



**HAL**  
open science

# Mise au point et validation d'une méthode de dosage de la fraction libre plasmatique de 8 $\beta$ -lactamines et application chez des patients de réanimation

Nicolas d'Houdain

## ► To cite this version:

Nicolas d'Houdain. Mise au point et validation d'une méthode de dosage de la fraction libre plasmatique de 8  $\beta$ -lactamines et application chez des patients de réanimation. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. dumas-03476914

**HAL Id: dumas-03476914**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03476914v1>**

Submitted on 13 Dec 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.

## **U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

Année : 2019

Thèse n°11

Mémoire du DIPLOME d'ETUDES SPECIALISEES DE PHARMACIE HOSPITALIERE

Tenant lieu de THESE d'exercice pour l'obtention du

**DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 21 décembre 2018 à Bordeaux (33) par

**Nicolas d'HOUDAIN**

Né le 21 octobre 1988 à Paris XV<sup>ème</sup> (75)

### **MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DE LA FRACTION LIBRE PLASMATIQUE DE 8 $\beta$ -LACTAMINES ET APPLICATION CHEZ DES PATIENTS DE REANIMATION**

Sous la direction du Dr Rachel Legeron

#### **Membres du jury**

Madame Dominique BREILH	Pharmacien, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier	Présidente
Monsieur Cédric CARRIE	Médecin, Praticien hospitalier	Juge
Monsieur Fabien XUEREB	Pharmacien, Maître de conférences des Universités, Praticien hospitalier	Juge
Monsieur Antoine DUPUIS	Pharmacien, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier	Juge

## Remerciements

### **A mon jury de thèse :**

Merci à ma présidente de thèse le Pr Dominique Breilh, pharmacien chef de service au CHU de Bordeaux, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous suis reconnaissant pour le temps et la confiance que vous m'avez consacré tout au long de mon internat. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements.

Merci à ma directrice de thèse le Dr Rachel Legeon, pharmacien au CHU de Bordeaux d'avoir accepté de diriger ce travail, pour ton esprit critique, ces moments passés au laboratoire et surtout au temps consacré à ce travail.

Merci au Dr Fabien Xuereb, maître de conférences et pharmacien au CHU de Bordeaux pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et t'être rendu disponible lorsque j'en avais besoin.

Merci au Dr Cédric Carrié, pour toute l'énergie que tu as mise et que tu continues de mettre dans le travail que nous avons réalisé et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci au Pr Antoine Dupuis, pharmacien au CHU de Poitiers d'avoir gentiment accepté de faire partie de mon jury et permis de soutenir cette thèse.

### **A ma famille, à mes amis et à mes anciens collègues :**

A ma patate chérie avec qui je partage ma vie depuis les premières années de fac et sans qui rien ne serait pareil. Merci pour ta générosité, pour ton soutien quotidien et pour nos moments passés et à venir.

A mes parents que j'aime profondément, qui m'ont toujours soutenu, accompagné, motivé et sans lesquels je ne serai jamais arrivé là où j'en suis aujourd'hui. A mes petites sœurs avec lesquelles j'ai passé de merveilleux moments, je suis très fier de ce que vous êtes devenues. A mes grands-parents Mimi, Daddy, grand maman et Pierre. A mon parrain Marco que j'aime profondément. A mon cousin Adrien et à toute ma famille.

Au amis d'enfance Arnaud, Alban, Blou, Pilou, Julien, Patrick... on est généralement nostalgique des moments passés mais l'on peut l'être aussi de ceux que l'on n'a pas eus car je sais qu'il y en aura encore bien d'autres.

Aux amis de l'internat et de la fac : Thibault, Florent, Cécile, Adrien, Jean, Clément, Simon, Sacha, Hélène, Margaux, Jeremy (et toute l'ASPIC) et tous ceux avec lesquels j'ai passé et continu de passer de merveilleux moments. On s'est quand même bien amusés !

Aux pharmaciens, médecins, internes, préparatrices et paramédicaux avec lesquels j'ai tant appris.

## Table des matières

Remerciements .....	2
Table des matières .....	3
Liste des figures .....	6
Liste des tableaux .....	7
Liste des abréviations .....	8
I. Introduction.....	9
A. Généralités sur les $\beta$ -lactamines .....	11
1. Propriétés physico-chimiques des $\beta$ -lactamines.....	11
2. Pharmacodynamie des $\beta$ -lactamines .....	12
3. Pharmacocinétique des $\beta$ -lactamines .....	13
B. Revue bibliographique des méthodes utilisées pour le dosage de la FU des anti-infectieux... 14	
1. Généralités sur la bioanalyse des médicaments .....	14
2. Revue de la littérature des différentes méthodes de dosages de la FU et de la fraction totale des $\beta$ -lactamines dans le plasma humain et incluses dans l'étude .....	15
a) La dialyse à l'équilibre .....	17
b) L'ultrafiltration sur membrane.....	18
3. Principaux phénomènes pouvant interférer avec la récupération de la FU par ultrafiltration sur membrane .....	19
4. Perturbation ex-vivo de la liaison protéine-médicament .....	20
II. Matériel et méthode .....	22
A. Matériel et solutions standards .....	22
1. Introduction.....	22
2. Matériels et Réactifs.....	22
3. Préparation des solutions mères, calibrants et contrôles qualité.....	23
B. Traitement de l'échantillon .....	24
1. Généralités .....	24

2.	Isolement de la FU par Ultrafiltration sur membrane.....	24
a)	Choix du dispositif d'ultrafiltration.....	24
b)	Conditions expérimentales.....	25
3.	Purification de l'ultrafiltrat par Extraction Liquide-Solide (SPE) .....	26
a)	Généralités .....	26
b)	La précipitation des protéines.....	28
c)	Conditions expérimentales.....	29
4.	Concentration de l'échantillon par Evaporation/Concentration .....	30
a)	Généralités .....	30
b)	Conditions expérimentales.....	30
5.	Dosage par HPLC-UV .....	31
a)	Généralités .....	31
b)	Conditions HPLC-UV .....	34
C.	Détermination de la fixation non spécifique (NSB) au cours de l'UF .....	35
D.	Rendement de l'ultrafiltration et facteur de correction de la gamme d'étalonnage .....	36
1.	Prérequis .....	36
2.	Evaluation du rendement de l'ultrafiltration .....	37
E.	Validation analytique selon les recommandations de la FDA/EMA.....	39
III.	Résultats .....	40
A.	Détection par HPLC-UV .....	40
B.	Optimisation des conditions de la SPE .....	42
1.	Traitement du diffusat (ionisation) .....	42
2.	Rendement de la SPE.....	46
C.	Validation analytique.....	47
1.	Linéarité, coefficient de corrélation et LOQ.....	47
2.	Exactitude et précision .....	47
3.	Stabilité.....	48
D.	Adsorption non spécifique .....	49

E. Facteur de correction .....	49
F. Résultats des dosages.....	50
IV. Discussion .....	52
V. Conclusion .....	54
Annexes .....	55
Bibliographie.....	57
SERMENT DE GALIEN .....	61
RESUME en français .....	62

## Liste des figures

Figure n° 1 : $\beta$ -lactamines incluses dans le protocole de recherche clinique « Hyperclairance » et faisant l'objet du développement de la méthode de dosage .....	10
Figure n° 2 : Les différentes familles de $\beta$ -lactamines.....	11
Figure n° 3 : Principe de la dialyse à l'équilibre.....	18
Figure n° 4 : Principe de l'ultrafiltration .....	19
Figure n° 5 : Influence de la température et du pH sur la FU (28) .....	21
Figure n° 6 : Principe de la SPE .....	28
Figure n° 7 : Principe de la PP.....	29
Figure n° 8 : Evaporateur sous flux gazeux.....	30
Figure n° 9 : chromatogramme obtenu après reprise avec le mélange B.....	31
Figure n° 10 : Influence du pH sur le temps de rétention (22).....	33
Figure n° 11 : Spectre UV du tazobactam.....	34
Figure n° 12 : Spectre UV du meropenem.....	34
Figure n° 13 : Proportion de FU de ceftriaxone fonction de l'albuminémie et de la concentration totale .....	36
Figure n° 14 : Calcul du rendement de l'ultrafiltration .....	38
Figure n° 15 : Chromatogramme observé à 210nm en milieu aqueux .....	40
Figure n° 16 : échantillon plasmatique chargé observé s aux longueurs d'ondes d'intérêt .....	41
Figure n° 17 : Blanc de plasma avec étalon interne à 305nm .....	42
Figure n° 18 : Blanc de plasma zoomé observé à 220nm.....	42
Figure n° 19 : Etats d'ionisation du cefepime.....	43
Figure n° 20 : Etats d'ionisation du tazobactam.....	43
Figure n° 21 : Etats d'ionisation de la ceftazidime .....	43
Figure n° 22 : Etats d'ionisation du meropenem.....	44
Figure n° 23 : Etats d'ionisation de la ceftriaxone.....	44
Figure n° 24 : Etats d'ionisation du cefotaxime.....	44
Figure n° 25 : Etats d'ionisation de la cefazoline.....	44
Figure n° 26 : Etats d'ionisation du linezolid (EI).....	45
Figure n° 27 : Etats d'ionisation de la piperacilline .....	45
Figure n° 28 $CF_i$ des analytes .....	49
Figure n° 29 : Concentrations plasmatiques des antibiotiques ( $\mu\text{g/ml}$ ).....	51

## Liste des tableaux

Tableau I : Log P des $\beta$ -lactamines de l'étude (Source : ChemAxon) .....	12
Tableau II : Pourcentage de fixation des $\beta$ -lactamines de l'étude(10,11).....	13
Tableau III : Revue de différentes méthodes développées pour la quantification de la FU ou totale dans le plasma incluant des $\beta$ -lactamines.....	15
Tableau IV : Influence de la température et du pH sur la FU (27).....	21
Tableau V : Charges en présence par molécules à pH = 2 et pH = 7,4 .....	45
Tableau VI: Rendement de la SPE.....	46
Tableau VII : Longueur d'onde ( $\lambda$ ), Temps de rétention (Tr), Gamme d'étalonnage, Coefficient de corrélation ( $r^2$ ) et CV à LOQ (CV LOQ) .....	47
Tableau VIII : Précision et exactitude .....	48
Tableau IX : Pourcentages de NSB observés .....	49
Tableau X : Moyenne, précision et CF .....	50
Tableau XI : Résultats des dosages.....	51



## Liste des abréviations

CF : Facteur de correction

CMI : Concentration minimale inhibitrice

EMA : Agence européenne du médicament

FU : Fraction libre

LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

LLE : Extraction liquide-liquide

LOQ : Limite de quantification

MM : Masse molaire

NSB : Fixation non spécifique

PLP : Protéines liant les pénicillines

PK/PD : Pharmacocinétique/Pharmacodynamie

PP : Précipitation des protéines

QC : Contrôle qualité

SPE : Extraction solide-liquide

## I. Introduction

Les  $\beta$ -lactamines font partie des antibiotiques les plus couramment utilisés chez les patients en sepsis ou en état de choc septique. Ces médicaments ont un effet bactéricide temps dépendant ce qui signifie que leur efficacité dépend de la durée pendant laquelle la concentration en fraction libre (FU) (qui représente la forme active) est supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la bactérie. Du fait de leur élimination majoritairement rénale, une altération de cette fonction est susceptible d'entraîner une augmentation des concentrations plasmatiques de ces médicaments. Inversement une hyperclairance rénale, phénomène fréquent en réanimation chirurgicale (35 à 70% chez les patients notamment en cas de traumatisme crânien (1,2)) peut tout aussi bien entraîner une diminution des concentrations plasmatiques par augmentation de l'excrétion de ces antibiotiques (3,4).

Les travaux présentés ont été réalisés dans le cadre de l'étude « Hyperclairance ». Il s'agit d'une étude prospective, observationnelle et monocentrique menée par le Dr Cédric Carrié au sein du service de Réanimation Chirurgicale et Traumatologique de l'Hôpital Pellegrin (CHU Bordeaux). Cette étude vise à déterminer les conséquences cliniques, pharmacologiques et microbiologiques d'une hyperclairance rénale chez les patients justifiant d'une antibiothérapie curative. L'hypothèse principale est que l'hyperclairance rénale peut conduire à un risque d'échec microbiologique et clinique via une diminution des concentrations plasmatiques en FU. L'objectif est donc d'évaluer l'exposition au médicament via des mesures de leur concentration plasmatique en FU et de les comparer aux CMI des bactéries.

Dans ce contexte, la disposition d'une méthode de dosage fiable et reproductible permettant de déterminer la FU plasmatique des 8  $\beta$ -lactamines (dont un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases) présentées en figure n°1 incluses dans le protocole de l'étude est un prérequis indispensable.

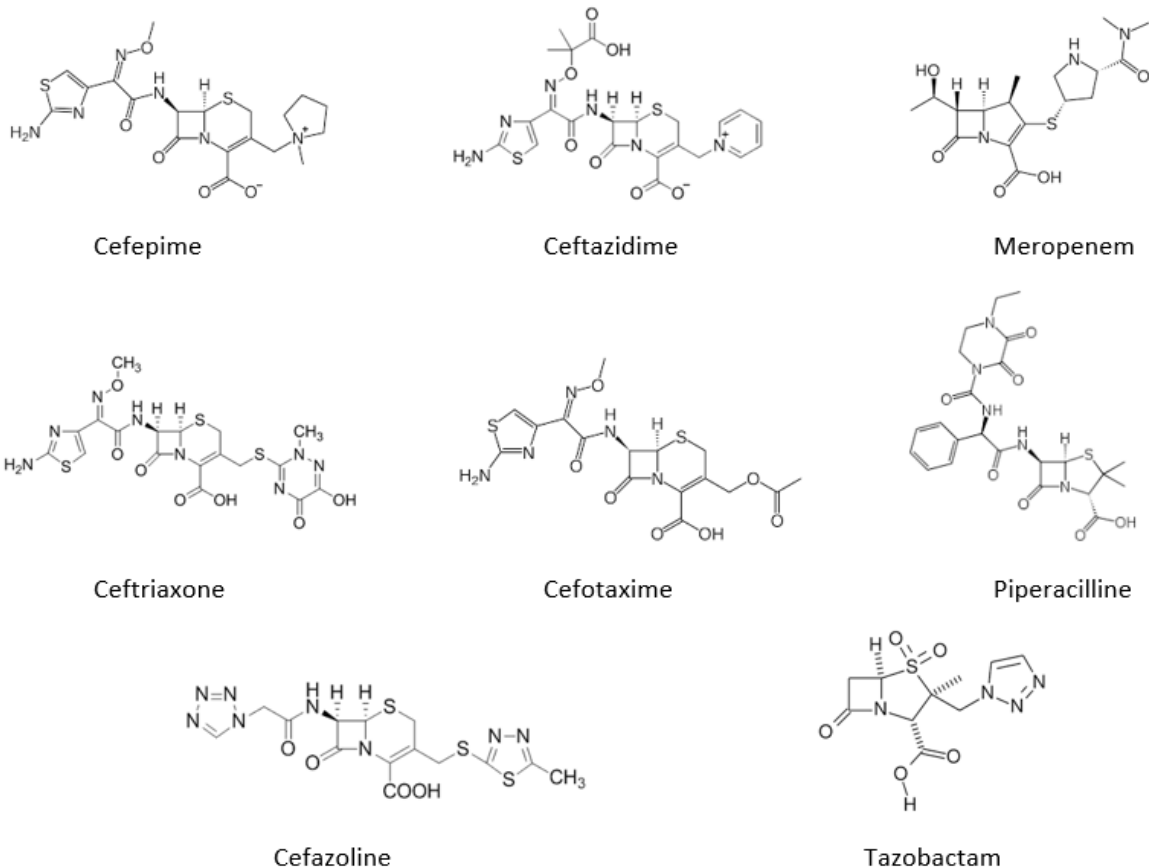


Figure n° 1 :  $\beta$ -lactamines incluses dans le protocole de recherche clinique « Hyperclairance » et faisant l'objet du développement de la méthode de dosage

L'objectif de ce travail est de mettre au point une méthode de dosage unique permettant la détermination simultanée de la FU des 8 molécules entrant dans l'étude offrant ainsi la possibilité de pouvoir quantifier les concentrations plasmatiques libres en cas de co-administration ou de changement d'antibiotique.

Afin d'appliquer cette méthode aux dosages des échantillons plasmatiques prévus par l'étude, l'ensemble du procédé a été validé analytiquement selon les recommandations européennes de l'EMA (5). Une attention particulière a été apportée lors du développement à l'optimisation du procédé de traitement des échantillons pour récupérer la FU. En effet, le dosage de la FU relève d'une certaine complexité en comparaison du dosage de la fraction totale.

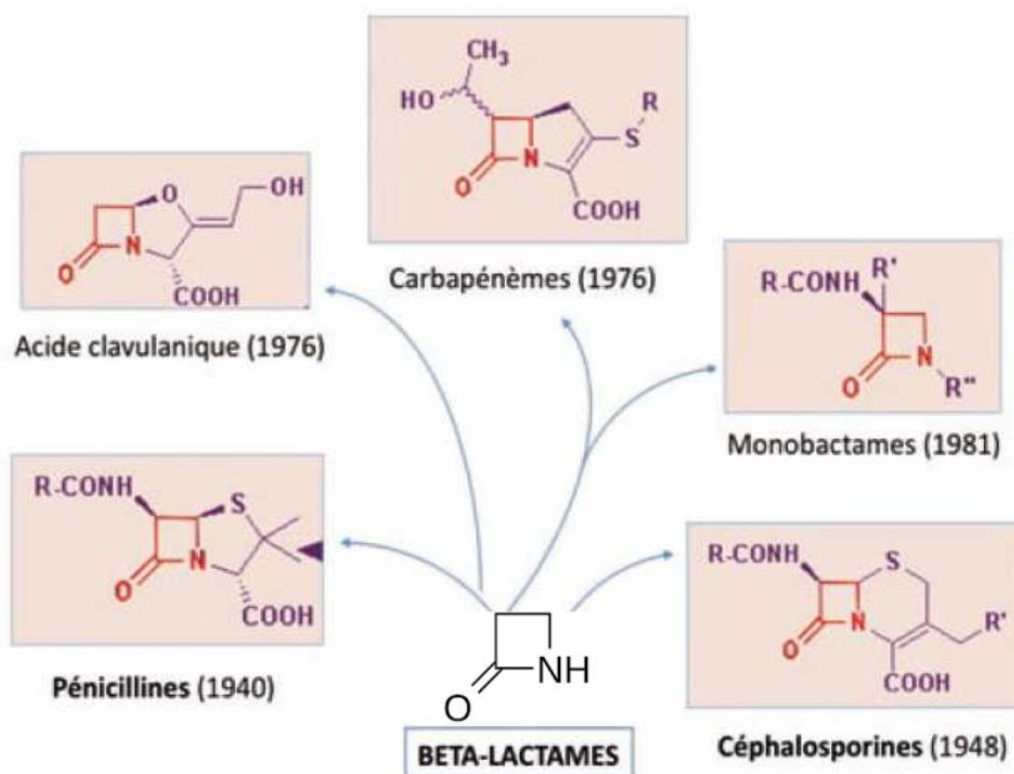
Les problèmes généraux les plus courants avec les techniques de dosages de la FU sont la perturbation *in vitro* de la liaison protéine-médicament établie *in vivo* et l'adsorption non spécifique aux matériaux (*Non Specific Binding*, NSB) (6).

## A. Généralités sur les $\beta$ -lactamines

Depuis la découverte de la pénicilline par Fleming en 1929, de nombreuses  $\beta$ -lactamines ont été développées. Tous les antibiotiques appartenant à la classe des  $\beta$ -lactamines présentent un mode d'action commun, mais se distinguent essentiellement par leur structure chimique, le spectre antibactérien, la sensibilité aux mécanismes de résistance et leur pharmacocinétique.

### 1. Propriétés physico-chimiques des $\beta$ -lactamines

Construites autour d'un noyau  $\beta$ -lactame commun, les  $\beta$ -lactamines sont classées par noyau puis par familles. Parmi les noyaux, on distingue les pénames (pénicillines), les céphèmes (céphalosporines), les monolactames (monobactams) et les pénèmes (carbapénèmes).



*D'après D.Comte, Rev Med Suisse 2012*

Figure n° 2 : Les différentes familles de  $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines sont généralement considérées comme hydrophiles étant donné que leur log P est généralement inférieur à 0 (Tableau I) (Source : ChemAxon).

La lipophilie d'une molécule peut être déterminée en calculant le coefficient de partage d'une molécule dans un mélange solvant aqueux + solvant organique, c'est-à-dire le rapport des concentrations respectives dans la phase organique et dans la phase aqueuse.

En pratique, on utilise le logarithme du coefficient de partage = log P. Le log P caractérise la lipophilie de la molécule et plus il est élevé, plus la molécule est lipophile.

Tableau I : Log P des  $\beta$ -lactamines de l'étude (Source : ChemAxon)

Analyte	LogP
Meropenem	-4,4
Cefepime	-4,3
Ceftazidime	-4,1
Ceftriaxone	-1,9
Cefazoline	-1,5
Cefotaxime	-1,4
Tazobactam	-1,4
Piperacilline	-0,26

## 2. Pharmacodynamie des $\beta$ -lactamines

Parmi les  $\beta$ -lactamines, les céphalosporines sont sans doute la classe la plus couramment prescrite chez les malades de réanimation en sepsis sévère ou état de choc septique. Leur mécanisme d'action leur confère une bactéricidie temps dépendante avec pour objectif une concentration plasmatique en FU supérieure à 4 à 8 fois la CMI (7,8).

Les  $\beta$ -lactamines se fixent aux protéines de liaison des pénicillines (PLP) au niveau de la membrane externe cytoplasmique. Dans la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (constituant essentiel de la paroi bactérienne), les transpeptidases et carboxypeptidases bactériennes reconnaissent le cycle bêta-lactame qui entre compétition avec leur substrat naturel, le dipeptide d'alanine. Cela entraîne l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane (composant essentiel de la paroi bactérienne) puis l'arrêt de la croissance et la mort de la bactérie.

Il existe différents mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines : modifications des PLP (Pneumocoques et SARM), production de  $\beta$ -lactamases, diminution de la perméabilité de la membrane externe (modification des porines chez les BGN), ainsi que les phénomènes d'efflux. Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases utilisées en association (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam, avibactam) ont une bonne activité contre les pénicillinases mais bien que porteurs d'un noyau  $\beta$ -lactame, ils sont dénués d'activité bactéricide ou bactériostatique.

### 3. Pharmacocinétique des $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines sont éliminées principalement par voie rénale généralement sous forme inchangée. Elles sont pourvues d'un faible volume de distribution (<1L/kg) et d'une courte demi-vie de l'ordre d'une à deux heures à l'exception notable de la ceftriaxone qui possède une demi-vie plus nettement longue (6 à 8 heures) permettant des prises plus espacées.

Du fait de cette faible demi-vie et de leur activité bactéricide temps dépendant, leur administration sous forme de perfusion continue s'est démocratisée en réanimation, permettant d'obtenir une concentration à l'équilibre supérieure aux CMI pendant 100% de l'intervalle entre deux administrations, rendant ainsi le traitement plus efficace (9).

Les  $\beta$ -lactamines se présentent sous forme d'acides faibles et se fixent presque exclusivement à l'albumine. Cette fixation dite de type 1 par opposition à la fixation de type 2, est de forte affinité et rapidement saturable à l'origine d'interactions médicamenteuses conduisant à des phénomènes de compétitions entre les différents ligands en présence. De plus, certaines de ces molécules présentent une fixation non linéaire dépendante de la concentration (10), donnée intéressante lorsque l'on s'intéressera au dosage de la FU.

Tableau II : Pourcentage de fixation des  $\beta$ -lactamines de l'étude(10,11)

Analyte	Pourcentage de fixation
Meropenem	2%
Cefepime	16-19%
Ceftazidime	15-17%
Ceftriaxone	85-95%
Cefazoline	75-88%
Cefotaxime	38-40%
Tazobactam	30%
Piperacilline	30%

## B. Revue bibliographique des méthodes utilisées pour le dosage de la FU des anti-infectieux

### 1. Généralités sur la bioanalyse des médicaments

La bioanalyse est une science destinée à identifier et quantifier des substances endogènes ou exogènes issues d'un organisme vivant. L'analyse d'échantillons biologiques (d'origine plasmatiques, biliaires, urinaires...) demande une connaissance théorique et pratique de la part du professionnel responsable de la mise au point d'une méthode et de l'interprétation des résultats.

Dans le domaine pharmaceutique, le dosage de médicaments dans les matrices biologiques s'effectue à tous les stades de son développement. Lors des stades précoces de la recherche préclinique et clinique (essais cliniques de phase I et II et III, avant commercialisation) il permet d'évaluer la distribution et l'exposition à la molécule dans l'intérêt de définir une posologie adaptée à l'effet recherché. D'une molécule à une autre, la posologie utilisée pourra être fixe ou variable en fonction du poids ou de la surface corporelle par exemple.

Une fois commercialisés les médicaments sont distribués et administrés à une population bien plus diversifiée (âge, poids, comorbidités, prise d'autres médicaments) que celle représentée dans les essais cliniques. A une posologie donnée, l'exposition au médicament peut varier d'un individu à l'autre à chacune des étapes du devenir du médicament dans l'organisme à savoir l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'excrétion. Une modification des concentrations plasmatiques pourra tout aussi bien n'avoir aucune conséquence (exemple des marges thérapeutiques larges), qu'entraîner une perte d'efficacité (par diminution des concentrations) ou une toxicité (par accumulation ou lié à son mode d'action pharmacologique). Ainsi, les études de pharmacocinétique menées après commercialisation ont pour principal objectif l'étude de la variabilité de l'exposition aux médicaments chez certaines populations de patients spécifiques incluant la recherche des co-variables d'intérêt. Elles peuvent également s'inscrire dans des études analysant les relations existant entre les doses du médicament et les effets thérapeutiques et/ou indésirables afin de déterminer le plus précisément possible le régime posologique qui garantira un rapport efficacité/tolérance optimal (étude pharmacocinétique/pharmacodynamique ou PK/PD). Enfin, le travail du bioanalyste permet d'apporter des réponses à de multiples questions de santé par le dosage des substances et l'interprétation des résultats des tests effectués en laboratoire.

2. Revue de la littérature des différentes méthodes de dosages de la FU et de la fraction totale des  $\beta$ -lactamines dans le plasma humain et incluses dans l'étude

Le dosage de la FU à partir d'un échantillon plasmatique comprend différentes étapes. A partir d'un échantillon plasmatique le plus souvent congelé et obtenu après centrifugation d'un tube de sang total, il faut tout d'abord se replacer dans les conditions *in vivo* afin de recréer la liaison protéine-médicament *in vitro*. Ensuite il faut isoler la FU, purifier l'échantillon pour faire précipiter les protéines résiduelles et/ou augmenter la spécificité lors du dosage (étape optionnelle) et enfin séparer, identifier et quantifier les analytes présents dans l'échantillon.

A ce jour, plusieurs méthodes de préparations d'échantillons sont disponibles pour doser la FU des médicaments. Parmi elles, la dialyse à l'équilibre et l'ultrafiltration sont le plus couramment utilisées dans l'étape de récupération de la FU. Bien que la dialyse à l'équilibre soit considérée comme la méthode de référence (12), l'ultrafiltration s'est progressivement imposée en routine pour sa simplicité de mise en œuvre et sa rapidité comme en témoigne le tableau III, reprenant notamment les différentes méthodes développées pour la quantification de la FU et de la fraction totale des  $\beta$ -lactamines. Dans ce contexte, seulement ces deux techniques sont donc développées dans ce manuscrit.

Tableau III : Revue de différentes méthodes développées pour la quantification de la FU ou totale dans le plasma incluant des  $\beta$ -lactamines

Auteurs	Molécules dosées	Instrumentation pour la détection	Fraction dosée	Simultanée	Technique d'isolement de la FU	Purification de la FU récupérée	Limites de quantification
<b>Briscoe et al 2012 (13)</b>	Ceftriaxone, cefazoline, meropenem, piperacilline	HPLC-UV	Libre	Non	Ultrafiltration sur membrane Matériel : Amicon Ultra™ Cut off : 30 kDa Condition centrifugation: 16200g, 10 min, pH : non fixé Température : non fixée	Pas de purification	0,1-50 $\mu$ g/ml
<b>Musson et al 2003 (14)</b>	Ertapenem	HPLC-UV	Libre	NA	Ultrafiltration sur membrane Matériel : Centrifree™ Cut off : 30 kDa Condition centrifugation: 1200g, 15 min pH : non fixé Température : non fixée	Pas de purification	0,25-100 $\mu$ g/ml



<b>Palma et al 2018</b> (15)	Cefazoline	HPLC-UV	Libre	NA	Ultrafiltration sur membrane Matériel : Centrifree™ Cut off : 30 kDa Condition centrifugation: 1000g, 30 min pH : non fixé Température : 37°C	Pas de purification	5–500 µg/ml
<b>Connor et al 2011</b> (16)	Piperacilline, Tazobactam	HPLC-UV	Libre	Oui	Ultrafiltration sur membrane Matériel : Centrifree™ Cut off : 30 kDa Condition centrifugation: 2000g, 10 min pH : non fixé Température : 4°C	Pas de purification	2–250 µg/ml 0,5–62,5 µg/ml
<b>Di Giovamberardino et al 2009</b> (17)	Piperacilline, Tazobactam	HPLC-UV	Libre	Oui	Ultrafiltration sur membrane Matériel : ULTRAFREE® Cut off : 30 kDa Condition centrifugation: 1000g, 10 min pH : non fixé Température : non fixée	Pas de purification	0,5–500 µg/ml 0,12–62,5 µg/ml
<b>Verhoven et al 2018</b> (18)	Piperacilline, Tazobactam	HPLC-UV	Libre	Oui	Ultrafiltration sur membrane Matériel : VivaFree® Cut off : 30 kDa Condition centrifugation: 2500g, 30 min pH : non fixé Température : non fixée	Pas de purification	2–2000 µg/ml 2–60 µg/ml
<b>Ongas et al 2018</b> (19)	Ceftriaxone	LC-MS/MS	Libre	Oui	Ultrafiltration sur membrane Matériel : Centrifree™ Cut off : 30 kDa Condition centrifugation: 2000g, 30 min pH : non fixé Température : 37°C	Précipitation des protéines par ACN/MeOH	0,4–300 µg/ml
<b>Parker et al 2015</b> (20)	Cefazoline	UPLC-MS/MS	Libre	Oui	Ultrafiltration sur membrane Matériel : Centrifree™ Cut off : 30 kDa Condition centrifugation: 2500g, 5 min pH : non fixé Température : 37°C	Pas de purification	0,1–500 µg/ml
<b>McWhinney et al 2010</b> (21)	Ceftazidime, meropenem, ceftriaxone, cefazoline, piperacilline	HPLC-UV	Totale	Non	NA	Précipitation des protéines par ACN	5-500 µg/ml 5-250 µg/ml 10-1000 µg/ml
<b>Verdier et al 2011</b> (22)	Cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, meropenem, piperacilline	HPLC-UV	Totale	Oui	NA	Précipitation des protéines par ACN	5 - 200 µg/ml
<b>Ikeda et al 2007</b> (23)	Meropenem	HPLC-UV	Totale	NA	NA	Nanosep 10kDa 12000g	0,05-100 µg/ml

<b>Legrand et al 2012 (24)</b>	Cefazoline, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, piperacilline	UHPLC-UV	Totale	Oui	NA	Précipitation des protéines par ACN + Acide formique 0.1%	2 - 100 µg/ml
<b>Carlier et al 2012 (25)</b>	Cefazoline, ceftazidime, meropenem, piperacilline, tazobactam	UPLC-MS/MS	Totale	Oui	NA	Précipitation des protéines par ACN	0,5-100 µg/ml 1,5-100 µg/ml
<b>Carlier et al 2015 (26)</b>	Ceftazidime, meropenem, piperacilline	UPLC-MS/MS	Totale	Oui	NA	Précipitation des protéines par ACN	1-100 µg/ml 0,5-80 µg/ml 1-150 µg/ml

A la lecture de ces données, les techniques d'ultrafiltration pour isoler la FU et d'HPLC-UV pour séparer, identifier et quantifier les analytes sont les plus couramment utilisées. La remise en conditions physiologiques devient presque systématique depuis les études de Nilsson (2013) et Kratzer (2014) (27,28) alors qu'elle n'était presque jamais effectuée auparavant. Enfin, les techniques de purification d'échantillon sont rarement utilisées dans le dosage de la FU car l'étape d'ultrafiltration permet déjà de purifier l'échantillon en protéines, étape indispensable avant l'injection dans le système de chromatographie.

Ainsi dans ce paragraphe, nous ferons l'état des lieux des deux principales techniques conduisant à l'obtention de la FU des médicaments à partir du plasma à savoir la dialyse à l'équilibre et l'ultrafiltration sur membrane puis nous détaillerons dans le matériel et méthode la mise au point de notre méthode de dosage.

#### *a) La dialyse à l'équilibre*

Le principe porte sur la diffusion au travers d'une membrane perméable ou semi-perméable, de molécules diffusibles selon la porosité de la membrane et en fonction d'un gradient de concentration. La diffusion des molécules se fera du côté le plus concentré vers le côté le moins concentré. Chaque espèce en solution subit individuellement ce processus. À l'équilibre, les concentrations de chaque espèce diffusible sont égales de part et d'autre. La quantité de matière présente d'un compartiment à l'autre dépendra donc du volume de part et d'autre de la membrane. Un mécanisme impliquant les charges électriques des molécules existe également mais reste négligeable en comparaison du gradient de concentration. Le principe de la dialyse à l'équilibre est présenté en figure n°3.

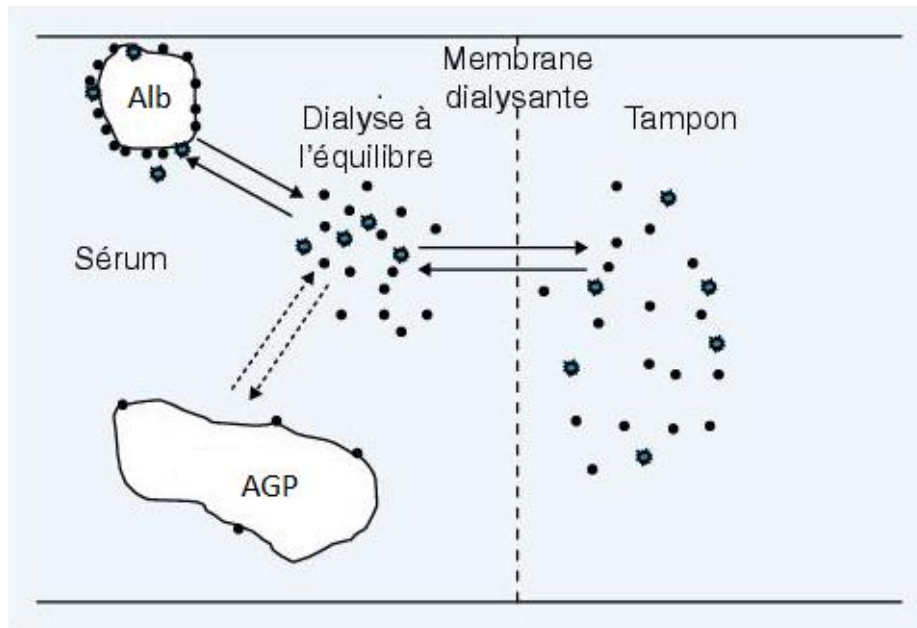


Figure n° 3 : Principe de la dialyse à l'équilibre

*b) L'ultrafiltration sur membrane*

Cette technique repose sur l'application d'une pression qui permet le transfert du solvant à travers une membrane dont la taille des pores assure la rétention de solutés. Ainsi après centrifugation les molécules de taille inférieure à la porosité du filtre (ou "cut-off") et la majorité du solvant aqueux passent au travers du filtre et sont récupérés dans le tube collecteur. C'est ce qu'on appelle le diffusat qui contient entre autres la FU de l'analyte, non lié aux protéines plasmatiques. A la surface du filtre se trouve le rétentat contenant les molécules et/ou particules retenues par la membrane (notamment les protéines plasmatiques liées ou non aux analytes) de taille supérieure à la porosité du filtre.

Cependant, toute la FU ne se retrouve pas dans le diffusat. La quantité restante dans le filtre dépend de la force centrifuge appliquée et du volume de rétentat.

Les dispositifs d'ultrafiltration commercialisés utilisent des membranes de cut-off de l'ordre de 3, 10, 30, 50 ou 100 kDa. Le principe de l'ultrafiltration est présenté en figure n°4.

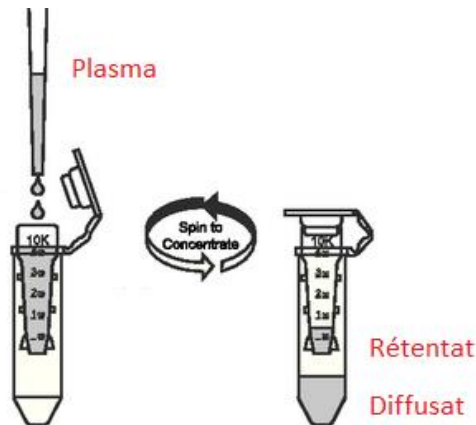


Figure n° 4 : Principe de l'ultrafiltration

De nombreux types de filtres sont disponibles sur le marché. Le choix du dispositif d'ultrafiltration utilisé doit prendre en compte :

- La porosité du filtre : De façon générale la taille des pores est généralement 2 fois plus petite que l'espèce la plus petite à retenir (pour assurer une bonne rétention tout en limitant le colmatage en profondeur de la membrane). Quel que soit la technique employée, connaître la nature de la ou des protéines sur laquelle ou lesquelles se fixent les analytes permettra de choisir le cut-off adapté pour retenir la fraction liée et ne récupérer que la FU.
- Les matériaux : qui doivent être choisis afin de limiter les affinités avec les solutés pour éviter les phénomènes d'adsorption non spécifiques.
- La compatibilité avec les contraintes de pH, de températures et de solvant utilisés au cours du procès d'ultrafiltration nécessaires au maintien *in-vitro* de l'équilibre de la liaison protéine-médicaments

### 3. Principaux phénomènes pouvant interférer avec la récupération de la FU par ultrafiltration sur membrane

Lors l'étape de récupération de la FU, que ce soit par ultrafiltration ou dialyse à l'équilibre, il existe un phénomène d'adsorption connu sous le nom de fixation non spécifique (NSB) au cours duquel une partie des analytes et des autres molécules constituant le plasma vont s'adsorber sur les surfaces du filtre et du tube de récupération (6,12,28,29).

Le pourcentage de NSB varie d'une molécule à l'autre selon sa lipophilie (log P), sa concentration, la présence d'autres molécules mais aussi en fonction du matériau des dispositifs utilisés et de la matrice biologique elle-même. Un travail de *Wang et al* (12) sur l'influence des matrices montre que la présence de protéines plasmatiques permet de diminuer le NSB en démontrant que ce dernier ne constitue pas une limitation, même pour les composés hautement lipophiles car les sites seraient passivés en présence de plasma. Malgré cela, de nombreuses études cherchent à comprendre comment réduire davantage ce NSB dans le but d'augmenter le rendement de l'ultrafiltration. Plusieurs agents permettant de passiver les membranes et de limiter le NSB comme le Tween, le BSA ou le lait en poudre ont montré une certaine efficacité.

Il existe des protocoles de passivation (30) proposés par certains laboratoires. Malheureusement, ces agents influencent aussi très probablement la liaison protéique (6) rendant leur utilisation discutable. En d'autres termes, on pourrait s'affranchir du NSB grâce à ces agents mais on pourrait tout aussi bien déplacer la liaison et donc modifier le pourcentage de FU.

Si l'on souhaite isoler la FU par le biais de l'ultrafiltration, il faut également prêter attention à la force centrifuge utilisée car l'utilisation d'une force trop élevée peut déséquilibrer la liaison protéine-ligand biaisant ainsi le résultat du dosage (28).

#### 4. Perturbation ex-vivo de la liaison protéine-médicament

Les différents types de liaisons entre protéines et ligands ont fait l'objet de plusieurs études (6,10,27,28,31–36) ces dernières années permettant la mise en évidence de nombreux paramètres pouvant influencer la fixation protéique et qui sont à maîtriser si l'on s'intéresse au dosage de la FU (ou de la fraction liée). La non prise en compte de certains d'entre eux pourrait conduire à la réalisation d'une mauvaise courbe de calibration lors de la validation de la méthode de dosage et par conséquent, à rendre un résultat lors du dosage de l'échantillon non représentatif de la concentration telle qu'elle est *in vivo*. Ces paramètres sont physiologiques (pH, température, bilirubinémie) (6,27,28,34,36), pharmacocinétiques (10,31–33) (concentration plasmatique de l'analyte) ou encore biochimiques (concentration en protéine et nombre de sites de fixations, présence d'inhibiteurs compétitifs et affinité des ligands) (35,36).

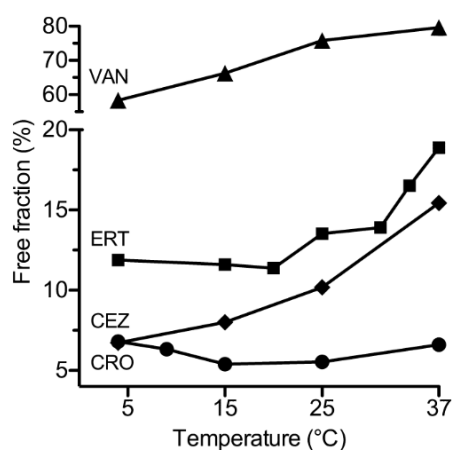
Lors de la mise au point et du dosage, la prise en compte de l'ensemble de ces paramètres permet de rétablir *in vitro* la liaison protéine-ligand telle qu'elle est *in vivo* et de la maintenir jusqu'à l'obtention de la FU. De notre côté, pH et température sont fixés en amont de l'étape de récupération de la FU. Des exemples de l'influence du pH et de la température sur la proportion de FU sont présentés en en Tableau IV (Nilsson et al) et figure n°5 (Kratzer et al).

*Tableau IV : Influence de la température et du pH sur la FU (27)*

Compound	Unbound fraction (%)		
	32°C	37°C	40°C
Ropivacaine	6	6	9
Bupivacaine	4	5	13
Mepivacaine	21	24	26
Prilocaine	55	65	74
Lidocaine	17	25	23

Compound	pH 6.4	pH 7.4	pH 8.4	pH 9.4
	Ropivacaine	28	6	4
Bupivacaine	22	5	2	3
Mepivacaine	72	24	13	12
Prilocaine	70	65	54	52
Lidocaine	47	25	14	12



Influence of temperature on the free fraction of vancomycin 25 mg/L (VAN), ertapenem 16 mg/L (ERT), cefazolin 20 mg/L (CEZ) or ceftriaxone 20 mg/L (CRO) in plasma. Depicted are means of 2-5 independent experiments. Ultrafiltration time was extended at lower temperatures, up to 40 min at 4 °C, in order to get sufficient (>60 µL) filtrate.

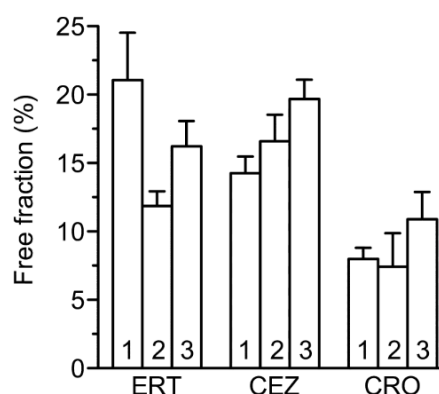


Fig. 3. Mean (SD) free fraction (n=6 for each, plasma and serum) of ertapenem 25 mg/L (ERT), cefazolin 25 mg/L (CEZ) or ceftriaxone 25 mg/L (CRO) in (1) serum/plasma buffered to pH 7.4, (2) unbuffered serum/plasma, and (3) serum/plasma buffered to pH 8.5.

*Figure n° 5 : Influence de la température et du pH sur la FU (28)*

## II. Matériel et méthode

### A. Matériel et solutions standards

#### 1. Introduction

De nombreuses méthodes de dosages de médicaments sont publiées mais aucune ne permet de doser simultanément la FU ou même la fraction totale des 8 molécules incluses dans l'étude. Le recours aux étapes de purification et de concentration n'est pas systématique car plus longues, plus onéreuses et nécessitant des étapes de mises au point. En effet le traitement de l'échantillon peut être plus limité notamment lorsque la détection est réalisée par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) (qui est une technologie plus spécifique que la spectrométrie) car elle permet de discriminer deux analytes même lorsqu'ils sont co-élus en chromatographie liquide avec une bonne sensibilité. Ainsi plus la technologie de détection est spécifique et sensible moins la purification et la concentration de l'échantillon en amont sera exigeante. D'autre part, raccourcir le temps consacré au traitement de l'échantillon permet également de limiter la dégradation de l'analyte à doser au cours du process. Par conséquent, dans la littérature peu de méthodes de dosage de la FU dans le plasma intègrent une étape de purification en supplément de l'étape d'ultrafiltration.

Les méthodes de dosage de la FU des antibiotiques à l'étude préexistantes sont rarement consensuelles, les modes opératoires sont multiples (même pour le dosage d'une même molécule) et parfois peu détaillées. Néanmoins, les travaux de certains auteurs (6,28,34) notamment sur la maîtrise des paramètres pouvant influencer la FU évoqués en première partie nous a permis d'optimiser notre méthode de dosage.

#### 2. Matériels et Réactifs

Les antibiotiques cefepime 1 g, ceftazidime 1 g, ceftriaxone 1 g, cefotaxime 1 g, cefazoline 1 g et piperacilline/tazobactam 4/0,5 g proviennent du laboratoire Mylan, le meropenem et le linezolid du laboratoire Fresenius Kabi. L'acétonitrile (ACN) et le méthanol (MeOH) de chez Biosolve sont respectivement de qualité HPLC-S Gradient et LC-MS.

Le tampon phosphate  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et l'acide orthophosphorique à 85% sont obtenus auprès de Prolabo et l'eau désionisée utilisée tout au long des expérimentations est obtenue à partir du système de déionisation de la société Aquadem.

Les filtres utilisés pour l'ultrafiltration sont des filtres Amicon Ultra-0,5 mL avec un cut-off de 10 000 Dalton (10 kDa) de chez Millipore. La purification a été effectuée en utilisant un dispositif d'extraction en phase solide Strata-X 33 $\mu\text{m}$  Polymeric Reversed Phase du laboratoire Phenomenex.

Enfin, pour le dosage, nous avons utilisé un système HPLC Agilent 1100 series et une colonne HPLC ProntoSIL C18 (125 x 4,0 mm ; 3  $\mu\text{m}$ ) de chez Bischoff chromatography a été utilisée pour la séparation des composés en HPLC.

### 3. Préparation des solutions mères, calibrants et contrôles qualité

Les solutions mères ont été préparées dans de l'eau déionisée à 40 mg/ml pour le cefepime, la ceftazidime, le meropenem, le cefotaxime, la ceftriaxone, la cefazoline et à 40/5 mg/ml pour la piperacilline/tazobactam. Les solutions mères ont été stockées à  $-80^\circ\text{C}$  pendant 2 mois maximum. Dans ces conditions, elles restent stables plusieurs mois (21,37).

Le linezolid a été utilisé comme étalon interne et dilué à 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dans le tampon phosphate 100 mM pH2. Pour la courbe d'étalonnage, des solutions étalons ont été préparées dans de l'eau déionisée à 0,5 ; 1 ; 5 ; 20 ; 50 ; 80 ; 125 et 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour le cefepime, la ceftazidime, le cefotaxime, la cefazoline et le meropenem ; à 0,25 ; 0,5 ; 2 ; 5 ; 20 ; 75 ; 125 et 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour la ceftriaxone et à 2/0,25 ; 4/0,5 ; 10/1,25 ; 25/3,125 ; 50/6,25 ; 100/12,5 ; 150/18,75 et 250/31,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour la piperacilline / tazobactam.

Trois contrôles qualité (QC) ont été préparés à partir de solutions mères diluées dans de l'eau désionisée à 1,5 ; 75 et 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour le cefepime, la ceftazidime, le cefotaxime, la cefazoline et le meropenem à 0,75 ; 80 et 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour la ceftriaxone et à 6/0,75 ; 90/11,25 et 200/25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour la piperacilline/tazobactam.



## B. Traitement de l'échantillon

### 1. Généralités

Une étape d'extraction ou à minima de précipitation des protéines est indispensable lorsque l'on souhaite doser la fraction totale d'un médicament car elle permet de ne pas obstruer la colonne de chromatographie et/ou d'endommager le matériel. Pour le dosage de la FU, aucune règle n'est établie. L'utilisation d'un filtre avec un cut-off suffisamment petit au cours de l'ultrafiltration ou de la dialyse à l'équilibre incite certains auteurs (13–18) à injecter directement un volume de diffusat dans la chaîne HPLC. D'autres (6,19) effectuent quand même une étape de précipitation des protéines (PP) après l'ultrafiltration.

Le développement d'une méthode de dosage simultanée de plusieurs molécules par HPLC-UV chez des patients polymédiqués nécessite que cette dernière soit suffisamment spécifique. En effet, plus le nombre de médicaments pris par un patient est important, plus le risque d'avoir une molécule co-éluee lors du dosage sera grand. Ainsi, la question de la purification du diffusat peut se poser notamment lorsque la détection est réalisée par HPLC-UV par rapport à l'HPLC-MS/MS. Une étape de purification post-ultrafiltration permettra non seulement de s'affranchir des protéines résiduelles mais aussi de se séparer de potentiels interférents. Actuellement les deux techniques de purification des matrices biologiques pour le dosage des médicaments les plus utilisées sont l'extraction liquide-liquide (LLE) et l'extraction liquide-solide (SPE). Par ailleurs dans la perspective d'appliquer notre méthode au dosage de la fraction totale, la mise au point d'une telle étape de purification (ici post-ultrafiltration pour le dosage de la fraction libre) pourra être facilement transposable.

### 2. Isolement de la FU par Ultrafiltration sur membrane

#### *a) Choix du dispositif d'ultrafiltration*

Le choix de la porosité de la membrane du filtre est basé en premier lieu sur la masse molaire (MM) de la protéine de liaison des analytes. L'ensemble de nos analytes ayant pour protéine de fixation l'albumine (65 kDa), le choix d'un filtre de porosité inférieure sera utilisé pour isoler la FU. Comme décrit précédemment, de façon générale la taille des pores est généralement 2 fois plus petite que l'espèce la plus petite à retenir (pour assurer une bonne rétention tout en limitant le colmatage en profondeur de la membrane).

Ainsi une porosité de maximum 30Kda est donc préférable. Quatre porosités inférieures à 65 kDa sont disponibles sur le marché à savoir 50, 30, 10 ou 3 kDa offrant chacune des avantages et des inconvénients. Une porosité de 30 kDa permet la rétention d'albumine mais le diffusat est plus riche en interférents et en peptides de faible masse molaire que si l'on utilise une porosité inférieure. La porosité de 3 kDa permet d'obtenir un diffusat dénué de la plupart des interférents mais le risque de colmatage du filtre est trop important lorsque l'on manipule du plasma et conviendrait à des matrices plus « propres » comme l'urine ou le LCR par exemple. Au vu de la littérature et des inconvénients des porosités de 3 et 30 kDa, le choix s'est porté sur un filtre de 10 kDa.

Le type de membrane utilisé est également un élément important car elle aura une influence sur le rendement de l'ultrafiltration.

Il existe deux principaux types de membrane, celles en polyethersulfone et celles en cellulose régénérée. A partir des données publiées (6), nous avons choisi une membrane en cellulose régénérée car les molécules (lipophiles essentiellement) semblent moins s'adsorber dessus.

Actuellement trois dispositifs sont couramment utilisés pour le dosage de la FU des médicaments (Nanosep<sup>®</sup>, Centrifree<sup>®</sup> et Amicon<sup>®</sup>) répondent à nos exigences et sont compatibles avec les conditions expérimentales prévues de volume d'échantillon, de température (37°C), de pH (physiologique) et de solvants. Ainsi, compte tenu également du coût et des dispositifs utilisés précédemment au sein du laboratoire, notre choix s'est porté sur les filtres Amicon Ultra-0,5 ml 10kDa.

#### *b) Conditions expérimentales*

Nous avons vu l'importance de remettre en conditions physiologiques les échantillons plasmatiques.

Comme la concentration en FU ne semble pas varier selon le volume de diffusat (37), si l'on injecte directement une partie de ce dernier dans la chaîne chromatographique, la variabilité volumique inter échantillon ne devrait pas poser problème. Cependant, si l'on ajoute des étapes de purification /concentration par évaporation (puis reprise) après l'ultrafiltration, il est primordial de conserver dans les mêmes proportions et tout au long du traitement de l'échantillon (de l'UF à la concentration par évaporation) la quantité de matière d'analyte libre soumise au dosage d'un échantillon à l'autre. Autrement dit le volume du diffusat soumis à la purification /concentration doit être constant d'un échantillon à l'autre.

Dans ce contexte, la dilution du plasma avant ultrafiltration permet d'une part d'augmenter le volume de diffusat (passage des analytes et de la phase aqueuse) réduisant ainsi la variabilité volumique inter-échantillons et d'autre part de limiter le colmatage du filtre en diminuant la viscosité de l'échantillon.

La capacité du filtre de 500  $\mu\text{L}$  nous permet de diluer 300  $\mu\text{L}$  de plasma avec 190  $\mu\text{L}$  d'eau déminéralisée auxquels sont ajoutés 10  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 100 mM pH 2, nécessaire pour atteindre le pH physiologique. Le mélange est ensuite incubé pendant 20 min à 37 ° C pour approcher la température physiologique. Enfin, il est centrifugé à 4650 g pendant 15 min à 37 ° C. La fixation du pH et de la température aux conditions physiologiques étant nécessaire au maintien de l'équilibre protéine-médicament établi *in vivo* tout comme l'application d'une force de centrifugation relativement faible (mais suffisamment élevée pour que le phénomène de filtration soit complet). Une fois les diffusats récupérés, les calibrants et les QC sont ajoutés à hauteur de la quantité de matière théoriquement contenue dans un volume de 300  $\mu\text{L}$  de plasma (quantité introduite dans le dispositif d'ultrafiltration).

### 3. Purification de l'ultrafiltrat par Extraction Liquide-Solide (SPE)

#### a) Généralités

La SPE est une méthode de préparation de l'échantillon au cours de laquelle des composés en solution ou en suspension dans une phase liquide sont séparés des autres éléments du mélange par adsorption sélective sur une phase solide en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Le principe est basé sur le partage des composés entre une phase liquide, le diffusat, et une phase stationnaire, l'adsorbant. Les adsorbants SPE sont le plus souvent catégorisés par la nature du mécanisme de leurs interactions primaires avec l'analyte d'intérêt. Les trois mécanismes les plus communs en SPE sont la phase inverse (RP), la phase normale (NP) et l'échange d'ions.

La SPE en phase inverse permet l'extraction de composés organiques en phase aqueuse. La SPE en phase normale permet l'extraction de composés hydrophile dans une phase organique et enfin la SPE avec échange d'ions (anion ou cation) permet la rétention de molécules chargées par une résine échangeuse d'ions. Cette dernière est plus spécifique et est largement dépendante du pKa des analytes et par conséquent est moins universelle que les deux précédentes. La SPE est de plus en plus utilisée (38–40) pour purifier les matrices biologiques en vue du dosage de médicaments en raison de sa rapidité et de son efficacité par rapport à la LLE.

En effet, les avantages de la SPE comparée à la LLE sont :

- La faible consommation de solvant
- La rapidité d'extraction permettant un gain de temps considérable (support multi plaque, extractions simultanées)
- La possibilité d'automatisation
- La reproductibilité dans le traitement des échantillons
- Plus de sélectivité en raison d'un grand nombre d'adsorbant et de différents mécanismes de rétention

La SPE se déroule en quatre étapes schématisées sur la figure n°6.

La première est une étape de conditionnement de l'adsorbant qui consiste à imprégner l'adsorbant et produire ainsi un environnement convenant à l'adsorption de l'analyte. Cette étape permet d'assurer des interactions reproductibles avec l'analyte.

La seconde étape consiste à déposer l'échantillon dans la cartouche (phase d'adsorption). Au cours de cette étape l'analyte est retenu sur la phase stationnaire tandis que le maximum d'interférents non retenus est éliminé.

La troisième étape, le lavage, a pour but d'éliminer des interférents faiblement retenus. Il faudra choisir des solvants de faibles forces éluantes pour n'éluer que les interférents.

Enfin la quatrième et dernière étape dite d'élution, consiste à récupérer les analytes retenus sur la phase stationnaire par élution à l'aide d'un solvant de force éluante suffisamment importante (méthanol ou acétonitrile dans le cas d'extraction en phase inverse) pour rompre les liaisons analyte-phase stationnaire. L'éluat récupéré contenant les analytes sera concentré puis analysé.

Ainsi, les choix du type de greffon, des solvants de lavage et d'élution et de l'état d'ionisation des analytes sont importants pour une purification optimale. L'utilisation d'une solution tampon pour modifier l'état d'ionisation des analytes pourra être utilisée si besoin avant cette étape d'extraction. Les cartouches de SPE doivent être choisies en fonction des analytes. Les phases échangeuses d'ions sont les plus sélectives mais si l'on veut être capable de retenir tous les analytes inclus dans la méthode, c'est une phase inverse qu'il faut utiliser car plus universelle. Ainsi, le choix s'est porté sur un sorbant permettant la rétention de composés apolaires et aromatiques par des liaisons covalentes ( $\pi$ - $\pi$ ), hydrogènes (dipôle-dipôle), et hydrophobes.

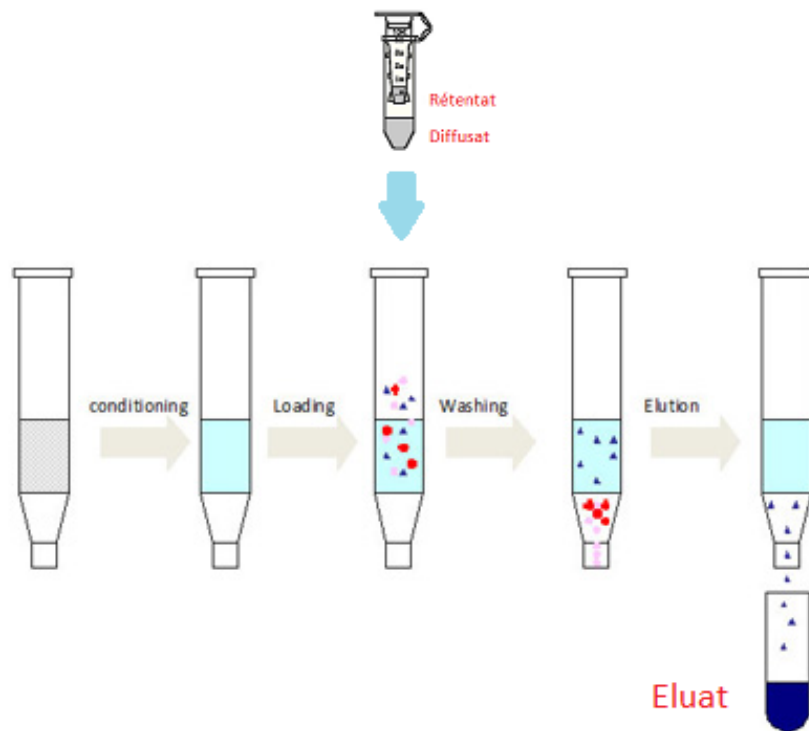


Figure n° 6 : Principe de la SPE

*b) La précipitation des protéines*

Le principe de la PP présenté en figure n°7 est donné à titre informatif et n'est pas été utilisé dans notre méthode de dosage. La PP est communément utilisée pour purifier les échantillons plasmatiques pour le dosage de la fraction totale, pour des raisons de simplicité, de rapidité mais aussi pour des raisons économiques. Malheureusement, elle ne permet pas particulièrement d'augmenter la spécificité de la méthode.

A un diffusat (dosage de la FU) ou à un plasma (dosage de la fraction totale), est ajouté un solvant organique comme du méthanol ou de l'acétonitrile puis le mélange est centrifugé pour faire précipiter les éléments protéiques. Le surnageant est éventuellement concentré avant injection dans la chaîne HPLC.

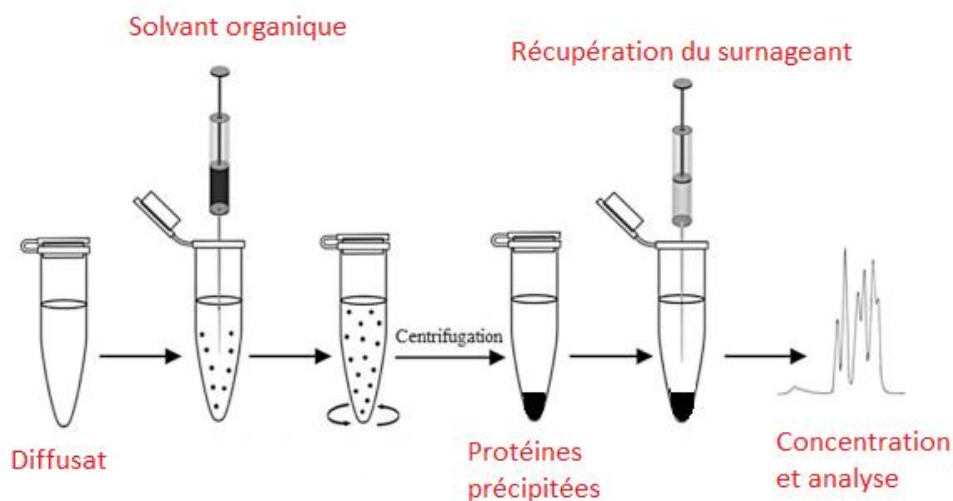


Figure n° 7 : Principe de la PP

### c) Conditions expérimentales

Les cartouches de SPE sont conditionnées selon les recommandations du laboratoire avec 1mL de méthanol (MeOH) et équilibrées en deux temps avec 0,5ml puis 1mL d'eau déionisée pour enlever toute trace de MeOH. Une fois tamponné par 700µl de tampon phosphate pH=2 100mM contenant l'étalon interne à 10 µg/ml, le diffusat est chargé dans la cartouche SPE.

Après chargement des échantillons a lieu l'étape de lavage pour laquelle le laboratoire recommande l'utilisation d'un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (avec 5% à 60% de MeOH). Trois solutions dont deux mélanges ont donc été testés successivement ; 1ml de MeOH/H<sub>2</sub>O 5/95 v/v ; 1ml de MeOH/H<sub>2</sub>O 3/97 v/v ; et 2 fois 1ml d'eau déionisée à 100%.

Pour chaque condition testée, nous avons calculé le rendement de la SPE (après élution à chaque fois avec 2\*0,4 ml MeOH/ACN 50/50 v/v) et dosé les analytes potentiellement présents dans ces solutions de rinçage. La condition pour laquelle la plus petite quantité d'analytes est retrouvé a donc été choisie. Ainsi le lavage est réalisé deux fois avec 1 ml d'eau déionisée (100% H<sub>2</sub>O). Enfin, pour l'étape d'élution (en deux temps pour optimiser le rendement), plusieurs mélanges ont aussi été testés. Le mélange Acide formique 2% dans du MeOH/ACN v/v recommandé par le laboratoire, du MeOH à 100% et le mélange MeOH/ACN 50/50 v/v. Ce dernier permet d'obtenir le meilleur rendement.

Tous les rendements ont été calculé en effectuant le rapport des aires obtenues en chargeant les calibrant avant SPE sur celles obtenues en chargeant les calibrants après SPE.

#### 4. Concentration de l'échantillon par Evaporation/Concentration

##### a) Généralités

Une fois le diffusat purifié par SPE, une étape de concentration avant analyse peut être réalisée pour augmenter la sensibilité de la méthode. Il existe plusieurs types d'évaporateurs dont les plus couramment utilisés sont des évaporateurs sous flux gazeux. Alors que l'échantillon est chauffé (attention aux molécules thermolabiles), un gaz (généralement de l'azote) est injecté à la surface des échantillons afin d'accélérer l'évaporation de l'éluat. Une fois évaporé, un volume fixe de liquide de reprise est ajouté pour remettre en solution les analytes avant analyse. Par ailleurs la concentration par évaporation puis reprise par un volume de solvant fixe permet également de limiter la variabilité de volume d'éluat inter-échantillons. Un exemple d'évaporateur sous flux gazeux est présenté en figure n°8.



Figure n° 8 : Evaporateur sous flux gazeux

##### b) Conditions expérimentales

Lors de l'étape de concentration, une température élevée permet de raccourcir le temps d'évaporation mais elle accélère la vitesse de dégradation des analytes. La température critique, définie comme celle à ne pas dépasser a été évaluée. Sous un flux continu d'azote de 5L/min, de nombreux pics de dégradation ont été observés à 50°C mais aucun à des températures inférieures à 40°C. Par précaution, la température d'évaporation n'excède donc pas 35°C.

Trois solvants de reprise ont été testés à volume équivalent, un mélange tampon phosphate 30 mM/ACN 93/7 v/v (A) correspondant à la phase mobile au début du run, le solvant d'éluat ACN/MeOH v/v (B) et un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O 30/70 v/v (C).

Les aires des pics observés avec le mélange A sont pour la plupart des analytes, inférieures à celles obtenues avec les mélanges B et C. L'utilisation de la phase purement organique B ne permet pas d'obtenir des pics gaussiens comme l'illustre la figure n°9.

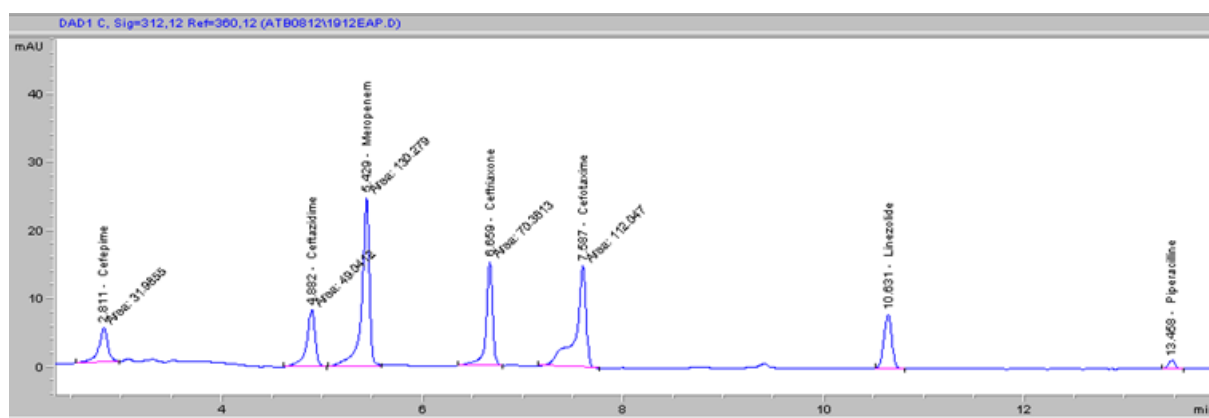


Figure n° 9 : chromatogramme obtenu après reprise avec le mélange B

Le mélange C constitue donc le meilleur solvant de reprise. D'autres essais ont été réalisés à partir de ce mélange en faisant varier la proportion de MeOH mais sans montrer de meilleurs résultats.

Enfin, plusieurs volumes de reprise ont été testés à 50µl, 100µl, 150µl, 200µl et 500µl. Bien que de faibles volumes permettent d'augmenter la sensibilité, du fait de la largeur des gammes d'étalonnages et du nombre de molécules, le volume de reprise de 200µl permet à la fois une bonne dissolution des analytes et la linéarité des points de gamme. En se basant sur le rapport des aires obtenues avec chacun des volumes de reprise, une reprise avec 50µl ne permet pas une bonne dissolution de certains analytes. Si l'on souhaite augmenter la sensibilité de la méthode, une reprise par 100µl à minima est recommandée mais la limite haute de quantification doit être diminuée.

## 5. Dosage par HPLC-UV

### a) Généralités

La dernière étape consiste à doser les analytes présents dans le liquide de reprise. Pour la séparation, l'identification et la quantification, plusieurs méthodes analytiques sont utilisées au laboratoire. La LC-MS/MS ou l'HPLC-UV sont les techniques de séparation et de détection/identification les plus communément utilisées. LC-MS/MS offre une meilleure sensibilité et spécificité que la spectrométrie UV/visible mais son utilisation reste limitée par son coût et tous les laboratoires n'en sont pas équipés.



L'HPLC (généralement de partage à polarité de phases inversées) permet la séparation des molécules présentes dans un mélange aqueux. Le couplage de cette technique séparative en amont de la détection est une étape supplémentaire incontournable pour simplifier l'échantillon en vue de son analyse par le système de spectrométrie de masse ou de spectrophométrie UV. Elle consiste à faire passer au sein d'une phase stationnaire solide (colonne de chromatographie) apolaire dans le cas de l'HPLC en phase inverse une phase mobile liquide polaire dans laquelle un volume prédéfini de liquide de reprise refermant les analytes a été ajouté. Tout comme pour la SPE, la phase stationnaire permet la rétention des analytes. Pour une séparation optimale, il est nécessaire de jouer sur la force éluante de la phase mobile en appliquant un ou plusieurs gradients d'éluion. En HPLC-UV, une fois séparés en sortie de colonne les analytes sont identifiés et quantifiés à partir du pic chromatographique dont l'aire sera proportionnelle à la concentration (jusqu'à saturation des détecteurs).

Plusieurs paramètres sont à définir : la phase stationnaire (longueur, taille, diamètre interne et type de greffons sur la silice de la colonne de chromatographie), la ou les phases mobiles avec l'utilisation d'un gradient d'éluion ou non, le débit de la phase mobile et la température du four à colonne. Chacun d'entre eux modifie le temps de rétention des analytes. Lorsque l'on augmente le débit et la température, on diminue le temps de rétention. Lorsque l'on augmente la longueur de la colonne et le nombre de carbones des greffons, on augmente le temps de rétention et l'efficacité de la colonne. L'effet du pH et de la polarité de la phase mobile sur la rétention n'est pas le même d'un composé à l'autre.

L'étude de l'influence du pH sur le temps de rétention de plusieurs molécules par *Verdier et al* (22) présentée en figure n°10 nous montre que le temps de rétention de la plupart des molécules à l'étude ( $\beta$ -lactamines) diminue lorsque le pH augmente. Ces résultats ont été observés lors de la mise au point de notre méthode, avec plusieurs analytes co-élus lorsque l'on utilisait un tampon phosphate à pH=6 alors qu'ils étaient bien séparés avec un tampon phosphate pH=2.

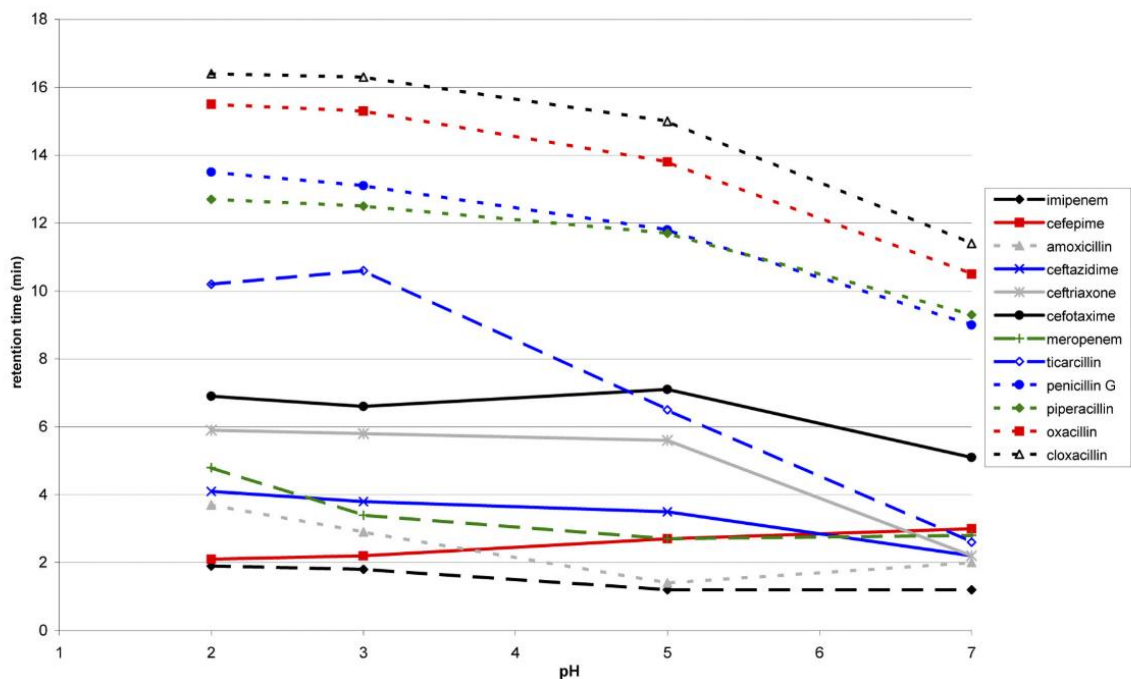


Figure n° 10 : Influence du pH sur le temps de rétention (22)

Le type de phase stationnaire utilisée pour la rétention des  $\beta$ -lactamines est généralement apolaire de type C18 (ou C8) donc la phase mobile doit être plutôt polaire. Pour doser simultanément plusieurs analytes avec une détection par spectrophométrie UV, ces derniers doivent avoir un temps de rétention différent. S'ils sont co-élus, ils ne doivent pas absorber à la même longueur d'onde, ce qui dans notre cas pose un problème car toutes les molécules appartiennent à la même famille. Le travail de *Verdier et al* (22) dans lequel une partie des antibiotiques dosés sont communs avec ceux de notre étude nous a aidé à définir le type de phase mobile à appliquer.

Il existe plusieurs détecteurs en spectrométrie UV/Visible, mesurant l'absorption de la lumière par l'analyte en sortie de colonne. La détection UV/visible est régie par la loi de Beer Lambert ( $A = \epsilon lC$ ). L'analyte doit donc absorber la lumière à une longueur d'onde accessible au détecteur, avoir un coefficient d'absorption ( $\epsilon$ ) suffisamment grand et que la phase mobile n'absorbe pas aux longueurs d'ondes choisies par l'opérateur. Plus  $\epsilon$  sera grand, plus la sensibilité sera grande, et plus la longueur d'onde à laquelle absorbe la molécule sera importante, plus la spécificité sera importante.

Parmi les détecteurs disponibles, le détecteur à barrette de diode est le plus utilisé car en parallèle de la quantification des composé à une longueur d'onde fixe, il permet l'acquisition du spectre de l'échantillon en balayant plusieurs longueurs d'ondes, une représentation en 3 dimensions (temps, absorbance, longueur d'onde) et une caractérisation des composés par leur spectre. Deux exemples de spectres UV sont présentés en figure n°11 et 12.

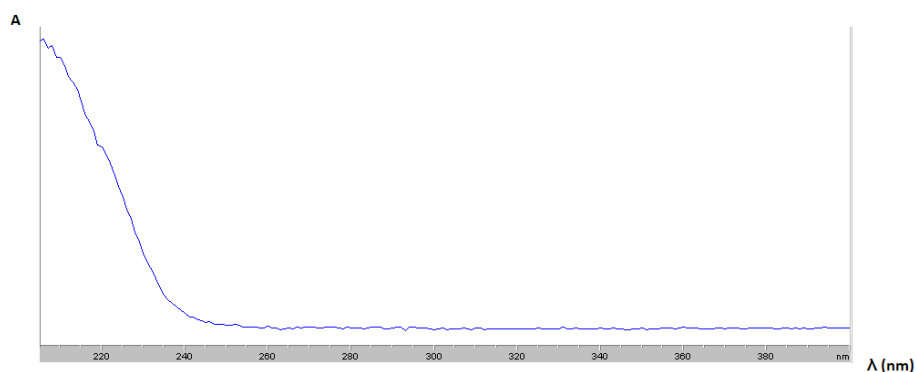


Figure n° 11 : Spectre UV du tazobactam

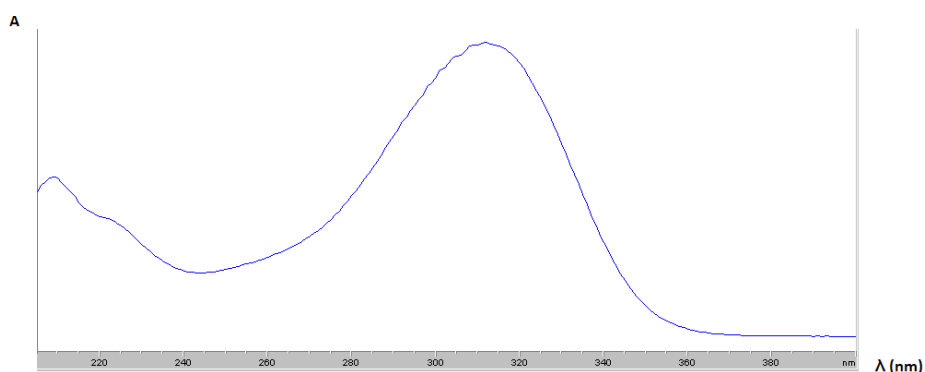


Figure n° 12 : Spectre UV du meropenem

A partir de ces spectres sera définie la longueur d'onde à laquelle sont identifiés les analytes. Le spectre du tazobactam (figure n°11) et son  $\epsilon$  obligent l'opérateur à travailler à une longueur d'onde comprise entre 210 et 220 nm, malheureusement commune à de nombreuses molécules et donc non spécifique. Au contraire, le spectre du meropenem (figure n°12) et son  $\epsilon$  permettent de travailler à une longueur d'onde plus importante et plus spécifique.

#### *b) Conditions HPLC-UV*

La phase mobile A est constituée d'un tampon phosphate 30mM ajusté à pH 2 avec de l'acide orthophosphorique 85% et la phase mobile B, d'acétonitrile. Les analytes sont entraînés au travers de la colonne ProntoSIL C18 (125 x 4,0 mm ; 3  $\mu$ m) par un gradient d'élution avec un débit de 1,0 ml/min.

De 0 à 6 min la proportion de phase mobile B augmente linéairement de 7 à 19% puis de 19% à 50% de 6 à 13,5 min. Le système revient aux conditions initiales de 13.5 à 20 min. La température du four à colonne est fixée à 30°C. Le tazobactam n'absorbant qu'à des longueurs d'ondes comprises entre 210 et 220nm, il est observé à 220nm. La piperacilline et l'étalon interne (le linezolid) sont quant à eux observés à 260nm. Enfin, pour obtenir une bonne spécificité, les autres analytes sont observés à 305nm.

### C. Détermination de la fixation non spécifique (NSB) au cours de l'UF

Le NSB a été évalué au cours de l'ultrafiltration pour chaque molécule à la limite de quantification (LOQ) ou proche de la LOQ (en supposant que la proportion de molécules adsorbées est maximale aux faibles concentrations) à partir d'une solution aqueuse concentrée à 0,5 µg/ml pour le cefepime, le tazobactam, la ceftazidime, le meropenem, la ceftriaxone, le cefotaxime, la cefazoline et à 4 µg/ml pour la piperacilline.

Le NSB a été calculé pour chaque analyte en faisant le rapport des aires des pics de chromatographie des échantillons soumis à l'ultrafiltration sur les échantillons n'ayant pas subi l'ultrafiltration et injectés directement dans l'HPLC. Pour les échantillons soumis à l'ultrafiltration, 500µl de la solution aqueuse chargée en analytes sont introduit dans le dispositif d'ultrafiltration (Amicon Ultra-0,5 ml 10 kDa) puis centrifugés à 4650 g pendant 15 min à 37°C. Après cette centrifugation le filtre est retourné dans le tube de récupération et à nouveau centrifugé à 500 g pendant 2 min afin de récupérer le rétentat. Seule la fraction de médicament adsorbée sur le dispositif par NSB n'est pas récupérée.

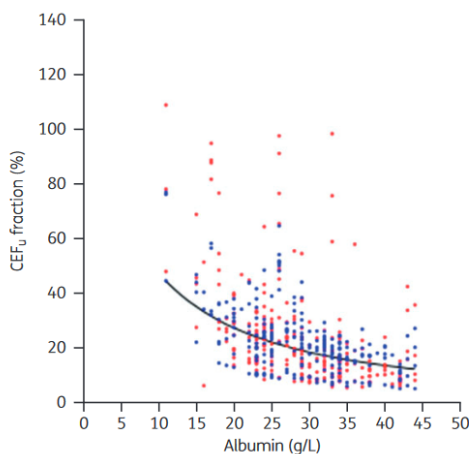
Les échantillons non soumis à l'ultrafiltration, sont incubés dans un tube de récupération avant analyse par le système HPLC-UV pour éliminer une potentielle fixation non spécifique sur le tube de récupération (29).

Pour chacune des deux conditions l'analyse a été conduite en triplicat à partir de 500µl de la même solution (concentration et quantité en analyte au départ identique).

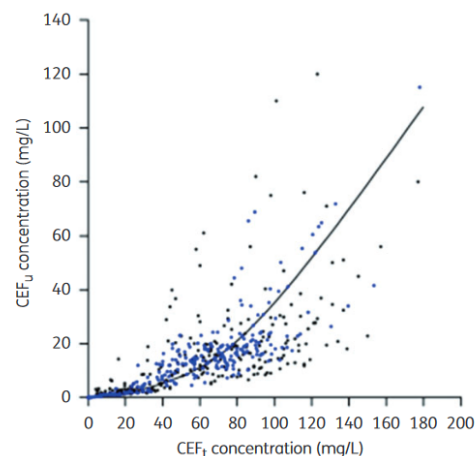
## D. Rendement de l'ultrafiltration et facteur de correction de la gamme d'étalonnage

### 1. Prérequis

Lorsqu'une méthode de dosage est mise au point, les calibrants utilisés pour effectuer les points de gamme ou les contrôles qualités (QC) doivent théoriquement effectuer les mêmes étapes que subiront les échantillons à doser et dans la même matrice. Les calibrants sont donc par conséquent chargés en amont des étapes conduisant au dosage et l'utilisation d'une matrice plasmatique provenant d'un pool de donneurs sains est recommandée. Pour le dosage de la FU nous avons vu que de nombreux paramètres sont susceptibles de modifier la liaison protéine-ligand et donc de modifier la proportion de FU ; la composition de la matrice plasmatique dans laquelle se trouvent les analytes jouant un rôle important. Dans le cas de l'étude hyperclairance, les patients polymédiqués, parfois en hyper bilirubinémie et en hypoalbuminémie ( $27.6 \pm 4.3$  g/L (n=369)) n'ont pas la même matrice plasmatique que des donneurs sains. Charger les calibrants dans un pool de plasma provenant de donneurs sains inclus par conséquent un biais inquantifiable, pouvant conduire à une courbe de calibration erronée bien que l'on soit en mesure de fixer le pH et la température. Un exemple de l'influence de l'albuminémie et de la concentration plasmatique sur la proportion de FU de la ceftriaxone par *Bos et al* (41) est présenté en figure n°13.



**Figure 3.** Covariate relationship between albumin and the  $CEF_u$  fraction. Plasma albumin concentration versus observed (red dots) and individual predicted (blue dots)  $CEF_u$  fraction, with the model-predicted relationship (black line) for virtual patients with the median  $CEF_u$  concentration of 11.8 mg/L. The unbound fraction increases in a non-linear fashion with a decreasing albumin concentration.



**Figure 4.** Total versus unbound ceftriaxone concentrations. Black dots, observed concentrations; blue dots, individual predicted concentrations; black line, model-predicted relationship between total and unbound concentration for a patient with a median albumin concentration of 29 g/L.

Figure n° 13 : Proportion de FU de ceftriaxone fonction de l'albuminémie et de la concentration totale

De plus, lorsque l'on prend l'exemple des molécules incluses dans l'études, nous avons vu que certaines d'entre elles (ceftriaxone, cefazoline) ont une fixation protéique dite « concentration dépendante ». Effectuer la gamme d'étalonnage en chargeant les calibrants en amont de l'ultrafiltration ne permet donc pas d'obtenir une courbe de calibration linéaire pour ces molécules. Il n'est pas exclu qu'au cours de l'ultrafiltration (réalisée dans les conditions physiologiques pour ne pas perturber la liaison établie in vivo), les analytes se fixent aux protéines plasmatiques in vitro différemment et on est dans l'incapacité de prévoir ce phénomène, son importance et maîtriser sa variabilité.

Du fait de la nature des molécules à doser et de la population cible, charger les calibrants dans un diffusat directement obtenu à partir d'un pool de plasmas peut être une solution. Ainsi pour contourner ce biais d'étalonnage et dans le souci d'une calibration exacte, nous avons fait le choix de charger les calibrants sur des échantillons exempts de protéines, soit post ultrafiltration dans le diffusat. En procédant de la sorte, il faut évaluer le rendement de l'ultrafiltration en vue d'appliquer un facteur de correction (CF) aux résultats des dosages des échantillons plasmatiques des patients, qui eux sont soumis à l'ultrafiltration. Bien qu'il existe un biais lors de la détermination de ce CF, ce dernier est quantifiable.

## 2. Evaluation du rendement de l'ultrafiltration

Nous avons donc chargé les calibrants dans le diffusat. Avec cette méthodologie, les échantillons patients et les calibrants ne subissent les même étapes. En effet seuls les échantillons patients subissent l'étape d'ultrafiltration. Il est donc important d'évaluer le rendement de cette étape ainsi que sa variabilité pour prendre en compte la part de médicaments perdue au cours de ce processus. Le rendement de l'ultrafiltration a été évalué afin de déterminer un CF pour chaque molécule et destiné à être appliqué aux résultats des dosages des patients. Bien que les données de la littérature montrent qu'une variation du volume de diffusat n'impacte pas la concentration en analytes, étant donné que la totalité du diffusat est chargé dans la cartouche de SPE la simple considération du NSB ne suffit pas pour calculer ce CF et c'est en quantité de matière qu'il faut raisonner. Les protéines plasmatiques permettent de diminuer le NSB en se fixant sur les sites d'adsorption mais il n'est pas possible d'évaluer le rendement dans le plasma étant donné la présence de protéines de fixation. Le rendement a donc été évalué dans de l'eau déionisée (bien que le NSB attendu soit plus important).

Il a été calculé en effectuant le rapport des aires des molécules réalisant l'ultrafiltration avec celles directement ajoutées au tube de collection. Le rendement a été effectué en quadruplat pour chacun des points de gamme ( $R_i$ ) constituant la courbe de calibration de chaque analyte et pour mettre en évidence une éventuelle corrélation entre concentration et rendement. La manipulation est présentée en figure n°14.

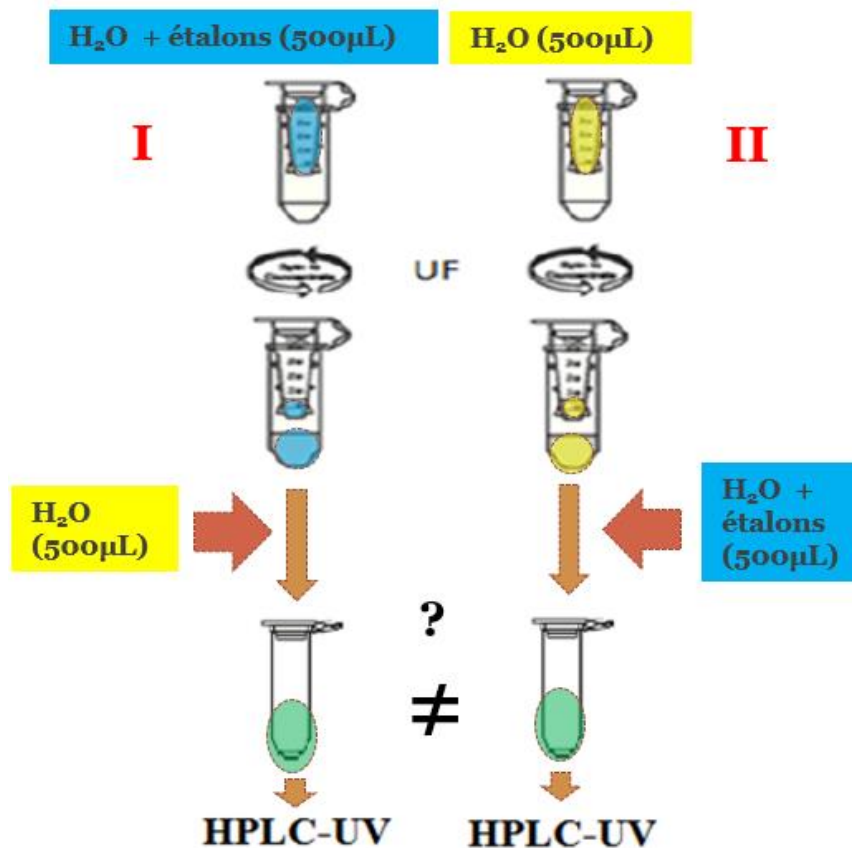


Figure n° 14 : Calcul du rendement de l'ultrafiltration

Deux méthodes de passivation des filtres ont tout de même été testées (30) pour tenter de passiver les filtres et améliorer le rendement. Dans la première méthode, 300 µl de plasma dilués avec 200 µl d'eau sont introduits dans les filtres Amicon et laissés au repos 2 heures. Les filtres sont ensuite lavés avec de l'eau déionisée, retournés et centrifugés pour éliminer le liquide résiduel. Dans la seconde méthode, 300 µl de plasma dilués avec 200 µl d'eau sont introduits dans les filtres Amicon puis centrifugés 15 min à 4650g. Les filtres sont ensuite lavés comme dans la première méthode. Malheureusement, les rendements obtenus avec ces deux méthodes sont moins bons que ceux obtenus sans passivation pour les deux protocoles et pour tous les β-lactames, probablement en raison des traces de protéines offrant plus de sites de fixations que les filtres.

Enfin, en effectuant la moyenne ( $m_{R_i}$ ) et l'écart-type ( $CV_{R_i}$ ) des rendements, nous avons considéré qu'un CV inférieur à 10% permet d'écarter une corrélation entre rendement et concentration, permettant ainsi de déterminer un CF unique (avec  $CF=m_{CF_i}$  et  $CF_i=1/R_i$ ). Cependant, pour un CV supérieur à 10%, une courbe de corrélation a été établie à partir des  $R_i$ . Si le coefficient de corrélation de la courbe est suffisamment proche de 1, alors une relation entre concentration et rendement est établie.

## E. Validation analytique selon les recommandations de la FDA/EMA

Les recommandations faites par la Food and Drug Administration ou l'EMA sont des référentiels pour la mise au point d'une méthode de dosage dans le plasma. Une méthode validée selon les recommandations de ces agences est gage de qualité. Ces recommandations mettent en avant les critères que doit remplir la méthode avant le dosage des échantillons plasmatiques des patients. Ces critères sont multiples :

- Spécificité (capacité à reconnaître la molécule d'intérêt)
- Sélectivité (capacité à différencier la molécule d'intérêt des autres composants de la matrice)
- Sensibilité (capacité à détecter de faibles concentrations)
- Linéarité (relation entre signal et concentration)
- Précision (écart à la moyenne)
- Exactitude (écart à la valeur théorique)
- Répétabilité (étroitesse entre résultats successifs obtenus avec la même méthode dans des conditions identiques)
- Rendement (un rendement suffisant est gage d'une bonne répétabilité)
- Cross-over (absence de persistance de signal après analyse d'un échantillon)
- Stabilité (l'analyte reste stable le temps du dosage).

La validation de la méthode doit être réalisée sur trois jours au minimum (pas nécessairement successifs) par le calcul de la précision, de l'exactitude et de la linéarité.

La linéarité est définie au travers des points de calibrations (ou points de gammes) au nombre de six minimum en plus du blanc de plasma avec et sans étalon interne (EI). La moyenne des concentrations obtenues au cours de ces trois jours de validation permet de tracer la courbe de calibration en utilisant le mode de régression (linéaire ou quadratique) et d'obtenir un coefficient de corrélation  $r^2 > 0,99$ .

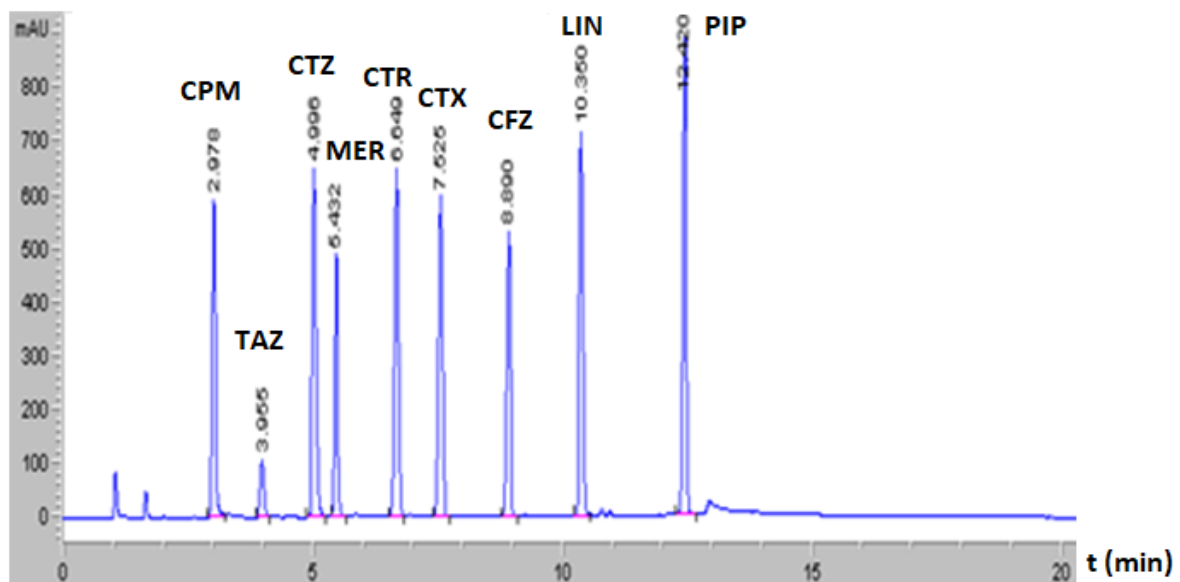


La précision et exactitude sont définis au travers des contrôles qualité (QC), au nombre de trois. Ces QC correspondent à des points de concentrations mais ce ne sont pas des point de calibration. Ils sont répartis de telle sorte à couvrir la gamme d'étalonnage, le premier ne devant pas être supérieur à trois fois le point de calibration le plus bas de la gamme (LLOQ), le second dans les concentrations intermédiaires (Middle QC) et le troisième proche du point de calibration le plus haut de la gamme (ULOQ). Il est recommandé que ces trois QC soient réalisés en six exemplaires pour chacun des jours de validation.

### III. Résultats

#### A. Détection par HPLC-UV

Le chromatogramme observé à 210 nm (longueur d'onde commune aux 8 antibiotiques) obtenu à partir d'un échantillon aqueux au sein duquel l'ensemble des analytes sont présents est présenté en figure n°15.



Cefepime (CFP, 3,0min), tazobactam (TAZ, 4,0 min), ceftazidime (CTZ, 5,0 min), meropenem (MER, 5,4 min), ceftriaxone (CTR, 6,6 min), cefotaxime (CTX, 7,5 min), ceftazoline (CFZ, 8,9 min), linezolid (LIN, 10,4 min) et piperacilline (PIP, 12,4 min) à 210 nm.

Figure n° 15 : Chromatogramme observé à 210nm en milieu aqueux

Après s'être assuré que chacun des composés absorbe aux longueurs d'ondes balayées par le détecteur, l'objectif est de trouver une longueur d'onde ( $\lambda$ ) sélective pour chaque molécule avec si possible un coefficient d'absorption suffisamment élevé pour conserver un maximum de sensibilité. Le tazobactam n'absorbant qu'à des  $\lambda$  comprises entre 210 et 220nm, il est observé à 220nm. La piperacilline et l'étalon interne (le linezolid) sont quant à eux observés à 260nm. Enfin, pour obtenir une bonne spécificité, les autres analytes sont observés à 305nm.

A partir d'un échantillon plasmatique dans lequel sont présents chacun des analytes, l'absence de pics interférents aux différents temps de rétention atteste de la sélectivité de notre méthode HPLC-UV dans un plasma vierge.

Les résultats des chromatogrammes observés aux différentes longueurs d'ondes sont présentés en figure n°16 A, B, C et D. Le chromatogramme A correspond à l'analyse de l'échantillon plasmatique contenant 20  $\mu\text{g/ml}$  de cefepime (3,1 min), de ceftazidime (5,2 min), de meropenem (5,7 min), de ceftriaxone (6,9 min), de cefotaxime (7,8 min) et de cefazoline (9,2 min) observés à 305 nm. Le chromatogramme B correspond à l'analyse de l'échantillon plasmatique contenant 20  $\mu\text{g/ml}$  de piperacilline (12,6 min) et 140  $\mu\text{g/ml}$  d'EI (10,5 min) observés à 260 nm. Le chromatogramme C correspond à l'analyse de l'échantillon plasmatique contenant 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de tazobactam (4,2 min) observé à 220 nm.

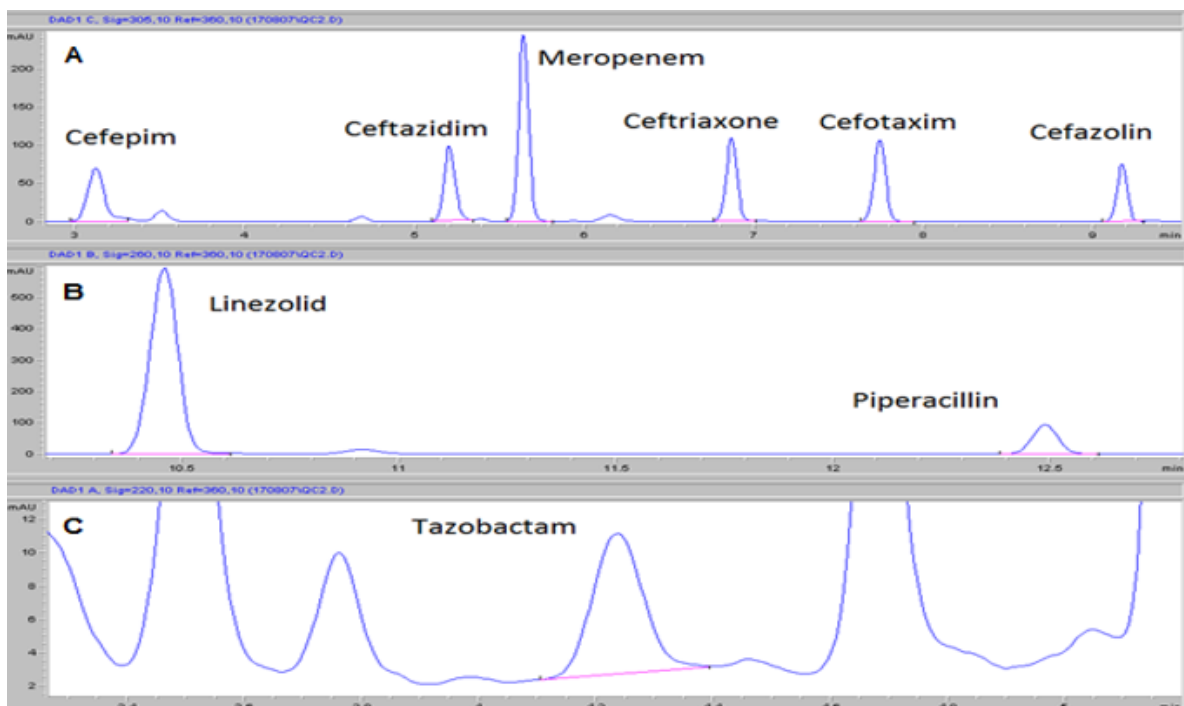


Figure n° 16 : échantillon plasmatique chargé observé s aux longueurs d'ondes d'intérêt

Le chromatogramme présenté en figure n°17 observé à 305 nm est obtenu après injection d'un blanc de plasma auquel est ajouté l'EI. Aucun pic en dehors de l'EI n'est visible à cette longueur d'onde. Il en est de même à 260 nm. Hormis les autres molécules administrées au patient, le risque d'interférence est très faible.

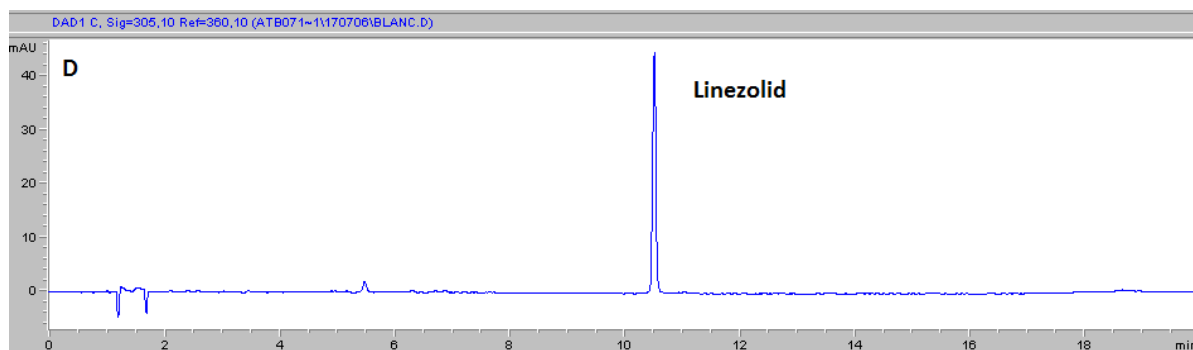


Figure n° 17 : Blanc de plasma avec étalon interne à 305nm

Enfin, le chromatogramme présenté en figure n°18 observé à 220 nm et zoomé au niveau du temps de rétention du tazobactam (4,0 min), est obtenu après injection d'un blanc de plasma auquel est ajouté l'EI. Aucun élément plasmatique n'est observé à 4,0 min. Cependant, si une autre molécule administrée devait avoir un temps de rétention similaire, il absorberait très probablement à 220 nm empêchant alors la quantification du tazobactam.

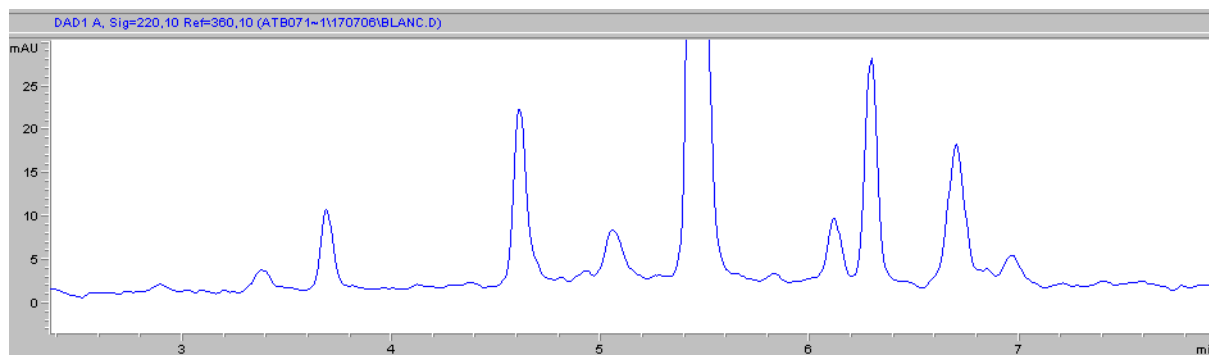


Figure n° 18 : Blanc de plasma zoomé observé à 220nm

## B. Optimisation des conditions de la SPE

### 1. Traitement du diffusat (ionisation)

Une fois le choix du sorbant effectué, il faut évaluer le rendement de l'extraction étape par étape. L'objectif est d'obtenir un rendement supérieur à 70% pour limiter les biais liés aux pertes tout en purifiant le diffusat au maximum.

Après ultrafiltration, le diffusat est à pH physiologique et l'état d'ionisation des molécules joue sur la capacité du sorbant à retenir les molécules mais ne semble pas être le seul facteur impliqué. En effet, certains analytes sont retenus par le sorbant à pH physiologique alors que d'autres ne le sont pas comme le cefepime, le cefotaxime et la piperacilline, bien qu'ils soient ionisés de la même manière. Nous avons donc recherché un pH auquel tous les analytes sont retenus par le sorbant.

Pour commencer, le pKa nous permet de connaître le pH auquel nous sommes en présence d'une espèce majoritaire dans l'espoir d'obtenir le meilleur rendement possible. Les différents états d'ionisations de chaque molécule sont présentés en figures n° 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 et 21.

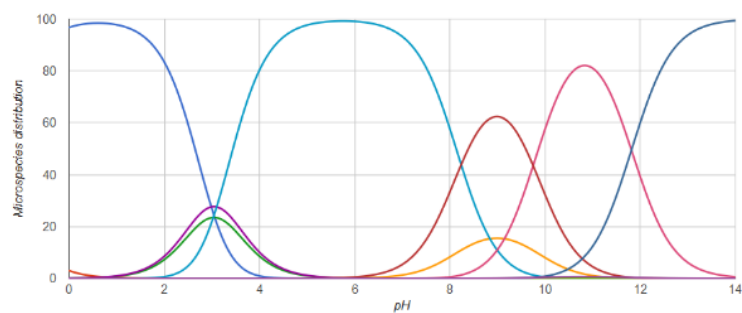


Figure n° 19 : Etats d'ionisation du cefepime

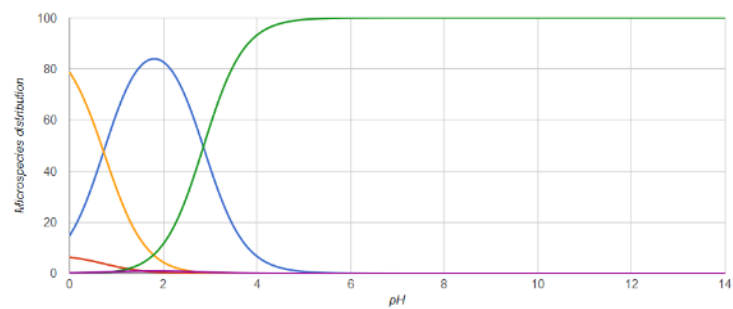


Figure n° 20 : Etats d'ionisation du tazobactam

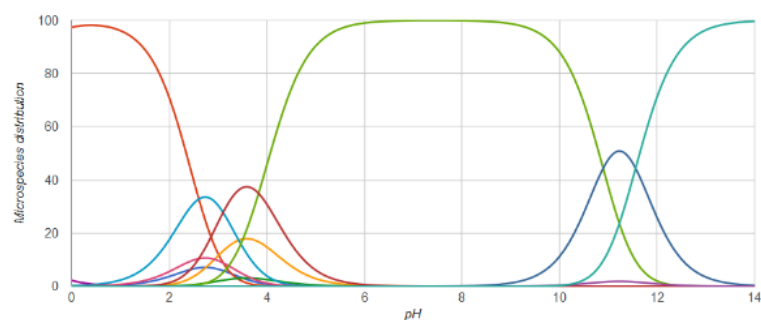


Figure n° 21 : Etats d'ionisation de la ceftazidime

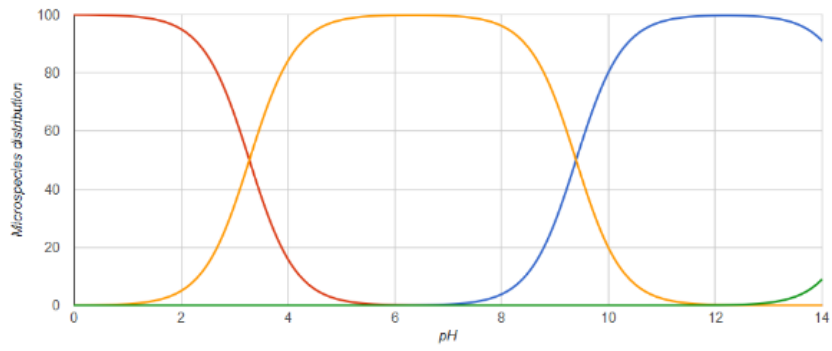


Figure n° 22 : Etats d'ionisation du meropenem

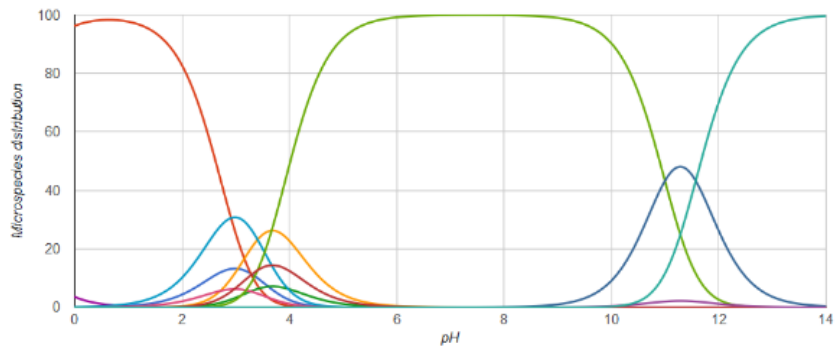


Figure n° 23 : Etats d'ionisation de la ceftriaxone

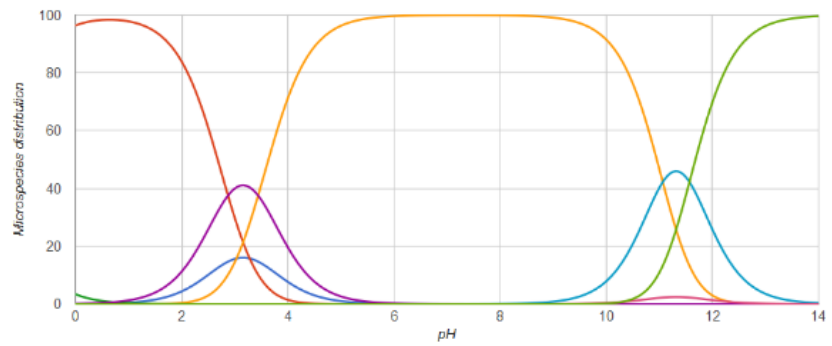


Figure n° 24 : Etats d'ionisation du cefotaxime

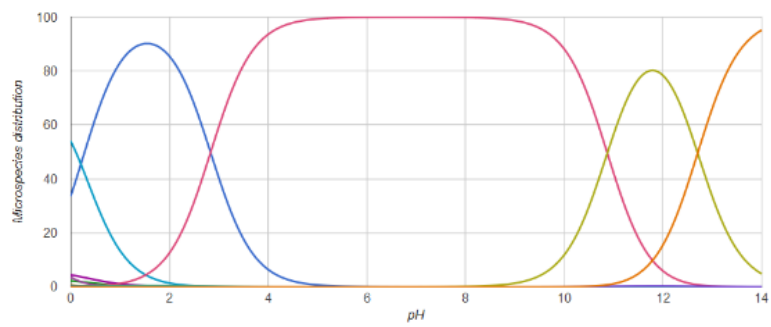


Figure n° 25 : Etats d'ionisation de la cefazoline

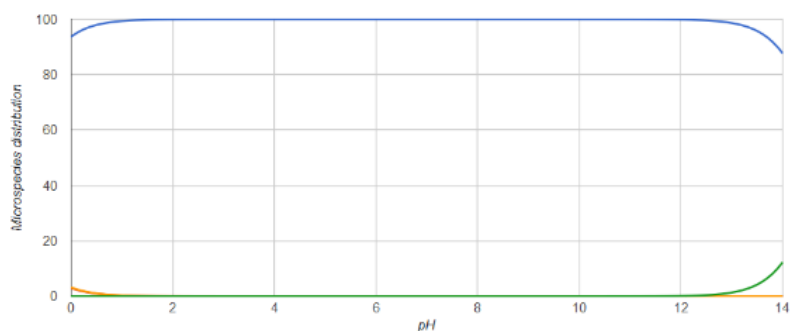


Figure n° 26 : Etats d'ionisation du linezolid (EI)

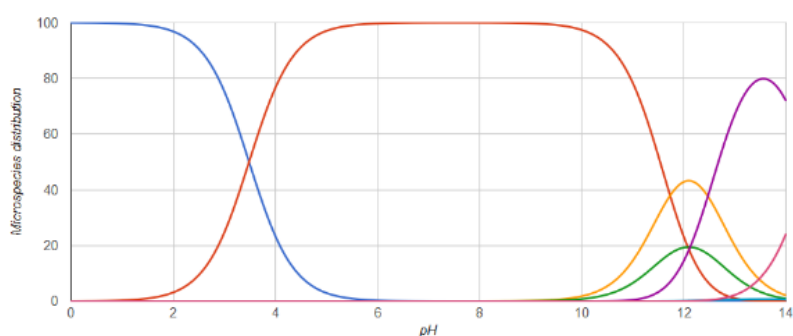


Figure n° 27 : Etats d'ionisation de la piperacilline

C'est donc à un pH proche de 2 qu'il faut nous manipuler dans l'espoir que chaque analyte soit retenu par le sorbant.

Le résumé des charges en présence des analytes à pH 2 et à pH 7,4 est présenté dans le tableau V.

Tableau V : Charges en présence par molécules à pH = 2 et pH = 7,4

pH	Cefepime	Tazobactam	Ceftazidime	Meropenem	Ceftriaxone	Cefotaxime	Cefazoline	Piperacilline
2	++	0	+	+	+	+	0	0
7,4	+++	-	+-	+-	--	-	-	-

Après avoir tamponné le diffusat à différents pH, l'ajout de 700µl du même tampon phosphate utilisé en amont de l'ultrafiltration (tampon phosphate pH 2, 100mM) a permis d'obtenir un rendement acceptable. Le diffusat n'est tamponné qu'une fois les cartouches de SPE conditionnées, au risque de dégrader les analytes à ce pH auquel la stabilité est de deux minutes.

Les cartouches de SPE sont conditionnées selon les recommandations du laboratoire avec 1mL de méthanol (MeOH) et sont équilibrées en deux temps avec 0,5ml puis 1mL d'eau déionisée pour enlever toute trace de MeOH.

Le diffusat est ensuite tamponné et chargé dans la cartouche SPE avant lavage.

Les analytes potentiellement présents sont dosés dans les 3 solutions de lavage (en plus du calcul du rendement de la SPE) : 1ml de MeOH/H<sub>2</sub>O 5/95 v/v, 1ml de MeOH/H<sub>2</sub>O 3/97 v/v et 2 fois 1ml d'eau déionisée à 100%. Pour chaque condition testée, nous avons quantifié la quantité de chacun des analytes retrouvés dans la solution de lavage (éluant à chaque fois avec 2\*0,4 ml MeOH/ACN 50/50 v/v). Lorsque l'on utilise 1ml de la solution de lavage MeOH/H<sub>2</sub>O 5/95 v/v, principalement 2 molécules sont retrouvées dans les solutions de lavage : le meropenem et le tazobactam. Plus de la moitié de ces deux analytes sont élués. C'est donc à partir de ce mélange qu'ont été déterminées les deux autres solutions en utilisant à chaque fois de moins de phase organique. Pour le meropenem, avec le mélange MeOH/H<sub>2</sub>O 3/97 v/v, 25% est retrouvé dans la solution de lavage (rendement SPE 45%). Avec le lavage par 2 fois 1ml d'eau déionisée à 100%, rien n'est retrouvé dans la solution de lavage offrant ainsi un rendement à 74% ce qui signifie que 26% est perdu lors de l'étape de chargement de l'échantillon. Pour le tazobactam, le rendement SPE passe de 50% avec le mélange MeOH/H<sub>2</sub>O 3/97 v/v à 63% avec la solution de lavage par 2 fois 1ml d'eau déionisée à 100%.

La condition pour laquelle la plus petite quantité d'analytes est retrouvée a été choisie. Ainsi le lavage est réalisé avec deux fois 1 ml d'eau déionisée (100% H<sub>2</sub>O).

Enfin, pour l'étape d'éluion (en deux temps pour optimiser le rendement), plusieurs mélanges ont aussi été testés. Le mélange Acide formique 2% dans du MeOH/ACN v/v recommandé par le laboratoire, du MeOH à 100% et le mélange MeOH/ACN 50/50 v/v. Ce dernier permet d'obtenir le meilleur rendement.

## 2. Rendement de la SPE

Les rendements de chacun des analytes sont présentés dans le tableau n°VI.

Tableau VI: Rendement de la SPE

<b>Analyte</b>	<b>Rendement SPE (%)</b>
<b>Cefepime</b>	86.6
<b>Tazobactam</b>	63.1
<b>Ceftazidime</b>	90.8
<b>Meropenem</b>	73.8
<b>Ceftriaxone</b>	80.7
<b>Cefotaxime</b>	95.2
<b>Cefazoline</b>	93.4
<b>Piperacilline</b>	88.8

## C. Validation analytique

### 1. Linéarité, coefficient de corrélation et LOQ

La régression linéaire classique ne permettant pas d'obtenir un coefficients de corrélation >0,99 la ceftazidime et le meropenem, la régression quadratique a été utilisée pour tracer la courbe de corrélation permettant ainsi l'obtention de coefficients de corrélation  $\geq 0,9999$  pour chacun des analytes (tableau VII).

Tableau VII : Longueur d'onde ( $\lambda$ ), Temps de rétention (Tr), Gamme d'étalonnage, Coefficient de corrélation ( $r^2$ ) et CV à LOQ (CV LOQ)

Analyte	$\lambda$	Tr (min)	Gamme ( $\mu\text{g/mL}$ )	$r^2$	CV LOQ (%)
PIP	260	12,5	2-250	1.0000	5,67
CTR	305	7,8	0,25-200	0,9999	4,27
CFP	305	3	0,5-200	1.0000	7,67
CTZ	305	5,2	0,5-200	0,9999	2,13
MER	305	5,7	0,5-200	0,9999	8,80
CTX	305	8,7	0,5-200	0,9999	3,60
CFZ	305	9,5	0,5-200	1.0000	3,80
TAZ	220	4,1	0,5-31,25	0,9999	10,80

### 2. Exactitude et précision

A partir des QC, l'exactitude et la précision ont été évaluées pour chaque composé sur trois jours par des essais de répétabilité intra et inter journaliers. La précision et l'exactitude intra et inter-journalière étaient inférieures à 15% comme recommandé par la FDA/EMA pour tous les analytes et même inférieures à 10% pour chacun des composés, excepté pour le Tazobactam pour lequel la précision intra-jour et inter-jour se situait entre 10 et 15% pour la plupart des QC. Les résultats sont présentés dans le tableau VIII.



Tableau VIII : Précision et exactitude

Compounds/Q C	Intra-journalier (n=6)			Inter-journalier (n=18)		
	Moyenne ± ET (µg/ml)	Précision (%)	Exactitude (%)	Moyenne ± ET (µg/ml)	Précision (%)	Exactitude (%)
<b>PIP</b>						
200	199,75±3,85	1,93	-0,12	196,08±4,14	2,11	-1,96
90	90,10±0,69	0,77	0,11	89,06±1,20	1,35	-1,05
6	5,77±0,14	2,38	-3,89	5,65±0,16	2,76	-5,87
<b>CTR</b>						
150	137,02±5,48	4,00	-8,65	137,94±4,54	3,29	-8,04
80	77,65±3,14	4,04	-2,94	76,05±3,52	4,63	-4,93
0,75	0,81±0,03	3,90	7,53	0,76±0,05	7,06	0,82
<b>CFP</b>						
150	152,37±4,62	3,03	1,58	153,86±6,86	4,46	2,57
75	74,82±1,58	2,11	-0,25	78,28±3,35	4,28	4,37
1,5	1,49±0,04	2,92	-0,56	1,56±0,07	4,51	3,70
<b>CTZ</b>						
150	152,67±6,06	3,97	1,78	153,09±5,70	3,72	2,06
75	74,57±1,81	2,43	-0,57	76,91±2,76	3,59	2,54
1,5	1,57±0,05	3,27	4,67	1,56±0,05	3,15	3,78
<b>MER</b>						
150	149,09±8,94	6,00	-0,60	144,01±12,67	8,80	-4,00
75	76,19±2,05	2,70	1,58	71,96±6,72	9,34	-4,05
1,5	1,60±0,13	8,22	6,78	1,59±0,11	7,20	6,15
<b>CTX</b>						
150	152,67±5,60	3,67	1,78	153,71±3,98	2,59	2,47
75	75,73±1,51	2,00	0,97	76,78±1,52	1,98	2,37
1,5	1,54±0,04	2,68	2,56	1,54±0,04	2,73	2,33
<b>CFZ</b>						
150	153,31±6,14	4,00	2,21	151,36±4,71	3,11	0,90
75	75,21±1,50	1,99	0,27	75,86±1,77	2,33	1,15
1,5	1,56±0,05	3,09	3,67	1,53±0,05	3,23	1,74
<b>TAZ</b>						
25	24,22±2,26	9,32	-3,10	25,55±2,83	11,06	2,19
11,25	12,35±1,18	9,52	9,78	11,23±1,53	13,09	3,88
0,75	0,70±0,08	11,53	-6,69	0,74±0,09	12,28	-1,25

### 3. Stabilité

La stabilité des composés dans l'échantillonneur automatique réglé à 20°C a été évaluée pendant 12 heures (T0h, T4h, T8h et T12h), respectivement à 1,25 ; 12,5 et 28,125 µg/ml pour le tazobactam et à 1 ; 10 ; 100 et 225 µg/ml pour les autres composés.

Aucune dégradation significative (<5%) du temps zéro n'a été observée à 4 heures. A 8 heures, la dégradation était proche de 10% pour le meropenem et la ceftriaxone et de 10 à 15% à 12 heures. La solution d'EI était stable au moins deux semaines (dégradation <2%) et donc préparée 2 fois par mois.

#### D. Adsorption non spécifique

En dehors de la piperacilline pour laquelle le NSB atteint près de 23%, il est inférieur à 10% pour les autres analytes. Ainsi, même s'il est démontré que les protéines plasmatiques diminuent l'adsorption, la différence de NSB entre plasma et l'eau déionisée n'est pas significative, sauf peut-être pour la piperacilline. Les valeurs du NSB de chaque analyte sont présentées dans le tableau IX.

Tableau IX : Pourcentages de NSB observés

Analyte	PIP	CTR	CFP	CTZ	MER	CTX	CFZ	TAZ
NSB (%)	22.66	2.84	8.25	6.58	6.84	9.31	5.31	4.32

#### E. Facteur de correction

Les  $CF_i$  (inversement proportionnels aux  $R_i$ ) de chaque analytes sont présentés en figure n°28.

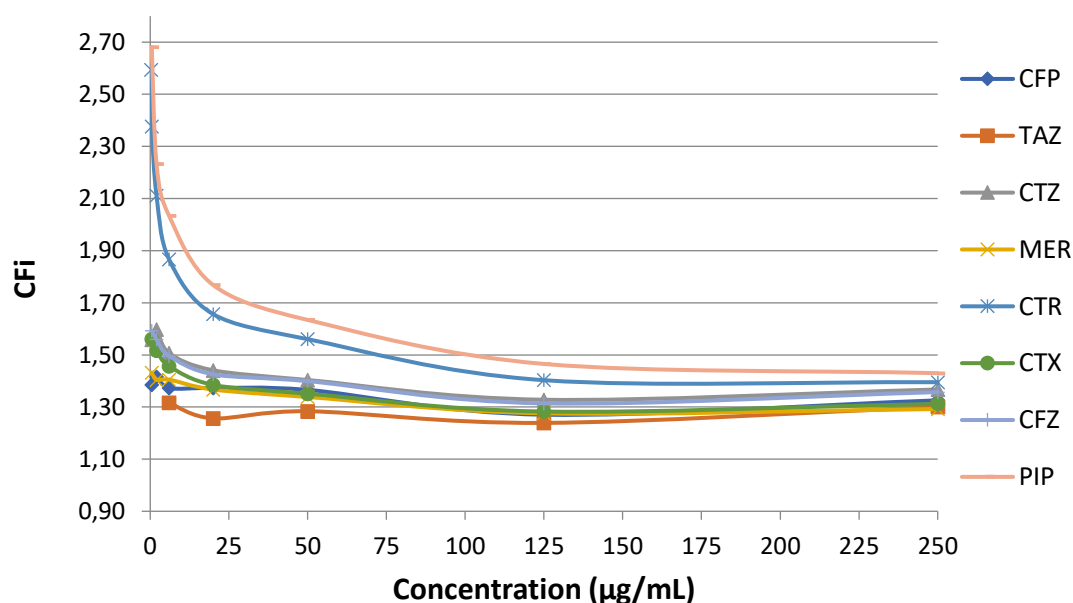


Figure n° 28  $CF_i$  des analytes

L'équation attribuée aux six composés pour lesquels le CV est inférieur à 10% (cefepime, tazobactam, ceftazidime, meropenem, cefotaxime et cefazoline) est sous la forme  $y=ax$  (avec  $x$  le résultat du dosage de l'échantillon plasmatique du patient et  $a$  le CF).

A partir des courbes de tendance de la piperacilline et de la ceftriaxone, l'équation permettant d'obtenir un coefficient de corrélation  $> 0,99$  est sous la forme  $y=ax^{-b}$ . Les résultats figurent dans le tableau X.

Tableau X : Moyenne, précision et CF

Analyte	PIP	CTR	CFP	CTZ	MER	CTX	CFZ	TAZ
$m_{CFi} \pm ET$	1,76±0,32	1,67±0,28	1,36±0,05	1,46±0,10	1,36±0,06	1,41±0,11	1,45±0,10	1,30±0,03
$CV_{CFi} (\%)$	18,13	16,82	3,46	6,88	4,39	7,45	7,17	2,47
$y$	$2,4411x^{-0,102}$	$2,2384x^{-0,093}$	1,36x	1,46x	1,36x	1,41x	1,45x	1,30x
$r^2$	0,9928	0,992	NA	NA	NA	NA	NA	NA

## F. Résultats des dosages

Cette méthode a été appliquée avec succès pour déterminer la FU pour chacune des 7  $\beta$ -lactamines et de l'inhibiteur de  $\beta$ -lactamases issus de nombreux échantillons plasmatiques. Considérant la stabilité des composés dans le passeur d'échantillons, tous les échantillons de patients ont été analysés en moins de 8 heures à partir du moment où ils ont été placés dans l'échantillonneur automatique pour une analyse HPLC-UV. Les résultats des dosages issus des 125 patients et les concentrations critiques obtenues à partir des données de l'EUCAST sont présentées dans le tableau XI et en figure n°29.

Tableau XI : Résultats des dosages

	Dosages	Médiane (µg/ml)	Moyenne (µg/ml)	Ecart-type (µg/ml)	Concentrations critiques (mg/l)
Pipéracilline	174	31,7	36,5	29,8	4-16
Tazobactam	144	6,8	8,5	6,8	-
Ceftriaxone (pic)	63	27,0	27,0	8,0	1-2
Ceftriaxone (vallée)	63	1,8	2,0	1,0	1-2
Cefepime	18	28,5	28,9	7,6	4-8
Ceftazidime	45	29,5	32,7	13,9	4-8
Cefotaxime	12	11,9	11,8	6,4	1-2
Cefazoline	32	13,2	14,8	6,2	1-2
Meropenem	24	9,5	15,9	13,8	2-8

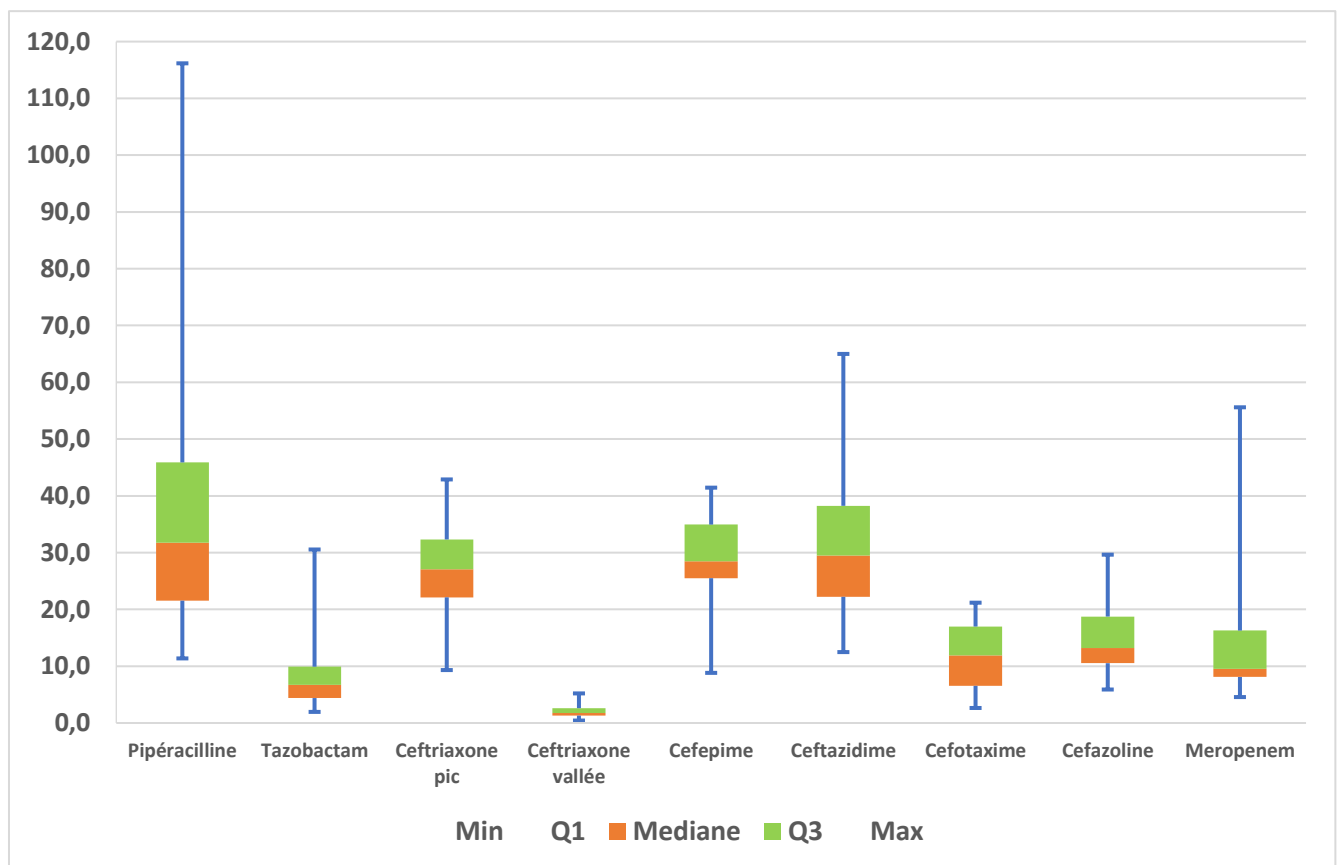


Figure n° 29 : Concentrations plasmatiques des antibiotiques (µg/ml)

## IV. Discussion

Le calcul du rendement comporte un biais car il est réalisé dans de l'eau déionisée et peut être inférieur au rendement réel issu du plasma du fait d'un effet protecteur des composants plasmatiques contre les sites d'adsorption (6). Les filtres Amicon en cellulose régénérée limitent l'adsorption des composés hydrophiles et leur filtre latéral limite le colmatage pour obtenir un volume de diffusat constant d'un échantillon à l'autre. Etant donné la valeur du NSB des analytes lui-même déterminé dans de l'eau déionisée, nous avons jugé notre calcul du rendement acceptable. Pour obtenir une valeur plus exacte, il faudrait comparer le NSB calculé dans de l'eau déionisée avec le NSB calculé dans le plasma et appliquer la différence au rendement réalisé dans l'eau déionisée. Cependant, il aurait été nécessaire de mettre au point une méthode de dosage de la fraction totale en réalisant la gamme sur les mêmes concentrations que la méthode de dosage de la FU et dans ce cas, une technique de précipitation directe aurait sûrement été utilisée mais un biais de sensibilité aurait pu poser problème. Le CF appliqué à chaque analyte a été déterminé à partir d'un volume fixe de plasma (300 $\mu$ L) dilué avec 190 $\mu$ L d'eau déionisée et 10 $\mu$ L de la solution tampon 100 mM pH=2. Lors du dosage des échantillons plasmatiques, 300 $\mu$ L sont donc nécessaires.

Si les valeurs des CF peuvent parfois sembler élevées c'est parce qu'en plus du NSB, le volume de rétentat est relativement important car il représente environ 25% du volume total chargé dans le filtre (en raison d'une force centrifuge modérée). Par conséquent, chaque CF était  $\geq 1,3$ . De toute évidence, comme le rétentat dépend directement de la force centrifuge, le rendement pourrait être amélioré en usant d'une force centrifuge plus importante mais au risque de rompre l'équilibre entre les protéines et leurs ligands. Enfin, bien que nous ayons tenté de reproduire les conditions physiologiques en fixant le pH et la température, d'autres paramètres sont susceptibles d'affecter l'équilibre protéine-ligand.

Le linezolide a été choisi pour les longueurs d'ondes auxquelles il absorbe, son rendement en SPE, sa stabilité en solution et son temps de rétention qui est différent de celui des autres analytes. Toutefois, c'est aussi un médicament susceptible d'être co administré aux antibiotiques étudiés.

Concernant la SPE, nous avons vu que le recours à son utilisation était de pouvoir augmenter la sensibilité (à condition d'obtenir un rendement suffisant) et de purifier davantage l'échantillon plasmatique chez des patients polymédiqués diminuant ainsi le risque d'interférence entre les analytes et les autres médicaments que reçoivent les patients.

Dans notre cas, certaines limites sont à prendre en compte comme l'aspect chronophage (mauvaise stabilité de certains analytes), le rendement (insuffisant pour le tazobactam), le coût (associé au développement et au dosage), le biais sur le résultat (étape supplémentaire avant le dosage), la complexité du développement (8 antibiotiques) et le manque de spécificité de détection UV pour le tazobactam. Cette étape nous est donc apparue comme importante au risque de ne pas pouvoir doser les analytes par HPLC-UV dans certains échantillons plasmatiques de patients polymédiqués.

L'HPLC-UV manque de spécificité dosage par rapport la LC-MS/MS, laquelle aurait permis de gagner en spécificité pour le tazobactam et éventuellement en sensibilité. Cela nécessite accès à un appareil LC-MS/MS et aussi étalon interne marqué très coûteux. Le choix de l'HPLC-UV a été réalisé étant donné sa disponibilité au laboratoire et sa sensibilité suffisante pour la majorité des molécules dosées.

La stabilité courte de certains analytes en solutions comme la ceftriaxone ou le meropenem nous laisse supposer que les valeurs de concentrations observées *in vitro* sont peut-être inférieures aux concentrations *in vivo*. En effet, les essais de stabilité ne prennent ni en compte le temps passé dans l'organisme (une partie du médicament est dans l'organisme depuis plusieurs minutes à plusieurs heures au moment du prélèvement), ni le temps passé entre le prélèvement, la centrifugation, la congélation à -20°C (qui prend elle-même plusieurs heures) puis à -80°C, la décongélation avant le dosage et l'aspect brutalisant de ces étapes.

Un dosage immédiat ou une congélation immédiate à -80°C permettrait de limiter cette dégradation.

Pour réaliser les gammes, nous nous sommes inspirés de ce qui est décrit dans la littérature bien que les schémas d'administration et de prélèvements soient généralement différents des nôtres.

Au vu des résultats des dosages, ces gammes devront être revues si les schémas d'administrations viennent à changer.

Enfin, la médiane et la moyenne des concentrations plasmatiques en FU des analytes chez les patients en hyperclairance rénale sont supérieures aux concentrations critiques (42). Cependant, pour obtenir une bactéricidie optimale avec ces antibiotiques, les concentrations plasmatiques doivent être supérieures ou égales à 4 fois la CMI. Pour la piperacilline et la ceftriaxone (résiduel), les concentrations observées pourraient être insuffisantes pour traiter le patient contre certaines bactéries catégorisées intermédiaires. De plus, nous pouvons observer sur les box plot (figure n°29) que les valeurs des concentrations plasmatiques sont très variables malgré l'utilisation d'une dose fixe.

## V. Conclusion

L'objectif de ce travail était de développer une méthode de dosage simultanée de la FU de sept  $\beta$ -lactamines et d'un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases administrés en perfusion continue (sauf ceftriaxone) chez les patients de réanimation chirurgicale, polymédiqués et généralement en hyperclairance rénale et en d'hypoalbuminémie. A notre connaissance, il s'agit de la première méthode utilisant un protocole commun de SPE dans le dosage simultané des 8 analytes étudiés dans le plasma et utilisant la notion de facteur de correction.

La surveillance des  $\beta$ -lactamines dans les unités de soins intensifs peut s'avérer très utile, en particulier pour lorsque les CMI sont élevées. Le paramètre prédictif de l'efficacité des antibiotiques est le temps pendant lequel les concentrations plasmatiques sont au-dessus de la CMI de la bactérie à éliminer. Considérant que la FU est la forme active de l'antibiotique, connaître sa concentration constitue un élément important du succès thérapeutique.

Le dosage de la FU requiert une parfaite connaissance des paramètres qui modulent la liaison protéine – ligand en sachant qu'il existe peut-être d'autres facteurs qui nous sont inconnus. En ce qui concerne les molécules faiblement fixées (<30%), devant la complexité de la mise au point, des biais de remise en condition in vivo, des biais liés aux étapes, de l'aspect chronophage et du coût du matériel, le dosage de la FU ne nous semble donc pas intéressant au regard du dosage de la fraction totale. Il est discutable pour les molécules moyennement fixées [30-70%]. A propos du dosage des composés fortement fixés pour lesquels la proportion de FU peut varier sensiblement en cas de dysprotéinémie ou de la présence d'autres molécules (fixation de type I, compétition), la courbe d'étalonnage ne devrait pas être réalisée en chargeant les calibrants dans un pool de plasmas en amont de l'ultrafiltration.

Le chargement des calibrants après l'ultrafiltration avec l'utilisation d'un facteur de correction est discutable mais il nous semble plus adapté dans ce contexte, si tenté qu'il soit possible de le déterminer. Des études supplémentaires devront être menées afin d'optimiser l'évaluation du rendement de l'ultrafiltration pour reproduire l'effet passivant des protéines plasmatiques.

## Annexes

### Annexe 1 : Protocole de dosage par HPLC-UV

#### **Méthodes utilisées :**

- Equilibrage colonne : Méthode ATB5EQ
- Dosage : ATBHYCL
- Rinçage colonne : ATB5RI

#### **Matériel utilisé :**

- Colonne ProntoSIL HPLC C18 125/4.0mm; 3 µm), Bischoff Chromatography
- Filtres Amicon Ultra-0,5ml 10 kDa, Merck Millipore
- StrataX 33u reverse phase 30mg, Phenomenex

#### **Mode opératoire :**

- **Ultrafiltration : Filtres Amicon Ultra-0,5ml 10 kDa**

**Préchauffer la centrifugeuse en la faisant tourner à vide 15 min à 13000 TPM pour la faire chauffer.**

- Préparation de l'échantillon patient : 300 µL Plasma + 190 µL H<sub>2</sub>O + 10µL TMP 100mM pH=2 (sans Linezolide) puis vortexer
- Placer 500µL dans filtre Amicon 10 kDa.
- Placer à l'étuve : 20 min 37°C
- UF : 7000 tours/min (4650g) 15 min
  
- **Extraction SPE : StrataX RP 33u (1 goutte/sec max)**
  - Conditionnement : 1 mL MeOH
  - Rinçage : 0.5mL puis 1mL H<sub>2</sub>O
  - Chargement :
    - Extemporément : Traitement de l'échantillon : ajouter 700 µL TMP Linezolide (Tampon phosphate pH=2 100 mM + Linezolide (10µg/mL))
    - Vortexer 2\*10 sec
    - Charger l'échantillon en totalité
  - Lavage : 2\*1 ml H<sub>2</sub>O
  - Elution : 2\*0.4 ml MeOH/ACN v/v



- **Evaporation :**
  - Sous azote entre 35 °C (environ 1h30)
  - Reprise par 200µL MeOH/H<sub>2</sub>O (30/100) : vortex 2\* 10 sec
  
- **Dosage HPLC-UV : Méthode ATBHYCL**
  - 220nm (tazobactam)
  - 260nm (piperacilline et EI)
  - 305nm (cefepime, ceftazidime, meropenem, ceftriaxone, cefotaxime, cefazoline)

## Annexe 2 : Schémas d'administration des β-lactamines

**Ceftriaxone** : 2g sur 30 min en perfusion unique. Pic à prélever à H0+1, vallée à prélever avant l'injection suivante.

**Piperacilline – Tazobactam**) : Bolus de 4/0,5g sur 1 heure puis 8g/48ml à 4ml/h soit 16g/jour en 2 seringues électriques. Dosage au plateau à partir de 12h d'administration.

**Cefepime** : Bolus de 2g sur 1 heure puis 2g/48ml à 6 ml/h soit 6g/jour en 3 seringues électriques. Dosage au plateau à partir de 12h d'administration.

**Ceftazidime** : Bolus de 2g sur 1 heure puis 2g/48ml à 6 ml/h soit 6g/jour en 3 seringues électriques. Dosage au plateau à partir de 12h d'administration.

**Meropenem** : Bolus de 2g sur 1 heure puis 2g/48ml à 6 ml/h soit 6g/jour en 3 seringues électriques. Dosage au plateau à partir de 12h d'administration.

**Cefotaxime** : Bolus de 2g sur 1 heure puis 2g/48ml à 6 ml/h soit 6g/jour en 3 seringues électriques. Dosage au plateau à partir de 12h d'administration.

**Cefazoline** : Bolus de 2g sur 1 heure puis 100mg/kg sur 24h répartie en 2 ou 3 seringues électriques. Dosage au plateau à partir de 12h d'administration.

## Bibliographie

1. Barletta JF, Mangram AJ, Byrne M, Hollingworth AK, Sucher JF, Ali-Osman FR, et al. The importance of empiric antibiotic dosing in critically ill trauma patients. *J Trauma Acute Care Surg* [Internet]. 2016 Dec;81(6):1115–21. Available from: <http://journals.lww.com/jtrauma%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed18b&NEWS=N&AN=611774823>
2. Udy AA, Baptista JP, Lim NL, Joynt GM, Jarrett P, Wockner L, et al. Augmented Renal Clearance in the ICU. *Crit Care Med* [Internet]. 2014 Mar;42(3):520–7. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003246-201403000-00004>
3. Carrié C, Petit L, D’Houdain N, Sauvage N, Cottenceau V, Lafitte M, et al. Association between augmented renal clearance, antibiotic exposure and clinical outcome in critically ill septic patients receiving high doses of  $\beta$ -lactams administered by continuous infusion: a prospective observational study. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2018 Mar;51(3):443–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.11.013>
4. Udy AA, Lipman J, Jarrett P, Klein K, Wallis SC, Patel K, et al. Are standard doses of piperacillin sufficient for critically ill patients with augmented creatinine clearance? *Crit Care* [Internet]. 2015;19(1):28. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4341874&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Agency EM. Guideline on bioanalytical method validation Draft [Internet]. Vol. 44. 2012. 1-23 p. Available from: [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)
6. Kratzer A, Kees F, Dorn C. Unbound fraction of fluconazole and linezolid in human plasma as determined by ultrafiltration: Impact of membrane type. *J Chromatogr B* [Internet]. 2016 Dec;1039:74–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.040>
7. Roberts JA, Ulldemolins M, Roberts MS, McWhinney B, Ungerer J, Paterson DL, et al. Therapeutic drug monitoring of  $\beta$ -lactams in critically ill patients: proof of concept. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2010 Oct;36(4):332–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.008>
8. Udy AA, Varghese JM, Altukroni M, Briscoe S, McWhinney BC, Ungerer JP, et al. Subtherapeutic Initial  $\beta$ -Lactam Concentrations in Select Critically Ill Patients. *Chest* [Internet]. 2012 Jul;142(1):30–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.11-1671>
9. Jehl F, Levêque D. Perfusion continue des bêtalactamines : intérêts, inconvénients, modalités pratiques. *Réanimation* [Internet]. 2009 Jun;18(4):343–52. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1624069309000784>
10. Ulldemolins M, Roberts JA, Rello J, Paterson DL, Lipman J. The Effects of Hypoalbuminaemia on Optimizing Antibacterial Dosing in Critically Ill Patients. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2011 Feb;50(2):99–110. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/11539220-000000000-00000>

11. Zhang F, Xue J, Shao J, Jia L. Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. *Drug Discov Today* [Internet]. 2012 May;17(9–10):475–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2011.12.018>
12. Wang C, Williams NS. A mass balance approach for calculation of recovery and binding enables the use of ultrafiltration as a rapid method for measurement of plasma protein binding for even highly lipophilic compounds. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2013 Mar;75:112–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2012.11.018>
13. Briscoe SE, McWhinney BC, Lipman J, Roberts JA, Ungerer JPJ. A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* [Internet]. 2012 Oct;907:178–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.016>
14. Musson DG, Birk KL, Kitchen CJ, Zhang J, Hsieh JY., Fang W, et al. Assay methodology for the quantitation of unbound ertapenem, a new carbapenem antibiotic, in human plasma. *J Chromatogr B* [Internet]. 2003 Jan;783(1):1–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023202002404>
15. Palma EC, Laureano JV, de Araújo BV, Meinhardt NG, Stein AT, Dalla Costa T. Fast and sensitive HPLC/UV method for cefazolin quantification in plasma and subcutaneous tissue microdialysate of humans and rodents applied to pharmacokinetic studies in obese individuals. *Biomed Chromatogr*. 2018;32(8):1–11.
16. Connor MJ, Salem C, Bauer SR, Hofmann CL, Groszek J, Butler R, et al. Therapeutic drug monitoring of piperacillin-tazobactam using spent dialysate effluent in patients receiving continuous venovenous hemodialysis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(2):557–60.
17. Di Giovamberardino G, Ferrannini M, Testore GP, Federici G, Pastore A. High performance liquid chromatographic determination of plasma free and total tazobactam and piperacillin. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(1–2):86–8.
18. Verhoven SM, Groszek JJ, Fissell WH, Seegmiller A, Colby J, Patel P, et al. Therapeutic drug monitoring of piperacillin and tazobactam by RP-HPLC of residual blood specimens. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2018;482(January):60–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.03.021>
19. Ongas M, Standing J, Ogutu B, Waichungo J, Berkley JA, Kipper K. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the simultaneous quantitation of ceftriaxone, metronidazole and hydroxymetronidazole in plasma from seriously ill, severely malnourished children. *Wellcome Open Res* [Internet]. 2017;2:43. Available from: <https://wellcomeopenresearch.org/articles/2-43/v1>
20. Parker SL, Guerra Valero YC, Roberts DM, Lipman J, Roberts JA, Wallis SC. Determination of Cefalothin and Cefazolin in Human Plasma, Urine and Peritoneal Dialysate by UHPLC-MS/MS: Application to a pilot pharmacokinetic study in humans. *Biomed Chromatogr*. 2016;30(6):872–9.
21. McWhinney BC, Wallis SC, Hillister T, Roberts JA, Lipman J, Ungerer JPJ. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* [Internet]. 2010 Jul;878(22):2039–43. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157002321000348X>

22. Verdier M-C, Tribut O, Tattevin P, Le Tulzo Y, Michelet C, Bentué-Ferrer D. Simultaneous Determination of 12  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection: Application to Therapeutic Drug Monitoring. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2011 Oct;55(10):4873–9. Available from: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00533-11>
23. Ikeda K, Ikawa K, Morikawa N, Miki M, Nishimura S-I, Kobayashi M. High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for real-time therapeutic drug monitoring of meropenem in plasma. *J Chromatogr B* [Internet]. 2007 Sep;856(1–2):371–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023207004059>
24. Legrand T, Vodovar D, Tournier N, Khoudour N, Hulin A. Simultaneous Determination of Eight  $\beta$ -Lactam Antibiotics, Amoxicillin, Cefazolin, Cefepime, Cefotaxime, Ceftazidime, Cloxacillin, Oxacillin, and Piperacillin, in Human Plasma by Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2016 Aug;60(8):4734–42. Available from: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00176-16>
25. Carlier M, Stove V, Roberts JA, Van de Velde E, De Waele JJ, Verstraete AG. Quantification of seven  $\beta$ -lactam antibiotics and two  $\beta$ -lactamase inhibitors in human plasma using a validated UPLC-MS/MS method. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2012 Nov;40(5):416–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.06.022>
26. Carlier M, Stove V, De Waele JJ, Verstraete AG. Ultrafast quantification of  $\beta$ -lactam antibiotics in human plasma using UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B* [Internet]. 2015 Jan;978–979:89–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.11.034>
27. Nilsson LB. The bioanalytical challenge of determining unbound concentration and protein binding for drugs. *Bioanalysis* [Internet]. 2013 Dec;5(24):3033–50. Available from: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/bio.13.274>
28. Kratzer A, Liebchen U, Schleibinger M, Kees MG, Kees F. Determination of free vancomycin, ceftriaxone, cefazolin and ertapenem in plasma by ultrafiltration: Impact of experimental conditions. *J Chromatogr B* [Internet]. 2014 Jun;961:97–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.05.021>
29. Taylor R, Morrell S, Mamoon H, Wain G, Ross J. Decline in Cervical Cancer Incidence and Mortality in New South Wales in Relation to Control Activities (Australia). *Cancer Causes Control* [Internet]. 2006 Apr;17(3):299–306. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10552-005-0515-z>
30. Millipore. Passivation of Amicon® Microcon Microconcentrators® for Improved Recovery [Internet]. Available from: <http://tinyurl.com/pukx38x>
31. McNamara PJ, Gibaldi M, Stoeckel K. Volume of distribution terms for a drug (ceftriaxone) exhibiting concentration-dependent protein binding. II. Physiological significance. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 1983;25(3):407–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6313380>
32. Nation RL, Theuretzbacher U, Tsuji BT. Concentration-dependent plasma protein binding: Expect the unexpected. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2018 Sep;122(6):341–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.004>

33. Mukker JK, Singh RP, Derendorf H. Determination of Atypical Nonlinear Plasma–Protein-Binding Behavior of Tigecycline Using an In Vitro Microdialysis Technique. *J Pharm Sci* [Internet]. 2014 Mar;103(3):1013–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915306808>
34. Kees MG, Wicha SG, Seefeld A, Kees F, Kloft C. Unbound fraction of vancomycin in intensive care unit patients. *J Clin Pharmacol* [Internet]. 2014 Mar;54(3):318–23. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcph.175>
35. Wright JD, Boudinot FD, Ujhelyi MR. Measurement and analysis of unbound drug concentrations. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 1996 Jun;30(6):445–62. Available from: <http://www.cipa2011.cz/proceedings/pdfs/B-2/Sun.pdf>
36. Tillement J-P, Zini R, Glasson S, Jacotot B. Fixation plasmatique et pharmacocinétique des médicaments. *La Rev Médecine Interne* [Internet]. 1982 Mar;3(1):75–80. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0248866382800118>
37. McMillin GA, Juenke J, Dasgupta A. Effect of Ultrafiltrate Volume on Determination of Free Phenytoin Concentration. *Ther Drug Monit* [Internet]. 2005 Oct;27(5):630–3. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00007691-200510000-00015>
38. Dubala A, Nagarajan JSK, Vimal CS, George R. Simultaneous quantification of cefpodoxime proxetil and clavulanic acid in human plasma by LC–MS using solid phase extraction with application to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B* [Internet]. 2013 Mar;921–922:49–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.01.018>
39. Davis MD, Wade EL, Restrepo PR, Roman-Esteva W, Bravo R, Kuklennyik P, et al. Semi-automated solid phase extraction method for the mass spectrometric quantification of 12 specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, and select herbicides in human urine. *J Chromatogr B* [Internet]. 2013 Jun;929:18–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.04.005>
40. Humbert L. Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications. *Ann Toxicol Anal* [Internet]. 2010 May 12;22(2):61–8. Available from: <http://www.ata-journal.org/10.1051/ata/2010010>
41. Bos JC, Prins JM, Mistício MC, Nunguiane G, Lang CN, Beirão JC, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamic target attainment of ceftriaxone in adult severely ill sub-Saharan African patients: a population pharmacokinetic modelling study. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2018 Jun 1;73(6):1620–9. Available from: <https://academic.oup.com/jac/article/73/6/1620/4924395>
42. Microbiologie SFDE. Comité de l’antibiogramme de la SFM [Internet]. 2018. Available from: [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM\\_V1\\_0\\_FEV\\_2018.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_V1_0_FEV_2018.pdf)

## SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) 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.

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

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

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

## RESUME en français

Notre travail s'intègre dans une étude prospective intitulée « hyperclairance » ayant pour objectif de déterminer si l'hyperclairance rénale peut conduire à un risque d'échec microbiologique et clinique via une diminution des concentrations plasmatiques en fraction libre pour 8  $\beta$ -lactamines (cefepime, ceftazidime, meropenem, ceftriaxone, cefotaxime, cefazoline, piperacilline et tazobactam). En l'absence de méthode de dosage simultanée de la fraction libre des antibiotiques inclus dans l'étude, l'objectif est de mettre au point une telle méthode puis de la mettre en application sur des échantillons plasmatiques provenant des patients de réanimation. La mise au point d'une méthode de dosage de la fraction libre des médicaments relève d'une certaine complexité en comparaison du dosage de la fraction totale. La liaison protéine-médicament est influencée par certains paramètres comme le pH, la température ou encore la composition de la matrice plasmatique. A cela s'ajoute d'autres problématiques comme la fixation protéique concentration dépendante, la fixation non spécifiques aux supports et le manque de stabilité de certains analytes qui peuvent complexifier davantage la mise au point et le dosage de la fraction libre. Etant donné la nature des molécules à doser et de la différence de composition entre blancs de plasma et matrice de la population cible, la méthode a été validée en chargeant les calibrants après l'étape de récupération de la fraction libre dans un diffusat issu d'un pool de plasma de donneurs sains. Ainsi, le rendement de l'ultrafiltration a été évalué afin de déterminer un facteur de correction pour chaque molécule et destiné à être appliqué aux résultats des dosages des patients. La méthode de dosage, validée selon les recommandations de l'agence européenne du médicament comportera une première étape d'ultrafiltration suivi d'une étape d'extraction en phase solide liquide et enfin une étape de séparation et de quantification par HPLC-UV.

### TITRE en anglais

Development and validation of a dosing method in plasma of the unbound fraction of 8 beta-lactam and application in patients from intensive care unit

**DISCIPLINE** : Pharmacie hospitalière et collectivités

**MOT-CLES** : Liaison aux protéines, Ultrafiltration, Extraction en phase solide, HPLC, Surveillance pharmacologique, Bêta-Lactames, Hypoalbuminémie

### INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR :

Université de BORDEAUX  
UFR des Sciences Pharmaceutiques  
146 rue Léo Saignat  
33076 BORDEAUX Cedex