

Exploration de l'interférence analytique des lipides sur le dosage plasmatique du mitotane par HPLC-UV

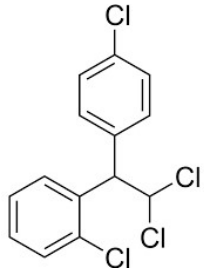
Eva Pereira

Interne en biologie médicale

Encadrants : Dr Benoit Blanchet, Dr Alicja Puszekiel

Biologie du médicament – Toxicologie (Hôpital Cochin, APHP)

Le mitotane ...



Carcinome corticosurrénalien non opérable, métastatique ou récidivant

Composé très lipophile

Demi-vie d'élimination très longue, entre 18 et 159 jours (1)

Corrélation entre concentrations plasmatiques et effet thérapeutique (2)

Concentrations thérapeutiques entre 14 et 20 mg/L (3)



Toxicités neurologiques si > 20 mg/L

Traitement à l'origine de dyslipidémies (4)

Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique

(1) Moolenaar, A J et al. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 1981

(2) Haak, H R et al. *British journal of cancer*, 1994

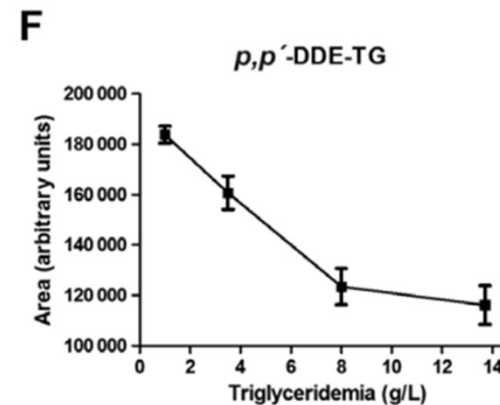
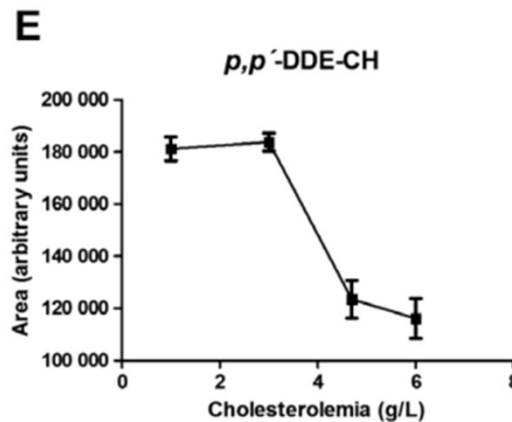
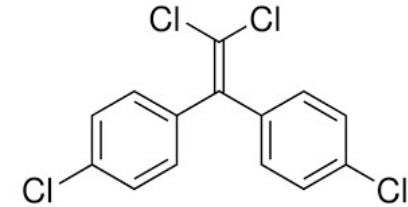
(3) Baudin, E. et al. *Cancer*, 2001

(4) Gagnon, N. et al, *Endocr Oncol*. 2022

Le mitotane ...

... son dosage plasmatique, et les lipides

- Dosage par HPLC-UV, gamme de 0.5-25 mg/L
- Utilisation du 4,4'-dichlorodiphényldichloroéthylène ou 4,4'-DDE comme étalon interne (EI) à 8.9 µg/L
- **En routine** : concentrations parfois très élevées (> 25 mg/L), avec signal d'EI faible
- Constat de l'interférence lipides – dosage du mitotane (5) : diminution du signal d'EI en cas de dyslipidémies

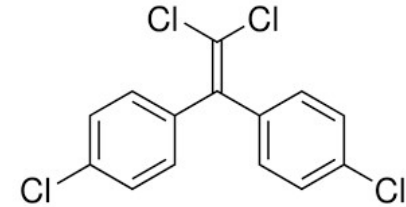


(5) Paci, A. et al, *Endocrinology, diabetes & metabolism case reports*, 2016

Le mitotane ...

... son dosage plasmatique, et les lipides

- Dosage par HPLC-UV, gamme de 0.5-25 mg/L
- Utilisation du 4,4'-dichlorodiphényldichloroéthylène ou 4,4'-DDE comme étalon interne (EI) à 8.9 µg/L
- **En routine** : concentrations parfois très élevées (> 25 mg/L), avec signal d'EI faible
- Constat de l'interférence lipides – dosage du mitotane (5) : diminution du signal d'EI en cas de dyslipidémies



Comment diminuer cet effet matrice, et quelles stratégies utiliser en routine pour s'affranchir de l'interférence analytique ?

(5) Paci, A. et al, *Endocrinology, diabetes & metabolism case reports*, 2016

Objectifs

- Confirmer l'influence des lipides (triglycérides et cholestérol) sur le signal d'étalon interne
- Elaborer des stratégies permettant de s'affranchir de cette interférence

Preuve de l'influence des lipides sur le signal d'EI

Récolte de tubes de patients dyslipidémiques ne recevant pas de mitotane

Surcharge en EI ($8.9 \mu\text{g/L}$)

Mesure par HPLC-UV

Gammes de lipides

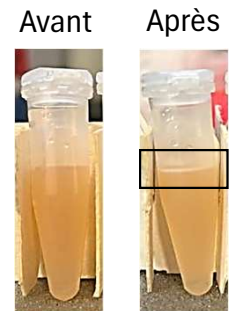
Plasmas de concentrations croissantes en triglycérides (TRIG) et cholestérol (CHOL) (n=35, tripliqués)



Diminution du signal d'EI avec les TRIG/CHOL ?

Tests de crémage

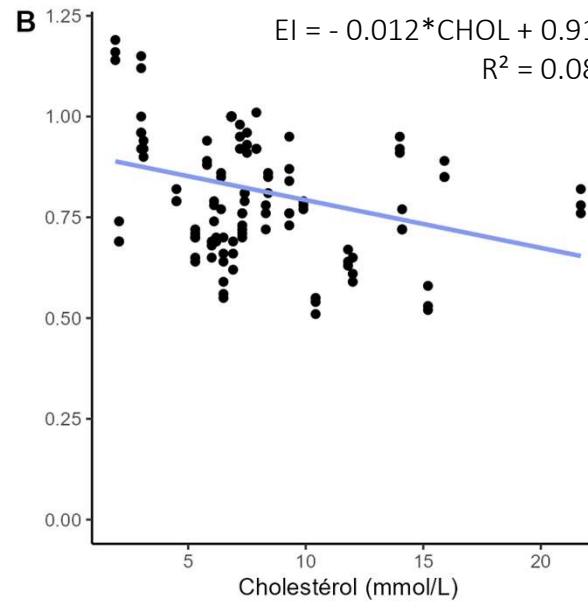
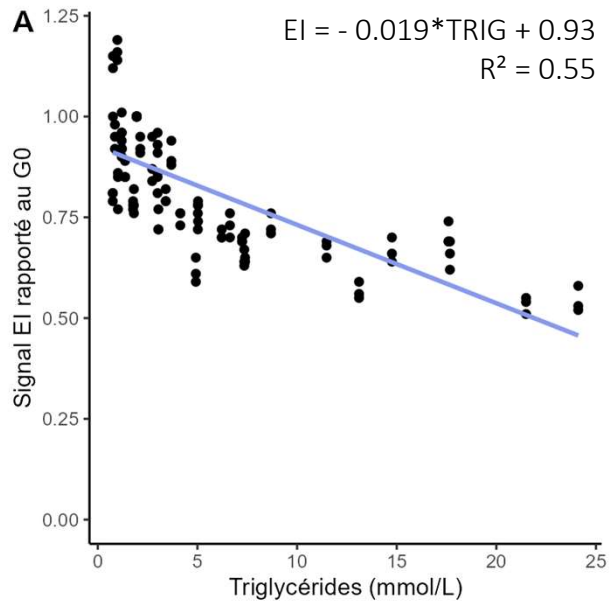
Conservation une nuit à 4°C de tubes normaux, hyperTRIG et hyperCHOL (n=5/groupe)
Nouvelle mesure du signal le lendemain



Normalisation du signal d'EI ?

Gammes de lipides

Diminution du signal d'EI avec les TRIG/CHOL ?



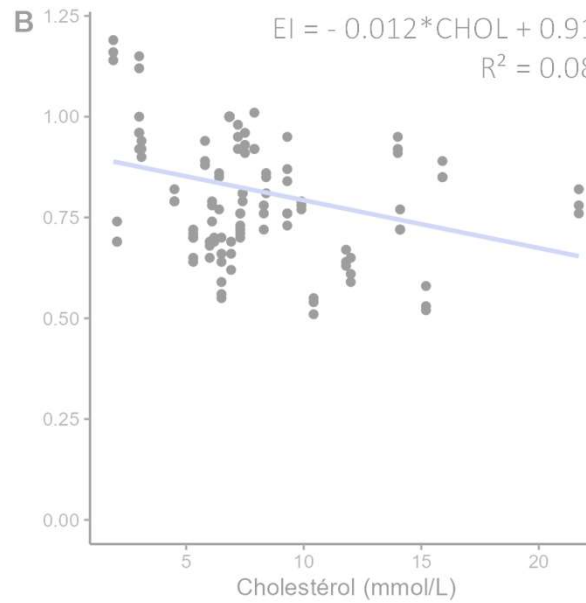
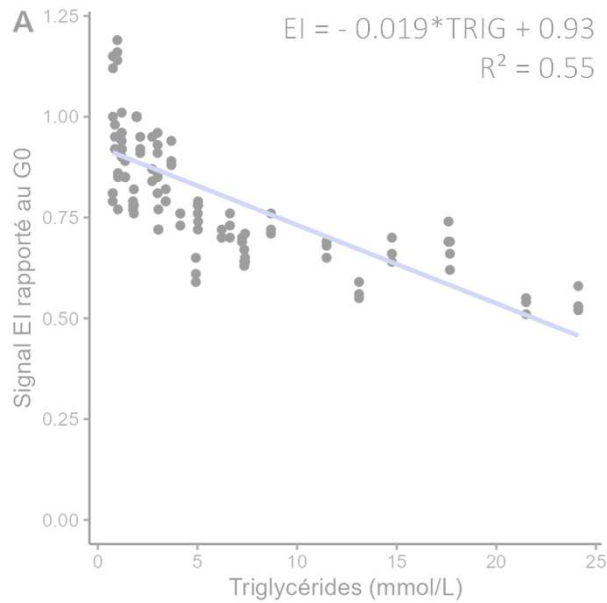
Régression linéaire

Lipides	P-value Univariée
TRIG	< 0.001
CHOL	< 0.001

Effet marqué des triglycérides et du cholestérol

Gammes de lipides

Diminution du signal d'EI avec les TRIG/CHOL ?



Régression linéaire

Lipide	P-value	
	Univariée	Multivariée
TRIG	< 0.001	< 0.001
CHOL	< 0.001	< 0.001



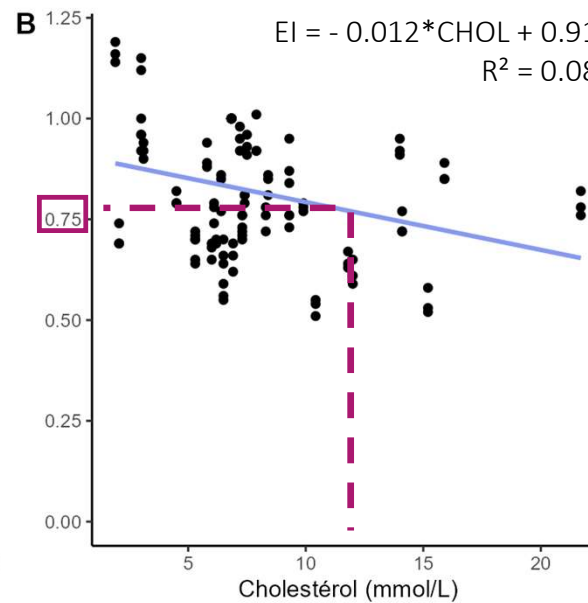
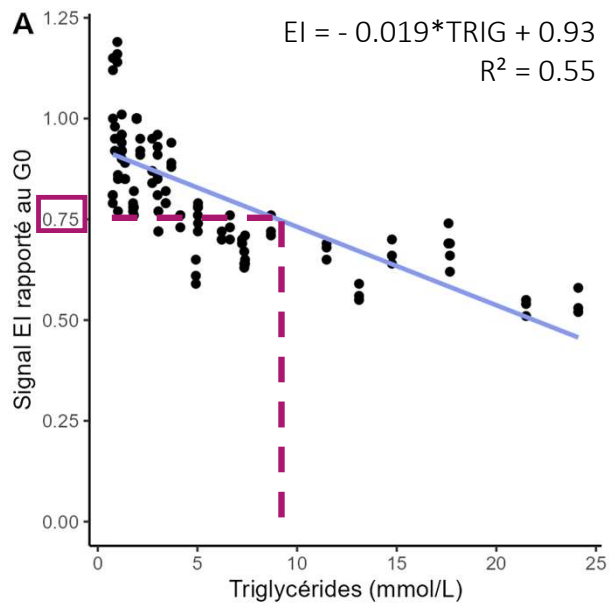
Analyse multivariée :

$$EI = -0.019*TRIG - 0.010*CHOL + 1.00$$
$$R^2 = 0.61$$

Effet marqué des triglycérides et du cholestérol, indépendamment

Gammes de lipides

Diminution du signal d'EI avec les TRIG/CHOL ?



Régression linéaire

Lipide	P-value	
	Univariée	Multivariée
TRIG	< 0.001	< 0.001
CHOL	< 0.001	< 0.001

Analyse multivariée :

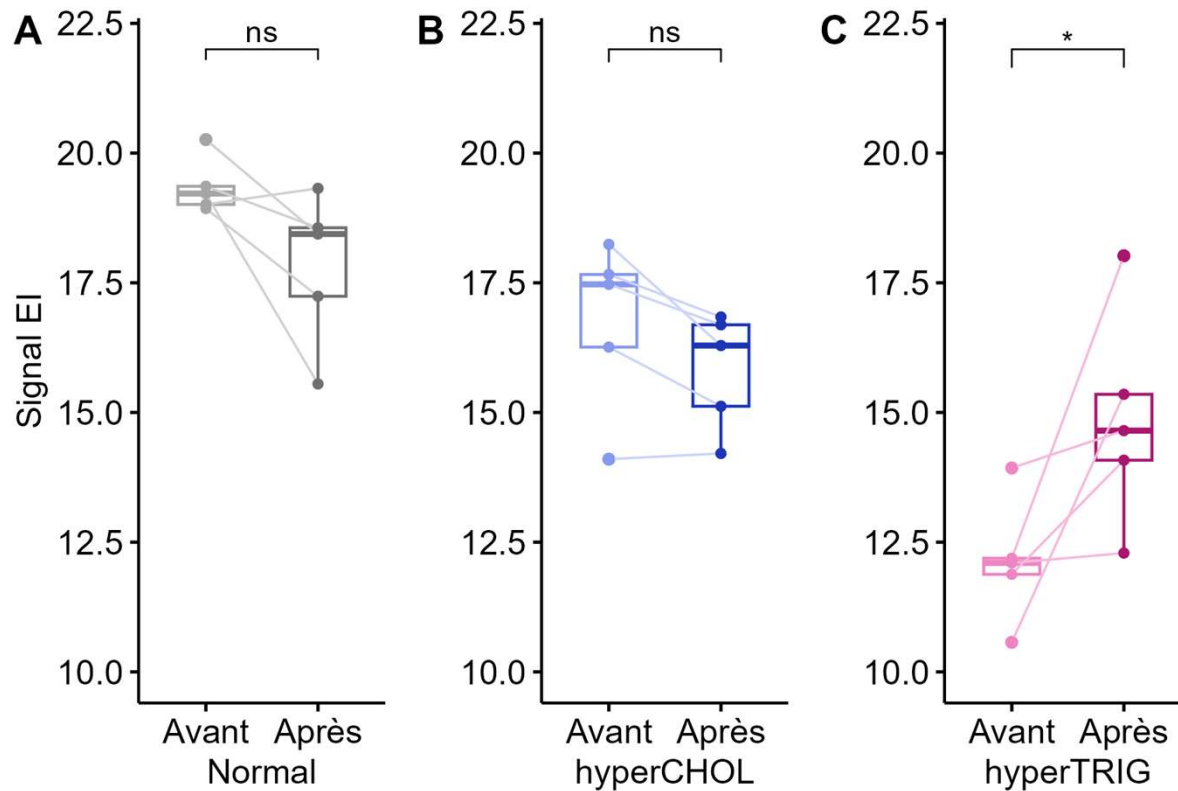
$$EI = -0.019 \cdot TRIG - 0.010 \cdot CHOL + 1.00$$

$$R^2 = 0.61$$

25% du signal d'EI perdu si :
[TRIG] > 10 ou [CHOL] > 11 mmol/L

Tests de crémage

Normalisation du signal d'EI ?



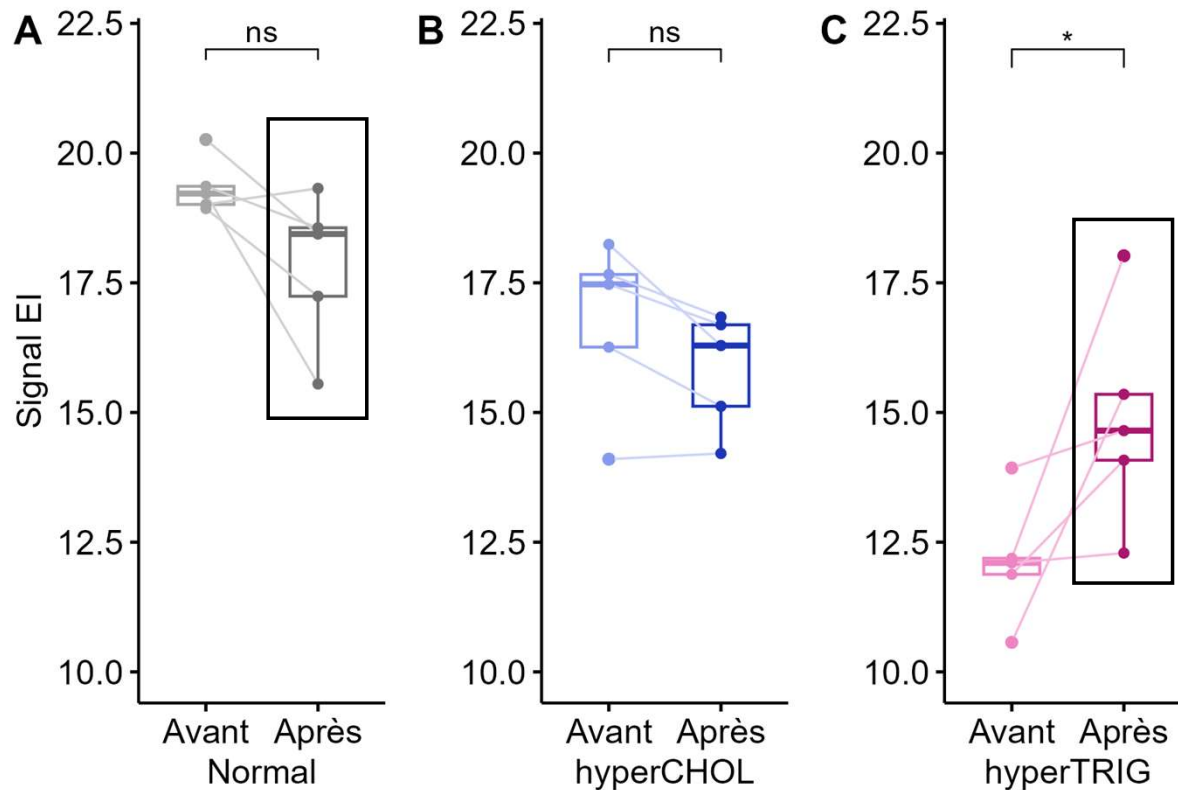
Signal d'EI augmenté (+23%) chez les hyperTRIG seulement

n = 5 par groupe, test de Wilcoxon

*0.01 < p-valeur < 0.05 : **

Tests de crémage

Normalisation du signal d'EI ?



Signal d'EI augmenté (+23%) chez les hyperTRIG seulement

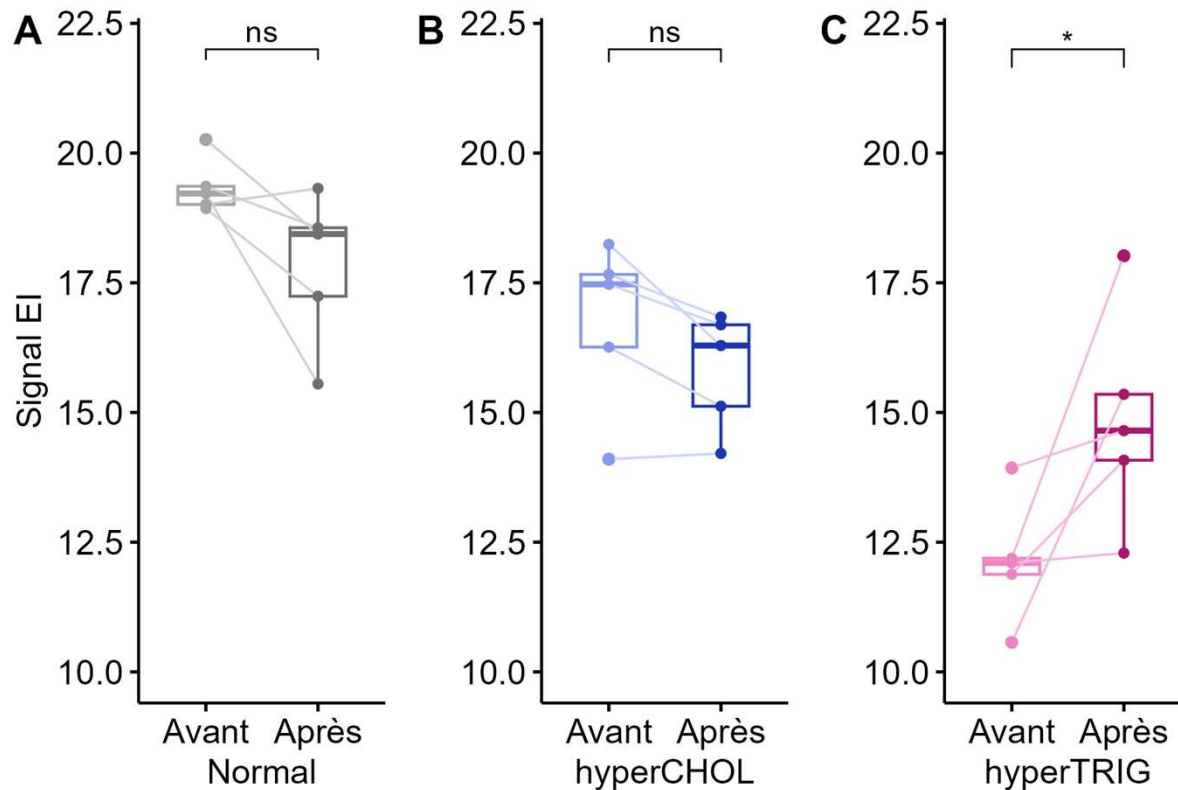
Mais persistance d'une différence de -16% avec le groupe Normal

n = 5 par groupe, test de Wilcoxon

*0.01 < p-valeur < 0.05 : **

Tests de crémage

Normalisation du signal d'EI ?



Signal d'EI augmenté (+23%) chez les hyperTRIG seulement

Mais persistance d'une différence de -16% avec le groupe Normal

Test de crémage insuffisant pour normaliser le signal d'EI

n = 5 par groupe, test de Wilcoxon

*0.01 < p-valeur < 0.05 : **

Recherche de stratégies pour s'affranchir de l'effet

Constitution d'une base de données regroupant tous les patients dosés à Cochin pour lesquels :

Mitotanémie > 25 mg/L et/ou signal EI faible

Dosage des lipides (TRIG et CHOL)

(n = 15)

Stratégie 1

Dilution au 1/10
dans du plasma
vierge

Stratégie 2

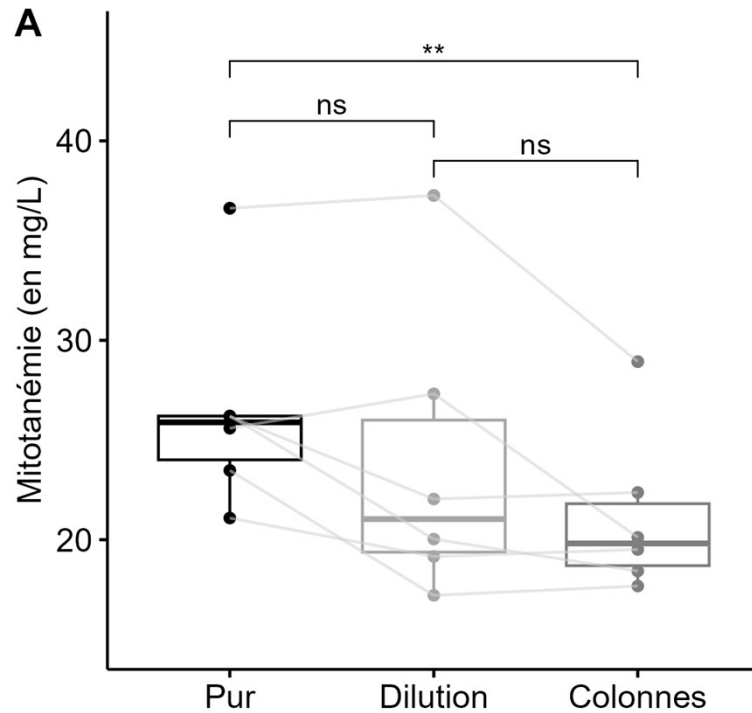
Colonnes
d'extraction des
lipides



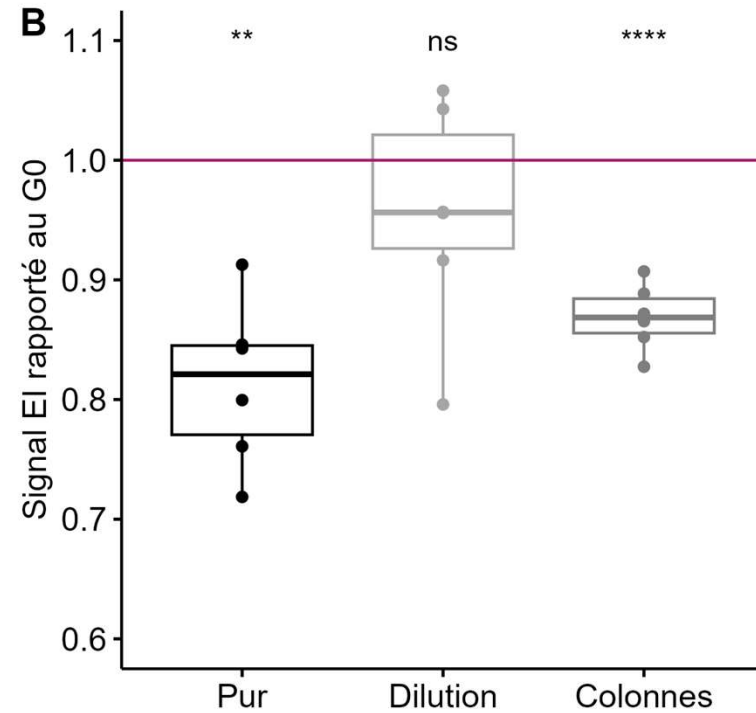
Réanalyse par HPLC-UV

Comparaison des stratégies

Chez des patients normolipidémiques



Pas de différence significative, sauf entre mitotaniémie pure et colonnes (-20%)

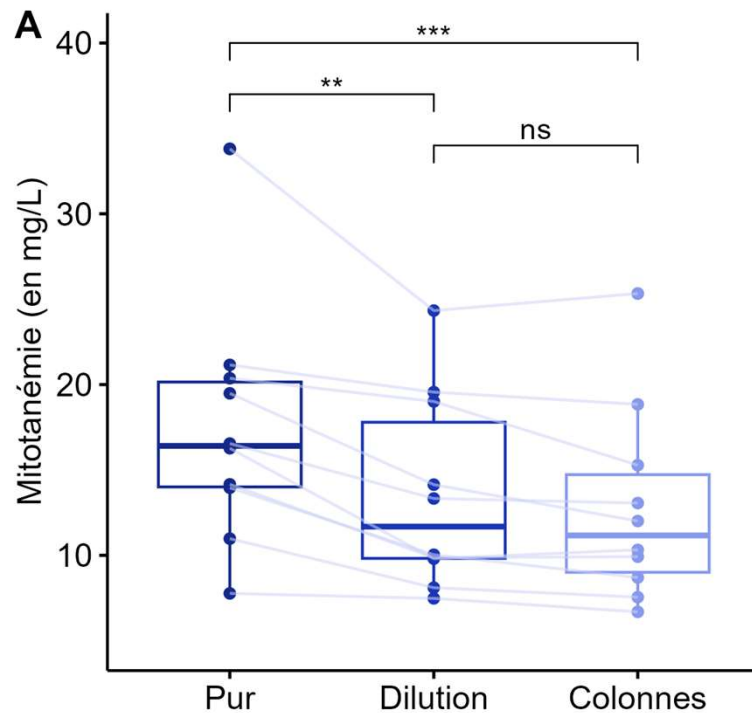


Signal d'EI en moyenne plus faible avec les colonnes (0.87, significativement différent de 1)

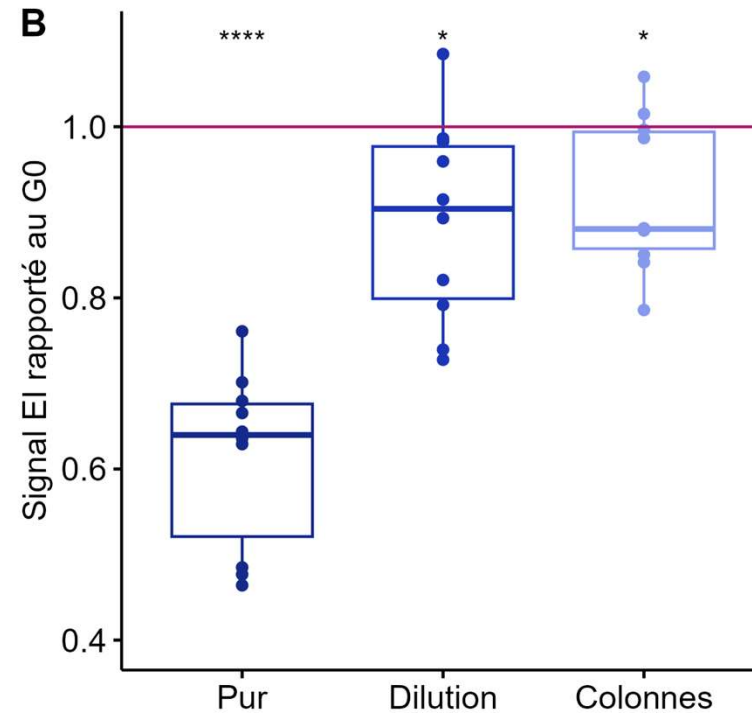
$n = 6$, test de Student, $0.001 < p\text{-valeur} < 0.01$: **, < 0.0001 : ****

Comparaison des stratégies

Chez des patients hyperlipidémiques (TRIG > 10 mM ou CHOL > 11 mM)



Pas de différence significative de la mitotanémié entre les deux stratégies



Signal d'EI en moyenne plus faible (0.89 et 0.92 pour la dilution et les colonnes, respectivement)

$n = 9$, test de Student, p -valeur : $0.01 < * < 0.05$, $0.001 < ** < 0.01$, $0.0001 < *** < 0.01$, $**** < 0.0001$

Discussion et conclusion

- Preuve de l'influence indépendante des TRIG/CHOL sur le signal d'EI
- Mécanisme ?
- Stratégies testées : dilution au 1/10 et extraction sur colonnes

Signal d'EI quasi normalisé dans les deux cas

A priori équivalentes chez des patients hyperlipidémiques

→ Utilisables en routine

Perspectives

- Vérifier chez des patients de concentrations intermédiaires en lipides
- Affiner le seuil de lipides responsable de l'extinction de signal d'EI
- Concentration de référence à laquelle comparer les résultats ?

Remerciements

- Laboratoire de Biologie du médicament – toxicologie (Hôpital Cochin, APHP)

Benoit Blanchet
Alicja Puszkiel
Xavier Declèves
Michel Vidal
Mourad Mseddi

Blaise Pasquiers
Inès Benhabiles
Eva Reygue
Jules Frichet
Sani Sadjji



- Laboratoire de pharmacologie de l'Institut Gustave Roussy

Notamment les Dr Sophie Broutin, Julia Delahousse et David Combarel

Remerciements

- Laboratoire de Biologie du médicament – toxicologie (Hôpital Cochin, APHP)

Benoit Blanchet
Alicja Puszkiel
Xavier Declèves
Michel Vidal
Mourad Mseddi

Blaise Pasquiers
Inès Benhabiles
Eva Reygue
Jules Frichet
Sani Sadjji



- Laboratoire de pharmacologie de l'Institut Gustave Roussy

Notamment les Dr Sophie Broutin, Julia Delahousse et David Combarel

Et merci pour votre attention