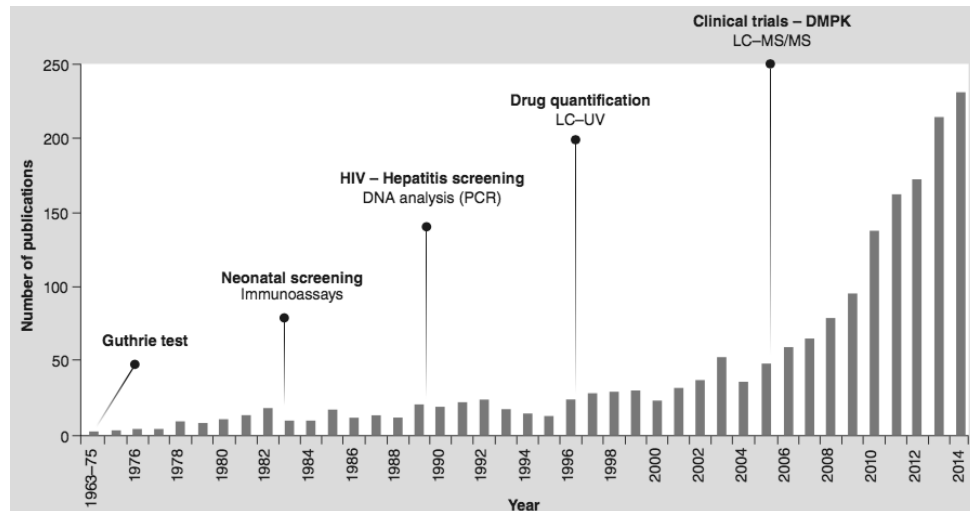


Figure 1 : Nombre d'articles relatifs aux analyses DBS trouvés dans PubMed en utilisant les mots clés « dried blood spots » (Déglon et al., 2015)

Une récente étude a recensé 2018 analytes mesurés à partir d'échantillons DBS. Parmi ces analytes, 50% appartenaient à la classe des petites molécules (lipides, acides aminés, acides gras, médicaments, drogues...etc.), 33% étaient classés dans les grosses molécules (cytokines, antigènes, hormones, protéines, anticorps...), 15% dans les acides nucléiques (ADN, ARN...) et 2% parmi les éléments minéraux (potassium, sodium, sélénium...)(Freeman et al., 2018).

## 2.2 Prélèvement des échantillons sur buvard

### 2.2.1 Prélèvement non volumétrique

Le papier buvard permet de recueillir une ou plusieurs gouttes de sang total capillaire. Le sang peut être prélevé au bout du doigt, au niveau du talon ou encore au niveau du lobe de l'oreille par piqûre à l'aide d'une lancette stérile à usage unique. La première goutte de sang générée doit être essuyée puisqu'elle présente un excès de liquide tissulaire et n'est pas représentative de la composition sanguine.

La seconde goutte de sang peut être appliquée sur une carte de prélèvement dans la zone marquée. La zone indiquée doit être remplie de préférence avec une seule goutte de sang de manière homogène et diffuser de façon symétrique des deux côtés du buvard.

Afin d'analyser un volume fixe de sang, de petits disques de 3 à 8 mm de diamètre sont perforés directement dans le DBS. Ces disques peuvent ensuite subir les étapes d'extraction et d'analyse. La procédure d'analyse des DBS non volumétriques est schématisée dans la figure 2.

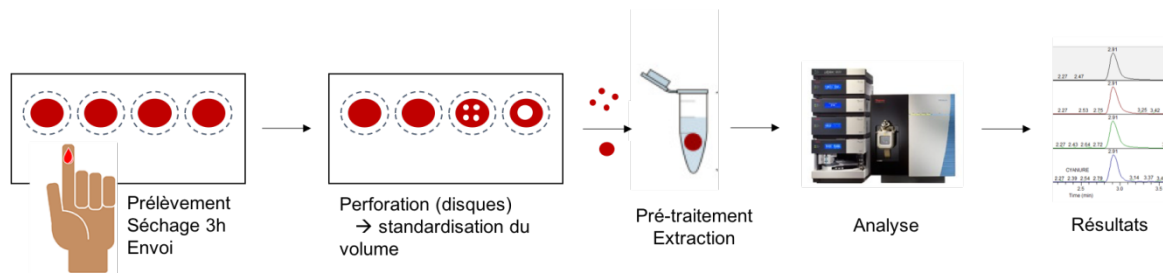


Figure 2 : Schéma de la procédure d'analyse DBS non volumétrique

Cette technique de prélèvements non volumétriques est la plus fréquemment utilisée mais présente cependant quelques inconvénients majeurs liés à la reproductibilité du volume de la goutte déposée, à l'influence de l'hématocrite dans la diffusion du sang sur buvard et à l'homogénéité des prélèvements. Ces mécanismes seront évoqués dans la partie 2.2.5.

## 2.2.2 Prélèvement volumétrique

Afin de pallier les inconvénients des modes de prélèvement non volumétriques, les dispositifs liés à la technologie micro-fluidique sont capables de collecter du sang total, du plasma ou du sérum et de contrôler le volume dans un format standardisé et fiable. La procédure d'analyse à partir d'un prélèvement volumétrique est illustrée dans la figure 3.

Il existe plusieurs stratégies de collecte de sang dans lesquelles un échantillon de sang séché volumétrique peut être directement généré à partir d'une goutte de sang non volumétrique, sans utiliser de pipettes. Dans cette partie, nous évoquerons deux dispositifs de micro-prélèvements présentant des technologies distinctes : le micro-prélèvement capillaire et le micro-prélèvement volumétrique absorbant.

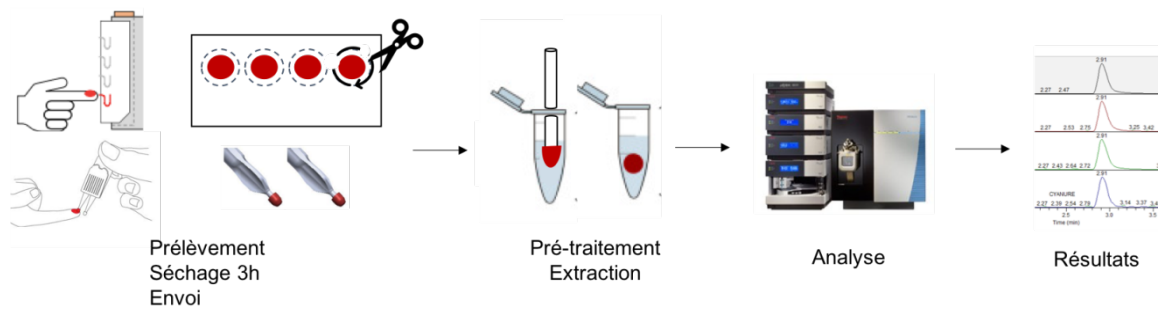


Figure 3 : Schéma de la procédure d'analyse DBS volumétrique

### 2.2.2.1 Le micro-prélèvement capillaire

Le micro-prélèvement capillaire consiste à prélever des volumes sanguins précis et standardisés dans un capillaire en verre. Divers dispositifs sont aujourd'hui commercialisés proposant des capillaires jetables héparinés ou non comme Capitainer-B, Minicaps®, Drummond™ Aqua-Cap ou encore les dispositifs HemaPEN® et HemaXis™ détaillés et illustrés ci-dessous (figure 4).

HemaXis™ est un dispositif produit par DBS System SA (Gland, Suisse) utilisant des techniques de micro-fluidique à usage unique destinées à collecter, transporter et stocker des échantillons biologiques (Leuthold et al., 2015). HemaXis™ DB 10 permet de récolter quatre échantillons de sang capillaire séché d'un volume de  $10 \pm 0,5 \mu\text{L}$  (IC 95%) sur un seul et même buvard. Les échantillons sont collectés dans des canaux micro-fluidiques et à la fermeture du boîtier, un volume contrôlé de sang est transféré sur le buvard. Ce boîtier plastique assure en plus une protection pour le transport et le stockage des échantillons (Annexe 1). A ce jour, seul HemaXis™ DB 10 prévu pour le sang total est disponible à la vente en Europe et aux États-Unis. Un prototype de seconde génération (HemaXis DX) est en cours de développement. Il propose l'extraction et la collecte de sérum ou plasma à partir d'une goutte de sang directement sur les papiers buvards.

Une alternative au système capillaire HemaXis™ est proposée par Trajan (Victoria, Australie) avec un dispositif de micro-échantillonnage appelé HemaPEN®. Ce système de micro-prélèvement sanguin présenté sous forme de stylo, intègre quatre capillaires couplés à une plateforme de distribution de quatre buvards. Chaque buvard est capable de stocker un volume de  $2,74 \mu\text{L} \pm 5\%$  de sang. Les types de substrat qui constituent les buvards sont Whatman® 903 ou D226™ Perkin Elmer. Sa conception en forme de stylo rend le dispositif ergonomique et assure l'intégrité de l'échantillon grâce à un système clos.

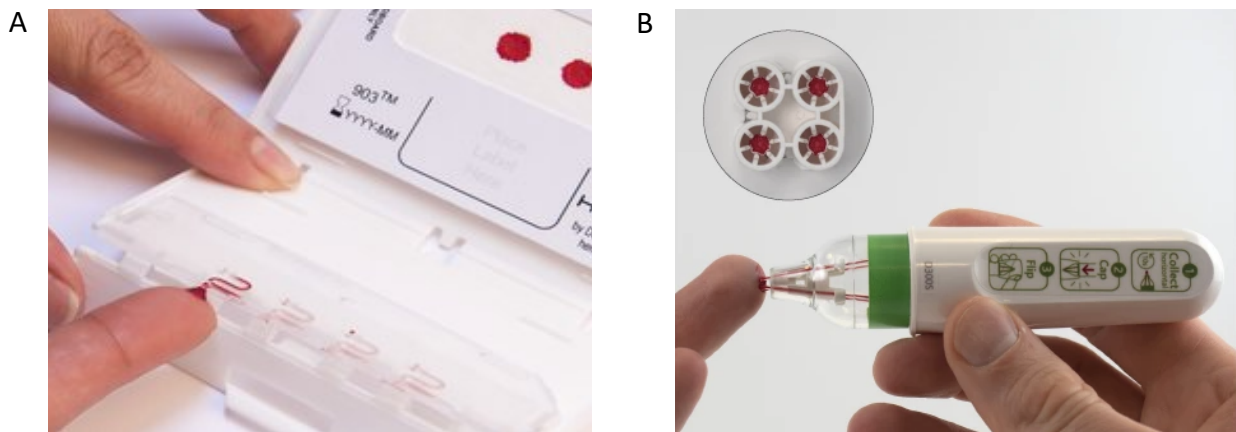
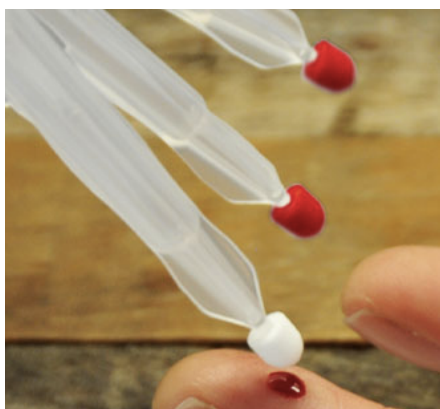


Figure 4 : Exemples des dispositifs de prélèvement DBS détaillés :

(A) Hemaxis™ et (B) HemaPEN®

#### 2.2.2.2 Le micro-prélèvement volumétrique absorbant

Le dispositif de micro-échantillonnage volumétrique par absorption (VAMS) Mitra™, développé par Neoteryx (Torrance, États-Unis), est basé sur l'absorption volumétrique d'un échantillon liquide sur une pointe poreuse (De Kesel et al., 2015). Le dispositif VAMS est généralement constitué d'une mèche hydrophile poreuse, fixée sur un manche, conçue pour absorber un volume fixe et précis d'échantillon (figure 5). Ces dispositifs sont disponibles pour collecter 10, 20 ou 30  $\mu\text{L}$  de sang humain ou animal. Les pointes VAMS sont séchées et peuvent être stockées dans des cartouches ou encore des racks de 96 puits pour réaliser des techniques d'extraction automatisables. Outre le sang total, le dispositif a également été testé pour recueillir d'autres liquides biologiques comme du plasma, de l'urine ou de la salive.



*Figure 5 : Dispositif de micro-échantillonnage volumétrique par absorption VAMS (Neoteryx®) et son rack de 96 puits : Mitra® 96-Autorack*

### 2.2.3 Sélection du papier buvard

La nature du papier buvard peut influencer les performances analytiques. En effet, elle a un impact sur la diffusion de l'échantillon au moment du dépôt et peut influencer l'homogénéité et la répartition de l'échantillon. Le buvard peut également jouer un rôle sur la stabilité des composés d'intérêts contenus dans l'échantillon. De plus, il peut être à l'origine d'interférences entre différents composés présents dans les échantillons pouvant faire varier le rendement d'extraction (Chen et al., 2012).

Dans une étude évaluant l'utilisation de différents buvards pour l'analyse de six immunosuppresseurs (tacrolimus, sirolimus, everolimus, temsirolimus, cyclosporine A et ascomycine), Koster et son équipe ont révélé une différence de performance, notamment pour des valeurs d'hématocrites ou de concentrations extrêmes. Ils recommandent ainsi d'étudier différents types de papiers buvards afin d'optimiser le rendement d'extraction (Koster et al., 2015).

Aujourd'hui, de nombreux buvards sont commercialisés et présentent différentes spécificités. La plupart sont composés d'une matrice de cellulose (papier filtre) avec des dimensions et des épaisseurs variables. Certains sont prétraités avec des agents dénaturants ou des inhibiteurs enzymatiques comme les buvards FTA®DMPK-A et FTA®DMPK-B qui permettent la lyse du contenu cellulaire et la dénaturation des protéines dans l'échantillon. A l'inverse, les buvards Whatman 903®, Ahlström 226 et FTA®DMPK-C ne font pas l'objet de pré-traitement et seront plus adaptés à l'analyse de composés protéiques (Majumdar and Howard, 2011).

On peut également ajouter les buvards FTA® Elute qui sont généralement utilisés pour extraire l'ADN.

Des essais ont été réalisés sur des mousses à base de biopolymères. Le principe Agilent Bond Elut DMS propose un support à base d'alginate et chitosane. Certains médicaments basiques tels que le citalopram, la méthadone, le lopéramide ou encore la sertraline ont été testés et analysés après extraction électro-membranaire et précipitation. Cette nouvelle technique permettrait d'augmenter le rendement d'extraction. Elle peut résoudre certains problèmes inhérents aux buvards en cellulose comme la réduction de la sensibilité due aux techniques d'élution et d'évaporation. Elle permettrait également d'éviter la suppression ionique en spectrométrie de masse due à certains constituants (Eibak et al., 2012).

Ainsi, le choix du buvard dépend de nombreux facteurs notamment des propriétés physico-chimiques du composé d'intérêt, de la stabilité de l'échantillon ou encore des solvants d'extraction. Ces facteurs doivent être pris en compte à chaque développement de méthode en vue d'une analyse quantitative des composés d'intérêts.

#### 2.2.4 Volume d'échantillon

Le volume d'échantillon requis pour l'analyse dépend fortement de la sensibilité de la méthode analytique employée, représentée par sa limite de quantification (LDQ).

En général, une goutte de sang déposée après contact sur le buvard contient un volume compris entre 10 et 50  $\mu\text{L}$  alors qu'un dépôt généré par la chute d'une goutte de sang sur le buvard sera compris entre 20 et 70  $\mu\text{L}$ . Quelle que soit la technique utilisée, il est important que la pulpe du doigt n'entre pas en contact avec le buvard.

Afin de standardiser le volume d'échantillon requis pour l'analyse, les DBS sont perforés pour générer des petits poinçons ou disques de diamètres différents. Pour cela, des outils manuels ou automatiques de différents diamètres sont disponibles. Il est recommandé d'éviter de perforer les bords extérieurs des disques, en périphérie du DBS, afin de réduire les problèmes d'homogénéité. Le diamètre des disques peut varier de 3 à 8 mm, sachant qu'un disque de 4 mm est à peu près équivalent à 5,7  $\mu\text{L}$  d'échantillon, en supposant un hémocrite moyen (Capiou et al., 2019).

En fonction du volume de sang requis pour atteindre la LDQ, il est possible d'utiliser plusieurs disques. Cependant, il est recommandé de limiter le nombre de disques par analyse afin de réduire les risques d'erreurs dues à l'échantillonnage et permettre une seconde analyse de l'échantillon si besoin (Capiou et al., 2019).

Le volume d'échantillon peut être fixé préalablement par des dispositifs proposant des volumes fixes. Dans ce cas, les DBS générés par ces dispositifs volumétriques seront entièrement récupérés pour l'analyse.

## 2.2.5 Facteurs influençant la reproductibilité des DBS

### 2.2.5.1 L'effet « hématoците »

Dans le domaine de la biologie clinique, les problèmes liés à l'hématocrite sont un obstacle majeur à l'acceptation de cette technique de micro-échantillonnage en routine. Ils présentent de multiples aspects, notamment des problèmes d'homogénéité d'échantillons, de rendement d'extraction et par conséquent de conformité de résultats. L'hématocrite (Ht) est défini par le volume occupé par les globules rouges par rapport au volume sanguin total et généralement exprimé en pourcentage. L'Ht détermine la viscosité du sang et diffère en fonction de la qualité du prélèvement, de la population cible et de l'état de santé du patient. La figure 6 illustre bien les différents taux d'hématocrites que l'on peut rencontrer, principalement influencés par les pathologies et l'âge des patients.

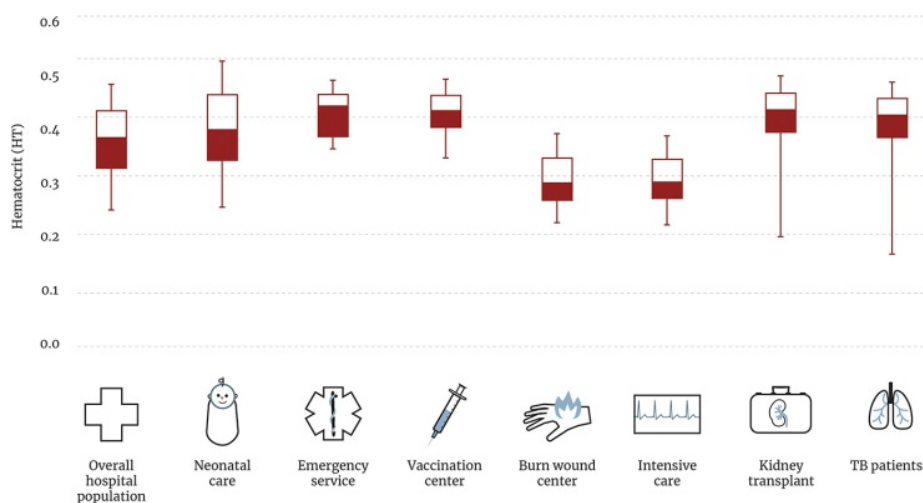


Figure 6 : Boxplots illustrant la distribution des valeurs d'hématocrite (Ht) par population de patients (Capiou et al., 2019)



Comme le révèle la figure 7, l'Ht est positivement corrélée à la viscosité du sang et affecte sa diffusion sur le buvard. Ainsi, pour un même volume de sang, le prélèvement avec un Ht élevé (0,50) va générer un DBS de diamètre plus petit qu'un prélèvement avec un Ht plus faible (0,30). Par conséquent, un disque obtenu après perforation d'un diamètre fixe ne donnera pas la même quantité de sang *in fine* et des Ht différents entraîneront un biais significatif du résultat quantitatif (Denniff and Spooner, 2010a).

L'effet de l'hématocrite doit être évalué pendant la validation de méthode. Pour une méthode quasi universelle, l'intervalle d'Ht à évaluer devrait s'étendre entre 0,20 et 0,65, sinon l'intervalle devra englober au moins 95% des Ht de la population cible. A moins qu'aucune influence de l'Ht ne soit observée sur l'ensemble de l'intervalle étudié lors de la validation analytique et que l'on suppose que toutes les valeurs d'Ht des patients sont comprises dans cet intervalle, il est recommandé d'utiliser une méthode évaluant l'Ht des échantillons DBS. Diverses approches ont été développées comme celle de Kesel *et al.* qui proposent de prédire l'Ht à partir d'un algorithme basé sur la concentration du potassium dans les DBS (De Kesel et al., 2014). Capiou *et al.* proposent une alternative en estimant l'Ht à travers la mesure de réflectance de la longueur d'onde (Capiou et al., 2016).

#### 2.2.5.2 L'effet « volcan »

Un second problème décrit avec ces prélèvements, appelé effet « volcan », est lié à la propagation hétérogène de la goutte de sang sur le buvard. Cet effet est influencé par les conditions de séchage (position, humidité...), le type de buvard employé et la taille des poinçons. Ce phénomène est décrit pour le buvard Whatman 903<sup>®</sup> pour lequel la quantité de globules rouges est plus importante en périphérie. Le rendement de récupération de l'analyte sera ainsi différent entre la périphérie et le centre du DBS (O'Mara et al., 2011).

Par conséquent, les concentrations de l'analyte peuvent être différentes selon l'endroit perforé pour réaliser les disques.

### 2.2.5.3 L'effet « volume »

L'effet « volume » s'explique par la divergence de volume selon la procédure de prélèvement employée. En effet, une goutte de sang n'aura pas le même volume si elle est déposée après contact ou après une chute sur le buvard. Afin d'aider la collecte d'un volume de sang précis pour l'analyse, les buvards peuvent être dotés de marquages sous forme de cercles indiquant un volume minimal requis et maximal autorisé comme illustré dans la figure 7. La collecte de DBS chez des patients bénéficiant d'une formation à l'emploi de ces dispositifs garantit de meilleurs prélèvements. Une équipe a développé une application accessible à domicile sur ordinateur ou smartphones capable d'évaluer la qualité du DBS au moment du prélèvement, en analysant une image de l'échantillon. Les performances de l'application ont été comparées au jugement de techniciens de laboratoire expérimentés. L'application a permis d'obtenir une décision adéquate dans 90 % des cas. L'utilisation de l'application a permis d'améliorer la qualité des prélèvements à domicile avant l'envoi au laboratoire chez les patients formés et non formés de 80 % à 96 % et de 42 % à 88 %, respectivement (Veenhof et al., 2019).

Ces facteurs étant connus, plusieurs stratégies ont été développées afin de s'en affranchir et de faire des prélèvements sur buvards des techniques de routine. Les dispositifs volumétriques mis au point par les différentes firmes permettent de résoudre en partie les inconvénients susnommés.

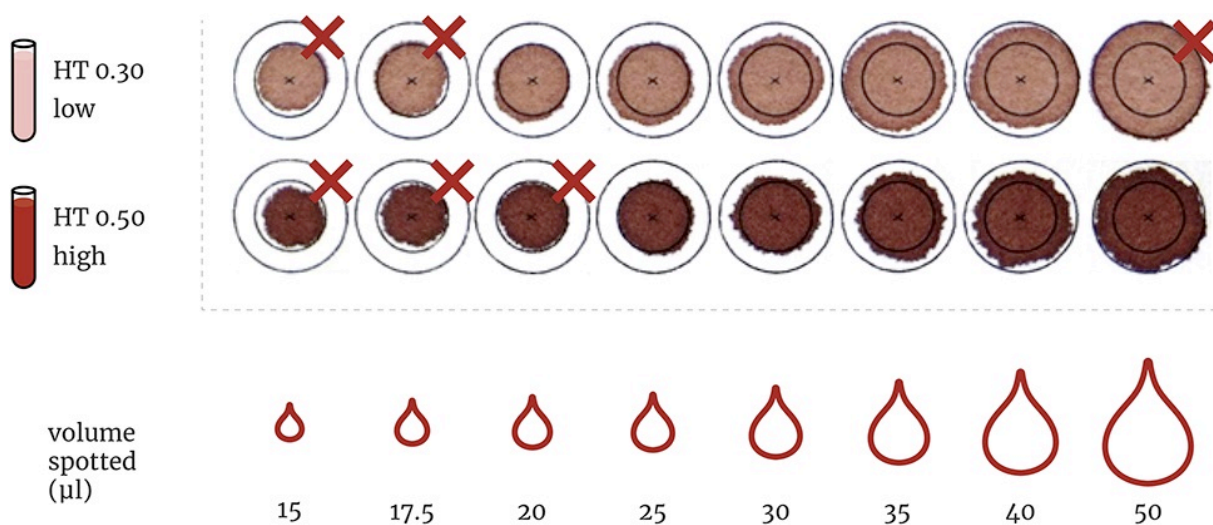


Figure 7 : Exemple de DBS à deux niveaux d'Ht associés au volume minimal requis et maximal autorisé

## 2.2.6 Processus de séchage et de conservation

A la suite du dépôt de sang, le buvard est mis à sécher à l'air en position horizontale à température ambiante au minimum 2 à 3 heures avant d'être analysé ou acheminé au laboratoire. Le contact avec d'autres surfaces, l'exposition directe du soleil ou la présence d'une source de chaleur doivent être évités. La négligence des conditions et du temps de séchage peut affecter la stabilité et le rendement de récupération des analytes d'intérêts. De plus, l'humidité peut nuire à l'intégrité de l'échantillon en induisant une croissance microbienne. Une étude examinant la taille et l'apparence des DBS sur plusieurs buvards (Whatman 903<sup>®</sup>, FTA<sup>®</sup> et FTA<sup>®</sup>Elute) a révélé des différences suite à l'exposition à des conditions d'humidité et de températures élevées. Aucun effet n'a été rapporté sur les buvards Whatman 903<sup>®</sup> et FTA<sup>®</sup>. En revanche pour le buvard FTA<sup>®</sup>Elute, ces conditions ont eu pour conséquences de compromettre l'intégrité du DBS (Denniff and Spooner, 2010b).

Dans certains cas, le temps de séchage requis peut être plus long puisqu'il dépend de la température et de l'humidité ambiante, du volume de l'échantillon et du type de buvard. Si nécessaire, l'ajout d'un dessiccateur permet d'éliminer jusqu'à 5% d'eau supplémentaire à l'humidité ambiante. Dans d'autres cas, le temps de séchage requis peut être réduit. Il convient donc d'étudier ces facteurs dans le cadre du développement et de la validation de la méthode analytique. Ainsi, les conditions de stockage devront imiter au maximum les conditions rencontrées pendant le transport et le stockage des échantillons de patients.

## 2.3 Préparation des échantillons

Avant de procéder à l'extraction de composés d'intérêts à partir de matrices biologiques, l'ajout d'un étalon interne (EI) est fondamental. Le choix de l'EI est basé sur les propriétés physico-chimiques qui doivent être similaires à celles du composé cible. Cette condition garantit un comportement similaire tout au long de l'analyse, permettant ainsi de vérifier l'efficacité de l'extraction, de compenser l'effet matrice et les problèmes inhérents à l'ionisation des composés lors de l'analyse par spectrométrie de masse.

Les techniques de préparation d'échantillons actuelles suggèrent d'ajouter l'EI à l'échantillon biologique avant d'entamer le processus d'extraction. Cependant, il est difficile d'incorporer l'EI dans les matrices solides comme celles des buvards.

Différentes approches sont proposées, tel qu'un système de pulvérisation homogène de l'EI sur le buvard avant l'extraction afin d'assurer une répartition uniforme (Abu-Rabie et al., 2015). Cette technique exige un système de pulvérisation performant et validé, difficilement concevable dans la plupart des laboratoires. Des systèmes entièrement automatisés ont donc été développés comme le CAMAG®DBS-MS 500. Il incorpore directement l'EI par pulvérisation avant l'étape d'extraction (Luginbühl and Gaugler, 2020).

Une autre solution serait d'imprégner le buvard vierge d'EI avant tout prélèvement (Mommers et al., 2013). Cette technique requiert un prétraitement initial sur une large surface puisqu'il est impossible de prédire la zone de dépôt de l'échantillon de façon précise. De plus, les standards de calibration et les contrôles de qualité doivent suivre le même procédé et la stabilité de l'EI doit être démontrée en amont à différentes conditions et pour une période donnée.

La technique la plus utilisée aujourd'hui pour sa simplicité et sa robustesse consiste à incorporer un volume fixe d'EI au solvant d'extraction (van Baar et al., 2013). Cependant, cette méthode ne permet pas de compenser la variabilité du rendement de récupération de l'analyte d'intérêts à partir du buvard. (Capiou et al., 2019).

La nature du solvant d'extraction joue un rôle crucial dans la récupération de l'analyte à partir du buvard. Les solvants d'extraction doivent être optimisés en fonction du profil de solubilité des analytes (coefficient de partage, polarité) en veillant à minimiser l'extraction parallèle des impuretés endogènes source d'interférences. Les solvants organiques (acétonitrile, méthanol) sont généralement les plus employés pour extraire les composés d'intérêts. Suite à des problèmes de stockage qui ont engendré la fixation permanente du sang sur le buvard, Borremans et son équipe ont suggéré l'ajout d'un solvant à base d'ammonium pour améliorer le rendement de récupération sur buvard sans endommager les différents composants du sang comme les anticorps (Borremans, 2014).

Pour améliorer le rendement de récupération, il est nécessaire d'optimiser le volume du solvant d'extraction, la technique d'extraction (ex : imprégnation du DBS avec ou sans sonication aux ultrasons), la température utilisée et la durée nécessaire pour atteindre des performances optimales.

## 2.4 Avantages des techniques de micro-échantillonnage

En comparaison avec les prélèvements sanguins classiques, l'utilisation des échantillons DBS offre de nombreux avantages.

Le prélèvement sanguin sur buvard est relativement facile à pratiquer et ne nécessite pas de compétences médicales. Il peut donc être réalisé à domicile, ce qui offre plus de confort et d'autonomie au patient et évite des déplacements inutiles en laboratoire de ville ou à l'hôpital.

Les prélèvements capillaires au bout du doigt sont beaucoup moins invasifs que la ponction veineuse traditionnelle. Ils sont donc plus adaptés aux patients nécessitant de nombreuses analyses, en particulier ceux possédant des veines fragiles ou endommagées comme les enfants, les personnes âgées ou les utilisateurs de drogues. L'utilisation des micro-prélèvements permet de minimiser le volume de sang prélevé sur les patients (10 à 100  $\mu\text{L}$  versus 5 mL pour le prélèvement veineux). Les paramètres pharmacocinétiques étudiés chez l'enfant sont souvent rares par manque d'études et les prélèvements à répétition pour ce type de données sont éthiquement discutables dans cette population en raison d'un processus de collecte souvent compliqué. En augmentant le nombre d'échantillon par la réalisation de micro-prélèvements, cela permettrait de décrire de façon plus précise les paramètres pharmacocinétiques des médicaments au sein de cette population.

La capacité de stockage grâce à sa petite taille et la possibilité de conservation à température ambiante pour un certain nombre d'analytes en font un atout précieux. En effet, les prélèvements réalisés dans un contexte de toxicologie médico-légale nécessitent de grands espaces de stockage afin de conserver les échantillons pour des demandes d'analyses complémentaires ou de contre-expertises, ce qui peut relever du défi dans la plupart des laboratoires, exigeant de nombreux frigo et congélateurs.

De plus, développer des dispositifs miniaturisés permet de limiter les quantités d'échantillons pour l'analyse, les quantités de solvants utilisés lors de la préparation des échantillons et bien sûr les déchets qui en découlent. L'utilisation de DBS permet également de s'affranchir des techniques de prétraitement classiques puisqu'il n'est pas nécessaire de centrifuger les échantillons en amont à la différence des prélèvements conventionnels, à condition bien entendu d'avoir vérifié la stabilité des composés d'intérêt dans le sang total séché.

Ce mode d'échantillonnage réduit les risques de contamination du personnel médical et des individus intervenant dans le transport et la prise en charge de l'échantillon biologique. Contrairement aux échantillons liquides traditionnels comme le sang ou le plasma, les DBS ne nécessitent pas de manipulation particulière comme les autres échantillons à risques biologiques. Il a été démontré que le séchage des gouttes de sang sur des supports tels que les papiers buvards, inactive les virus comme le VIH, le VHB et d'autres pathogènes infectieux sans risque de contamination pour le personnel médical (Hirtz and Lehmann, 2015). L'organisation mondiale de la santé (OMS) considère que les DBS ne sont pas soumis à des exigences particulières pour leur transport et qu'ils peuvent ainsi être expédiés par voie postale (WHO 2017). Cette caractéristique confère aux DBS un atout majeur, notamment dans les pays ou les zones reculées ne disposant pas des ressources nécessaires en matière de diagnostic et de suivi des patients.

Ainsi, une étude réalisée en 2016 a montré l'intérêt de ces techniques d'échantillonnage pour le suivi thérapeutique pharmacologique d'antirétroviraux (névirapine, éfavirenz et lopinavir) dans des zones rurales de Tanzanie suite à l'envoi de DBS. L'étude de stabilité des composés d'intérêts doit systématiquement être envisagée et les premiers résultats obtenus sont prometteurs (Duthaler et al., 2018).

Dans un contexte de conduite sous l'influence de drogue, un test salivaire est généralement utilisé pour dépister les quatre classes de drogues dites conventionnelles, à savoir cannabis, cocaïne, amphétamines et opiacés. En raison du risque de faux positifs, les tests doivent être confirmés en LC-MS/MS par une analyse sanguine. A cette fin, l'échantillonnage par DBS peut présenter l'avantage d'être prélevé sur place de manière simple, rapide et économique sans contrainte de présence d'un personnel médical pour réaliser le prélèvement (Gaugler et al., 2019).

D'un point de vue économique, il est intéressant de noter que l'utilisation de ces micro-échantillons induit une réduction importante des coûts, principalement en raison de la diminution du temps de travail du personnel médical qualifié nécessaire pour réaliser les prélèvements veineux et de la diminution du nombre de consommables à usage unique. De plus, il entraîne une réduction des manœuvres à réaliser pour le traitement de l'échantillon et sa facilité de stockage réduit les besoins matériels nécessaires à sa conservation.

Par ailleurs, l'expédition des échantillons conventionnels s'avère onéreuse en raison des conditions d'envois qui nécessitent de réfrigérer ou congeler les prélèvements pendant le transport. Une étude allemande a comparé les coûts d'un prélèvement sanguin classique avec ceux d'un DBS réalisé à domicile dans le STP du voriconazole dans un service d'hématologie pédiatrique et du tacrolimus dans un service de néphrologie pédiatrique. Le coût des soins de santé a diminué de 7 % pour les patients en hématologie et de 21 % pour les patients en néphrologie (Martial et al., 2016).

Selon un avis d'expert publié en 2018, l'avenir du STP à partir d'analyses des DBS est prometteur (Velghe et al., 2018). Dans un climat de contraintes pesant sur les allocations de ressources des systèmes de santé, l'émergence du concept de Health Technology Assessment (HTA) intéresse l'ensemble des acteurs de santé et favorise les approches à moindre coûts. Le STP basé sur ces micro-échantillonnages peut être une approche rentable, non seulement en vérifiant l'observance du patient mais aussi en permettant une thérapie adaptée au patient. En effet, avec plusieurs médicaments coûtant des milliers d'euros par mois, la stratégie thérapeutique ne s'arrête plus au bon traitement chez le bon patient mais s'appuie aujourd'hui sur de nombreux critères, et notamment l'optimisation de la concentration au bon moment.

Enfin, en recherche expérimentale, le micro-prélèvement a aussi montré son efficacité. Grâce aux très faibles volumes requis, le micro-prélèvement facilite les études sur de petits animaux telles que les études pharmacologiques. Suite à la réglementation en vigueur visant à protéger les animaux au cours des études précliniques, cette procédure d'échantillonnage reste conforme aux principes des 3R (Replacement, Reduction, Refinement) en permettant de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés et de diminuer leur stress (Wickremsinhe and Perkins, 2015).

Ces techniques de micro-échantillonnage dans le monde de l'industrie pharmaceutique et de la recherche expérimentale présentent un grand intérêt d'un point de vue éthique et économique.

Le tableau 1 ci-dessous donne un aperçu comparatif entre l'échantillonnage conventionnel et les techniques alternatives de micro-échantillonnage. Les signes « ++ » et « - » représentent respectivement les points forts et les points faibles de chaque technique. Le signe « + » expose le potentiel de la technique et le signe « +/- » ne permet pas de se prononcer puisque certains critères dépendent fortement du composé analysé.

*Tableau 1 : Comparatif de l'échantillonnage conventionnel et des techniques alternatives de micro-échantillonnage.*

	Plasma/ Sérum	Micro- échantillon non volumétrique	Micro- échantillon volumétrique
Facilité d'échantillonnage	-	++	++
Faible volume d'échantillon	-	+	++
Effet de l'hématocrite sur le volume et le rendement d'extraction	++	-	+/-
Possibilité de transport à température ambiante	-	++	++
Rapidité de préparation de l'échantillon	+/-	+	+
Stabilité des échantillons à température ambiante	-	+/-	+/-
Automatisation de la préparation de l'échantillon	+/-	++	+

## 2.5 Limites des techniques de micro-échantillonnage

L'inconvénient majeur des prélèvements DBS réside dans la nature de l'échantillon biologique utilisé qui est majoritairement du sang total.

A l'exception de certains médicaments comme l'hydroxychloroquine ou le lithium par exemple pour lesquels le sang total est utilisé pour le STP, le plasma est la matrice d'ordinaire exploitée pour mesurer les concentrations systémiques des composés utilisés à la fois dans



l'évaluation de la pharmacocinétique (PK) et de la pharmacodynamique (PD), dans la découverte de médicaments et dans le STP (Rowland and Emmons, 2010). Cependant, les DBS sont réalisés à partir de sang total et la nature de l'échantillon entraîne des difficultés d'interprétation liées à l'absence de valeurs de références dans cette matrice et à la difficulté d'extrapolation à partir des données fournies pour les matrices plasma ou sérum, souvent mieux documentées et reconnues par les cliniciens.

Pour rappel, le sang total est composé de plasma et de globules rouges ainsi que d'une fraction de globules blancs et de plaquettes, ces deux derniers étant très minoritaires. In vivo, les médicaments peuvent se lier aux composants du plasma ou s'accumuler dans les globules rouges, ce qui entraîne des différences entre les concentrations observées dans le sang total et le plasma (ou le sérum) (Jager et al., 2014).

Ainsi, la différence de concentration entre les DBS et le plasma peut s'expliquer par la fraction de médicament dans le plasma par rapport au sang total, l'hématocrite et l'affinité du médicament pour les globules rouges. La concentration de l'analyte dans les globules rouges dépend de la répartition globules rouge/plasma ( $K_{GR:plasma}$ ), qui elle-même dépend de la perméabilité de la membrane cellulaire pour l'analyte et de l'affinité de l'analyte pour les cellules sanguines. Ainsi, d'après les observations décrites par Jager *et al.*, l'équation (1) permettrait d'estimer les concentrations plasmatiques à partir des concentrations retrouvées dans le sang total. Cependant, cette équation est réalisable uniquement si les données d'hématocrite individuelles et de constante de répartition de l'analyte entre les globules et le plasma sont disponibles. Or, dans les échantillons DBS il est difficile d'obtenir les valeurs d'hématocrite. Elles peuvent seulement être estimée à partir des approches évoquées plus haut dans la partie 2.2.5.1.

Équation 1 :

$$[Analyte]_{plasma} = \frac{[Analyte]_{sang\ total}}{(1-Hte) + K_{GR:plasma} \times Hte}$$

Hte : Hématocrite individuelle

$K_{GR:plasma}$  : Constante de répartition de l'analyte entre les globules rouges et le plasma

$[Analyte]_{plasma}$  : Concentration plasmatique de l'analyte

$[Analyte]_{sang\ total}$  : Concentration de l'analyte dans le sang total

Ainsi, l'interprétation des résultats de DBS nécessite de récolter de nouvelles données thérapeutiques réalisées sur la matrice « sang total » ou d'avoir un modèle de prédiction des concentrations plasmatiques à partir de l'analyse des DBS.

Les faibles volumes de sang obtenus par micro-échantillonnage (5 à 10  $\mu$ L en moyenne par prélèvement) nécessitent le développement de méthodes analytiques très sensibles. La spectrométrie de masse apparaît certes comme la technique de choix, mais cette technologie reste onéreuse et n'est pas déployée dans tous les laboratoires d'analyse, ce qui limite l'utilisation des prélèvements sur buvards.

L'utilisation de DBS non volumétriques limite la qualité des échantillons en l'absence de volume précis. L'absence d'une approche universelle pour surmonter les problèmes liés à l'échantillonnage des DBS a été un autre obstacle majeur à la mise en œuvre généralisée dans les laboratoires.

## 2.6 Applications

De l'application dans le domaine des omiques (génomique, protéomique et métabolomique) au dépistage néonatal en passant par les études cliniques, divers domaines biomédicaux montrent un grand intérêt pour le développement et l'amélioration des techniques de micro-échantillonnage. Nous allons aborder dans cette partie quatre domaines de la pharmacologie et toxicologie où l'application du micro-échantillonnage s'avère intéressante : les études précliniques, le dopage, le domaine de la toxicologie et le suivi thérapeutique pharmacologique.

### 2.6.1 Études précliniques

Au cours du développement d'un médicament, des études précliniques permettent d'étudier le comportement de divers composés dans l'organisme. Les données étudiées lors des phases précliniques sont d'ordre pharmacologique et toxicologique et sont réalisées en menant des expériences sur des animaux de laboratoire.

Dans le cadre d'une étude préclinique, une évaluation des paramètres pharmacocinétiques du tacrolimus a été menée sur le rat en comparant les données issues d'échantillons de sang total, de plasma et d'un échantillon de sang séché généré par le dispositif VAMS®. Le tacrolimus a été administré par voie orale à des rats, à une dose de 10 mg/kg puis 0,5, 1, 2, 4, 8 et 24 heures après la dose, des échantillons de sang (environ 150 µL) ont été prélevés dans la veine cervicale au moyen d'une seringue héparinée. A partir du même échantillon, des aliquots de plasma, sang total et des échantillons VAMS ont été préparés. L'extraction a ensuite été réalisée pour chaque matrice à partir d'aliquots de 10 µL. L'extraction du tacrolimus dans le dispositif VAMS® a été réalisée par un mélange méthanol/eau (1:1, v/v) contenant l'étalon interne suivi d'une sonication pendant 15 min avant agitation et centrifugation pour obtenir le surnageant. Le sang total et le plasma ont été extraits respectivement à partir d'un mélange sulfate de zinc/eau/méthanol (5:25:70, v/v/v) et acétonitrile/méthanol (1:1, v/v). La limite de quantification du tacrolimus à partir des dispositifs VAMS était de 0,2 ng/mL. Une comparaison des méthodes a montré que les concentrations dans le sang total et les dispositifs VAMS® étaient similaires. D'autre part, les concentrations de tacrolimus dans le plasma étaient différentes de ceux des dispositifs VAMS, probablement en raison de la répartition du tacrolimus dans les cellules sanguines. Cependant, les paramètres pharmacocinétiques étudiés ( $T_{1/2}$ ,  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC(0-24h)$ , clairance et volume de distribution) étaient comparables entre les trois matrices.

Bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour confirmer l'utilisation de dispositifs VAMS comme méthode efficace dans les études pharmacocinétiques chez les animaux, le dispositif VAMS a permis d'étudier les paramètres pharmacocinétiques du tacrolimus chez les rats et semble prometteur pour l'étude d'autres médicaments (Kita et al., 2019).

### 2.6.2 Dopage

Les programmes sportifs déploient des efforts considérables pour maintenir l'intégrité des compétitions sportives en effectuant des contrôles antidopage en compétition et hors compétition. Le faible coût, la simplicité de prélèvement et le caractère moins invasif de l'utilisation des DBS a motivé l'Agence Mondiale Antidopage (AMA) à accorder une attention particulière à ces nouvelles méthodes. L'équipe du professeur Thevis a testé trois composés

représentatifs des substances fréquemment employées dans le dopage. Il s'agit de deux composés parmi la classe des anabolisants, le stanozolol et le déhydrochlorométhyltestostérone (DHCMT) et un composé classé dans les stimulants, la pseudoéphédrine. En outre, il a été démontré que la méthode offrait des limites de détection de 20 pg/mL pour le stanozolol et de 0,8 ng/mL pour le DHCMT et la pseudoéphédrine. La stabilité de ces trois analytes dans le DBS a été validée pendant au moins 28 jours à température ambiante. Le développement et la validation de cette méthode à partir de prélèvements réalisés sur buvard en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem haute résolution (LC-HRMS) a permis de mettre en évidence l'intérêt de ces techniques dans la lutte antidopage moderne (Tretzel et al., 2015). En 2019, l'AMA a ainsi signé des protocoles d'entente avec sept organisations antidopage pour l'application de tests de dépistage à partir de DBS dans les analyses de routine dans le cadre des jeux olympiques et paralympiques d'hiver 2022 de Pékin.

### 2.6.3 Toxicologie

L'utilisation de DBS à des fins d'analyses toxicologiques gagne également en popularité. L'attrait du micro-échantillonnage pour cette discipline, notamment pour la toxicologie médico-légale, vient en partie de sa facilité d'échantillonnage et de la stabilité des analytes sur ce type de matrice.

Des études ont été menées pour évaluer la contamination du fœtus suite à la consommation de cocaïne ou de tabac chez la femme enceinte. La benzoylecgonine (BZE) et la cotinine, les métabolites respectifs de ces deux drogues, ont ainsi été déterminées à partir de DBS réalisés chez le nouveau-né (Henderson et al., 1997; Spector et al., 2007).

Dans un contexte de toxicologie médico-légale, à l'exception des cheveux conservés à température ambiante et impérativement au sec, tous les autres prélèvements doivent être conservés au froid à +4°C ou congelés à -20°C, voire à -80°C. Néanmoins, des problèmes de stabilité ont déjà été signalés pour certains médicaments et métabolites de drogues. Pourtant, l'utilisation des DBS semble améliorer la stabilité de la zopiclone particulièrement instable dans le sang et le plasma (Jantos et al., 2013). Certains opiacés et en particulier la 6-monoacétylmorphine (6-MAM), métabolite spécifique et instable de l'héroïne, ont montré

une grande stabilité à température ambiante sur buvard (Garcia Boy et al., 2008). Sausseureau *et al.* a évalué la stabilité à long terme de la cocaïne et de ses métabolites dans les DBS et a constaté qu'après six mois de stockage à -20°C, les concentrations n'avaient pas varié de plus de 20% (Sausseureau et al., 2012).

Moretti et son équipe ont développé une méthode d'identification et de quantification d'antidépresseurs et d'antipsychotiques en LC-MS/MS sur DBS prélevés en post-mortem. Ils ont évalué la stabilité des analytes sur une période de trois mois. Pour ce faire, des volumes de 85 µL de sang total prélevés lors de l'autopsie ont été déposés à la pipette sur des buvards Whatman 903® puis séchés et stockés à température ambiante. En parallèle, des échantillons de sang liquide conventionnels ont été collectés simultanément et stockés à -20°C. Les échantillons ont été analysés en triplicat immédiatement après le prélèvement, dans les 3 semaines suivantes et après 3 mois. Les DBS ont été extraits dans un tampon phosphate et purifiés à l'aide de cartouches d'extraction en phase solide (SPE). Au total, vingt-deux antidépresseurs et dix-neuf antipsychotiques ont été identifiés et respectivement neuf et cinq d'entre eux ont été quantifiés. Aucun faux négatif ni faux positif ont été décelés. En raison de la présence de caillots et d'une mauvaise qualité générale des prélèvements post-mortem, 5% des DBS ont dû être exclus. Les limites de détection (LDD) se situaient entre 0,1 et 3,2 ng/mL pour les antidépresseurs et 0,1 et 5,2 ng/mL pour les antipsychotiques. Les limites de quantifications (LDQ) variaient de 5 à 10 ng/mL pour les deux familles thérapeutiques. Les cartouches Bond Elute pour la procédure SPE ont garanti un bon rendement de récupération sur buvard excepté pour la paliperidone, la quétiapine et la fluoxétine. De manière générale, les concentrations observées à partir des DBS étaient toutes inférieures de 10 à 15% à celles mesurées dans le sang conventionnel. Toutefois, une bonne corrélation des concentrations a été observée entre les échantillons de sang conventionnels et les DBS stockés respectivement à -20°C et à température ambiante, excepté pour la fluvoxamine qui présentait des concentrations beaucoup plus faibles dans les DBS.

Le pourcentage de dégradation pour la majorité des analytes était inférieur à 20% dans les échantillons conventionnels et les buvards après 3 mois de stockage, respectivement à -20°C et à température ambiante. Les résultats obtenus à partir de prélèvements post-mortem réalisés le jour de l'autopsie, suggèrent que les DBS peuvent être utilisés en complément des

échantillons conventionnels en attendant des études supplémentaires à grande échelle concernant la stabilité des analytes dans les DBS (Moretti et al., 2019).

Protti *et al.* ont développé et validé une méthode en LC-MS/MS après optimisation des performances pour l'analyse du tétrahydrocannabinol (THC), ses deux principaux métabolites 11OH-THC et THC-COOH, et dix cannabinoïdes de synthèse (JWH-018, JWH-073, JWH-250, JWH-200, HU-211, CP 47,497, JWH-019, JWH-122, JWH-081, AM-2201) à partir de micro-échantillons réalisés sur buvard et VAMS (Protti et al., 2017).

Gaugler *et al.* ont développé une technique entièrement automatisée pour le dépistage de drogues à partir de prélèvements de sang (DBS) et d'urine séchés (DUS) sur buvard. La qualité des buvards a été vérifiée à l'aide d'un logiciel de reconnaissance d'images. Les échantillons ont été analysés via un analyseur automatique de type CAMAG®DBS-MS 500 réalisant l'extraction en ligne couplée à une LC-MS/MS. La totalité de l'extrait a été introduite dans le système LC-MS/MS augmentant la sensibilité de la méthode. Le temps d'analyse était de 5 minutes par échantillons en utilisant une méthode comprenant 28 analytes cibles et 20 minutes pour la recherche de plus de 1200 molécules. Chaque composé était détecté par cinq transitions MRM (Multiple Reaction Monitoring) afin d'améliorer l'intensité totale du signal d'un composé et d'acquérir suffisamment de données pour confirmer les médicaments cibles (Gaugler et al., 2019).

#### 2.6.4 Le suivi thérapeutique pharmacologique

Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) consiste à mesurer la concentration thérapeutique dans le sang, dans le but d'optimiser le traitement et d'adapter individuellement la posologie. Cette approche repose sur le principe que, pour certains médicaments, les effets sont directement liés à leur concentration sanguine ou plasmatique et en raison d'une variabilité pharmacocinétique interindividuelle, la concentration obtenue chez un sujet donné n'est pas prévisible (Clarke, 2016). Le STP permet ainsi de décrire des phénomènes de sous-dosage qui peuvent mener à des échecs thérapeutiques ou encore des phénomènes de surdosage pouvant entraîner des effets indésirables voire des intoxications aiguës graves ou des décès. Cette exploration permet également d'identifier les interactions

médicamenteuses, de surveiller l'observance du traitement ou encore d'explorer la pharmacocinétique du médicament (Avataneo et al., 2019).

Le STP est un autre domaine qui suscite un intérêt croissant pour l'utilisation de stratégies d'échantillonnage alternatives et peu invasives. L'analyse de DBS a fait l'objet d'un grand nombre de développements de méthodes pour le STP de diverses classes thérapeutiques : immunosuppresseurs (Koster et al., 2017), antiépileptiques (Velghe et al., 2019) , antirétroviraux (D'Avolio et al., 2010), antipaludéens (Gallay et al., 2018), antibiotiques (Barco et al., 2017), antifongiques (Cheng et al., 2018 ; Moorthy et al., 2019), analgésiques (Delahaye et al., 2020), antidépresseurs (Berm et al., 2015), neuroleptiques (Geers et al., 2017) et de plus en plus d'anticancéreux (Jager et al., 2014 ; Lampič et al., 2019).

Moorthy et al. ont développé une méthode LC-MS/MS pour la quantification du voriconazole et son métabolite, le N-oxyde-voriconazole à partir de dispositifs VAMS<sup>®</sup> qui permettent de prélever 10 µL de sang total. Les calibrateurs et contrôles préparés dans du sang total ont été mis en contact avec les dispositifs VAMS<sup>®</sup> pendant 15 minutes puis séchés pendant 3 heures, le tout à température ambiante. Les molécules ont été extraites en plaçant les dispositifs dans une plaque de 96 puits avec un mélange acétonitrile/méthanol (1 :1, v/v) contenant l'étalon interne. Tous les échantillons ont été soumis à une sonication pendant 15 minutes, puis agités et centrifugés. Les surnageants ont été transférés sur une nouvelle plaque 96 puits pour l'analyse LC-MS/MS. La durée d'analyse était de 4 minutes par échantillon. Les courbes standard étaient linéaires entre 10 et 10 000 ng/mL pour les deux molécules. Les valeurs de justesse et précision intra- et inter-jours évalués sur 3 jours, se situait entre 87 et 102 % avec un coefficient de variation inférieur à 12 %. Les rendements de récupération étaient de 94 % pour le voriconazole et de 87 % pour le N-oxyde-voriconazole. Le voriconazole était stable pendant 1 mois dans des micro-échantillons séchés dans différentes conditions (+4°C, -20°C et -78 °C). Cette méthode permet une quantification acceptable du voriconazole et de son métabolite et sa mise en œuvre à partir de DBS prélevés chez des patients est prête à être évaluée (Moorthy et al., 2019).

Une étude a évalué la faisabilité de l'utilisation de DBS pour le STP du busulfan, un agent alkylant utilisé dans le conditionnement avant la transplantation de cellules souches hématopoïétiques en pédiatrie. Les concentrations sanguines de busulfan obtenues à partir

du buvard étaient bien corrélées aux concentrations plasmatiques. L'étude a aussi démontré que les changements de taux d'Ht n'ont pas eu d'impact sur les performances du test. (Dilo et al., 2020)

L'étude menée par Velghe et al., a permis de développer une méthode d'extraction entièrement automatisée à partir du CAMAG DBS-MS500 couplé à un système de LC-MS/MS en ligne pour quantifier quatre antiépileptiques de première génération (phénytoïne, acide valproïque, phénobarbital, carbamazépine) et un métabolite actif (carbamazépine-10,11-époxyde) à partir de DBS. Le développement de la méthode a inclus l'optimisation de la procédure d'extraction entièrement automatisée. Elle comprenait entre autres, le réglage de la caméra intégrée afin d'ajuster le centre du DBS, la pulvérisation de l'étalon interne directement sur les DBS et l'extraction qui a été réalisée à partir d'un mélange Eau/Acétonitrile (80/20, v/v) contenant 5mM d'acétate d'ammonium. Une fois la validation de méthode effectuée, quinze échantillons DBS provenant de patients situés à l'étranger et recevant des antiépileptiques ont été testés pour réaliser le STP. Pour la validation, un volume de 25 µL de calibrateurs et contrôles préparés dans du sang total a été déposé à la pipette sur les buvards. Les gammes étaient comprises entre 25 et 150 µg/mL pour l'acide valproïque, 1 et 160 µg/mL pour le phénobarbital, entre 4 et 80 pour la phénytoïne et de 2 à 48 µg/mL et 0,25 à 24 µg/mL respectivement pour la carbamazépine et son métabolite. Toutes les molécules étaient stables dans les DBS pendant au moins 1 mois lorsqu'ils étaient stockés à température ambiante, à 4°C et -20°C, et pendant au moins 4 jours lorsqu'ils étaient stockés à 60°C. Le rendement de récupération était d'environ 60% pour tous les analytes et semblait dépendre de l'hématocrite lorsque celui-ci était élevé. Les intervalles de concentrations d'antiépileptiques retrouvés chez les patients étaient les suivants : acide valproïque (33,9 à 47,1 µg/mL), phénobarbital (4,54 à 14,2 g/mL) et carbamazépine (3,05 à 7,84 µg/mL) (Velghe et al., 2019).

Les validations analytiques sont nombreuses et l'application clinique sur des patients est encore réservée à un très petit nombre de molécules et demandent souvent des études supplémentaires. Toutefois, les développements de méthodes à partir des DBS dans l'objectif de réaliser du STP chez des patients semblent prometteurs.



### 3 Le suivi thérapeutique pharmacologique du Vémurafénib dans l'histiocytose langerhansienne de l'enfant

#### 3.1 Généralités sur l'histiocytose à cellules de Langerhans

L'histiocytose à cellules de Langerhans (HCL) ou histiocytose Langerhansienne (HL) est une maladie systémique rare (orpheline) caractérisée par des lésions inflammatoires et l'accumulation de cellules dendritiques. Les histiocytes sont dérivés des progéniteurs de cellules hématopoïétiques de la lignée myéloïde qui se différencient par la suite en cellules dendritiques, monocytes et macrophages. Les histiocytes présentent des caractéristiques immunologiques des cellules de Langerhans épidermiques qui sont les cellules dendritiques de la peau et des muqueuses. (Collin et al., 2015).

Cette maladie atteint les patients de la période néonatale à l'âge adulte, cependant elle touche en majorité les enfants de 0 à 15 ans, avec un pic de fréquence entre 1 et 4 ans. L'HL a une incidence estimée à 5 cas par million chez l'enfant avant l'âge de 15 ans et 2,7 cas par million chez l'adulte. En France, en avril 2019, le registre des histiocytoses comptait 1956 enfants âgés de moins de 15 ans, 294 patients âgés entre 15 et 30 ans et 396 patients âgés de plus de 30 ans. Il existe une très légère prédominance masculine (Guyot-Goubin et al., 2008).

##### 3.1.1 Classification et physiopathologie

Depuis 2016, la classification des histiocytoses comporte 5 catégories distinctes. Elle est basée sur des critères cliniques, radiologiques, phénotypiques, génétiques et moléculaires. L'HL est classée parmi le groupe de Langerhans (L) qui rassemble la maladie d'Erdheim-Chester (ECD), l'HL/ECD mixte, le xanthogranulome extracutané juvénile et l'histiocytose à cellules indéterminées (Emile et al., 2016).

En 2010, une avancée majeure a permis d'ouvrir la voie à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'HL. Dans l'étude menée en 2010 par Badalian-Very *et al.*, la mutation  $BRAF^{V600E}$  a été décrite dans 57% des échantillons étudiés (Badalian-Very *et al.*, 2010). La mutation  $BRAF^{V600E}$  entraîne une activation récurrente de la voie kinase RAS-RAF-MEK-ERK-MAP. Cette maladie serait liée à l'activation des protéines MAP kinases (Mitogen Activated Protein kinase) et devient une pathologie clonale impliquant des mutations somatiques récurrentes.

La découverte de ces mutations, dont les fréquences relatives sont illustrées dans la figure 8, a permis de progresser sur les mécanismes de cette pathologie, de faire évoluer le concept de maladie inflammatoire primaire à celui de néoplasie myéloïde inflammatoire et d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques (Berres *et al.*, 2014).

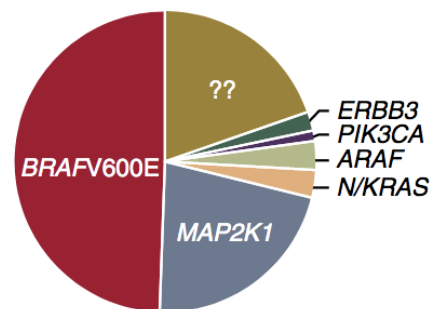


Figure 8 : Fréquences relatives de l'activation des mutations de kinases dans l'HL

### 3.1.2 Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques et l'évolution de la maladie varient considérablement, passant de la forme isolée monosystémique avec résolution spontanée à la forme multisystémique réfractaire au traitement et associée à un taux de mortalité avoisinant les 20% (Degar and Rollins, 2009). Cette maladie présente des atteintes extrêmement variables. Tout organe ou système peut être atteint, mais les plus fréquemment impliqués sont les os (80%), la peau (33%) et l'hypophyse (25%). Les autres organes concernés sont le foie (15%), la rate (15%), le système hématopoïétique (15%), les poumons (15%), les ganglions lymphatiques (5-10%) et le système nerveux central, à l'exception de l'hypophyse (2-4%) (Haupt *et al.*, 2013).

### 3.1.3 Pronostics

L'histiocytose langerhansienne est actuellement classée en fonction de l'implication d'un ou plusieurs organes (forme monosystémique ou multisystémique) dont des organes à risque que sont le foie, la rate et la moelle osseuse (Haupt et al., 2013). Une majorité de patients présentent une forme monosystémique (70%) principalement associée à des atteintes osseuses, ganglionnaires ou cutanées. Parmi les patients atteints de formes multisystémiques (30%), la moitié présente un organe à risque (Kim et al., 2014).

Le pronostic de l'HL dépend en grande partie de l'implication des organes à risques et de la réponse au traitement initial (Krooks et al., 2018). Les formes monosystémiques d'HL présentent un excellent pronostic avec un taux de survie avoisinant les 100%. Le taux de réactivation à 5 ans, défini par la réapparition des symptômes après une période de rémission complète ou partielle de la maladie, est inférieur à 20% et touche généralement les mêmes organes (Morimoto et al., 2010). En revanche, les formes multisystémiques présentent un risque potentiel élevé de mortalité.

La moitié des lésions de la maladie présente une mutation récurrente de l'oncogène BRAF, la mutation  $BRAF^{V600E}$ . Dans les populations pédiatriques, la présence de la mutation  $BRAF^{V600E}$  dans les lésions est associée à un risque de réactivation significativement plus élevée (Berres et al., 2014). Cette mutation est également associée à des manifestations plus sévères de la maladie et des taux de complications et de séquelles plus élevés.

### 3.1.4 Les Stratégies thérapeutiques

#### 3.1.4.1 Les thérapies non ciblées

Les options thérapeutiques sont nombreuses et varient en fonction de l'étendue de la maladie et des atteintes au moment du diagnostic. Compte tenu du pronostic généralement favorable des formes monosystémiques, un traitement systémique n'est pas toujours nécessaire.

Lors de l'évaluation des options de traitement, la stratification des patients avec une HL multisystémique et l'implication des organes à risque est essentielle. Un traitement systémique est recommandé pour tout patient présentant une forme multisystémique avec implication d'un organe à risque.

Un panel extrêmement varié de médicaments est utilisé pour traiter l'HL, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) aux molécules cytostatiques telles que la vincristine, la vinblastine, l'étoposide, la 6 mercaptopurine (6-MP), le méthotrexate, la cytarabine et la cladribine. À cette liste peuvent s'ajouter des thérapies immunomodulatrices ou immunosuppressives telles que l'interféron alpha, la ciclosporine A ou encore les inhibiteurs de TNF-alpha (Donadieu et al., 2012).

La première ligne de traitement systémique, la plus fréquemment utilisée, est basée sur la combinaison de vinblastine (6mg/m<sup>2</sup>, en bolus intra-veineux, une fois par semaine) et stéroïdes (prednisone 40mg/m<sup>2</sup>/j par voie orale) pendant 6 semaines. En cas de réponse complète, un traitement d'entretien est poursuivi avec la combinaison vinblastine et stéroïdes pendant 12 mois. En revanche, en cas de progression de la maladie, un traitement dit de « sauvetage » est proposé en combinant une chimiothérapie à base de cytarabine et cladribine (Bernard et al., 2005) voire une greffe de cellules souches hématopoïétiques après un conditionnement d'intensité réduite en troisième ligne de traitement (Steiner et al., 2005). A ce stade, les patients présentent un taux de mortalité compris entre 15 et 25%. Ces thérapies entraînent une durée d'hospitalisation importante et généralement des toxicités graves pouvant entraîner le décès (Abla et al., 2018).

#### 3.1.4.2 Les thérapies ciblées

La compréhension des mécanismes de cette pathologie et l'identification des mutations de la voie MAPK dans l'HL, notamment la mutation BRAF<sup>V600E</sup>, a permis d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les thérapies ciblées sont devenues une stratégie évidente pour les formes résistantes d'HL et l'avancée dans sa prise en charge est en grande partie liée à l'utilisation des thérapies ciblant la voie des MAPK dans d'autres pathologies, notamment le mélanome (Jang and Atkins, 2014).

L'efficacité des inhibiteurs de tyrosine kinase anti-MEK, tramétinib et cobimétinib, a été rapportée pour la première fois dans l'histiocytose non-LCH (Bubolz et al., 2014).

Les inhibiteurs BRAF, telles que le dabrafénib en cours d'étude de phase I/II dans l'HL pédiatrique ou encore le vémurafénib (VMF) dans les formes multisystémiques réfractaires sont prometteuses (Donadieu et al., 2019; Héritier et al., 2015).

## 3.2 Place des thérapies ciblées dans le traitement de l'HL : Exemple du vémurafénib

### 3.2.1 Généralités

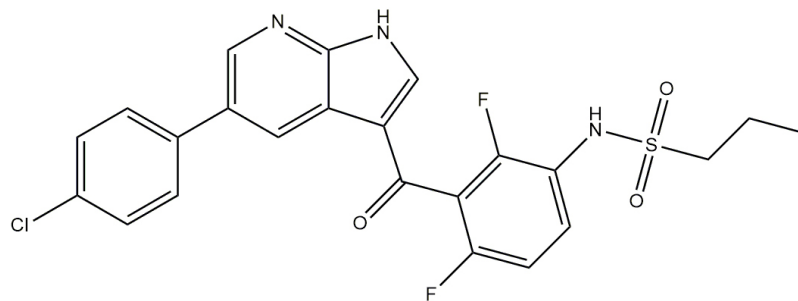


Figure 9 : Structure chimique du vémurafénib

Le vémurafénib (Zelboraf®) est un antinéoplasique et immunomodulateur, classé dans la famille des inhibiteurs de protéines kinases et soumis à prescription hospitalière. La structure chimique du VMF qui a pour formule  $C_{23}H_{18}ClF_2N_3O_3S$  est illustrée dans la figure 9.

En 2011, le VMF commercialisé par la société Genentech aux Etats-Unis était le premier inhibiteur de la sérine-thréonine kinase BRAF approuvée par la FDA pour le traitement des patients atteints d'un mélanome non résecable ou métastatique porteur de la mutation  $BRAF^{V600E}$  à la dose de 960mg deux fois par jour associé à l'inhibiteur MEK cobimétinib (Cotellic® ; Genentech). A ce jour, en France, ce médicament possède l'autorisation de mise sur le marché (AMM) uniquement dans le cadre de cette pathologie en bithérapie avec les anti-MEK ou en monothérapie en seconde ligne de traitement si l'association est contre-indiquée.

En 2017, la FDA a étendu son autorisation au traitement de la maladie d'Erdheim-Chester chez les adultes porteurs de la mutation  $BRAF^{V600E}$  (Diamond et al., 2018).

Ainsi, le VMF a été utilisé avec succès dans certaines pathologies associées à des mutations BRAF après l'échec de chimiothérapies classiques et a permis une amélioration clinique rapide (Haroche et al., 2015; Protsenko et al., 2015; Robinson et al., 2014; Skrypek et al., 2014).

Le VMF fait l'objet d'études récentes et encourageantes, notamment pour le cancer du poumon non à petites cellules (Mazieres et al., 2020) ou le glioblastome de bas grade non résecable muté BRAF en combinaison avec un anti-MEK (Yau and Ameratunga, 2020). Un essai clinique débuté en octobre 2014 est en cours sur le territoire français visant à évaluer l'efficacité et la tolérance du VMF sur 500 patients adultes atteints de divers cancers, en situation d'échec thérapeutique et présentant la même mutation *BRAF<sup>V600E</sup>*.

En Avril 2016, le comité des médicaments orphelins (COMP) de l'Agence européenne des médicaments (EMA) a accordé le statut de médicament orphelin au VMF dans l'HL (Donadieu et al., 2016).

### 3.2.2 Mécanisme d'action :

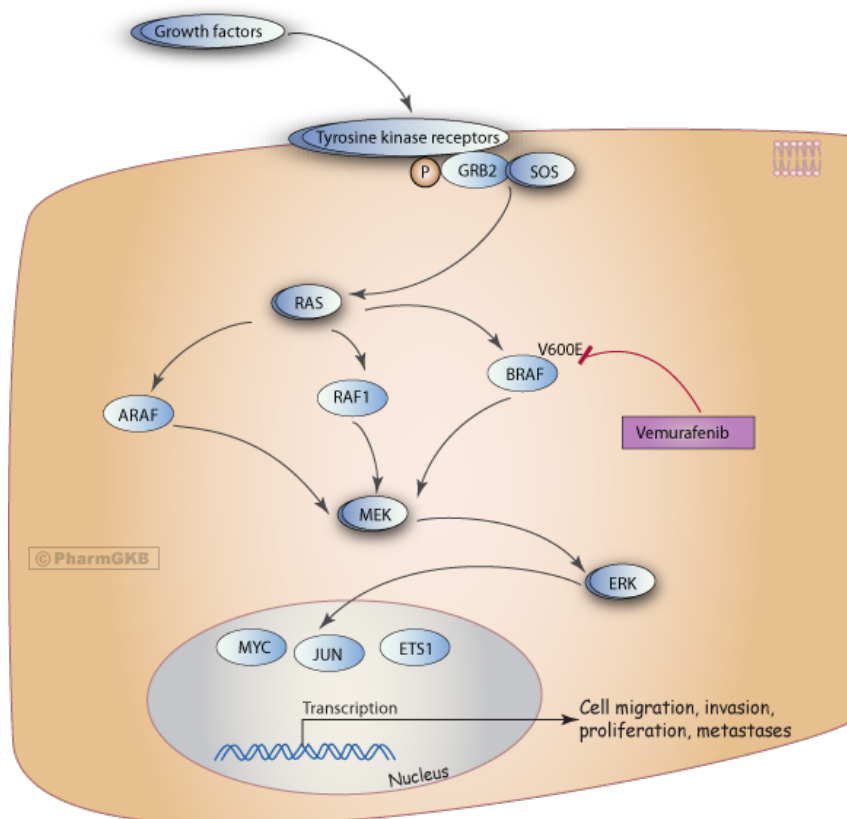


Figure 10 : Le mécanisme d'action du vemurafénib et les effets de signalisation en aval

(Source : <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165980050>)

Pour comprendre le mécanisme d'action du VMF, illustré dans la figure 10, il faut revenir sur la cascade de signalisation RAS/RAF/MAPK. Elle est induite par l'activation de récepteurs membranaires, eux-mêmes stimulés par des facteurs de croissance comme l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ou des cytokines. Après une cascade de phosphorylations successives, cette voie de signalisation régule la transcription d'un grand nombre de gènes cibles impliqués dans la régulation de la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. En présence de la mutation V600E du gène *BRAF*, la voie de signalisation est activée de façon anormale (Lievre and Laurent-Puig, 2010). Le VMF cible spécifiquement la mutation  $BRAF^{V600E}$  et permet un rétablissement temporaire d'une voie de signalisation RAS/RAF/MAPK normale. L'inhibition de ces protéines kinases est devenue, tout naturellement, l'un des premiers choix dans le développement des thérapies ciblées pour les maladies néoplasiques.

### 3.2.3 Posologie

La dose recommandée de VMF chez les patients adultes atteints de mélanome est de 960 mg deux fois par jour (soit une dose quotidienne totale de 1920 mg). La posologie chez l'enfant est comprise entre 20 et 30 mg/kg/jour. Dans l'étude de Donadieu *et al.*, les enfants dont l'âge médian était de 1,8 ans ont reçu du VMF par voie orale à la posologie de 10mg/kg deux fois par jour, pendant 8 semaines minimum (Donadieu et al., 2019).

### 3.2.4 Pharmacocinétique

Les résultats d'une étude pharmacocinétique réalisée chez 9 enfants atteints d'HL, âgés de 1 à 14 ans indiquent une aire sous la courbe (AUC 0-12h) de  $202 \pm 158 \mu\text{g/mL/h}$ , une concentration minimale ( $C_{\text{min}}$ )  $11,3 \pm 8,5 \mu\text{g/mL}$  et une concentration maximale ( $C_{\text{max}}$ ) de  $13 \pm 8,8 \mu\text{g/mL}$  pour un  $T_{\text{max}}$  à 4,5 heures après 14 jours de traitement (J14) et une dose médiane de 21,4 mg/kg/J. L'AUC augmentait de 3,8 fois entre le jour d'instauration du VMF (J0) et le J14. Les concentrations plasmatiques moyennes semblent comprises entre 11,6 et 20,6  $\mu\text{g/mL}$  (IC 95%)(Donadieu et al., 2019) alors que celles de l'adulte sont évaluées à  $40 \pm 20 \mu\text{g/mL}$  (Flaherty et al., 2010).

Le volume apparent de distribution (Vd) du VMF chez les patients atteints d'un mélanome métastatique est estimé à 91 litres et la clairance est estimée à 31L par jour. *In vitro*, le VMF est fortement lié aux protéines plasmatiques humaines (> 99 %)(Goldinger et al., 2015).

Son métabolisme est principalement assuré par un des cytochromes P450, le CYP3A4 et son transport est effectué par des protéines d'efflux, les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) principalement ABCB1 (ou P-gp pour « P-glycoprotéine») ou ABCG2 (ou BCRP pour « Brest Cancer Resistance Protein »). Le VMF est également inhibiteur de la P-gp *in vitro*.

La demi vie d'élimination est estimée à 57 heures (entre 30 et 120 heures) chez l'adulte et son élimination est majoritairement biliaire (Goldinger et al., 2015).

Il semble que les paramètres pharmacocinétiques soient influencés par la nourriture. D'après une étude, la prise de VMF après un repas riche en matières grasses, peut augmenter de façon significative l'exposition sanguine au VMF en augmentant de 2,5 fois la concentration maximale (Cmax) et 4,7 fois l'aire sous la courbe (AUC) sans augmenter la demi-vie (Ribas et al., 2014).

Les études pharmacocinétiques réalisées chez les adultes atteints de mélanomes ont montré une variabilité interindividuelle importante (Alvarez et al., 2014; Funck-Brentano et al., 2015).

### 3.2.5 Pharmacogénétique

Certains polymorphismes génétiques du *CYP3A4*, *ABCB1* et *ABCG2* sont connus pour avoir un impact sur l'expression de ces enzymes ou transporteurs. Aussi, des variants génétiques pourraient partiellement expliquer la forte variabilité interindividuelle de l'exposition au VMF. Dans une étude de variants génétiques de patients adultes atteints d'un mélanome métastatique, les variants *CYP3A4\*22* et *ABCB1 3435C>T* sont significativement associés à une incidence plus importante des toxicités liées au VMF corrélées à une exposition sanguine plus élevée. Les patients porteurs d'un ou plusieurs allèles *CYP3A4\*22* ont des risques significativement plus élevés de déclarer des nausées de grade 3 à 4 (p=0,033), une hyperbilirubinémie quel que soit le grade (p=0,006) et des carcinomes cellulaires squameux (p=0,014). Le variant *ABCB1 3435 C>T* est quant à lui significativement associé à un plus grand nombre d'apparition de toxicités de grade 3 et plus (p=0,012) (Goey et al., 2019).



### 3.2.6 Preuve d'efficacité

Une récente étude internationale observationnelle portant sur une cohorte pédiatrique de 12 pays différents a été réalisée. Cinquante-quatre enfants atteints d'HL multisystémiques réfractaires ne répondant pas aux thérapies conventionnelles et portant des manifestations graves ont été inclus. Ces enfants dont l'âge médian était de 1,8 ans ont reçu du VMF hors AMM par voie orale en monothérapie à la posologie de 10mg/kg deux fois par jour, pendant 8 semaines minimum.

En fonction de l'extension des lésions de la maladie, les patients étaient répartis en 2 classes : organes à risques positif (RO+) et organes à risques négatifs (RO-). Parmi les critères d'évaluation, le score quantitatif d'activité de la maladie (DAS) qui reflète l'extension globale de l'HL a été utilisé. Pour les patients RO+, la réponse complète (RC) était définie comme un score DAS nul, et la réponse partielle (RP) comme une diminution du score DAS. Pour les patients RO-, la RC était définie par la disparition totale de la charge tumorale et la RP par une diminution de la charge tumorale supérieure à 50%.

Après 8 semaines de traitement par VMF, 38 patients étaient en RC et les 16 autres en RP. Le traitement par VMF met en évidence une amélioration clinique rapide des patients (Figure 11). Le DAS médian est passé de 7 à 0 en 8 semaines avec une diminution plus importante chez les RO+ (10 à 0) que chez les RO- (3 à 0). Les tumeurs ont régressé de 70% chez les patients RO- qui ont bénéficié d'un remodelage osseux. La réponse au VMF a persisté aussi longtemps que le patient est resté sous traitement optimisé.

L'arrêt de traitement chez trente patients après une médiane de 183 jours et sans traitement d'entretien a entraîné une réactivation rapide chez vingt-quatre d'entre eux. Les taux de réactivations à six et douze mois étaient respectivement de 72% et 84%. Le taux de réactivation était plus important chez les patients RO+. Pour la majorité d'entre eux la réintroduction du VMF a de nouveau permis d'observer une amélioration clinique. Le taux de survie globale à 2 ans était de 98% (Donadieu et al., 2019).

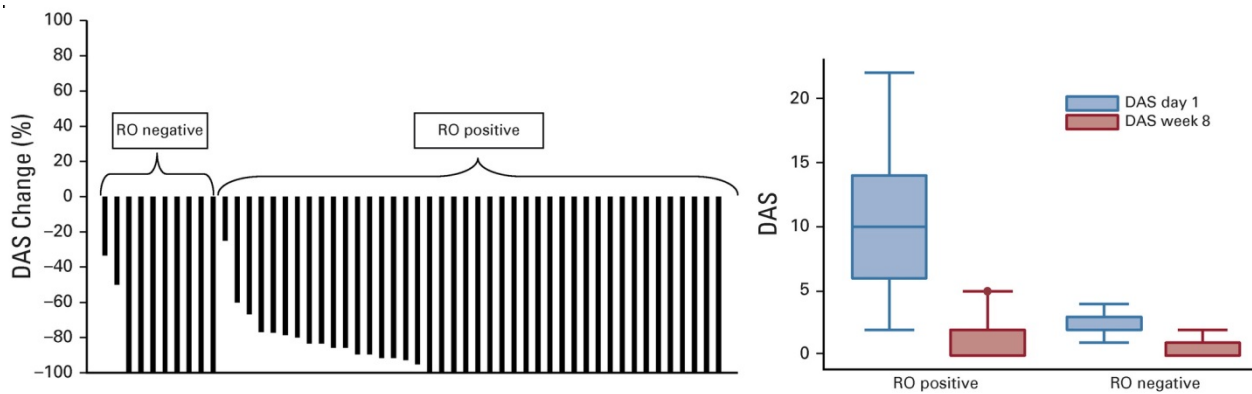


Figure 11 : Evolution de l'HL réfractaire après 8 semaines de traitement par VMF

### 3.2.7 Effets indésirables et toxicité

Dans la cohorte d'enfants atteints d'HL réfractaires décrite dans la partie (3.2.3 Preuve d'efficacité), 54 évènements indésirables ont été décrits chez 40 enfants traités par VMF. La très grande majorité des patients (n=37 ; 90%) a présenté au moins un effet indésirable cutané (EIC) dont la totalité a présenté un rash cutané. Parmi les autres EIC, des réactions de photosensibilité (n=13), des panniculites (n=7) et l'apparition d'onychomadèse sur une période transitoire (n=2) ont été décrits. Un quart des patients a présenté un évènement indésirable non cutané (n=8). Parmi eux, deux présentaient un allongement de l'intervalle QT de grade 1 transitoire à dose élevée, trois autres des douleurs articulaires de grade 1 ou 2, une légère cytolysé hépatique transitoire, une clonie transitoire des membres et du cou grade 3 et un épistaxis de grade 3 lié à une nécrose tumorale. Il a également été rapporté des arthralgies, céphalées et fièvre, ainsi que des affections gastro-intestinales de type nausées, vomissements et diarrhées. Quelques patients ont également développé des infections communautaires, de type grippe ou varicelle, sans complications. Toutefois, l'absence de groupe contrôle pour les enfants ne permet pas d'évaluer l'imputabilité réelle du VMF. La majorité des EIC étaient peu sévères avec des formes de grade 1 ou 2, transitoires ou alors sans séquelles pour une durée de traitement médiane de 417 jours (comprise entre 60 et 1140 jours). Aucun cas de tumeur secondaire, toxicité sanguine, toxidermie sévère ni de syndrome main pied n'ont été rapportés. Aucun retard de croissance n'a été rapporté même si le suivi était de courte durée. Malgré des EIC très fréquents et un suivi dermatologique indispensable, ils ont peu d'impacts sur la poursuite du traitement.

Chez les adultes, les EIC sont également décrits en majorité, néanmoins les effets indésirables semblent plus sévères. Dans l'étude multicentrique de 3222 patients atteints de mélanome métastatique traités par VMF, Larkin *et al.* décrivent des effets indésirables de grade 3 ou 4 chez 46% des patients, notamment des carcinomes épidermoïdes cutanés (CEC) dans 12% des cas. Chez ces patients, la médiane d'apparition des EI de grade 3 ou 4 et des CEC étaient respectivement d'environ 50 jours et 78 jours (Larkin et al., 2014).

### 3.2.8 Suivi thérapeutique pharmacologique

L'exposition sanguine au VMF est caractérisée par une forte variabilité interindividuelle avec une variation allant de 32 à 55% selon les nombreuses études réalisées chez l'adulte. Funck-Brentano *et al.* ont révélé dans une étude de 21 patients que des concentrations plasmatiques faibles à l'équilibre étaient associées à des progressions tumorales ( $39 \pm 20 \mu\text{g/mL}$  pour les patients chez qui on observe une première progression contre  $56 \pm 21 \mu\text{g/mL}$  pour les patients chez qui on observe une réponse complète ou partielle) (Funck-Brentano et al., 2015). Dans une autre étude, Kramkimel et son équipe montrent que les concentrations plasmatiques inférieures à  $40,4 \mu\text{g/mL}$  sont associées à une survie sans progression plus courte (1,5 mois versus 4,5 mois ;  $p=0,029$ ) (Kramkimel et al., 2016). Goldwirt *et al.* confirment également que les patients avec une concentration plasmatique supérieure à  $42 \mu\text{g/mL}$  ont moins de risques d'avoir une progression de leur mélanome ( $p=0,005$ ) (Goldwirt et al., 2016). Chez les patients adultes atteints de mélanome, les concentrations de VMF étaient significativement plus importantes chez les patients ayant développés un rash de grade  $> 2$  ( $62 \pm 25 \mu\text{g/mL}$  vs  $36 \pm 18 \mu\text{g/mL}$  ;  $p < 0,0001$ ) (Kramkimel et al., 2016). Selon le rapport du Committee for Medicinal Products for Human (CHMP) de l'Agence Européenne des médicaments (EMA), une autre étude a montré que le QT allongé était corrélé à une plus forte exposition du VMF.

Les données chez l'enfant sont beaucoup plus restreintes et les concentrations optimales ne sont pas connues. Dans une cohorte pédiatrique atteinte d'HL, la concentration résiduelle plasmatique de VMF a été mesurée à l'équilibre, au minimum 14 jours après instauration du traitement. Les concentrations plasmatiques étaient comprises entre 11,6 et 20,6 µg/mL (IC 95%) pour des doses comprises entre 13 et 41 mg/kg/jour avec une médiane à 21 mg/kg/jour. Ces données semblent apporter des précisions sur la zone thérapeutique cible du VMF dans une population pédiatrique atteinte d'HL qui semble être comprise entre 10 et 23 µg/mL (Donadiou et al., 2019).

Les effets indésirables semblent plus fréquents lorsque les concentrations résiduelles plasmatiques de VMF sont élevées. Dans l'étude de Donadiou *et al.*, les allongements de l'intervalle QT ont été observés alors que les concentrations plasmatiques étaient de 37 et 72 µg/mL. Trois patients avec une panniculite de grade 3 avaient des concentrations comprises entre 40 et 74 µg/mL. Une partie des événements indésirables semblent concentrations-dépendants et une diminution de dose pour les patients présentant une toxicité de grade 3 a entraîné une régression voire une disparition des effets indésirables.

Une dose deux fois plus importante a permis d'atteindre la zone thérapeutique cible et le passage en réponse complète clinique parmi trois patients sous exposés au VMF (<10 µg/mL). La figure 12 illustre bien l'intérêt d'augmenter la dose pour ce patient afin d'atteindre la zone thérapeutique cible.

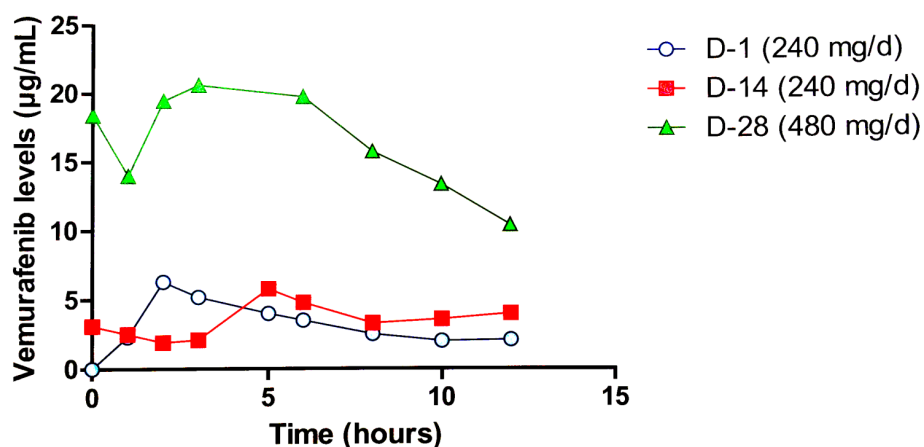


Figure 12 : Concentrations observées avant et après adaptation de posologie du VMF chez un patient pédiatrique

L'ajustement de dose ne semble pas être lié à un changement proportionnel de l'exposition sanguine au VMF (Nijenhuis et al., 2017). La relation entre la dose et l'exposition sanguine au VMF est encore controversée et reste malgré tout une condition importante pour justifier l'intérêt du suivi thérapeutique (Grippa2013).

La relation « exposition-effet » semble être corrélée, en ce qui concerne la toxicité et la réponse au traitement par VMF, justifiant une optimisation thérapeutique par le suivi thérapeutique pharmacologique.

De plus, le VMF est à la fois substrat et inducteur de certaines enzymes du cytochrome P450 et donc à risque d'interactions potentielles. Par ailleurs, l'apparition de résistances aux inhibiteurs BRAF survient rapidement après initiation du traitement, de l'ordre de quelques mois et pourrait en partie être expliquée par une sous exposition au traitement (Weeraratna, 2012). Le suivi thérapeutique du VMF repose sur le dosage de la concentration à l'équilibre soit environ 14 jours après l'initiation du traitement.

### 3.2.9 Méthodes de dosage du vémurafénib

Plusieurs méthodes permettant le dosage du VMF dans le plasma ont été décrites dans la littérature. Une méthode de chromatographie liquide à haute performance avec une détection UV (HPLC-UV) a été décrite pour la quantification simultanée du VMF et de l'erlotinib à partir de 200  $\mu$ L de plasma. L'étalonnage était linéaire dans la plage de 1,25 à 100  $\mu$ g/mL pour le VMF. Cependant, la méthode de détection UV manque de sensibilité et requiert des volumes importants pour atteindre une limite de quantification satisfaisante. De plus, cette dernière utilisait le sorafénib comme étalon interne, un anti-cancéreux, susceptible d'être administré simultanément aux patients (Zhen et al., 2013).

Une méthode LC-MS/MS sensible, reproductible et sélective a été mise au point pour la quantification simultanée de six inhibiteurs de tyrosine kinases (dabrafénib, tramétinib, vémurafénib, cobimétinib, pazopanib, régorafénib) et deux métabolites actifs (régorafénib-M2 et régorafénib-M5) dans le plasma humain. La précipitation des protéines plasmatiques a été réalisée avec du méthanol à partir de 100  $\mu$ L de plasma. La méthode a présenté une exactitude et une précision acceptable sur les plages de concentrations cliniquement pertinentes (limites supérieures de quantification comprises entre 500 et 100 000 ng/mL) et une bonne sensibilité avec des limites inférieures de quantification comprises entre 1 et 200

ng/ml. L'avantage de cette méthode réside dans l'analyse simultanée d'échantillons de sang de patients traités avec différents ITK, seuls ou en association, reflet des prescriptions de patients traités pour des mélanomes ou des histiocytoses (Cardoso et al., 2018).

Nijenhuis *et al.* ont développé une méthode de dosage du VMF en LC-MS/MS sur de plus faibles volumes de plasma (50µL) avec une gamme de calibration comprise entre 1 et 100 µg/mL. Le VMF a été isolé du plasma par extraction liquide-liquide (ELL) avec un volume de 1mL de méthyl tert-butyl éther (TBME). Après agitation (10 minutes à 1250 tr/min), centrifugation (5 minutes à 23 100 g) et congélation, la couche organique a été évaporée sous azote (15 minutes à 40°C). L'extrait sec a ensuite été reconstitué avec 1mL de méthanol à 50 % puis injecté. Le temps d'analyse était de 7 minutes par échantillons (Nijenhuis et al., 2014a). La technique d'extraction reste complexe et le temps d'analyse par échantillons relativement long.

Une méthode de dosage en LC-MS/MS développée sur de faibles volumes d'échantillons a été décrite par Alvarez *et al.*, basée sur une prise d'essai de 10 µL de plasma. La courbe de calibration était linéaire dans la plage 0,1-100 µg/mL, les limites de détection et de quantification étaient respectivement de 0,01 µg/mL et 0,1 µg/mL. Une simple précipitation des protéines avec un mélange eau/acétonitrile a été utilisée après ajout de vémurafénib-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> comme étalon interne. Cette méthode permet d'accélérer la procédure de prétraitement des échantillons en utilisant une simple précipitation tout en proposant une quantification sensible sur toute la plage de concentrations plasmatiques cibles pour des patients adultes atteints de mélanome (0,1-100 µg/mL) à partir de faibles volumes d'échantillons (Alvarez et al., 2014). Ce faible volume d'échantillon a permis son utilisation chez de petits animaux comme la souris (Viario et al., 2017).

Enfin, Nijenhuis *et al.* ont développé une méthode de dosage du VMF en LC-MS/MS à partir de DBS non volumétrique. Pour valider cette méthode, des volumes fixes de 15 µL de standards de calibration et contrôles de qualité préparés en amont à partir de sang total et congelés à - 20°C ont été déposés sur les buvards. La sensibilité de la méthode était suffisante et n'exigeait pas nécessairement une étape de concentration lors de l'extraction de l'échantillon. Après ajout d'un mélange méthanol-acétonitrile (50:50, v/v), les échantillons ont été mélangés et agités pendant 30 minutes à 1250 tours/minute. Pour éviter les effets de solvant pendant la chromatographie, l'extrait a été dilué avec de l'eau (1:1, v/v) avant d'être injecté. La technique a permis de quantifier le VMF à partir des DBS dans une gamme comprise

entre 1 et 100  $\mu\text{g/ml}$ . La précision et la justesse des échantillons de DBS avec différents niveaux d'hématocrite étudiés présentaient un coefficient de variation de 11,4% et un biais inférieur à 4,1% (Nijenhuis et al., 2014b). Cette méthode a permis de quantifier le VMF dans des échantillons DBS prélevés sur des patients atteints de mélanome et traités à différents schémas posologiques (240, 480 et 960 mg deux fois par jour). Contrairement à ce qui a été réalisé lors de la validation, les DBS de patients sont prélevés de façon non volumétrique puis perforés à l'aide d'un dispositif permettant de réaliser des disques de 3mm de diamètres.

La limite de quantification du VMF est bien inférieure aux concentrations les plus faibles mesurées chez les patients à l'état d'équilibre. Cette méthode de DBS a été développée pour étudier plus en détail la pharmacocinétique du VMF chez les patients atteints de mélanome (Nijenhuis et al., 2017).

En conclusion, les méthodes bioanalytiques permettant l'analyse quantitative des médicaments anticancéreux dans les DBS sont rares mais les résultats sont prometteurs. L'influence de l'hématocrite, du volume et de la capacité de diffusion du sang dans l'analyse des DBS reste un défi et doit être étudiée en profondeur lorsque les prélèvements sont réalisés de façon non volumétrique.

Avec l'introduction de thérapies ciblées en oncologie, la médecine personnalisée progresse et le STP des médicaments à partir des DBS présente un grand intérêt.

## CHAPITRE 2 – Validation d’une méthode de dosage du vémurafénib par LC-MS/MS à partir d’une goutte de sang séché (DBS)

La validation de méthode est un élément majeur pour démontrer la fiabilité des résultats analytiques générés et les compétences des laboratoires accrédités. Le présent travail a porté sur la mise au point et la validation d’une méthode de dosage du vémurafénib (VMF) par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à partir de gouttes de sang séché sur buvards à l’aide de dispositifs volumétriques (DBS, Hemaxis™). La méthode validée a ensuite été comparée à l’ancienne méthode utilisée au laboratoire pour le dosage du VMF dans le plasma recueilli à partir d’un prélèvement veineux conventionnel. Elle a enfin été appliquée au suivi thérapeutique pharmacologique du VMF dans une cohorte d’enfants atteints d’histiocytose Langerhansienne.

### 1 Matériels et méthodes

#### 1.1 Produits chimiques et matériaux

Le standard de référence du VMF ( $C_{23}H_{18}ClF_2N_3O_3S$ , 98%) provient de Sigma-Aldrich (Paris, France) et l’étalon interne (EI) deutéré vémurafénib- $^{13}C_6$  (VMF- $^{13}C_6$ ) provient d’Alsachim (Illkirch-Graffenstaden, France). Les solvants de qualité HPLC à savoir le méthanol (MeOH) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) proviennent de Sigma-Aldrich (Paris, France). L’acétonitrile (ACN) de qualité HPLC ainsi que l’acide formique concentré (100%) proviennent de VWR International (Merck, Fontenay sous-Bois, France). L’eau ultra pure (résistivité 18 M $\Omega$ ) est obtenue à partir du système de purification Milli-Q® (Merck, Fontenay sous-Bois, France). Les dispositifs d’échantillonnage HemaXis™ ainsi que les buvards Whatman 903™ ont été obtenus auprès de DBS System SA (Gland, Suisse). Les échantillons de plasma ou sang total vierges sont fournis par l’Etablissement Français du Sang (EFS, Le Chesnay, France). Des échantillons veineux de sang total vierge ont également été collectés sur des tubes EDTA auprès du service d’hématologie biologique de l’hôpital Raymond Poincaré (Garches, France).



## 1.2 Solutions mères, standards de calibration et contrôles de qualité

La solution mère de VMF est préparée à la concentration de 10 mg/mL dans un mélange DMSO/MeOH (1,1 ; v/v). Des solutions de travail servant à préparer les standards de calibration (SC) et les contrôles de qualité (CQ) sont préparées en double à 1 mg/mL, 500 µg/mL, 100 µg/mL et 1 µg/mL par dilution successives de la solution mère dans le MeOH. La solution de travail de vémurafénib-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (EI) à 10 µg/mL est obtenue par dilution dans le MeOH de la solution mère à 1 mg/mL préparée dans le DMSO. L'ensemble des solutions est conservé à -20°C.

La courbe de calibration est obtenue en surchargeant du plasma ou du sang total vierge avec des quantités adaptées de VMF. Pour ce faire, des volumes appropriés de solutions de travail sont évaporés sous air avant d'être repris par le plasma ou le sang total vierge de façon à générer 7 niveaux de SC à 1, 5, 10, 25, 50, 75 et 100 µg/mL. Trois niveaux de CQ à 15, 45 et 80 µg/mL sont obtenus en surchargeant du plasma ou du sang total vierge de la même façon. Pour générer les SC et les CQ extemporanément sous forme de DBS, 10 µL de sang total surchargé en VMF sont déposés à l'aide d'une pipette de laboratoire calibrée sur un buvard Whatman 903™. Les buvards sont ensuite séchés à plat sur une paillasse, à l'air libre, pendant deux heures.

## 1.3 Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est similaire pour les SC, les CQ et les échantillons de patients prélevés sur buvards ou par ponction veineuse conventionnelle (liquide). Les DBS générés lors des étapes de prélèvement ou de surcharge sont récupérés entièrement afin de correspondre à un volume exact de 10 µL de sang total.

Dans un tube Eppendorf de 2 mL, 10 µL d'EI (10 µg/mL) et 1 mL d'un mélange H<sub>2</sub>O/ACN (1/3 ; v/v) sont ajoutés à 10 µL de plasma, de sang total ou à un spot de sang séché. Après 30 secondes d'agitation à l'aide d'un vortex, ils sont laissés 10 minutes sur la paillasse à température ambiante avant d'être centrifugés 10 minutes à 14 000 tours par minutes. Le surnageant est ensuite récupéré, mise en vial et 10 µL sont injectés dans le système de chromatographique.

## 1.4 Conditions analytiques de la méthode LC-MS/MS

Le système employé est un spectromètre de masse de type TSQ Vantage (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France) doté d'un passeur automatique de type Thermo-Pal, une pompe Accela Ultra haute pression (UPLC) et d'un détecteur de type triple quadripôle. La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne Hypersil Gold aQ (ThermoFischer, 100mm×2,1mm i.d., 1,9µm) protégée par une pré-colonne de garde (10mm×2,1mm). L'élution est effectuée en 5 minutes en mode isocratique avec une phase mobile composée d'un mélange d'eau acidifiée par 0,1% d'acide formique et de méthanol (H<sub>2</sub>O/MeOH ; 30/70 ; v/v) avec un débit de 0,5 mL/min. L'ionisation des molécules a été effectuée à l'aide d'une source d'électronébulisation (ESI, electrospray ionisation) en mode positif sous une tension électrique de +3,5 kV. La température du capillaire de transfert des ions vers le compartiment quadripolaire est fixée à 350°C. L'azote (N<sub>2</sub>MID350, Parker Hannifin France SAS, Contamine-Sur-Avre, France) a été utilisé comme gaz vecteur et gaz auxiliaire sous une pression respective de 40 et 20 unités arbitraires. Le gaz de collision utilisé est l'argon. La dissociation induite par la collision avec l'argon est réalisée avec une pression de 1,5 mTorr. L'acquisition des données est effectuée en mode « Selected Reaction Monitoring » (SRM) avec 2 transitions *m/z* pour chaque composé, une pour la quantification et l'autre pour la confirmation.

Les conditions et les paramètres de détection sont établis par infusion continue de chaque molécule mis en solution à 1 mg/L dans la phase mobile à un débit de 5 µL/min. La masse des ions parents et fils, les énergies de collision ainsi que les temps de rétention pour le VMF et son EI (VMF<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) sont donnés dans le tableau 2 (les ions de quantification sont présentés en gras).

L'acquisition des données qualitatives et quantitatives a été réalisée à l'aide des logiciels Xcalibur et LCQuan (ThermoFisher Scientific), respectivement.

Tableau 2 : Temps de rétention et paramètres de détection du VMF et de son EI

Molécule	Temps de rétention (min)	Ion précurseur (m/z)	Ion fragment (m/z)	Energie de collision (Ev)	S-Lens
VMF	2,8	490,2	<b>383,3</b>	26	170
	2,8	490,2	255,2	41	170
VMF <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	2,8	496,2	<b>389,2</b>	26	169
	2,8	496,2	261,2	41	169

### 1.5 Validation de la méthode

Dans le cadre de la nouvelle loi HPST, l'accréditation des laboratoires de biologie médicale est devenue obligatoire. Il est donc nécessaire de réaliser une validation de méthode selon la norme ISO 15189 relative aux laboratoires de biologie médicale. Les recommandations de l'IATDMCT (International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology) sur le « développement et la validation de méthodes des DBS pour la surveillance thérapeutique des médicaments » basés sur les directives de la validation des méthodes bioanalytiques de l'EMA (European Medicines Agency) et de la FDA (Food and Drug Administration) a été un support pour cette validation.

La procédure analytique appréciant les critères de performance du dosage du vémurafénib par LC-MS/MS comprend les paramètres suivants : choix du modèle de calibration et linéarité, spécificité, contamination inter-échantillon, limites de détection et de quantification, justesse et fidélité, effet matrice, rendement d'extraction, effet de l'hématocrite et études de stabilité. Chaque série analytique comprenait trois niveaux de CQ et un échantillon de sang exempt de VMF (« blanc ») extrait dans les mêmes conditions que les SC et les CQ.

- Modèle de calibration et linéarité

La fonction de réponse est l'aptitude du modèle mathématique choisi pour l'établissement des gammes de calibration à fournir des valeurs mesurées de signal proportionnelles à la concentration de l'analyte dans l'échantillon. La quantification a été réalisée en étudiant les rapports de surface du pic du VMF sur celui de son EI en fonction de la concentration sur six courbes d'étalonnage indépendantes obtenues sur des jours différents. Quatre modèles de régression, linéaire ou quadratique, avec ou sans pondération ( $1/x$ ,  $1/x^2$ ,  $1/y$ ,  $1/y^2$ ), ont ensuite été étudiés selon l'analyse du biais. Le modèle retenu est le modèle permettant de répondre aux conditions suivantes : les concentrations calculées devront présenter par rapport aux concentrations théoriques un biais inférieur à 20% pour la limite de quantification (LDQ) et 15% pour les autres SC, et au moins 75% des SC devront répondre à ces conditions.

- Spécificité

La spécificité est la capacité de la méthode à quantifier le VMF dans un échantillon sans que cette mesure soit faussée par la présence de composés endogènes de la matrice, responsables d'interférences spectrales (atténuation ou amplification du signal) ou de recouvrements de pics en chromatographie. La spécificité est évaluée par l'analyse de 6 lots différents de plasma et sang total humain vierges. Ceux-ci sont comparés au tracé obtenu à la limite de quantification. Ces matrices ne doivent pas présenter d'interférences significatives au temps de rétention du VMF et de son EI. Les interférences n'excédant pas 20% du signal à la limite de quantification et 5% du signal avec l'EI sont considérées comme non significatives.

- Contamination inter-échantillons (Effet mémoire)

Les phénomènes de contamination inter-échantillons peuvent être observés lors d'un passage d'une série d'échantillons contenant des concentrations variées de l'analyte recherché. Le test consiste à rechercher l'effet mémoire exercé par l'injection d'un échantillon contenant une concentration élevée sur l'injection de l'échantillon qui le suit. En pratique, la contamination inter-échantillons est évaluée, dans une même série, en injectant successivement trois échantillons « blancs » immédiatement après le passage d'un standard de concentration

élevée (200 µg/mL). La réponse obtenue au temps de rétention du VMF dans les échantillons blancs ne doit pas dépasser 20% de la réponse de la LDQ et 5% de la réponse de l'EI.

- Limite de détection (LDD)

La LDD est définie comme la concentration la plus faible pour laquelle les spectres MS/MS ont pu être identifiés avec un rapport du signal sur le bruit de fond supérieur à 3.

- Limite de quantification (LDQ)

La LDQ est adaptée aux concentrations habituellement attendues et correspond au premier point de gamme du domaine de mesure choisi. Elle est définie comme la plus faible concentration que le système puisse quantifier avec une justesse de  $100 \pm 20\%$  (ou biais  $\leq 20\%$ ) et une précision (CV)  $\leq 20\%$  sur une série de 6 mesures.

- Justesse et fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'essai d'un même échantillon homogène. La justesse exprime la différence entre la moyenne des valeurs mesurées et une valeur de référence. La fidélité et la justesse de la méthode ont été déterminées par l'analyse de trois niveaux de CQ (15, 45 et 80 µg/mL). Cette analyse s'est déroulée sur trois jours différents (inter-séries). Chaque jour, la courbe d'étalonnage et six déterminations de chaque niveau de CQ ont été réalisées (intra-séries). Basées sur les recommandations CLSI-EP05 du Clinical and Laboratory Standard Institute, les valeurs obtenues ont été examinées à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) à partir des écarts types intra-séries et inter-séries. Le coefficient de variation intra-séries prend en compte la variabilité des six répétitions par jour pendant trois jours et le CV inter-séries la variabilité des trois jours d'analyse. La fidélité s'exprime par le CV (%) des valeurs expérimentales de chaque série des différents niveaux de CQ. Les six valeurs de chaque niveau de CQ devront présenter un CV inférieur ou égal à 15%. La justesse s'exprime par le taux de recouvrement (%) en comparant la moyenne des concentrations calculées pour chaque niveau de CQ, à la concentration théorique. Les six valeurs de chaque niveau de CQ devront présenter un pourcentage de recouvrement moyen compris entre 85 et 115% de la valeur théorique.

- Effet matrice et rendement d'extraction

Afin de déterminer le potentiel suppresseur ou amplificateur d'ions de la matrice, l'effet matrice a été évalué sur du sang total, du plasma et des gouttes de sang séché sur buvard à deux niveaux de concentrations (15 et 80 µg/mL) et sur six matrices provenant de sujets différents. L'évaluation de l'effet matrice et du rendement d'extraction a été effectuée selon l'approche suggérée par Matuszewski *et al*, qui consiste à évaluer trois séries d'échantillons différents surchargés avec des concentrations connues et selon les critères suivants : une série d'échantillons surchargés avant l'étape d'extraction, une série d'échantillons surchargés après extraction et une série d'échantillons surchargés pour lesquels la matrice biologique est remplacée par la phase mobile (Matuszewski *et al.*, 2003).

L'effet matrice a été calculé en réalisant le rapport entre les aires obtenues pour les matrices surchargées sur celles des solutions préparées à la même concentration dans la phase mobile. Le rendement d'extraction a été calculé en comparant les aires obtenues sur les matrices surchargées avant l'étape d'extraction avec celles surchargées après extraction.

- Effet de l'hématocrite (Ht)

L'effet de l'hématocrite (Ht) sur la détermination des concentrations de VMF a été évalué.

Un échantillon de donneur sain a été utilisé pour générer trois niveaux d'Ht différents après ajout ou retrait de plasma : 24,9% (faible), 40,9% (Ht du donneur, moyen) et 58,8% (fort). Ces niveaux d'Ht ont été déterminés à l'aide d'un automate XN-L (Sysmex®).

Pour évaluer un éventuel impact de l'Ht sur la récupération du VMF, 5 réplicats des trois niveaux d'Ht préalablement surchargés à deux niveaux de concentrations (15 et 80 µg/mL) sont analysés selon la procédure analytique décrite précédemment. La série présentant l'Ht du donneur sain (40,9%, n= 5) est considérée comme la série de référence. Les concentrations mesurées pour les niveaux d'Ht faible et fort ont été normalisés par la moyenne des concentrations mesurées pour l'Ht de référence. L'effet de l'Ht est considéré comme significatif si le biais relatif se situe à  $\pm 15$  % du biais de l'Ht moyen.

- Études de stabilité

La stabilité des échantillons de sang total surchargés à faible et forte concentrations (15 et 80 µg/mL) et déposés sur des buvards a été évaluée à différentes températures (-20°C, 4°C, 60°C) pendant 7 jours, et à température ambiante pendant 14 jours. Six répliqués de DBS par condition de température et de temps ont été préparés le même jour et conservés dans les différentes conditions. La concentration obtenue après analyse le jour de la préparation (à T° ambiante) a été considérée comme concentration de référence (T0). Les DBS ont été analysés au cours de la même série d'analyses après une semaine aux différentes températures et après deux semaines à température ambiante.

Le biais de la concentration moyenne dans chaque condition d'étude (n=6) ne doit pas dépasser 15% de la concentration déterminée à T0.

Nous avons également étudié la stabilité des échantillons de CQ extraits et maintenus à +4°C pendant 48h dans le passeur automatique d'échantillons afin de permettre la réinjection des extraits dans certaines situations (arrêt de l'automate par exemple). Le biais des concentrations obtenues à H48 ne doit pas dépasser 15% des concentrations obtenues initialement.

Remarque : Les taux de recouvrements, biais et coefficients de variations (CV) sont calculés selon les formules suivantes :

$$\text{Recouvrement (\%)} = \frac{\text{valeur mesurée}}{\text{valeur théorique}} \times 100$$

$$\text{Biais (\%)} = \frac{\text{valeur mesurée} - \text{valeur théorique}}{\text{valeur théorique}} \times 100$$

$$\text{CV (\%)} = \frac{\text{Ecart type}}{\text{moyenne}} \times 100$$

## 1.6 Application au suivi thérapeutique pharmacologique du VMF dans une cohorte d'enfants atteints d'histiocytose langerhansienne

La méthode validée a été appliquée à des échantillons de patients atteints d'histiocytose langerhansienne (HL) inclus dans une étude observationnelle européenne sous traitement par thérapie ciblée au VMF.

Chez huit patients, nous avons recueilli simultanément des échantillons de sang total prélevés par ponction veineuse dans des tubes d'héparinate de lithium sans gel, ainsi que des DBS recueillis sur le dispositif HemaXis™ DB 10 (DBS System SA, Gland, Suisse). Les échantillons de sang total ont été centrifugés pendant 10 minutes à 14000 g et le plasma récupéré a été conservé à -20°C avant l'analyse. Les DBS ont été réalisés directement à partir de sang capillaire par prélèvement au bout du doigt lors des consultations périodiques d'onco-hématologie à l'hôpital Trousseau (Paris) et Clocheville (Tours). Dans les services ne disposant pas de dispositif de prélèvement sur buvard ou quand la situation clinique ne le permettait pas (difficulté de réaliser les deux prélèvements par ponction et sur buvard simultanément), les DBS ont été réalisés au laboratoire à partir des échantillons de sang veineux appliqués dans le dispositif volumétrique afin de générer un volume précis de 10 µL. Les buvards ont été séchés pendant au moins deux heures, avant d'être analysés ou transportés au laboratoire à température ambiante. A la réception au laboratoire, les buvards ont été inspectés visuellement afin de s'assurer de la conformité de l'échantillonnage. L'analyse du plasma hépariné a été réalisée en duplicat à partir d'une méthode LC-MS/MS développée et validée au laboratoire de pharmacologie et toxicologie de Garches. Brièvement, 10 µL de plasma sont précipités en présence de 10 µL d'EI VMF<sup>13</sup>C<sub>6</sub> à 10 µg/mL à l'aide d'un millilitre d'un mélange H<sub>2</sub>O/ACN (1/3, v/v). Après 30 secondes d'agitation et centrifugation (5 minutes, 10 000 tr/min) à température ambiante, le surnageant est récupéré et 10 µL sont injectés dans le système LC-MS/MS (Alvarez et al., 2014).

L'analyse des DBS a été réalisée sur quatre réplicats selon la méthode décrite dans la partie 2.4. L'étalon interne VMF-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> a été utilisé pour les deux techniques de dosage. Les résultats du dosage du VMF à partir des DBS ont été comparés aux résultats obtenus par dosage plasmatique chez un même patient.



La corrélation entre les concentrations sanguines (DBS) et plasmatiques a été étudiée à l'aide d'une régression pondérée de Deming. A partir de la courbe de corrélation générée, une prédiction des concentrations plasmatiques a été calculée à partir des concentrations sanguines sans correction individuelle de l'hématocrite selon l'équation [2] suivante :

Équation 2

$$[VMF]_{DBS} = [VMF]_{plasma} \times a + b$$

a : pente de la droite de regression

b : ordonnée à l'origine

[VMF]<sub>plasma</sub> : Concentration plasmatique de VMF (µg/mL)

[VMF]<sub>DBS</sub> : Concentration sanguine de VMF déterminée à partir du DBS (µg/mL)

Les concentrations plasmatiques calculées à partir de l'équation [1] ont ensuite été comparées à celles obtenues après analyse des échantillons de plasma (ponction veineuse) des mêmes patients à l'aide d'un diagramme de Bland-Altman. Les critères d'acceptation sont inspirés des recommandations de la FDA et l'EMA pour la validation des méthodes d'analyses biomédicales, à savoir une différence de concentration n'excédant pas ±20% de la moyenne pour au moins 67% des échantillons analysés.

L'ensemble des calculs et figures ont été réalisés à l'aide les logiciels statistique R (Version 1.1.463 ; <http://cran.r-project.org>) et Prism (Graphpad ; version 7.0).

## 2 Résultats

### 2.1 Optimisation de la méthode de prétraitement

Nous avons évalué l'effet de la sonication aux ultrasons sur le rendement de récupération du VMF à partir du buvard à différents taux d'hématocrite (24,5% ; 40,9% et 58,8%) et pour des niveaux de concentrations faible (15 µg/mL) et élevé (200 µg/mL). Selon un test statistique de Mann Whitney, les concentrations obtenues avec ou sans sonication au moment de l'extraction n'ont montré aucune différence significative ( $p > 0,05$ ). Quelle que soit la concentration, la sonication ne semble pas améliorer le rendement de récupération du VMF. Les résultats sont illustrés dans la figure 13.

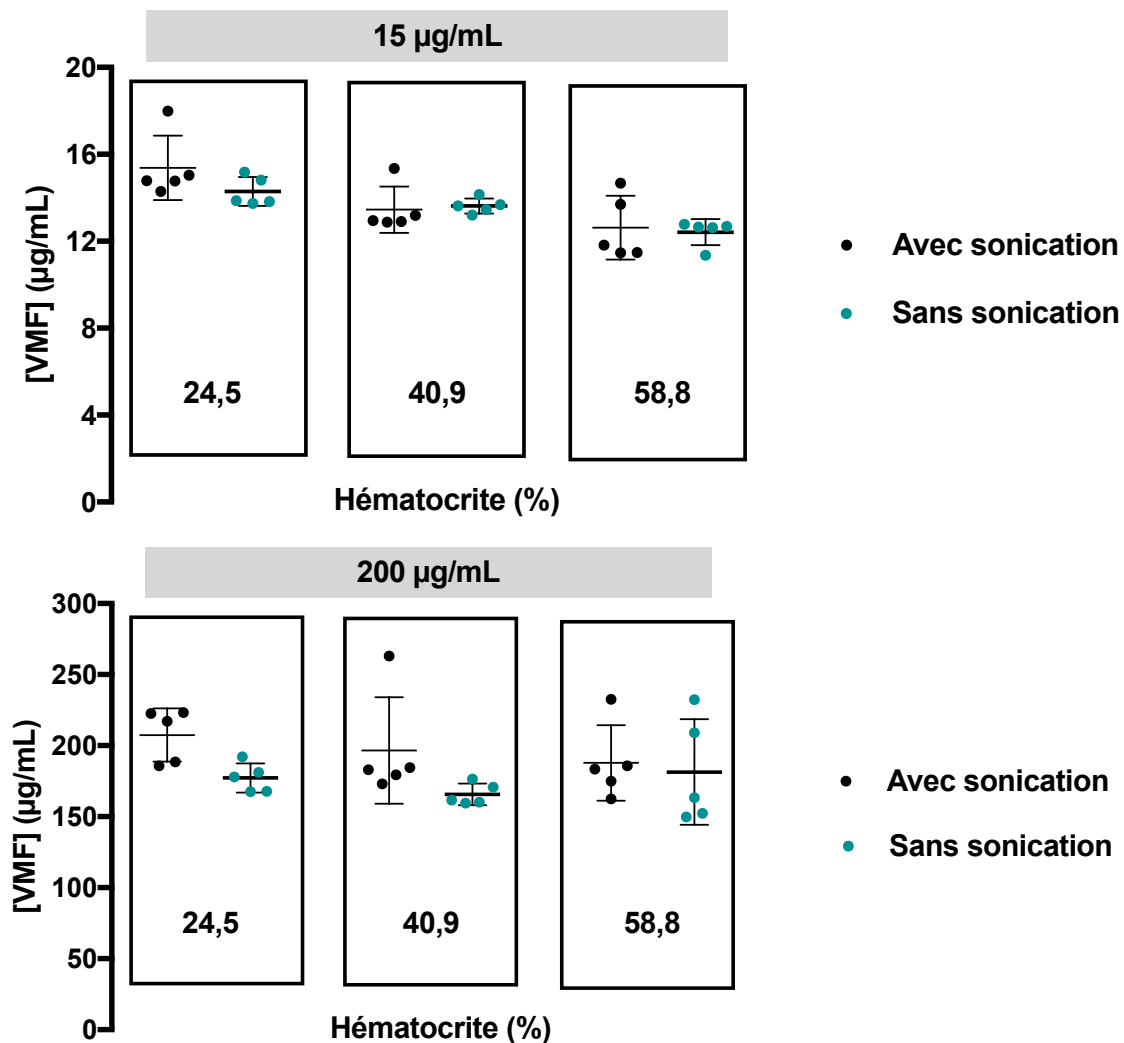


Figure 13 : Effet de la sonication sur le rendement de récupération du VMF

## 2.2 Validation de méthode

Le temps d'analyse (run) du VMF et son EI est de cinq minutes. La figure 14 représente les chromatogrammes du VMF et son EI, obtenus après l'analyse : (A) VMF (1 µg/mL) et VMF-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (10 µg/mL) ; (B) Echantillon « blanc ».

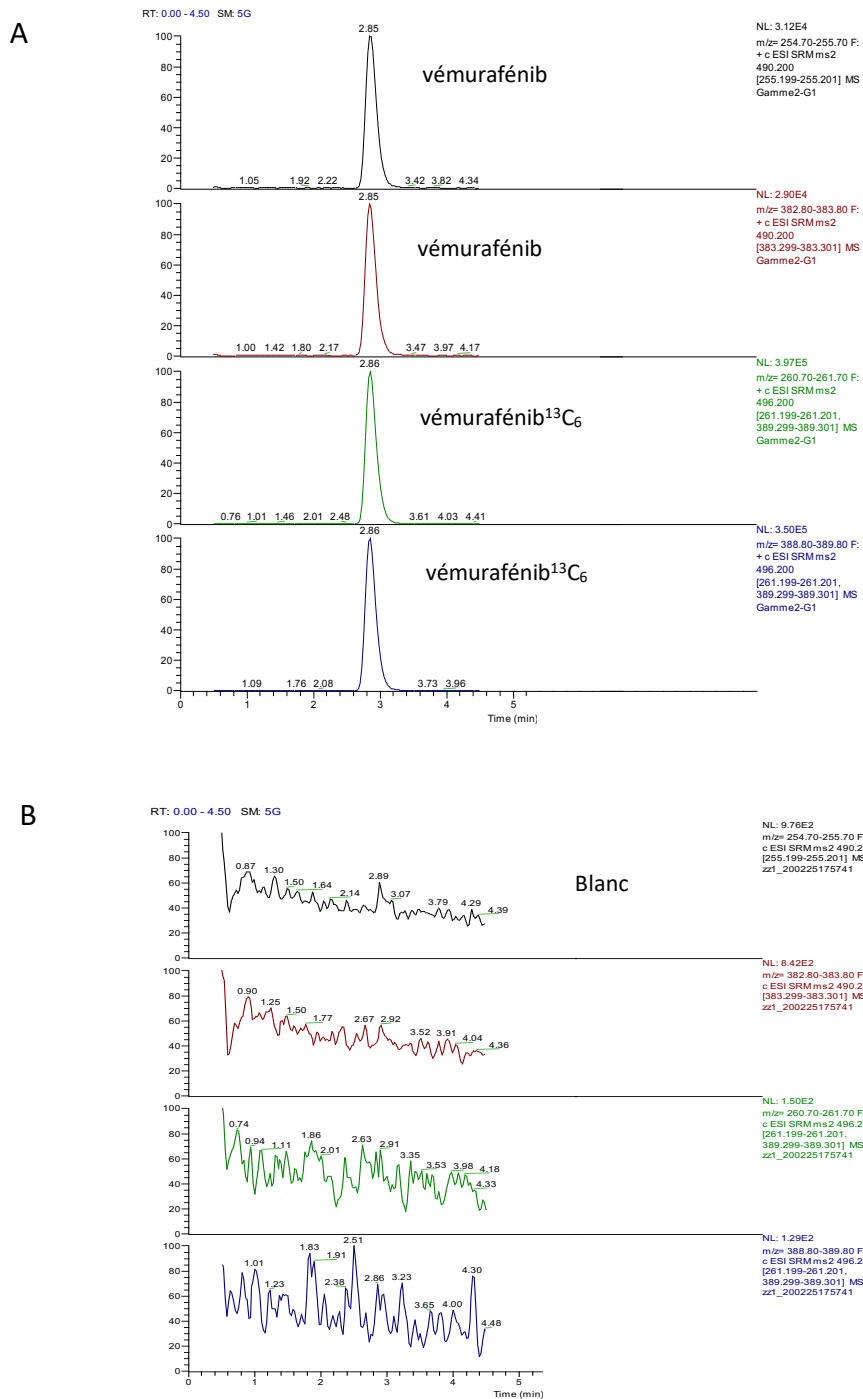


Figure 14 : Chromatogrammes du VMF et de son EI

Aucune interférence endogène de plasma ou sang total vierge n'a été observée aux temps de rétention et aux spectres SRM respectifs du VMF et son EI. De même, aucune contamination en mesure d'affecter l'exactitude des résultats n'a été observée lors de l'injection d'un échantillon « blanc » après trois passages consécutifs d'un standard élevé (200 µg/mL).

La linéarité a été testée entre 0,1 et 200 µg/mL avec un coefficient de détermination  $R^2$  à 0,996 (figure 15).

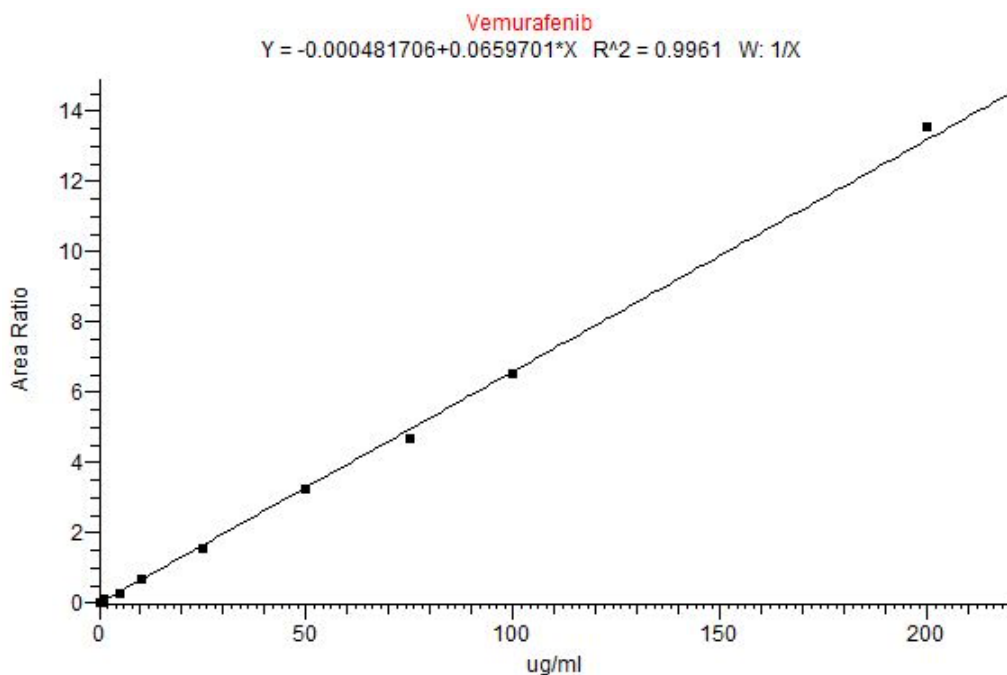


Figure 15 : Linéarité de la gamme de VMF testée entre 0,1 et 200 µg/mL

La validation a ensuite été effectuée sur le domaine de mesure compris entre 1 et 100 µg/mL, correspondant aux concentrations habituellement observées chez les patients atteints d'HL et de mélanome. La courbe de calibration en sept points a montré une bonne linéarité dans la plage de concentration de 1 à 100 µg/mL. Le coefficient de détermination  $R^2$  variait de 0,991 à 0,997. Le modèle linéaire utilisant une pondération de type  $1/x$  abouti aux meilleurs résultats de la fonction de réponse avec un biais compris entre 1% et 16% et un coefficient de variation (CV) compris entre 6% et 12%.

La LDD a été évaluée à 0,03 µg/mL. La LDQ évaluée à 1 µg/mL a montré un CV de 10% ainsi qu'un biais inférieur à 1%.

L'ensemble des paramètres de justesse et fidélité intra-jours et inter-jours évalués à partir d'échantillons surchargés en VMF aux 3 niveaux de CQ (15 ; 45 et 80 µg/mL) (n= 54) sont résumés dans le tableau 3. La justesse s'échelonne entre 94 et 101%. La fidélité, représentée par les CV intra-jours et inter-jours, varient entre 4,9 et 10,1% et entre 10,9 et 14,5%, respectivement.

*Tableau 3 : Justesse et fidélité intra-jours et inter-jours évaluées avec les DBS (n=54) aux 3 niveaux de CQ (15 µg/mL ; 45 µg/mL et 80 µg/mL)*

[VMF] (µg/mL)	Justesse Recouvrement (%)		Fidélité CV (%)	
	Intra-jour	Inter-jour	Intra-jour	Inter-jour
15	90,1 à 98,5	94,1	4,9	10,9
45	93 à 102	98,1	7	11,5
80	95,2 à 107,2	101,1	10,1	14,5

Le rendement de récupération et l'effet matrice des DBS sont satisfaisants, respectivement compris entre 81 et 87% et 100 et 116%. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec les matrices de sang total et plasma (tableau 4).

*Tableau 4 : Rendement d'extraction et effet matrice du VMF dans les DBS, le sang total et le plasma.*

	Molécule	Concentrations (µg/mL)	DBS	Sang total	Plasma
Rendement d'extraction (%)	VMF	15	87	100	98
		80	81	82	75
	EI	10	92	93	95
Effet matrice (%)	VMF	15	116	123	128
		80	100	103	109
	EI	10	117	126	125

Le taux de recouvrement (%) du VMF normalisé à l'Ht moyen mesuré à deux niveaux de concentration (15 et 80 µg/mL) et pour deux niveaux d'Ht (24,9%, et 58,8%) est conforme aux critères d'acceptabilité ( $\pm 15\%$  par rapport à la moyenne des échantillons avec un Ht de référence = 40,9%). La figure 16 illustre les taux de recouvrement normalisés à l'Ht moyen (%) en fonction des différents niveaux d'Ht évalués (24,5% ; 40,9% et 58,8%) (n=5) et à différentes concentrations : (A) 15 µg/mL et (B) 80 µg/mL.

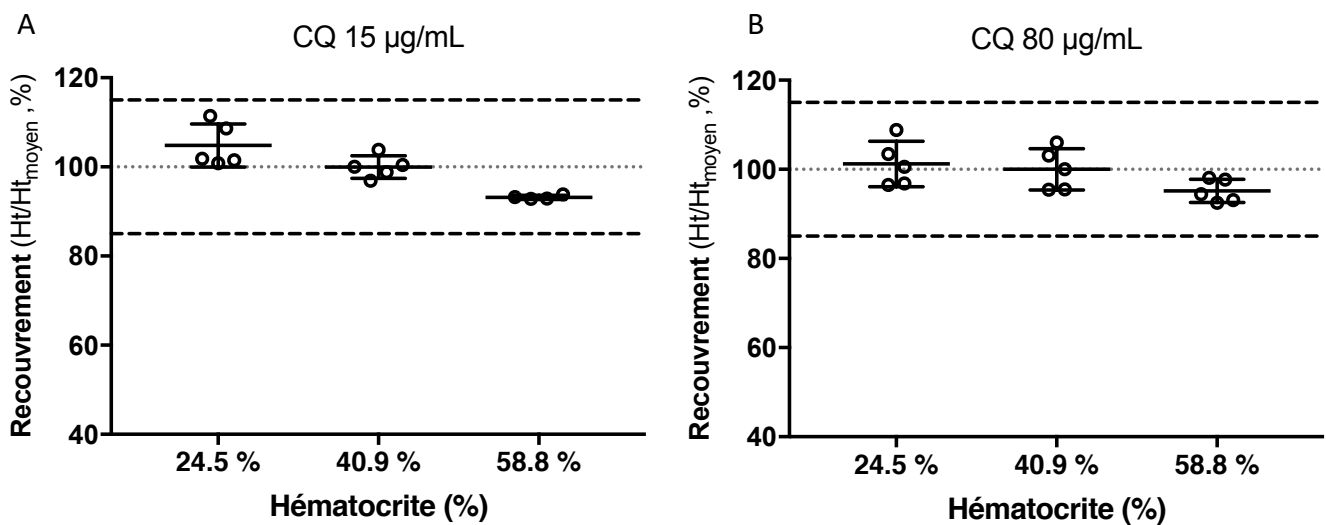


Figure 16 : Taux de recouvrement (%) du VMF à partir de DBS mesurés à différents niveaux d'Ht (24,9%, 40,9% et 58,8%) (n = 5) et normalisés aux résultats d'Ht moyen (40,9%)

L'étude de stabilité des CQ réinjectés après 48h de conservation à +4°C dans le passeur a montré une différence non significative entre les concentrations obtenues à H0 et à H48 (biais < 15%).

Les données de stabilité aux différentes températures et temps de conservation rapportées à la référence T0 montrent des résultats conformes aux critères d'acceptation préétablis ( $\pm 15\%$  par rapport à la référence T0) avec un biais compris entre 2 et 3% pour le CQ 15 µg/mL et un biais compris entre 3 et 9% pour le CQ 80 µg/mL.

Le VMF semble stable à température ambiante pendant au moins deux semaines, et à des températures extrêmes (entre -20° et +60°C) pendant au moins une semaine. Les résultats sont illustrés dans la figure 17.

La référence T0 correspond à la ligne 100% et représente une série d'échantillons mesurée le jour de la préparation des échantillons. Les données sont présentées comme le pourcentage moyen  $\pm$  écart type (n=6) de la concentration mesurée rapportée à la référence T0 à différentes concentrations : (A) 15  $\mu\text{g/mL}$  et (B) 80  $\mu\text{g/mL}$  et aux différentes conditions de conservation. Les lignes en pointillées représentent les limites d'acceptation  $\pm 15\%$  par rapport à la référence.

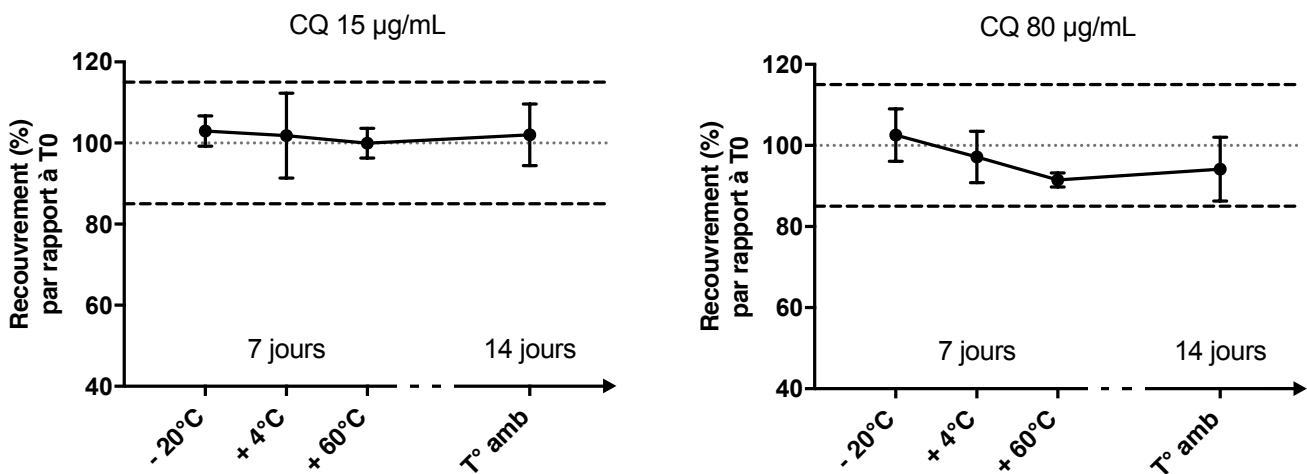


Figure 17 : Étude de stabilité du VMF dans les DBS dans différentes conditions de temps et de températures

## 2.3 Application au suivi thérapeutique pharmacologique du VMF dans une cohorte d'enfants atteints d'histiocytose langerhansienne

Dix échantillons DBS analysés en quatre réplicats associés à dix échantillons de plasma analysés en duplicats ont été recueillis. Sept patients prélevés lors de consultations dans le service d'hémo-oncologie pédiatrique de l'hôpital Trousseau (Paris) étaient atteints d'HL et l'un d'entre eux a bénéficié de deux prélèvements (n°5 et n°10) à 14 jours d'intervalle afin d'adapter la posologie. Un patient prélevé dans le service d'hémo-oncologie pédiatrique de l'hôpital Clocheville (Tours) atteint d'histiocytose non Langerhansienne atypique intracérébrale a également bénéficié de deux prélèvements (n°7 et n°9).

Trois prélèvements DBS ont été réalisés directement à partir de sang capillaire par prélèvement au bout du doigt (n°4, n°7 et n°9). Les autres prélèvements DBS ont été réalisés au laboratoire à partir des échantillons de sang veineux appliqués dans le dispositif volumétrique HemaXis™.

L'âge médian des patients était de 5,6 ans avec des âges compris entre 1,3 ans et 16 ans. Les doses de VMF allaient de 20 à 30 mg/kg par jour. Les patients avaient tous atteint la concentration d'équilibre (J14) après instauration du traitement ou adaptation de posologie. Le VMF a été correctement détecté dans tous les échantillons de patients, illustration avec le chromatogramme du VMF mesuré dans un des DBS du prélèvement n°10 à la concentration de 23 µg/mL (figure 18).

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 5.

*Tableau 5 : Concentrations de VMF mesurées à partir des DBS (n= 4) et d'échantillons de plasma (n=2)*

	âge	Conc. DBS 1 (µg/mL)	Conc. DBS 2 (µg/mL)	Conc. DBS 3 (µg/mL)	Conc. DBS 4 (µg/mL)	Conc. moy. DBS (µg/mL)	CV (%)	Conc. moy. plasma (µg/mL)
1	7,25	5,4	6,4	5,3	5,5	5,7	9%	11,6
2	4,92	11,5	12,1	11,6	11,4	11,7	3%	21,3
3	9	15,8	12,6	12,2	12,5	13,3	13%	26
4	4,75	11,3	10,9	10,8	-	11,0	2%	18
5	1,25	53,3	49,5	47,7	48,7	49,8	5%	91
6	6,33	23,4	23,8	23,9	23,5	23,7	1%	38,9
7	16,2	25,8	29,2	32,8	25,7	28,4	12%	50
8	1,17	12,2	11,7	12,1	11,6	11,9	2%	23
9	16,2	27,8	26,7	28,9	23,9	26,8	8%	47
10	1,3	23	22,7	23	22,6	22,8	1%	38,2



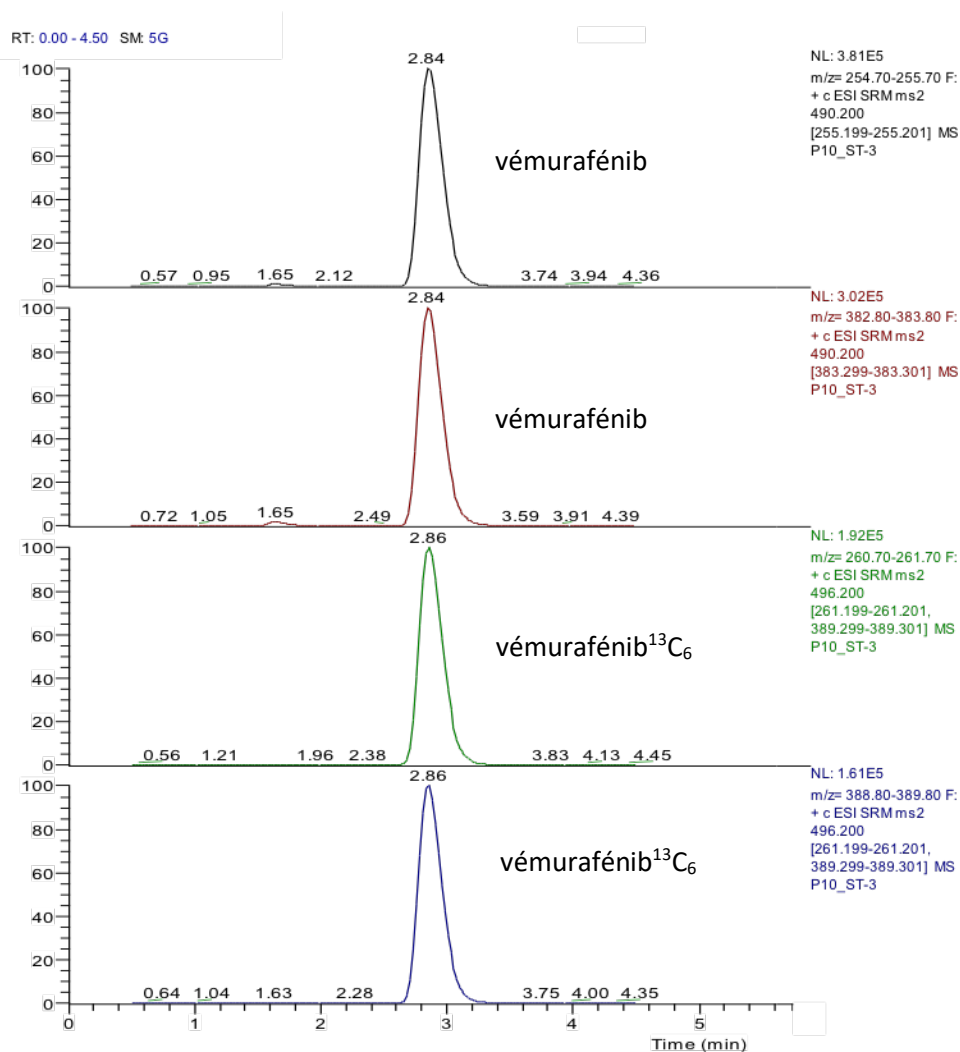


Figure 18 : Chromatogramme du VMF et de son EI mesuré dans un DBS de patient à la concentration de 23 µg/mL

Un contrôle visuel des buvards a mis en évidence deux problèmes d'échantillonnages illustrés dans la figure 19. Le premier dysfonctionnement (A) était sans conséquences pour l'analyse et comportait un buvard avec des excès de sang au-dessus du périmètre délimitant le volume de 10 µL (prélèvement n°7). Les quatre gouttes de sang ont pu être analysées normalement en veillant à ne pas introduire l'excès de sang. Le second dysfonctionnement (B) concernait le dispositif Hemaxis™ qui révélait un résidu de sang dans le capillaire de transfert illustrant une vidange incomplète sur le buvard (volume < 10µL). L'échantillon a été exclu de l'analyse (prélèvement n°4).

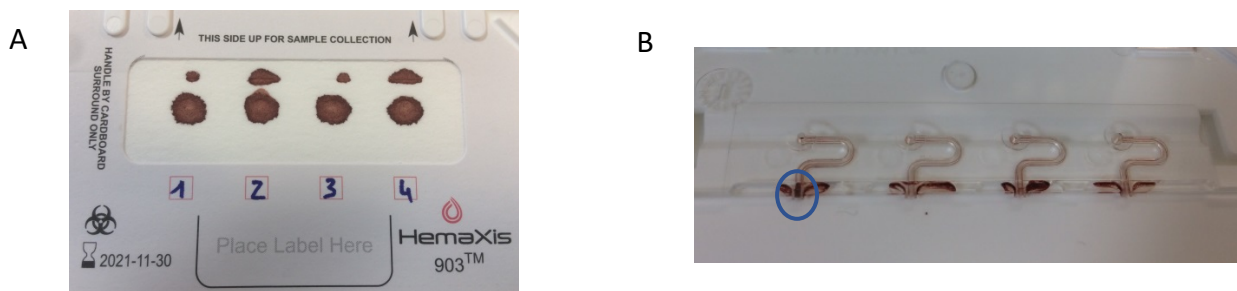


Figure 19 : Dysfonctionnements observés lors du contrôle visuel de deux échantillons DBS (A : volume par excès, B : volume insuffisant)

Une comparaison entre les concentrations mesurées dans le sang total et celles mesurées dans les DBS a été réalisée pour le prélèvement n°10 (n=4). La moyenne des concentrations mesurées dans ces deux matrices semblait similaire à celle des concentrations mesurées dans les DBS, respectivement  $22,9 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$  et  $22,8 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ .

L'analyse des quatre DBS pour l'ensemble des patients (n=10) montre une excellente reproductibilité avec un CV compris entre 1% et 13% (Figure 20).

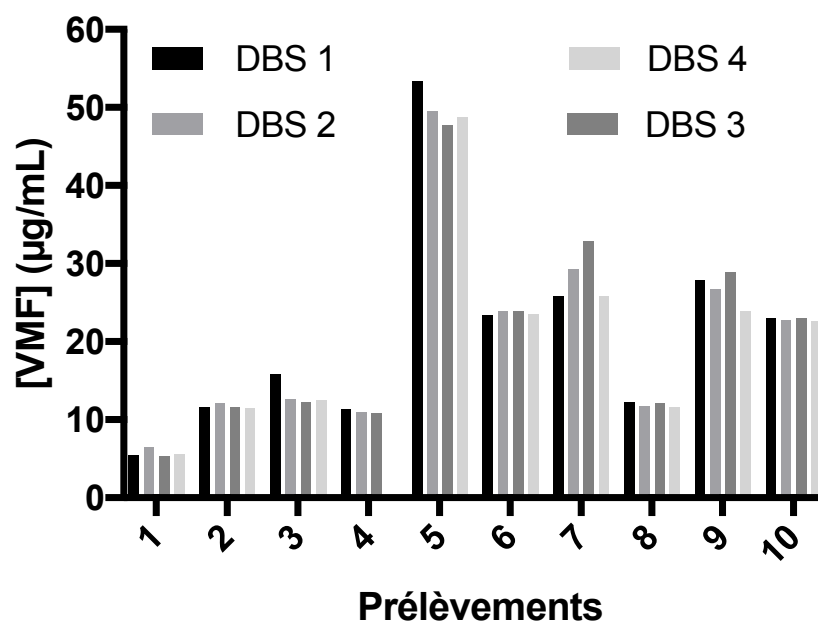


Figure 20 : Reproductibilité des résultats de dosage de VMF sur DBS (n=40)

Les moyennes des différentes concentrations mesurées à partir des DBS et des échantillons plasmatiques ont été analysées. Les concentrations de VMF observées à partir des DBS étaient systématiquement inférieures aux concentrations plasmatiques correspondantes du même patient (Figure 21).

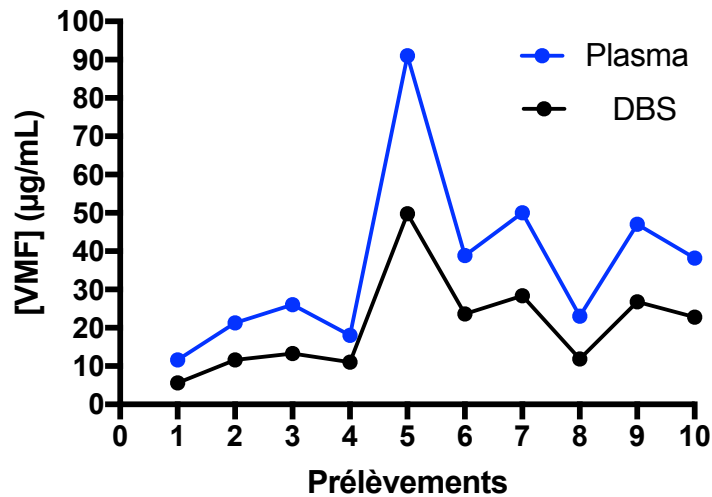


Figure 21 : Moyenne des concentrations de VMF mesurées à partir d'échantillons plasmatiques et DBS

La figure 22 montre la relation entre la moyenne des concentrations de VMF plasmatiques observées et celles déterminées à partir des DBS. Une parfaite corrélation a été observée entre les résultats des deux matrices, avec un coefficient de corrélation de Pearson  $r = 0,998$ . L'analyse de régression pondérée de Deming a permis de calculer une pente égale à 0,59 (95% IC, 0,55 à 0,63) avec une ordonnée à l'origine de  $-0,76 \mu\text{g/mL}$  (95% IC,  $-1,73$  à  $0,85 \mu\text{g/mL}$ ).

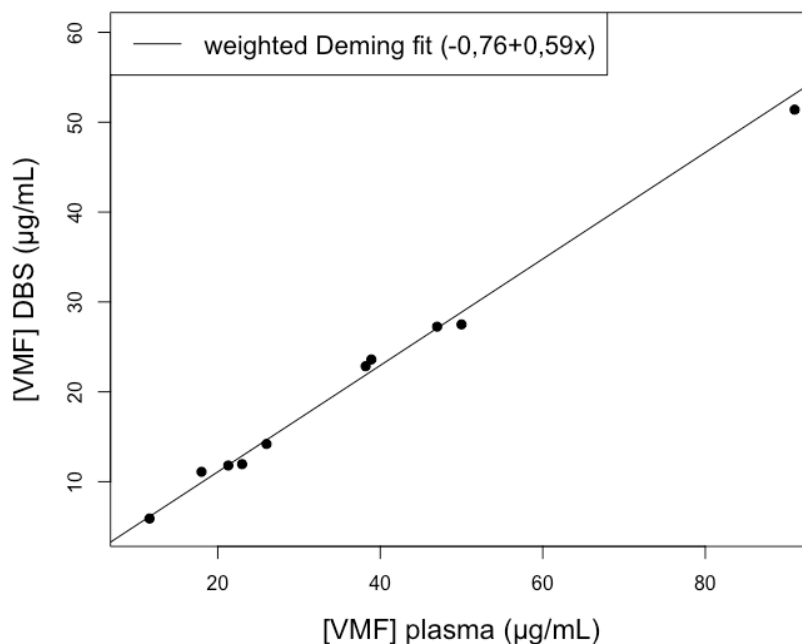


Figure 22 : Corrélation et pente de régression pondérée de Deming entre la moyenne des concentrations de VMF plasmatiques observées et celles calculées à partir des DBS

En utilisant les concentrations obtenues à partir des DBS, les concentrations plasmatiques ont pu être calculées à partir de l'équation (2) décrite dans la partie 2.6 et sont présentées dans le tableau 6 :

Tableau 6 : Concentrations plasmatiques de VMF mesurées versus concentrations plasmatiques calculées à partir des DBS

	Conc. plasmatiques mesurées (µg/mL)	Conc. plasmatiques calculées (µg/mL)	Biais (%)
1	11,6	11,2	3%
2	21,3	21,3	0%
3	26	25,4	2%
4	18	20,1	-12%
5	91	88,8	2%
6	38,9	41,4	-6%
7	50	48,0	4%
8	23	21,5	6%
9	47	47,6	-1%
10	38,2	40,1	-5%

La régression des concentrations plasmatiques mesurées et calculées a permis d'obtenir une pente égale à 1,01 (95% IC, 0,94 à 1,07) et une ordonnée à l'origine égale à -0,19 (95% IC, -1,6 à 2,4). Les biais entre les concentrations plasmatiques observées après analyse des échantillons de plasma et celles calculées à partir des résultats de dosage obtenus sur DBS varient entre 0 et 12% et sont ainsi satisfaisants ( $\leq 20\%$ ).

Nous avons comparé la méthode de référence (dosage plasmatiques direct) avec la méthode mise au point dans cette étude (dosage à partir des DBS et calcul des concentrations plasmatiques équivalentes). La figure 23 représente un graphique de Bland-Altman illustrant la différence des concentrations obtenues par les deux méthodes en fonction des niveaux de concentration de VMF (valeur exprimée en moyenne). La moyenne des différences est égale à -0,04 et donne une information sur le biais systématique.

La représentation graphique permet une analyse de chaque couple de valeur ( $[VMF]_{\text{plasma}}$  calculée et  $[VMF]_{\text{plasma}}$  mesurée) et permet d'observer que l'ensemble des couples est dispersé autour de 0 et compris dans l'intervalle de confiance à 95% avec des valeurs entre -3,4 et 3,5. Les points semblent se répartir aléatoirement autour de l'axe horizontale supposant une bonne concordance entre les deux méthodes. Les « limites supérieures et inférieures 95% » représentent une estimation de l'intervalle dans lequel 95% des futures différences entre les deux méthodes se trouveront.

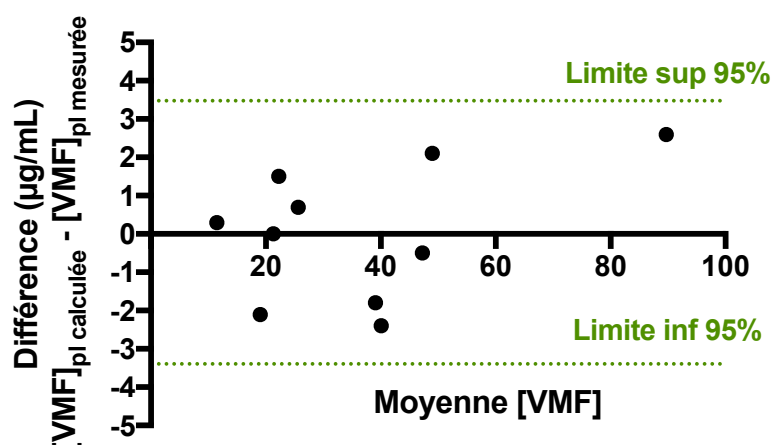


Figure 23 : Graphique Bland-Altman comparant les méthodes d'analyses des concentrations plasmatiques mesurées et calculées

### 3 Discussion

La méthode analytique de dosage de VMF à partir d'échantillons DBS est validée sur un intervalle de 1 à 100 µg/mL ( $r^2 \geq 0,991$ ).

De nombreuses méthodes analytiques de dosage du VMF ont déjà été décrites incluant des analyses par LC-MS/MS (Alvarez et al., 2014; Nijenhuis et al., 2014a, 2014b) ou HPLC-UV (Zhen et al., 2013).

Cette méthode nous a permis de quantifier le VMF sur des DBS de patients atteints d'HL avec un volume réduit de 10 µL. Seul Nijenhuis *et al.* a développé une méthode de dosage du VMF en LC-MS/MS en utilisant un volume légèrement plus élevé (15 µL) pour générer les DBS (Nijenhuis et al., 2014b). Cependant, ces DBS ont été prélevés de façon non volumétrique puis perforés à l'aide d'un dispositif permettant de réaliser des disques de 3 mm de diamètres sans réellement maîtriser le volume exact utilisé (Nijenhuis et al., 2016).

Contrairement aux concentrations plasmatiques de VMF observées chez les adultes atteints de mélanome (entre 40 et 100 µg/mL) (Funck-Brentano et al., 2015; Goldwirt et al., 2016; Kramkimel et al., 2016), les concentrations plasmatiques de VMF habituellement observées chez des enfants atteints d'HL semblent nettement plus basses (10 à 25 µg/mL) (Donadieu et al., 2019). Les limites de détection (LDD) et de quantification (LDQ) de la méthode que nous avons développée, évaluées à 0,03 µg/mL et 1 µg/mL respectivement répondent parfaitement aux besoins du suivi pharmacologique de la population pédiatrique. Ainsi, la sensibilité de la méthode employée permet de déceler des posologies inefficaces correspondant à des concentrations plasmatiques situées en dessous de l'intervalle thérapeutique (< 10 µg/mL). L'évaluation de la justesse et de la fidélité est satisfaisante avec une justesse supérieure à 88,3% et des CV inférieurs à 10,1%.

Avec un prétraitement minimaliste de l'échantillon (extraction statique sans étape de sonication), la méthode d'extraction des DBS est simple et rapide. La méthode décrite par Nijenhuis *et al.* nécessite une étape supplémentaire qui consiste à agiter les DBS avec les solvants d'extraction pendant 30 minutes à 1250 tr/min, augmentant le temps de prétraitement (Nijenhuis et al., 2014b).

Le rendement de récupération du VMF à partir des buvards semble comparable à celui obtenu avec les matrices conventionnelles (sang, plasma) et semble très peu affecté par les valeurs d'hématocrites. Aussi, l'effet matrice semble négligeable au regard des résultats obtenus sur les trois matrices (DBS versus sang/plasma). Les échantillons de patients prélevés sur DBS, plasma ou sang total pourront ainsi être analysés et quantifiés sur la même gamme de calibration quelle que soit la matrice utilisée.

Nous avons mis en évidence l'intérêt de réaliser une inspection attentive du dispositif et du buvard à l'arrivée au laboratoire afin de déceler des erreurs de prélèvements rendant l'échantillon non conforme. Néanmoins, les faibles volumes d'échantillon requis par la méthode validée permettent d'obtenir un nombre confortable de DBS (n=4) et augmente les chances d'avoir un prélèvement conforme et donc de réaliser la quantification du VMF.

Les résultats de laboratoire dépendent de la qualité de l'échantillon analysé et l'étape pré-analytique représente jusqu'à deux tiers des erreurs retrouvées (Bush, 2012). La qualité du DBS dépend du préleveur et n'est pas toujours aisée à évaluer.

Il a été décrit dans la littérature des différences de concentrations entre le sang veineux et le sang capillaire, notamment en raison d'un prélèvement de mauvaise qualité dilué par le liquide tissulaire (Capiou et al., 2019). Le retrait de la première goutte générée avant l'application sur le dispositif est indispensable et son oubli pourrait entraîner des sous-estimations de la concentration. De la même façon, le remplissage incomplet du micro-capillaire avant dépôt sur le buvard pourrait aboutir à la même observation. Toutefois, une démonstration aux parents devrait suffire pour réaliser des prélèvements conformes à domicile.

Les résultats de stabilité sont comparables à ceux retrouvés dans la littérature qui prouvent une grande stabilité du VMF à température ambiante. Nijenhuis a montré que le VMF était stable pendant 2 ans sur des buvards FTA DMPK-A à température ambiante (Nijenhuis et al., 2017). Cependant, à notre connaissance, aucune étude de stabilité du VMF soumis à des températures extrêmes n'a été réalisée dans les DBS. Ainsi, nous avons testé la stabilité du VMF dans les DBS à différentes conditions, notamment à des températures extrêmes (-20°C ou 60°C) pendant une semaine, permettant de mimer les conditions de transport potentielles

d'un échantillon DBS. Ce test d'épreuve a révélé la stabilité du VMF encourageant la possibilité d'envoi des dispositifs par voie postale quelle que soit la provenance et le moyen de transport. Les DBS peuvent donc être réalisés à domicile, procurant plus de confort au patient en évitant les déplacements inutiles en laboratoire de ville ou à l'hôpital.

Dans l'étude réalisée par Donadiou *et al.*, le suivi thérapeutique pharmacologique du VMF a été réalisé sur des patients atteints d'HL provenant du monde entier. Le coût de transport des échantillons rapportés par certains patients (ex : un échantillon en provenance d'Argentine) coutait aux alentours de 700 euros. Le prix d'un dispositif Hemaxis™ étant évalué à une quinzaine d'euros, l'envoi d'un DBS permettrait de réduire drastiquement les coûts de transports et ainsi de faire bénéficier du suivi thérapeutique pharmacologique du VMF à un plus grand nombre d'enfants atteints d'HL réfractaires. De plus, l'inclusion d'un plus grand nombre de patients chez qui un suivi thérapeutique pharmacologique serait réalisé permettrait de décrire de façon plus précise les paramètres pharmacocinétiques du VMF au sein de cette population.

Les concentrations de VMF observées à partir des DBS étaient systématiquement inférieures aux concentrations plasmatiques d'un même patient. Cependant, les valeurs thérapeutiques actuellement disponibles pour le VMF correspondent aux concentrations plasmatiques. Ainsi, l'interprétation des résultats de suivi thérapeutique pharmacologique du VMF nécessite de récolter de nouvelles données thérapeutiques réalisées sur du sang total ou d'avoir un modèle de prédiction des concentrations plasmatiques.

Les concentrations plasmatiques semblaient fortement corrélées avec les concentrations obtenues à partir des DBS. L'analyse de régression a permis de calculer les concentrations plasmatiques à partir de l'équation [2] décrite dans la partie 2.6 de ce chapitre.

La relation entre les deux concentrations pourrait ainsi être décrite par :

$$[\text{VMF}]_{\text{plasma}} = \frac{[\text{VMF}]_{\text{DBS}} + 0,76}{0,59}$$

Notre méthode de calcul des concentrations plasmatiques de VMF à partir d'un micro-échantillonnage de sang total standardisé sur buvard semble acceptable. Les différences observées entre les concentrations plasmatiques calculées à partir des DBS et les



concentrations plasmatiques analysées présentait des biais entre 0 et 12%, conforme aux recommandations de la FDA et l'EMA pour la comparaison de méthodes analytiques biomédicales.

Un échantillon de patients plus important permettrait d'ajuster le modèle de calcul utilisé dans cette étude et d'obtenir ainsi des valeurs de concentrations plasmatiques plus justes à partir des dosages réalisés sur DBS. Le cas de maladies rares et hétérogènes comme l'HL ne permettent pas d'obtenir un grand nombre d'échantillons. En augmentant le nombre d'échantillon par la réalisation de micro-prélèvements, cela permettrait de décrire de façon plus précise les paramètres pharmacocinétiques du VMF au sein de cette population.

Toutefois, nos résultats sont comparables à ceux de Nijenhuis *et al.*, qui a corrélé les concentrations de VMF plasmatique et issues de DBS dans une cohorte de huit patients adultes atteints de mélanome, les résultats ont donné une droite avec une pente égale à 0,64 et une ordonnée à l'origine égale à -0,83 µg/mL.

De plus, la différence obtenue entre les concentrations plasmatiques et sanguines peut s'expliquer par la répartition du VMF entre les globules rouges et le plasma ( $K_{GR:plasma}$ ), ainsi qu'à la valeur d'hématocrite propre à chaque patient (Jager *et al.*, 2014). Cependant, selon une étude réalisée par Nijenhuis *et al.*, aucune correction individuelle de l'hématocrite n'est nécessaire pour évaluer la concentration plasmatique à partir des concentrations observées sur les DBS (Nijenhuis *et al.*, 2014b). Cette conclusion est confortée par nos résultats ne montrant aucun effet de l'hématocrite du patient sur la concentration du VMF.

Il paraît de ce fait que la différence observée entre les concentrations sanguines et plasmatiques de VMF semble être liée à sa répartition entre les globules rouges et le plasma. Selon le rapport de l'EMA concernant les caractéristiques de distribution du VMF, le pourcentage global de  $^{14}C$ -VMF associé aux globules rouges était de  $11,40 \pm 3,75$  chez l'homme, ce qui nous permet de déduire le pourcentage global de VMF présent dans le plasma à 88,6% et ainsi de calculer la constante de répartition du VMF entre les globules rouges et le plasma ( $K_{GR:plasma}$ ) à 0,129. Ainsi, en s'inspirant de l'équation [1] (décrite dans la partie 2.5 du chapitre 1), le dénominateur de l'équation est égal à 0,65. C'est une valeur très similaire à la pente de régression obtenue à partir de notre méthode de calcul des concentrations qui donnait une pente égale à 0,59.

Cette méthode analytique simple et performante couplée à une bonne prédiction des concentrations plasmatiques à partir des DBS ouvre une nouvelle perspective au suivi thérapeutique pharmacologique du VMF et d'un grand nombre de médicaments utilisés en pratique clinique, notamment chez l'enfant (ex : anticancéreux, antiépileptiques).

L'intérêt de la méthode validée dans cette étude est illustré à travers deux situations évoquées ci-dessous :

**1) Première situation** : pour une dose de 240 mg matin et soir, la concentration plasmatique en VMF chez l'un des 8 patients (prélèvement n°5) était de 91 µg/mL, largement supérieure aux concentrations habituellement observées dans cette population pédiatrique (N : 10-25 µg/mL). Avec une telle concentration, le patient est à risque de toxicité et une diminution de posologie est recommandée. La concentration mesurée sur DBS était de 49,8 µg/mL et la concentration plasmatique calculée à partir de notre modèle révélait une concentration de 88,8 µg/mL. L'interprétation de la concentration calculée aurait été similaire à celle de l'analyse directe réalisée sur plasma. Suite à une adaptation de posologie à 240 mg le matin et 120 mg le soir, un contrôle (prélèvement n°10) a été réalisé deux semaines plus tard. Les concentrations plasmatiques calculées semblaient décroissantes mais toujours élevées (40,1 µg/mL). L'interprétation était similaire à celle de l'analyse plasmatique retrouvant une concentration égale à 38,8 µg/mL.

**2) Deuxième situation** : un traitement par VMF a été instauré chez une patiente atteinte d'histiocytose non Langerhansienne atypique intra-cérébrale mutée BRAF. Le résultat de la concentration plasmatique calculée à partir du DBS prélevé lors de la consultation était de 48 µg/mL pour un premier contrôle (prélèvement n°7) réalisé 20 jours après l'instauration du traitement. La concentration plasmatique mesurée parallèlement était quant à elle à 50 µg/mL. La patiente âgée de 16 ans présentait dans l'ensemble une bonne tolérance au traitement. Elle présentait toutefois un effet indésirable léger de type éruption cutanée diffuse (visage, thorax et membres) évoluant par flush non prurigineuse et sans ulcérations. Cependant, les objectifs thérapeutiques de cette patiente sont intermédiaires et se situent entre les cibles de l'enfant et l'adulte (42 à 100 µg/mL). Il a été décidé de réaliser un contrôle à la prochaine consultation en gardant la même posologie si la tolérance le permettait et de diminuer la posologie si besoin.

Le contrôle (prélèvement n°9) a permis de rendre une concentration similaire à la première pour des concentrations calculées et mesurées respectives de 40,1 µg/mL et 38,2 µg/mL.

Il a été recommandé d'adapter la posologie en fonction de la tolérance au traitement et de l'évolution clinique, et compte tenu de son âge, baisser la posologie de 25% si nécessaire. Là encore, l'interprétation a été similaire quelle que soit la méthode employée.

Par conséquent, l'impact clinique de la réalisation de suivi thérapeutique pharmacologique du VMF à partir des DBS semble être similaire à celui réalisé actuellement en routine sur du plasma.

## 4 Conclusion

L'absence d'approche simple et universelle pour surmonter les problèmes liés au prélèvement (effet de l'hématocrite, reproductibilité...etc.) souvent observés avec les dispositifs de prélèvement non volumétriques a été un obstacle majeur à la mise en œuvre généralisée des techniques de micro-échantillonnage sur buvard. Le développement de dispositifs volumétriques a permis de révolutionner l'analyse d'échantillons séchés sur buvard.

Le manque de données pharmacocinétiques chez des enfants atteints d'histiocytose langerhansienne traités par vémurafénib et la nécessité d'un suivi thérapeutique pharmacologique ont justifié le développement d'une méthode de dosage adaptée.

La méthode analytique de dosage de vémurafénib à partir d'échantillons DBS est validée sur un intervalle de 1 à 100  $\mu\text{g/mL}$  et permet de quantifier le vémurafénib sur des DBS de patients atteints d'histiocytose langerhansienne avec un volume réduit de 10  $\mu\text{L}$ .

Notre méthode de calcul des concentrations plasmatiques de vémurafénib à partir d'un prélèvement de sang capillaire sur buvard à l'aide de dispositifs volumétriques Hemaxis™ est satisfaisante et devient une alternative intéressante à l'analyse de sang veineux traditionnel.

En augmentant le nombre d'échantillon par la réalisation de micro-prélèvements, cela permettrait de décrire de façon plus précise les paramètres pharmacocinétiques du vémurafénib au sein de cette population.

Cette méthode analytique simple et performante couplée à une bonne prédiction des concentrations plasmatiques à partir des DBS ouvre une nouvelle perspective au suivi thérapeutique pharmacologique du vémurafénib et d'un grand nombre de médicaments utilisés en pratique clinique, notamment chez l'enfant (ex : anticancéreux, antiépileptiques, autres inhibiteurs de tyrosine kinase). La méthode analytique étant validée sur une large gamme, elle est également adaptée pour les cibles thérapeutiques d'adultes atteints de mélanomes.

Le prélèvement de DBS est un outil majeur pour améliorer l'accès au suivi thérapeutique pharmacologique dans le monde. A terme, de nouvelles méthodes devraient se développer grâce à l'amélioration des performances analytiques nécessitant des volumes d'échantillons de plus en plus faibles.

Sur la base des derniers développements, la perspective de voir apparaître ces micro-prélèvements en pratique courante s'intensifie. Les changements d'habitudes, la production de plasma séché (DPS) et l'acceptation par les autorités sanitaires pourraient transformer l'utilisation actuelle du DBS en une procédure établie et standardisée pour certains domaines de la biologie médicale.

## BIBLIOGRAPHIE

Abla, O., Rodriguez-Galindo, C., and Veys, P. (2018). Treatment of Relapsed and Refractory Langerhans Cell Histiocytosis in Children. In *Histiocytic Disorders*, O. Abla, and G. Janka, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 119–137.

Abu-Rabie, P., Denniff, P., Spooner, N., Chowdhry, B.Z., and Pullen, F.S. (2015). Investigation of different approaches to incorporating internal standard in DBS quantitative bioanalytical workflows and their effect on nullifying hematocrit-based assay bias. *Anal. Chem.* *87*, 4996–5003.

Alvarez, J.-C., Funck-Brentano, E., Abe, E., Etting, I., Saiag, P., and Knapp, A. (2014). A LC/MS/MS micro-method for human plasma quantification of vemurafenib. Application to treated melanoma patients. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *97*, 29–32.

Avataneo, V., D'Avolio, A., Cusato, J., Cantù, M., and De Nicolò, A. (2019). LC-MS application for therapeutic drug monitoring in alternative matrices. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *166*, 40–51.

van Baar, B.L.M., Verhaeghe, T., Heudi, O., Rohde, M., Wood, S., Wieling, J., de Vries, R., White, S., Cobb, Z., and Timmerman, P. (2013). IS addition in bioanalysis of DBS: results from the EBF DBS-microsampling consortium. *Bioanalysis* *5*, 2137–2145.

Badalian-Very, G., Vergilio, J.-A., Degar, B.A., MacConaill, L.E., Brandner, B., Calicchio, M.L., Kuo, F.C., Ligon, A.H., Stevenson, K.E., Kehoe, S.M., et al. (2010). Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood* *116*, 1919–1923.

Barco, S., Castagnola, E., Moscatelli, A., Rudge, J., Tripodi, G., and Cangemi, G. (2017). Volumetric adsorptive microsampling-liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of four antibiotics in human blood: Method development, validation and comparison with dried blood spot. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *145*, 704–710.

Berm, E.J.J., Paardekooper, J., Brummel-Mulder, E., Hak, E., Wilffert, B., and Maring, J.G. (2015). A simple dried blood spot method for therapeutic drug monitoring of the tricyclic antidepressants amitriptyline, nortriptyline, imipramine, clomipramine, and their active metabolites using LC-MS/MS. *Talanta* *134*, 165–172.

Bernard, F., Thomas, C., Bertrand, Y., Munzer, M., Landman Parker, J., Ouache, M., Colin, V.M., Perel, Y., Chastagner, P., Vermynen, C., et al. (2005). Multi-centre pilot study of 2-chlorodeoxyadenosine and cytosine arabinoside combined chemotherapy in refractory Langerhans cell histiocytosis with haematological dysfunction. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *41*, 2682–2689.

Berres, M.-L., Lim, K.P.H., Peters, T., Price, J., Takizawa, H., Salmon, H., Idoyaga, J., Ruzo, A., Lupo, P.J., Hicks, M.J., et al. (2014). BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *J. Exp. Med.* *211*, 669–683.

Borremans, B. (2014). Ammonium improves elution of fixed dried blood spots without affecting immunofluorescence assay quality. *Trop. Med. Int. Health* 19, 413–416.

Bubolz, A.-M., Weissinger, S.E., Stenzinger, A., Arndt, A., Steinestel, K., Brüderlein, S., Cario, H., Lubatschowski, A., Welke, C., Anagnostopoulos, I., et al. (2014). Potential clinical implications of BRAF mutations in histiocytic proliferations. *Oncotarget* 5, 4060–4070.

Bush, V. (2012). Chapter 2 - Effects of Pre-analytical Variables in Therapeutic Drug Monitoring. In *Therapeutic Drug Monitoring*, A. Dasgupta, ed. (Boston: Academic Press), pp. 31–48.

Capiau, S., Wilk, L.S., Aalders, M.C.G., and Stove, C.P. (2016). A Novel, Nondestructive, Dried Blood Spot-Based Hematocrit Prediction Method Using Noncontact Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Anal. Chem.* 88, 6538–6546.

Capiau, S., Veenhof, H., Koster, R.A., Bergqvist, Y., Boettcher, M., Halmingh, O., Keevil, B.G., Koch, B.C.P., Linden, R., Pistos, C., et al. (2019). Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot-Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring. *Ther. Drug Monit.* 41, 409–430.

Cardoso, E., Mercier, T., Wagner, A.D., Homicsko, K., Michielin, O., Ellefsen-Lavoie, K., Cagnon, L., Diezi, M., Buclin, T., Widmer, N., et al. (2018). Quantification of the next-generation oral anti-tumor drugs dabrafenib, trametinib, vemurafenib, cobimetinib, pazopanib, regorafenib and two metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 1083, 124–136.

Chen, X., Zhao, H., Hatsis, P., and Amin, J. (2012). Investigation of dried blood spot card-induced interferences in liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 61, 30–37.

Cheng, X., Liu, K., Liu, Y., Wang, M., and Ma, Y. (2018). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of caspofungin in dried blood spots. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 32, 1068–1074.

Clarke, W. (2016). Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *Clin. Chall. Ther. Drug Monit. Spec. Popul. Physiol. Cond. Pharmacogenomics* 1–15.

Collin, M., Bigley, V., McClain, K.L., and Allen, C.E. (2015). Cell(s) of Origin of Langerhans Cell Histiocytosis. *Hematol. Clin.* 29, 825–838.

D'Avolio, A., Simiele, M., Siccardi, M., Baietto, L., Sciandra, M., Bonora, S., and Di Perri, G. (2010). HPLC-MS method for the quantification of nine anti-HIV drugs from dry plasma spot on glass filter and their long term stability in different conditions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52, 774–780.

De Kesel, P.M.M., Capiau, S., Lambert, W.E., and Stove, C.P. (2014). Current strategies for coping with the hematocrit problem in dried blood spot analysis. *Bioanalysis* 6, 1871–1874.

De Kesel, P.M.M., Lambert, W.E., and Stove, C.P. (2015). Does volumetric absorptive microsampling eliminate the hematocrit bias for caffeine and paraxanthine in dried blood samples? A comparative study. *Anal. Chim. Acta* 881, 65–73.

Degar, B.A., and Rollins, B.J. (2009). Langerhans cell histiocytosis: malignancy or inflammatory disorder doing a great job of imitating one? *Dis. Model. Mech.* 2, 436–439.

Déglon, J., Leuthold, L.A., and Thomas, A. (2015). Potential missing steps for a wide use of dried matrix spots in biomedical analysis. *Bioanalysis* 7, 2375–2385.

Delahaye, L., Dhont, E., De Cock, P., De Paepe, P., and Stove, C.P. (2020). Dried blood microsamples: suitable as an alternative matrix for the quantification of paracetamol-protein adducts? *Toxicol. Lett.*

Denniff, P., and Spooner, N. (2010a). The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs. *Bioanalysis* 2, 1385–1395.

Denniff, P., and Spooner, N. (2010b). Effect of storage conditions on the weight and appearance of dried blood spot samples on various cellulose-based substrates. *Bioanalysis* 2, 1817–1822.

Diamond, E.L., Subbiah, V., Lockhart, A.C., Blay, J.-Y., Puzanov, I., Chau, I., Raje, N.S., Wolf, J., Erinjeri, J.P., Torrisi, J., et al. (2018). Vemurafenib for BRAF V600-Mutant Erdheim-Chester Disease and Langerhans Cell Histiocytosis: Analysis of Data From the Histology-Independent, Phase 2, Open-label VE-BASKET Study. *JAMA Oncol.* 4, 384–388.

Dilo, A., Daali, Y., Desmeules, J., Chalandon, Y., Uppugunduri, C.R.S., and Ansari, M. (2020). Comparing Dried Blood Spots and Plasma Concentrations for Busulfan Therapeutic Drug Monitoring in Children. *Ther. Drug Monit.* 42, 111–117.

Donadieu, J., Chalard, F., and Jeziorski, E. (2012). Medical management of langerhans cell histiocytosis from diagnosis to treatment. *Expert Opin. Pharmacother.* 13, 1309–1322.

Donadieu, J., Berro, M., and Heritier, S. (2016). VEMURAFENIB had Obtained the Orphan Drug Designation Status in Europe for Langerhans Cell Histiocytosis in April 2016. *Pediatr. Blood Cancer* 63, S17–S17.

Donadieu, J., Larabi, I.-A., Tardieu, M., Visser, J., Hutter, C., Sieni, E., Kabbara, N., Barkaoui, M., Miron, J., Chalard, F., et al. (2019). Vemurafenib for Refractory Multisystem Langerhans Cell Histiocytosis in Children: An International Observational Study. *J. Clin. Oncol.* 37, JCO.19.00456.

Duthaler, U., Berger, B., Erb, S., Battegay, M., Letang, E., Gaugler, S., Natamatungiro, A., Mnzava, D., Donzelli, M., Krähenbühl, S., et al. (2018). Using dried blood spots to facilitate therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs in resource-poor regions. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 2729–2737.



Eibak, L.E.E., Hegge, A.B., Rasmussen, K.E., Pedersen-Bjergaard, S., and Gjelstad, A. (2012). Alginate and chitosan foam combined with electromembrane extraction for dried blood spot analysis. *Anal. Chem.* *84*, 8783–8789.

Emile, J.-F., Abla, O., Fraitag, S., Horne, A., Haroche, J., Donadieu, J., Requena-Caballero, L., Jordan, M.B., Abdel-Wahab, O., Allen, C.E., et al. (2016). Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages. *Blood* *127*, 2672–2681.

Flaherty, K.T., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., O'Dwyer, P.J., Lee, R.J., Grippo, J.F., Nolop, K., et al. (2010). Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 809–819.

Freeman, J.D., Rosman, L.M., Ratcliff, J.D., Strickland, P.T., Graham, D.R., and Silbergeld, E.K. (2018). State of the Science in Dried Blood Spots. *Clin. Chem.* *64*, 656–679.

Funck-Brentano, E., Alvarez, J.C., Longvert, C., Abe, E., Beauchet, A., Funck-Brentano, C., and Saiag, P. (2015). Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *26*, 1470–1475.

Gallay, J., Prod'hom, S., Mercier, T., Bardinnet, C., Spaggiari, D., Pothin, E., Buclin, T., Genton, B., and Decosterd, L.A. (2018). LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of seven antimalarials and two active metabolites in dried blood spots for applications in field trials: Analytical and clinical validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *154*, 263–277.

Garcia Boy, R., Henseler, J., Mattern, R., and Skopp, G. (2008). Determination of morphine and 6-acetylmorphine in blood with use of dried blood spots. *Ther. Drug Monit.* *30*, 733–739.

Gaugler, S., Al-Mazroua, M.K., Issa, S.Y., Rykl, J., Grill, M., Qanair, A., and Cebolla, V.L. (2019). Fully Automated Forensic Routine Dried Blood Spot Screening for Workplace Testing. *J. Anal. Toxicol.* *43*, 212–220.

Geers, L.M., Cohen, D., Wehkamp, L.M., van Hateren, K., Koster, R.A., Fedorenko, O.Y., Semke, A.V., Bokhan, N., Ivanova, S.A., Kosterink, J.G.W., et al. (2017). Dried Blood Spot Analysis for Therapeutic Drug Monitoring of Clozapine. *J. Clin. Psychiatry* *78*, e1211–e1218.

Goey, A.K., With, M. de, Agema, B.C., Hoop, E.O.-D., Singh, R.K., van der Veldt, A.A., Mathijssen, R.H., van Schaik, R.H., and Bins, S. (2019). Effects of pharmacogenetic variants on vemurafenib-related toxicities in patients with melanoma. *Pharmacogenomics* *20*, 1283–1290.

Goldinger, S.M., Rinderknecht, J., Dummer, R., Kuhn, F.P., Yang, K.-H., Lee, L., Ayala, R.C., Racha, J., Geng, W., Moore, D., et al. (2015). A single-dose mass balance and metabolite-profiling study of vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *Pharmacol. Res. Perspect.* *3*, e00113.

Goldwirt, L., Chami, I., Feugeas, J.-P., Pages, C., Brunet-Possenti, F., Allayous, C., Baroudjian, B., Madelaine, I., Sauvageon, H., Mourah, S., et al. (2016). Reply to “Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance” by Funck-Brentano et al. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *27*, 363–364.

Guyot-Goubin, A., Donadieu, J., Barkaoui, M., Bellec, S., Thomas, C., and Clavel, J. (2008). Descriptive epidemiology of childhood Langerhans cell histiocytosis in France, 2000–2004. *Pediatr. Blood Cancer* *51*, 71–75.

Haroche, J., Cohen-Aubart, F., Emile, J.-F., Donadieu, J., and Amoura, Z. (2015). Vemurafenib as first line therapy in BRAF-mutated Langerhans cell histiocytosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* *73*, e29-30.

Haupt, R., Minkov, M., Astigarraga, I., Schäfer, E., Nanduri, V., Jubran, R., Egeler, R.M., Janka, G., Micic, D., Rodriguez-Galindo, C., et al. (2013). Langerhans cell histiocytosis (LCH): guidelines for diagnosis, clinical work-up, and treatment for patients till the age of 18 years. *Pediatr. Blood Cancer* *60*, 175–184.

Henderson, L.O., Powell, M.K., Hannon, W.H., Bernert, J.T., Pass, K.A., Fernhoff, P., Ferre, C.D., Martin, L., Franko, E., Rochat, R.W., et al. (1997). An Evaluation of the Use of Dried Blood Spots from Newborn Screening for Monitoring the Prevalence of Cocaine Use among Childbearing Women. *Biochem. Mol. Med.* *61*, 143–151.

Héritier, S., Jehanne, M., Leverger, G., Emile, J.-F., Alvarez, J.-C., Haroche, J., and Donadieu, J. (2015). Vemurafenib Use in an Infant for High-Risk Langerhans Cell Histiocytosis. *JAMA Oncol.* *1*, 836–838.

Jager, N.G.L., Rosing, H., Schellens, J.H.M., Beijnen, J.H., and Linn, S.C. (2014). Use of dried blood spots for the determination of serum concentrations of tamoxifen and endoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* *146*, 137–144.

Jang, S., and Atkins, M.B. (2014). Treatment of BRAF-mutant melanoma: the role of vemurafenib and other therapies. *Clin. Pharmacol. Ther.* *95*, 24–31.

Jantos, R., Vermeeren, A., Sabljic, D., Ramaekers, J.G., and Skopp, G. (2013). Degradation of zopiclone during storage of spiked and authentic whole blood and matching dried blood spots. *Int. J. Legal Med.* *127*, 69–76.

Kim, B.E., Koh, K.-N., Suh, J.K., Im, H.J., Song, J.S., Lee, J.W., Kang, H.J., Park, K.D., Shin, H.Y., Choi, H.S., et al. (2014). Clinical features and treatment outcomes of Langerhans cell histiocytosis: a nationwide survey from Korea histiocytosis working party. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* *36*, 125–133.

Kita, K., Noritake, K., and Mano, Y. (2019). Application of a Volumetric Absorptive Microsampling Device to a Pharmacokinetic Study of Tacrolimus in Rats: Comparison with Wet Blood and Plasma. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* *44*, 91–102.

Koster, R.A., Botma, R., Greijdanus, B., Uges, D.R.A., Kosterink, J.G.W., Touw, D.J., and Alffenaar, J.-W.C. (2015). The performance of five different dried blood spot cards for the analysis of six immunosuppressants. *Bioanalysis* 7, 1225–1235.

Koster, R.A., Veenhof, H., Botma, R., Hoekstra, A.T., Berger, S.P., Bakker, S.J., Alffenaar, J.-W.C., and Touw, D.J. (2017). Dried blood spot validation of five immunosuppressants, without hematocrit correction, on two LC-MS/MS systems. *Bioanalysis* 9, 553–563.

Kramkimel, N., Thomas-Schoemann, A., Sakji, L., Golmard, J., Noe, G., Regnier-Rosencher, E., Chapuis, N., Maubec, E., Vidal, M., Avril, M., et al. (2016). Vemurafenib pharmacokinetics and its correlation with efficacy and safety in outpatients with advanced BRAF-mutated melanoma. *Target. Oncol.* 11, 59–69.

Krooks, J., Minkov, M., and Weatherall, A.G. (2018). Langerhans cell histiocytosis in children: History, classification, pathobiology, clinical manifestations, and prognosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 78, 1035–1044.

Lampič, K., Trontelj, J., Prosen, H., Drobne, D., Šmid, A., and Vovk, T. (2019). Determination of 6-thioguanine and 6-methylmercaptopurine in dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Method development, validation and clinical application. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 499, 24–33.

Larkin, J., Del Vecchio, M., Ascierto, P.A., Krajsova, I., Schachter, J., Neyns, B., Espinosa, E., Garbe, C., Sileni, V.C., Gogas, H., et al. (2014). Vemurafenib in patients with BRAF(V600) mutated metastatic melanoma: an open-label, multicentre, safety study. *Lancet Oncol.* 15, 436–444.

Leuthold, L.A., Heudi, O., Déglon, J., Raccuglia, M., Augsburg, M., Picard, F., Kretz, O., and Thomas, A. (2015). New microfluidic-based sampling procedure for overcoming the hematocrit problem associated with dried blood spot analysis. *Anal. Chem.* 87, 2068–2071.

Lievre, A., and Laurent-Puig, P. (2010). La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro Dig ISSN 1953-5171 2010 Vol. II N°1 2.*

Luginbühl, M., and Gaugler, S. (2020). The application of fully automated dried blood spot analysis for liquid chromatography-tandem mass spectrometry using the CAMAG DBS-MS 500 autosampler. *Clin. Biochem.*

Majumdar, T., and Howard, D. (2011). The Use of Dried Blood Spots for Concentration Assessment in Pharmacokinetic Evaluations. In *Pharmacokinetics in Drug Development*, pp. 91–114.

Martial, L.C., Aarnoutse, R.E., Schreuder, M.F., Henriët, S.S., Brüggemann, R.J.M., and Joore, M.A. (2016). Cost Evaluation of Dried Blood Spot Home Sampling as Compared to Conventional Sampling for Therapeutic Drug Monitoring in Children. *PLOS ONE* 11, e0167433.

Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., and Chavez-Eng, C.M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* *75*, 3019–3030.

Mazieres, J., Cropet, C., Montané, L., Barlesi, F., Souquet, P.J., Quantin, X., Dubos-Arvis, C., Otto, J., Favier, L., Avrillon, V., et al. (2020). Vemurafenib in non-small-cell lung cancer patients with BRAFV600 and BRAFnonV600 mutations. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *31*, 289–294.

Mommers, J., Mengerink, Y., Ritzen, E., Weusten, J., van der Heijden, J., and van der Wal, S. (2013). Quantitative analysis of morphine in dried blood spots by using morphine-d3 pre-impregnated dried blood spot cards. *Anal. Chim. Acta* *774*, 26–32.

Moorthy, G.S., Vedar, C., Zane, N., Prodell, J.L., and Zuppa, A.F. (2019). Development and validation of a volumetric absorptive microsampling assay for analysis of voriconazole and voriconazole N-oxide in human whole blood. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *1105*, 67–75.

Moretti, M., Freni, F., Valentini, B., Vignali, C., Groppi, A., Visonà, S.D., Osculati, A.M.M., and Morini, L. (2019). Determination of Antidepressants and Antipsychotics in Dried Blood Spots (DBSs) Collected from Post-Mortem Samples and Evaluation of the Stability over a Three-Month Period. *Mol. Basel Switz.* *24*.

Morimoto, A., Ishida, Y., Suzuki, N., Ohga, S., Shioda, Y., Okimoto, Y., Kudo, K., and Ishii, E. (2010). Nationwide survey of single-system single site Langerhans cell histiocytosis in Japan. *Pediatr. Blood Cancer* *54*, 98–102.

Nijenhuis, C.M., Rosing, H., Schellens, J.H.M., and Beijnen, J.H. (2014a). Development and validation of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay quantifying vemurafenib in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *88*, 630–635.

Nijenhuis, C.M., Rosing, H., Schellens, J.H.M., and Beijnen, J.H. (2014b). Quantifying vemurafenib in dried blood spots using high-performance LC-MS/MS. *Bioanalysis* *6*, 3215–3224.

Nijenhuis, C.M., Huitema, A.D.R., Marchetti, S., Blank, C., Haanen, J.B.A.G., van Thienen, J.V., Rosing, H., Schellens, J.H.M., and Beijnen, J.H. (2016). The Use of Dried Blood Spots for Pharmacokinetic Monitoring of Vemurafenib Treatment in Melanoma Patients. *J. Clin. Pharmacol.* *56*, 1307–1312.

Nijenhuis, C.M., Huitema, A.D.R., Blank, C., Haanen, J.B. a. G., Thienen, J.V. van, Rosing, H., Schellens, J.H.M., and Beijnen, J.H. (2017). Clinical Pharmacokinetics of Vemurafenib in BRAF-Mutated Melanoma Patients. *J. Clin. Pharmacol.* *57*, 125–128.

O'Mara, M., Hudson-Curtis, B., Olson, K., Yueh, Y., Dunn, J., and Spooner, N. (2011). The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples. *Bioanalysis* *3*, 2335–2347.

Protsenko, S.A., Semionova, A.I., Komarov, Y.I., Aleksakhina, S.N., Ivantsov, A.O., Iyevleva, A.G., and Imyanitov, E.N. (2015). BRAF-mutated clear cell sarcoma is sensitive to vemurafenib treatment. *Invest. New Drugs* 33, 1136–1143.

Protti, M., Rudge, J., Sberna, A.E., Gerra, G., and Mercolini, L. (2017). Dried haematic microsamples and LC-MS/MS for the analysis of natural and synthetic cannabinoids. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 1044–1045, 77–86.

Ribas, A., Zhang, W., Chang, I., Shirai, K., Ernstoff, M.S., Daud, A., Cowey, C.L., Daniels, G., Seja, E., O’Laco, E., et al. (2014). The effects of a high-fat meal on single-dose vemurafenib pharmacokinetics. *J. Clin. Pharmacol.* 54, 368–374.

Robinson, G.W., Orr, B.A., and Gajjar, A. (2014). Complete clinical regression of a BRAF V600E-mutant pediatric glioblastoma multiforme after BRAF inhibitor therapy. *BMC Cancer* 14, 258.

Rowland, M., and Emmons, G.T. (2010). Use of Dried Blood Spots in Drug Development: Pharmacokinetic Considerations. *AAPS J.* 12, 290–293.

Saussereau, E., Lacroix, C., Gaulier, J.M., and Gouille, J.P. (2012). On-line liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 885–886, 1–7.

Skrypek, M., Foreman, N., Guillaume, D., and Moertel, C. (2014). Pilomyxoid astrocytoma treated successfully with vemurafenib. *Pediatr. Blood Cancer* 61, 2099–2100.

Spector, L.G., Hecht, S.S., Ognjanovic, S., Carmella, S.G., and Ross, J.A. (2007). Detection of cotinine in newborn dried blood spots. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 16, 1902–1905.

Steiner, M., Matthes-Martin, S., Attarbaschi, A., Minkov, M., Grois, N., Unger, E., Holter, W., Vormoor, J., Wawer, A., Ouachee, M., et al. (2005). Improved outcome of treatment-resistant high-risk Langerhans cell histiocytosis after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 36, 215–225.

Tretzel, L., Thomas, A., Geyer, H., Pop, V., Schänzer, W., and Thevis, M. (2015). Dried blood spots (DBS) in doping controls: A complementary matrix for improved in- and out-of-competition sports drug testing strategies. *Anal Methods* 7.

Veenhof, H., Koster, R.A., Brinkman, R., Senturk, E., Bakker, S.J.L., Berger, S.P., Akkerman, O.W., Touw, D.J., and Alffenaar, J.-W.C. (2019). Performance of a web-based application measuring spot quality in dried blood spot sampling. *Clin. Chem. Lab. Med.*

Velghe, S., De Troyer, R., and Stove, C. (2018). Dried blood spots in therapeutic drug monitoring and toxicology. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 14, 1–3.

Velghe, S., Deprez, S., and Stove, C.P. (2019). Fully automated therapeutic drug monitoring of anti-epileptic drugs making use of dried blood spots. *J. Chromatogr. A* 1601, 95–103.

Viarisio, D., Müller-Decker, K., Hassel, J.C., Alvarez, J.-C., Flechtenmacher, C., Pawlita, M., Gissmann, L., and Tommasino, M. (2017). The BRAF Inhibitor Vemurafenib Enhances UV-Induced Skin Carcinogenesis in Beta HPV38 E6 and E7 Transgenic Mice. *J. Invest. Dermatol.* *137*, 261–264.

Weeraratna, A.T. (2012). RAF around the edges--the paradox of BRAF inhibitors. *N. Engl. J. Med.* *366*, 271–273.

WHO 2017 WHO | Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2017–2018.

Wickremsinhe, E.R., and Perkins, E.J. (2015). Using dried blood spot sampling to improve data quality and reduce animal use in mouse pharmacokinetic studies. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* *54*, 139–144.

Yau, W.H., and Ameratunga, M. (2020). Combination of BRAF and MEK inhibition in BRAF V600E mutant low-grade ganglioglioma. *J. Clin. Pharm. Ther.*

Zhen, Y., Thomas-Schoemann, A., Sakji, L., Boudou-Rouquette, P., Dupin, N., Mortier, L., Vidal, M., Goldwasser, F., and Blanchet, B. (2013). An HPLC-UV method for the simultaneous quantification of vemurafenib and erlotinib in plasma from cancer patients. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *928*, 93–97.



# ANNEXES

## ANNEXE 1: Mode d'emploi HemaXis™ DB 10

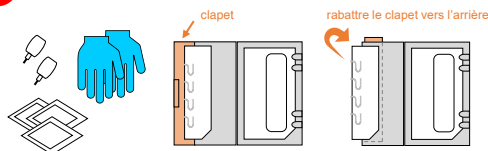
### HemaXis™ DB 10 MODE D'EMPLOI



Avant d'utiliser le dispositif consulter la vidéo explicative disponible sur notre site <http://hemaxis.com>

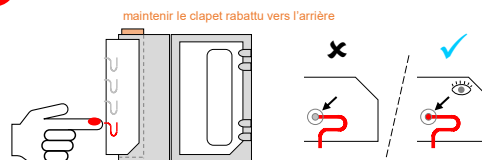
#### Comment utiliser HemaXis™ DB 10

##### 1 Préparer le matériel



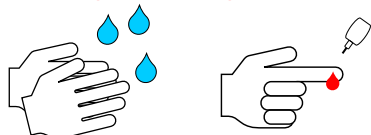
- Préparer le matériel (lancettes, tampons désinfectants)
- Mettre des gants et déballer le dispositif de son emballage
- Ouvrir le boîtier et rabattre le clapet vers l'arrière

##### 3 Remplir un canal de prélèvement



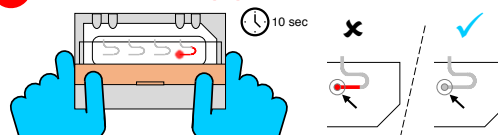
- Mettre la goutte de sang en contact avec l'entrée d'un canal
- Vérifier que le canal est complètement rempli (voir 👁)
- Si nécessaire, faire plusieurs contacts pour compléter le remplissage

##### 2 Générer une goutte de sang



- Demander au patient de se laver les mains puis désinfecter le doigt
- Piquer le bout du doigt et appuyer légèrement pour produire une goutte de sang
- Essuyer la première goutte de sang avec de la gaze puis générer une nouvelle goutte

##### 4 Transférer sur le papier buvard



- Fermer le boîtier tout en maintenant le clapet rabattu vers l'arrière
- Visualiser la vidange du canal jusqu'à la fin du transfert (voir 👁)
- Répéter les étapes 3-4 pour générer jusqu'à 4 échantillons. Fermer le clapet pour stockage ou envoi des échantillons.

USAGE UNIQUE: ne pas tenter de réutiliser un canal ayant déjà servi

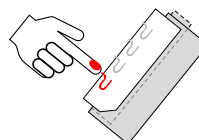
#### Conseils pour la résolution de problèmes

##### ? Quantité de sang insuffisante

- ✓ Réchauffer les mains du patients (e.g. passer sous l'eau chaude)
- ✓ Secouer ou masser les doigts pour activer la circulation
- ✓ Piquer de nouveau le doigt avec une autre lancette
- ✓ Utiliser une lancette plus longue, e.g. 1.8 mm

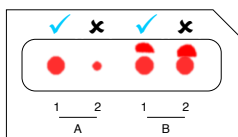
*Le sang coagule après quelques minutes*

##### ? Le canal ne se remplit pas complètement



- ✓ Incliner légèrement le dispositif pour avoir l'entrée des canaux vers le haut lors du remplissage
- ✓ Effectuer plusieurs contacts entre la goutte de sang et l'entrée du canal
- ✓ Générer plus de sang à partir du doigt du patient

##### ? Vérification d'acceptabilité des échantillons



###### A. Taille de la tache

1. Tache de taille correcte
2. Tache trop petite

*S'assurer que le transfert est terminé avant de réouvrir les volets  
Ne pas essuyer l'excès de sang éventuel à l'entrée des canaux*

###### B. Excédent de sang

1. Echantillon acceptable (excédent à > 2mm de la tache)
2. Echantillon non-acceptable (excédent à < 2mm de la tache)

*Eviter de toucher la peau du patient avec le dispositif*

##### ? Pas de transfert

- ✓ Appliquer plus de sang à l'entrée du canal pour s'assurer que le remplissage du canal est complet
- ✓ Presser et relâcher les volets du boîtier 2-3 fois
- ✓ Toujours effectuer le transfert dans les 2 minutes suivant le prélèvement pour éviter la coagulation du sang
- ✓ Ne pas presser trop fort lors du transfert
- ✓ Collecter un échantillon à la fois

USAGE UNIQUE: ne pas tenter de réutiliser un canal ayant déjà servi



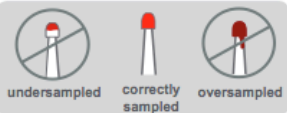
# ANNEXE 2 : Mode d'emploi VAMS Mitra®


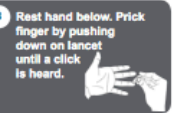

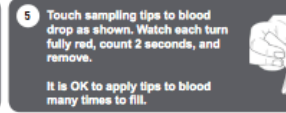


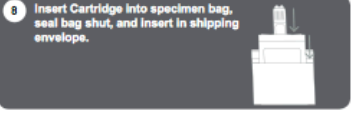
## instructions for use (right-handed)


Specimen collection and storage using the Mitra® Cartridge

[See reverse side for left-handed instructions]

**undersampled**     **correctly sampled**     **oversampled**








- 1 Prepare (see right-hand side).**  
Wash hands with soap and warm water.
- 2 Warm hands for 30 seconds.**  

- 3 Rest hand below. Prick finger by pushing down on lancet until a click is heard.**  

- 4 If needed, massage pricked finger upward until blood drop appears.**  
Wipe away first drop.  

- 5 Touch sampling tips to blood drop as shown. Watch each turn fully red, count 2 seconds, and remove.**  
It is OK to apply tips to blood many times to fill.  

- 6 Set Cartridge down, wipe away blood, and apply bandage.**  

- 7 Close Cartridge.**  

- 8 Insert Cartridge into specimen bag, seal bag shut, and insert in shipping envelope.**  




The "x" denotes suggested landing sites.

### Do this FIRST!

- Twist off lancet caps** 
- Remove Cartridge from specimen bag** **Do NOT remove desiccant.** 
- Open Cartridge** 
- Unwrap gauze** 
- Prepare adhesive bandages** 

**neoteryx**  
The blood microsampling innovator

neoteryx LLC  
1211 American Avenue  
San Jose, CA 95128  
PHONE: 408.515.1100  
WWW.NEOTERYX.COM  
©2019 NEOTERYX  
CE IVD

All other trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners. All other trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners. All other trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners. All other trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners. All other trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners. All other trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

IFU-022 (Rev A)



## **MORY Céline**

### **Validation d'une méthode de dosage du Vémurafénib par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à partir d'une goutte de sang séché (DBS) Application dans une cohorte pédiatrique atteinte d'histiocytose langerhansienne.**

Th. D. Pharm., Rouen, 2020, 105 p.

---

#### **RESUME**

Ces dernières années, l'intérêt des méthodes de micro-échantillonnage sous forme de sang séché sur buvard (DBS : Dried Blood Spot) a gagné en popularité dans les communautés biomédicales. L'absence d'approche simple et universelle pour surmonter les problèmes liés à la qualité du prélèvement et à l'absence de volume précis recueillis ont été des obstacles majeurs à sa mise en œuvre généralisée, jusqu'au développement récent de dispositifs de micro-échantillonnages volumétriques. La découverte de l'implication des mutations BRAF dans l'histiocytose langerhansienne (HL) représente une avancée majeure et a permis une amélioration thérapeutique considérable grâce à l'utilisation des thérapies ciblant la voie des MAPK comme le vémurafénib (VMF). Le manque de données pharmacocinétiques dans cette population et la nécessité d'un suivi thérapeutique pharmacologique (STP) justifient le développement d'une méthode de dosage adaptée. L'objectif de cette étude a été la mise au point et la validation d'une méthode de dosage du VMF par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à partir de DBS prélevés à l'aide de dispositifs volumétriques. La méthode a ensuite été appliquée au dosage du VMF dans une cohorte d'enfants atteints d'HL (n=8) afin de comparer et corrélérer les concentrations obtenues aux concentrations plasmatiques. Avec un prétraitement minimaliste et rapide de l'échantillon, la linéarité a été validée sur un intervalle de 1 à 100 µg/mL avec une justesse et une fidélité satisfaisante (biais et CV <20%). Le VMF sur DBS semble stable à des températures extrêmes (-20°C ou 60°C) pendant une semaine encourageant la possibilité de transferts des dispositifs par voie postale. Au total, dix paires d'échantillons (plasma et DBS) ont été obtenues et ont permis de calculer les concentrations plasmatiques à partir de l'analyse réalisée sur DBS. Le modèle de prédiction des concentrations plasmatiques de VMF à partir des DBS est satisfaisant et encourage à réaliser le STP en routine sur DBS. Ce mode de prélèvement est une alternative intéressante à l'analyse de sang veineux traditionnel et devient un outil majeur pour améliorer l'accès au STP dans des pays où le dosage n'est pas réalisé. La méthode analytique est adaptée aux cibles thérapeutiques d'adultes atteints de mélanomes et encourage le développement de ces méthodes à d'autres inhibiteurs de tyrosine kinase.

**MOTS CLES** : Dried Blood Spot (DBS) – Vémurafénib – LC-MS/MS – Suivi thérapeutique pharmacologique (STP) – Histiocytose Langerhansienne

---

#### **JURY**

Président et Co-directeur : Mr FAVENNEC Loic, PU-PH  
Directeur : Mr ALVAREZ Jean Claude, PU-PH  
Membres : Mr DONADIEU Jean, PH  
Mr LAMOUREUX Fabien, PH  
Mr LARABI Islam Amine, PH  
Mr WILS Julien, MCU-PH

---

**DATE DE SOUTENANCE** : 29 avril 2020