



**HAL**  
open science

# Optimisation des thérapeutiques immunosuppressives par méthode pharmacologique.

Florian Lemaitre

► **To cite this version:**

Florian Lemaitre. Optimisation des thérapeutiques immunosuppressives par méthode pharmacologique.. Pharmacologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA114832 . tel-01126866

**HAL Id: tel-01126866**

**<https://theses.hal.science/tel-01126866>**

Submitted on 6 Mar 2015

**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.

# UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

## ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

*PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE*

*EA 4123 « Barrières physiologiques et réponses thérapeutiques »*

## DISCIPLINE :

**Pharmacologie expérimentale et clinique**

ANNÉE 2013-2014

SÉRIE DOCTORAT N° 1291

## THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 30/09/2014

par

**Florian LEMAITRE**

# Optimisation des thérapeutiques immunosuppressives par méthode pharmacologique

### **Directeur de thèse :**

Mme le Professeur Christine FERNANDEZ Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Université Paris-Sud 11 / Hôpital Saint-Antoine)

### **Composition du jury :**

#### *Président du jury :*

M. le Professeur Robert FARINOTTI Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Université Paris-Sud 11 / Hôpital Pitié-Salpêtrière)

#### *Rapporteurs :*

M. le Professeur Pierre WALLEMACQ Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Université de Louvain / Nouvelles Cliniques St Luc)

M. le Professeur Franck SAINT-MARCOUX Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Université de Limoges / CHU de Limoges)

#### *Examineurs :*

M. le Professeur Eric BELLISSANT Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Université de Rennes 1 / CHU de Rennes)

Mme le Docteur Marie ANTIGNAC Praticien Hospitalier (Hôpital St Antoine)

M. le Docteur Benoît BLANCHET Praticien Hospitalier (Hôpital Cochin)

## **Remerciements :**

### ***A Madame le Professeur Christine Fernandez,***

Christine, reçoit ici tous mes remerciements pour m'avoir encadré de manière efficace et complète tout au long de ce travail de doctorat. Merci également pour mes deux ans et quelques mois d'assistant spécialiste exercés sous ta direction au laboratoire d'analyse du médicament de la Pitié-Salpêtrière, période au cours de laquelle j'ai énormément appris tout en prenant beaucoup de plaisir. Merci pour la formation scientifique et professionnelle de grande qualité reçue à ton contact et également pour ton extrême disponibilité. Merci enfin pour la confiance que tu m'as témoignée durant toute cette période de joyeuse collaboration.

### ***A Monsieur le Professeur Robert Farinotti,***

Vous m'avez fait le très grand honneur d'accepter de présider ce jury de doctorat, recevez ici toute l'expression de mon respect. J'ai pu, à votre contact, apprécier toute l'étendue de votre compétence professionnelle et de vos connaissances en pharmacocinétique et du médicament en général. Vous êtes pour moi un modèle dont je m'efforce humblement de suivre les traces.

### ***A Monsieur le Professeur Pierre Wallemacq,***

Je suis très honoré que vous ayez accepté de juger ce travail de doctorat. Vos travaux sur la pharmacocinétique intracellulaire des immunosuppresseurs ont inspiré ceux présentés dans ce manuscrit et il était donc tout naturel de vous proposer d'en être rapporteur.

### ***A Monsieur le Professeur Franck Saint-Marcoux,***

Franck, je t'exprime ici toute ma reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail de doctorat. Ta très grande connaissance de la pharmacologie en général et de celle des immunosuppresseurs en particulier, faisait de toi le rapporteur idéal pour ce travail.

***A Monsieur le Professeur Eric Bellissant,***

Vous m'avez accueilli au sein du service de pharmacologie du CHU de Rennes et m'avez accordé votre confiance et votre soutien. Soyez-en ici remercié. J'espère pouvoir continuer à mériter cette confiance dans le futur.

***A Madame le Docteur Marie Antignac,***

Merci Marie pour l'aide précieuse que tu m'as apportée dans la réalisation de ces travaux. Merci pour m'avoir enseigné les rudiments de la modélisation et m'avoir toujours aiguillé malgré mon inexpérience en la matière. Merci pour tes conseils, ton écoute, ta disponibilité et ta bonne humeur.

***A Monsieur le Docteur Benoit Blanchet,***

Benoit, j'ai fait ta connaissance à l'occasion de ce travail de doctorat et voilà un autre aspect positif que je peux en retirer. Merci pour ton aide et tes conseils de premier ordre sur la calcineurine. J'espère que nous aurons l'occasion de poursuivre notre collaboration sur cette thématique de recherche.

Merci à mes collègues assistants de la Pitié : Sarah Vautier-Cassard, Chloé Jansen, Hugues Michelon (les trois fantastiques), Patrick Hindlet, Julien Molina, Luc Nguyen-Kim, Caroline Hochart, Lauriane Goldwirt, Céline Magneux, Audrey Nahmiash.

Merci à mes collègues et chefs : Noël Zahr, Marion Buyse, Amina Afroun, Neila Benameur Marie-Clémence Verdier, Christelle Boglione-Kerrien, Fabrice Taïeb.

Merci aux internes qui se sont succédés au laboratoire (par ordre d'apparition) : François Roullet-Renoleau, Pierre-André Natella, Pierre-Antoine Fontaine, Julien Cristofini, Fabien Hernandez, Fahmi Ben Moussa, Anaïs Razurel, Tanguy Boissenot, Samia Aly, Alexandre Nicolas, Bastien Langrée, Marine Dermu, Camille Tron, Pierre Fillâtre.

Merci à ma famille et particulièrement à mon frère, Adrien, pour sa relecture attentive.

Merci, enfin et surtout, à mes amours : Félicie et Manon.

<b>1. Introduction</b> .....	17
<b>2. Généralités</b> .....	21
2.1 Thérapeutiques immunosuppressives et Pharmacologie .....	21
2.1.1 Inhibiteurs de Calcineurine .....	22
2.1.1.1 Ciclosporine .....	23
A. Pharmacocinétique .....	24
B. Effets indésirables .....	27
2.1.1.2. Tacrolimus .....	27
A. Pharmacocinétique .....	28
B. Effets indésirables .....	31
2.1.2 Inhibiteurs de la mammalian target of rapamycine (m-TOR).....	32
2.1.2.1 Sirolimus .....	33
A. Pharmacocinétique .....	34
B. Effets indésirables .....	35
2.1.2.2 Everolimus.....	36
A. Pharmacocinétique .....	37
B. Effets indésirables .....	40
2.2 Suivi thérapeutique pharmacologique des concentrations d'immunosuppresseurs .....	40
2.2.1 Suivi thérapeutique pharmacologique de la ciclosporine .....	42
2.2.2 Suivi thérapeutique pharmacologique du tacrolimus .....	45
2.2.3 Suivi thérapeutique du sirolimus.....	46
2.2.4 Suivi thérapeutique de l'évérolimus .....	47
2.2.5 Limites du suivi thérapeutique pharmacologique des concentrations d'immunosuppresseurs .....	48
2.2.6 Modélisation pharmacocinétique par approche de population .....	50

2.2.6.1	Modélisation pharmacologique.....	50
2.2.6.2	Approche de population .....	52
2.2.6.3	Analyse des données .....	54
2.2.6.4	Validation du modèle.....	56
2.2.7	Dosage des immunosuppresseurs dans les cellules mononuclées .....	58
2.2.8	Détermination de l'activité de la calcineurine.....	61
<b>3.</b>	<b>Objectifs.....</b>	<b>63</b>
<b>4.</b>	<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>65</b>
4.1	Pharmacocinétique de population.....	65
4.1.1	Patients et collection des données .....	65
4.1.2	Dosage sanguin de l'évérolimus.....	66
4.1.3	Génotypage .....	66
4.1.4	Modélisation pharmacocinétique .....	67
4.1.5	Validation du modèle .....	69
4.1.6	Conclusion.....	69
4.2	Dosages intracellulaires d'immunosuppresseurs .....	70
4.2.1	Séparation et purification des PBMC .....	70
4.2.2	Numération cellulaire .....	72
4.2.3	Mise au point du dosage des immunosuppresseurs dans les PBMC par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....	73
4.2.4	Validation des méthodes de dosage .....	76
4.2.4.1	Répétabilité .....	76
4.2.4.2	Fidélité intermédiaire .....	77
4.2.4.3	Linéarité .....	78
4.2.4.4	Spécificité.....	78
4.2.4.5	Limite de quantification.....	78
4.2.4.6	Rendement et effet de matrice .....	78

4.2.5 Conclusion.....	79
4.3 Détermination de l'activité de la calcineurine.....	81
4.3.1 Conclusion.....	84
<b>5. Résultats</b> .....	<b>85</b>
5.1 1 <sup>ère</sup> étude : Elaboration d'un modèle pharmacocinétique de l'évérolimus chez le transplanté cardiaque par approche de population.....	85
5.1.1 Rationnel .....	85
5.1.2 Patients et collection des données .....	86
5.1.3 Modélisation pharmacocinétique par approche de population .....	88
5.1.4 Validation du modèle .....	94
5.1.5 Conclusions .....	96
5.2 Dosages intracellulaires d'immunosuppresseurs .....	97
5.2.1 2 <sup>nde</sup> étude : dosage de l'évérolimus dans les PBMC.....	97
5.2.1.1 Rationnel .....	97
5.2.1.2 Résultats .....	98
5.2.1.2.1 Répétabilité .....	98
5.2.1.2.2 Fidélité intermédiaire .....	98
5.2.1.2.3 Linéarité .....	99
5.2.1.2.4 Spécificité .....	99
5.2.1.2.5 Limite de quantification .....	100
5.2.1.2.6 Rendement et effet de matrice .....	100
5.2.1.3 Application clinique chez le patient transplanté cardiaque .....	100
5.2.1.4 Conclusion.....	103
5.2.2 3 <sup>ème</sup> étude : Dosages du tacrolimus dans les PBMC .....	105
5.2.2.1 Rationnel .....	105
5.2.2.2 Résultats .....	106
5.2.2.2.1 Répétabilité .....	106

5.2.2.2.2 Fidélité intermédiaire .....	106
5.2.2.2.3 Linéarité .....	107
5.2.2.2.4 Limite de quantification .....	107
5.2.2.2.5 Rendement et effet de matrice .....	107
5.2.2.2.6 Application clinique de la méthode de dosage du tacrolimus dans les PBMC chez le patient transplanté cardiaque.....	108
5.2.2.3 Conclusion.....	112
5.3 4 <sup>ème</sup> étude : Pharmacocinétique et pharmacodynamie du tacrolimus en transplantation hépatique.....	113
5.3.1 Rationnel .....	113
5.3.2 Résultats .....	114
5.3.2.1 Patients et collection des données .....	114
5.3.2.2 Dosages sanguins, intracellulaires et détermination de l'activité calcineurine .....	116
5.3.2.3 Suivi clinique des patients .....	121
5.3.2.4 Conclusion.....	122
<b>6. Discussion générale.....</b>	<b>123</b>
6.1 Modélisation par approche de population de la pharmacocinétique de l'évérolimus chez le transplanté cardiaque.....	123
6.2 Dosages des immunosuppresseurs dans les PBMC.....	130
6.3 Pharmacocinétique-Pharmacodynamique du tacrolimus en transplantation hépatique.....	141
<b>8. Perspectives.....</b>	<b>150</b>
<b>9. Références.....</b>	<b>152</b>
<b>10. Annexes.....</b>	<b>175</b>



## Articles publiés

### Annexe 1 - Article 1

Lemaitre F, Bezian E, Goldwirt L, Fernandez C, Farinotti R, Varnous S, et al. Population pharmacokinetics of everolimus in cardiac recipients: comedications, ABCB1, and CYP3A5 polymorphisms. *Ther Drug Monit.* 2012 Dec;34(6):686–94. ....175

### Annexe 2 - Article 2

Roullet-Renoleau F, Lemaitre F, Antignac M, Zahr N, Farinotti R, Fernandez C. Everolimus quantification in peripheral blood mononuclear cells using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2012 Jul;66:278–81. ....176

### Annexe 3 - Article 3

Lemaitre F, Antignac M, Fernandez C. Monitoring of tacrolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells: application to cardiac transplant recipients. *Clin Biochem.* 2013 Oct;46(15):1538–41. ...177

### Annexe 4 - Article 4

Lemaitre F, Blanchet B, Latournerie M, Antignac M, Houssel-Debry P, Verdier MC, Dermu M, Camus C, Le Priol J, Roussel M, Zheng Y, Fillatre P, Curis E, Bellissant E, Boudjema K, Fernandez C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in liver transplant recipients: inside the white blood cells. *Article soumis à Clinical Biochemistry.* ....178

### Annexe 5 - Article 5

Lemaitre F, Antignac M, Verdier M-C, Bellissant E, Fernandez C. Opportunity to monitor immunosuppressive drugs in peripheral blood mononuclear cells: where are we and where are we going? *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc.* 2013 Aug;74:109–12. ....179

## Protocoles de recherche ayant reçu une autorisation réglementaire

### Annexe 6 - Protocole 1

Protocole OPTILTH - Optimisation des thérapeutiques immunosuppressives : élaboration d'un modèle pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD) de population en transplantation hépatique. Avis Favorable CCTIRS N°14.344 du 21 mai 2014. ....180

## **Annexe 7 - Protocole 2**

### **Protocole 2**

Protocole DIFF-TAC - Etude de la diffusion cellulaire du tacrolimus au travers de la membrane des cellules mononuclées. Avis favorable Comité d'éthique du CHU de Rennes N°13-44 du 12 juillet 2013. ....**181**

## Liste des figures

Figure 1. Structure chimique de la ciclosporine .....	23
Figure 2. Structure chimique du tacrolimus .....	28
Figure 3. Structure chimique du sirolimus .....	33
Figure 4. Structure chimique de l'évérolimus .....	36
Figure 5. Relation entre modèle et système réel ADE .....	51
Figure 6. Distribution tissulaire des médicaments .....	58
Figure 7. Représentation de l'hypothèse soutenant ce travail de doctorat .....	64
Figure 8. Séparation des cellules mononuclées.....	71
Figure 9. Exemples de chromatogrammes obtenus lors du dosage de l'évérolimus dans les PBMC après extraction d'un plasma blanc (A) et du plasma d'un patient transplanté cardiaque traité par évérolimus .....	75
Figure 10. Principe de l'inhibition des phosphatases interférentes lors de la détermination de l'activité de la calcineurine .....	82
Figure 11. Exemple de chromatogramme obtenu par HPLC-UV lors de la détermination de l'activité de la calcineurine .....	83
Figure 12. Concentrations résiduelles d'évérolimus (ng/mL) mesurées chez les 59 patients de l'étude (n=775 points) .....	88
Figure 13. Répartition des clairances d'évérolimus en fonction des génotypes <i>CYP3A5</i> des patients inclus dans l'étude .....	91

Figure 14. Graphiques des concentrations prédites (PRED) en fonction des concentrations observées (DV), des concentrations individuelles prédites (IPRED) en fonction des concentrations observées (DV) et des résidus individuels pondérés (IWRES) en fonction du temps (TIME) .....	93
Figure 15. Résultat obtenu par la procédure du visual predictive check (VPC). Les lignes en pointillés représentent les 2,5 <sup>ème</sup> et 97,5 <sup>ème</sup> percentiles, la ligne continue le 50 <sup>ème</sup> percentile des concentrations prédites .....	95
Figure 16. Exemple de chromatogrammes d'évérolimus et d'étalon interne obtenus chez un patient transplanté cardiaque traité par 0,75 mg d'évérolimus matin et soir .....	102
Figure 17. Concentrations en évérolimus dans les PBMC en fonction des concentrations sanguines en évérolimus chez 36 patients transplantés cardiaques à l'équilibre de leur traitement .....	103
Figure 18. Concentration en tacrolimus dans les PBMC en fonction du dosage de tacrolimus chez 24 patients transplantés cardiaques .....	110
Figure 19. Concentration en tacrolimus dans les PBMC en fonction des concentrations sanguines en tacrolimus chez 24 patients transplantés cardiaques .....	111
Figure 20. Concentrations sanguines moyennes en tacrolimus à J1 (losanges) et J7 (carrés) post-transplantation chez les 10 patients de l'étude. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ standard error of the mean (SEM) .....	117
Figure 21. Concentrations intracellulaires moyennes en tacrolimus à J1 (losanges) et J7 (carrés) post-transplantation chez les 10 patients de l'étude. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ standard error of the mean (SEM) .....	119

Figure 22. Activité moyenne de la calcineurine chez les patients de l'étude à J1 (losanges) et J7 (carrés). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  standard error of the mean (SEM)

.....120

## Liste des tableaux

Tableau 1. Paramètres pharmacocinétiques rapportés chez le volontaire sain .....	30
Tableau 2. Paramètres pharmacocinétiques de l'évérolimus chez le transplanté rénal .....	38
Tableau 3. Zones thérapeutiques recommandées pour les C <sub>2</sub> en transplantation rénale ....	43
Tableau 4. Zones thérapeutiques recommandées pour les C <sub>2</sub> en transplantation hépatique .....	43
Tableau 5. Cmin de ciclosporine recommandées en fonction du type de transplantation et du délai post-transplantation .....	44
Tableau 6. Cmin de tacrolimus recommandées selon le type de protocole d'immunosuppression en transplantation rénale .....	46
Tableau 7. Données démographiques, biologiques et thérapeutiques des 59 patients inclus dans l'étude .....	87
Tableau 8. Résumé des effets significatifs des covariables testées sur la clairance apparente de l'évérolimus .....	92
Tableau 9. Paramètres pharmacocinétiques de l'évérolimus obtenus chez 59 transplantés cardiaques et par la méthode du bootstrap .....	94
Tableau 10. Critères de validation de la méthode de dosage de l'évérolimus dans les PBMC .....	99
Tableau 11. Caractéristiques démographiques, biologiques et de traitement des 24 patients transplantés cardiaques au moment de leur inclusion dans l'étude .....	109

Tableau 12. Caractéristiques démographiques des 10 patients transplantés hépatiques inclus dans l'étude (moyenne $\pm$ écart-type) .....	115
Tableau 13. Paramètres biologiques à J1 et J7 de leur traitement par tacrolimus des patients inclus (moyenne $\pm$ écart-type) .....	115
Tableau 14. Paramètres pharmacocinétiques des patients inclus dans l'étude à J1 et J7 de l'initiation du traitement par tacrolimus (moyenne $\pm$ écart-type) .....	118
Tableau 15. Concentrations dans les PBMC ou les lymphocytes rapportées dans la littérature de 2003 à 2013 .....	139

## Liste des abréviations

ABCB1 : Protéine ABCB1 ou p-glycoprotéine

ADE : Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion

Akt : Protéine kinase B

AP-1 : Activating Protein 1

ALAT : Alanine aminotransférase

ALP : Phosphatase alcaline

ASAT : Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine triphosphate

AUC : Aire sous la courbe des concentrations

AUC<sub>0-4</sub>: Aire sous la courbe des concentrations entre 0 et 4h

AUC<sub>0-12</sub> : Aire sous la courbe des concentrations entre 0 et 12h

AUC<sub>0-12CNA</sub> : Aire sous la courbe de l'activité de la calcineurine entre 0 et 12h

BW : Poids

C<sub>2</sub> : Concentration mesurée deux heures après administration

cAMP : Protéine kinase adénosine monophosphate cyclique

CaN : Calcineurine

CL/F : clairance apparente

C<sub>max</sub> : Concentration maximale

C<sub>min</sub> : Concentration résiduelle

CYP2C8 : Cytochrome P450 2C8

CYP3A4 : Cytochrome P450 3A4

CYP3A5 : Cytochrome P450 3A5



CV : Coefficient de variation

DV : Concentrations observées

EC<sub>50</sub> : Concentration sanguine en tacrolimus diminuant de 50% l'effet pharmacologique

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétatique

EGTA : Acide éthylène glycol tétraacétique

eV : Electrovolt

FDA : Food and drug administration

FKBP-12 : FK binding protein 12

FPIA : Immunoassay avec détection par polarisation de fluorescence

HDL : Lipoprotéines de haute densité

HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HLA : Human Antigen Leucocyte

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

HPLC-UV : Chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection par ultraviolet

IATDMCT : Association internationale de suivi thérapeutique pharmacologique

ICH : International conference on harmonisation

IL-2 : Interleukine-2

IMC : Indice de masse corporelle

IPRED : Concentrations individuelles prédites

IS : Immunosuppresseur

IWRES : Résidus individuels pondérés

Ka : Constante d'absorption

KV : Kilovolt

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

MDRD : Modification of diet in renal disease

MELD : Model for end-stage liver disease

MRM : Multiple reaction monitoring

m-TOR : Mammalian target of rapamycin

NFAT : Nuclear factor of activated T-cell

NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor kappa B

NONMEM : Non linear mixed effects models

PBMC : Cellules mononuclées ou peripheral blood mononuclear cells

PI 3-k : Phosphatidylinositol-kinase de type 3

PRED : Concentrations prédites

RPMI : Roswell park memorial institute medium

SEM : Standard error of the mean

SFPT : Société française de pharmacologie et thérapeutique

SGOT : Aspartate aminotransférase

SGPT : Alanine aminotransférase

SNP : Single nucleotide polymorphism ou polymorphisme nucléotidique

STP : Suivi thérapeutique pharmacologique

TGO : Aspartate aminotransférase

TGP : Alanine aminotransférase

Vd : Volume de distribution

VPC : Visual predictive check

## 1. Introduction

Thérapeutique de dernier recours lors de la dysfonction terminale d'un organe vital, la transplantation vise à restaurer la fonction de l'organe par transfert chez un receveur d'un organe prélevé chez un donneur. Les premières tentatives de greffes ont concerné des tissus à la fin du XIXème siècle. Les problèmes d'histocompatibilité entre donneurs et receveurs ayant été identifiés à la suite des travaux de Jean Dausset sur le complexe majeur d'histocompatibilité (Human Antigen Leucocytes (HLA)) et de ceux de Jean Hamburger sur la sélection des donneurs sur des critères d'histocompatibilité, on a cru la transplantation d'organe réservée aux seuls jumeaux monozygotes. La première transplantation rénale a ainsi été effectuée à Boston en 1954 entre vrais jumeaux.

C'est la découverte de la capacité de l'immunosuppression à protéger le receveur des réactions de rejet qui va révolutionner la transplantation d'organe. L'action des corticoïdes, de l'azathioprine, du méthotrexate et de l'irradiation du receveur dans la prévention du rejet de greffe permit en 1959 le succès des premières transplantations allogéniques de rein à Boston par Merrill et à Paris par Hamburger. La première greffe hépatique fut effectuée en 1963. La première greffe cardiaque fut réalisée par Barnard en Afrique du sud en 1967 et par Cabrol en Europe en 1968.

L'amélioration des propriétés immunosuppressives des molécules utilisées (essentiellement au travers de la découverte des propriétés de la ciclosporine en 1972 par le laboratoire Sandoz) entraîna une diminution importante de la fréquence du rejet de greffe à partir du début des années 1980. Depuis, de nouvelles molécules et procédures sont venues enrichir

l'arsenal thérapeutique autorisant les patients bénéficiant d'une transplantation à vivre une vie quasiment normale.

En France, plus de 5000 organes ont été greffés en 2012 dont plus de 3000 reins, 1161 foies (plus de 100 greffes de foie effectuées au CHU de Rennes), 394 cœurs (dont environ 80 greffés à la Pitié-Salpêtrière) (1).

Près de 12.000 patients sont inscrits sur les listes d'attente de greffe en 2013 et 400 à 500 patients décèdent chaque année sans avoir pu bénéficier d'une transplantation (1).

La transplantation d'organe demeure le traitement de dernier recours de la perte de fonction définitive du cœur, du foie, des poumons, des reins. L'implantation de ces organes transplantés va induire chez le receveur une réaction immunitaire, laquelle peut conduire au rejet de la greffe et à la perte du greffon. Afin de limiter cette réaction immunitaire, les patients bénéficiant d'une transplantation vont être traités par des médicaments immunosuppresseurs (IS) dont l'objectif est de limiter la réaction immunitaire de l'hôte contre le greffon. Ces médicaments appartiennent à plusieurs classes médicamenteuses : les corticoïdes, les inhibiteurs de calcineurine (CaN) (ciclosporine et tacrolimus), les inhibiteurs de la mammalian target of rapamycin (m-TOR) (sirolimus et éverolimus), les antimétabolites (acide mycophénolique et azathioprine) et les anticorps (immunoglobulines anti-lymphocytaires, basiliximab, bélatcept, rituximab et alemtuzumab). Les indications de ces médicaments sont la prévention du rejet de greffe soit dans sa phase aiguë (induction) soit à distance de la période opératoire. Ils vont agir à différents niveaux cellulaires afin d'empêcher le déroulement des réactions immunitaires non-souhaitées (présentation de l'antigène, activation et prolifération cellulaire, migration et infiltration tissulaires de lymphocytes activés).

Malheureusement, en dépit de leur efficacité, ces principes actifs ne sont pas dénués de toxicité. Il convient donc, lors de leur emploi, d'assurer leur efficacité tout en minimisant le risque de toxicité inhérent à leur utilisation. Le suivi thérapeutique pharmacologique des concentrations sanguines d'IS, et en particulier pour les inhibiteurs de CaN, les inhibiteurs de m-TOR et les antimétabolites, a démontré son utilité quant à l'atteinte de ces deux objectifs. Ainsi, le maintien des concentrations sanguines d'IS au delà d'une limite inférieure et en deçà d'une borne supérieure, définissant ainsi une zone thérapeutique, a permis de réduire significativement le rejet aigu de greffe. Néanmoins, **malgré l'utilisation intensive de ce suivi thérapeutique pharmacologique, la fréquence du rejet aigu a peu diminué au cours de ces dernières années et celui-ci peut survenir chez le patient alors même que ses concentrations sanguines sont en zone thérapeutique.** C'est pourquoi la recherche d'améliorations de ce suivi thérapeutique ainsi que la recherche de nouveaux moyens de monitoring sont des axes pertinents d'investigation en pharmacologie des IS.

**La modélisation des concentrations sanguines** d'IS comme la pharmacogénétique des protéines de transport et de métabolisme des IS devraient permettre une individualisation des posologies des médicaments anti-rejet. Ces approches autorisent également l'atteinte plus rapide des objectifs thérapeutiques de concentrations sanguines.

Les IS ayant pour cible des structures protéiques internes aux cellules (et notamment aux lymphocytes), **la concentration intracellulaire** en IS et/ou **l'activité des protéines cibles** pourraient être des biomarqueurs plus pertinents que la simple mesure de la concentration sanguine dans le cadre de la prévention du rejet de greffe.

**L'objectif de ce travail est de proposer une optimisation de l'utilisation des IS à l'aide de méthodes pharmacologiques en développant de nouveaux outils : modèle pharmacocinétique permettant une meilleure prédiction des concentrations sanguines**

**des IS, dosage intracellulaire des IS et détermination de l'activité des cibles protéiques des IS.**

Au delà de son impact en pratique courante, ce travail doit permettre d'améliorer les connaissances des relations entre concentrations sanguines des IS - concentration intracellulaire et effet sur la protéine cible.

## 2. Généralités

### 2.1 Thérapeutiques immunosuppressives et Pharmacologie

La prévention du rejet de greffe repose sur l'utilisation d'associations IS appartenant à des classes thérapeutiques différentes : inhibiteurs de calcineurine (ciclosporine (Sandimmun©, Neoral©), tacrolimus (Prograf©, Advagraf©, Modigraf©)), inhibiteur de m-TOR (sirolimus (Rapamune©), éverolimus (Certican©)), antimétabolites (acide mycophénolique (Cellcept©, Myfortic©), azathioprine (Imurel©)), corticoïdes et anticorps (immunoglobulines de lapin (Thymoglobuline©), immunoglobulines de cheval (Lymphoglobuline©), basiliximab (Simulect©), rituximab (Mabthera©). L'objectif du traitement est de diminuer la réaction immunitaire liée à la transplantation d'un organe exogène à l'organisme tout en limitant les effets indésirables liés d'une part, à la toxicité des traitements et, d'autre part, à l'immunodépression générée.

Le traitement comporte deux périodes : une période d'induction et une période d'entretien. L'objectif du traitement d'induction, faisant appel principalement aux anticorps, est double. Il vise à diminuer le risque de rejet aigu durant la période initiale post-opératoire par déplétion lymphocytaire et à permettre de retarder l'introduction du traitement d'entretien. Le traitement d'entretien vise également à diminuer le risque de rejet de greffe à court terme mais aussi à moyen et long terme. Les effets indésirables liés aux traitements IS peuvent être à la fois le fait d'une immunosuppression excessive avec développement de pathologies infectieuses voire de néoplasies et de la toxicité intrinsèque des molécules avec

principalement une néphrotoxicité importante mais également d'autres effets indésirables (neurotoxicité, diabète, gastralgie, hyperlipidémie...).

L'immunosuppression, importante initialement, va être progressivement diminuée afin que les effets bénéfiques des traitements restent supérieurs aux risques.

Le présent travail étant essentiellement centré sur les inhibiteurs de calcineurine et les inhibiteurs de m-TOR, nous développerons exclusivement la pharmacologie de ces deux classes médicamenteuses.

### **2.1.1 Inhibiteurs de Calcineurine**

La ciclosporine et le tacrolimus sont des IS de la classe des inhibiteurs de calcineurine. Ces molécules vont, à l'intérieur du lymphocyte, se lier à des immunophilines, la cyclophiline pour la ciclosporine et le FK-binding protein 12 (FKBP-12) pour le tacrolimus (2). Les complexes ainsi formés vont se lier secondairement au calcium et à la calcineurine, une sérine-thréonine phosphatase, qui déphosphoryle des facteurs de croissance et notamment le Nuclear factor of Activated T-cell (NFAT) (3). L'activité de la calcineurine et la translocation du NFAT vers le noyau se trouvent ainsi inhibées. Parallèlement, l'effet d'autres facteurs de croissance partiellement dépendants de la calcineurine, le Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) et l'Activating Protein 1 (AP-1), se trouvent également inhibés. L'inhibition de ces facteurs de croissance entraîne une diminution de la sécrétion de cytokines et principalement de l'interleukine-2 (IL-2). La diminution de cette sécrétion va bloquer la prolifération cellulaire des lymphocytes et ainsi diminuer la réaction immunitaire (2).



### 2.1.1.1 Ciclosporine

La ciclosporine A est un décapeptide cyclique isolé à partir d'un champignon (*Trichoderma polysporum* ou *Tolyocladium inflatum gams*) en 1970, indiqué dans la greffe d'organe et de tissus ainsi que dans la greffe de cellules souches. Elle peut être indiquée dans le cadre de la transplantation rénale, hépatique, cardiaque, pulmonaire et pancréatique à la phase d'induction et d'entretien du traitement (Figure 1) (4,5).

Les posologies sont adaptées en fonction des concentrations sanguines mesurées lors du suivi thérapeutique pharmacologique recommandé au cours d'un traitement par ciclosporine (6).

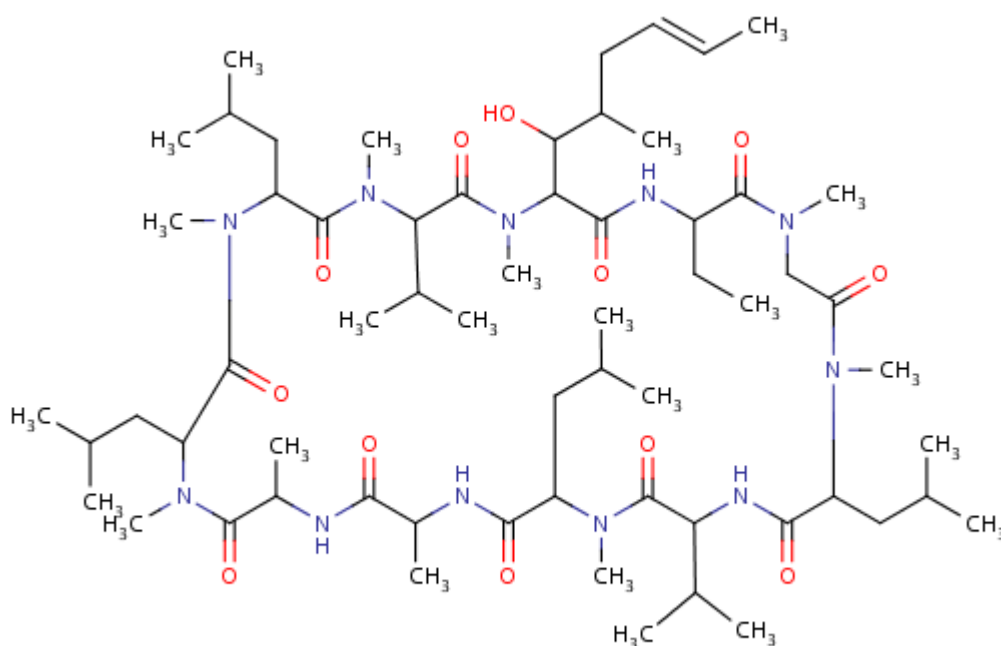


Figure 1. Structure chimique de la ciclosporine d'après (7).

## **A. Pharmacocinétique**

### **Absorption**

La ciclosporine est absorbée de manière incomplète dans la partie haute de l'intestin (duodénum et jéjunum). La concentration maximale (C<sub>max</sub>) est obtenue entre 1 et 6 heures avec la spécialité Sandimmun® (moyenne 3,5 heures) et plus rapidement avec la spécialité microémulsionnée Néoral® (1,5 à 2 heures) (4,5). L'absorption est extrêmement variable d'un individu à un autre et la biodisponibilité est rapportée pour le Sandimmun® comme pouvant aller de 5 à 89% (8). La spécialité Neoral® présente une biodisponibilité plus importante que la spécialité Sandimmun® de 20 à 50% (4).

La ciclosporine est substrat de la P-glycoprotéine ou protéine ABCB1 codée par le gène *ABCB1* (9). Cette protéine est ubiquitaire mais son expression est importante au niveau de l'épithélium digestif. Il s'agit d'une protéine d'efflux qui va donc limiter l'absorption de la ciclosporine et pourrait également influencer sur sa distribution et son élimination. ABCB1 est le jeu d'un polymorphisme de son expression et/ou de son activité laquelle contribue encore à la variabilité de la pharmacocinétique de la ciclosporine (9). La ciclosporine est également un substrat du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) formant au niveau de l'intestin une barrière coopérative avec ABCB1 (10). Un polymorphisme du gène *CYP3A4* codant pour la protéine CYP3A4, le *CYP3A4\*22*, présent avec une fréquence de 5 à 7% dans la population caucasienne, a récemment été identifié comme influençant la pharmacocinétique de la ciclosporine (10).

De nombreux travaux ont également mis en avant le rôle du cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) dans le métabolisme de la ciclosporine. Le polymorphisme du gène de ce cytochrome est à l'origine d'une importante variabilité de la pharmacocinétique de la ciclosporine (11).

La C<sub>max</sub> et l'aire sous la courbe (AUC) de la ciclosporine augmentent avec la dose administrée de façon curvilinéaire entre 0 et 1400 mg avec la spécialité Sandimmun®. L'administration de la spécialité Neoral® avec l'alimentation entraîne une diminution de la C<sub>max</sub> et de l'AUC (4).

### **Distribution**

Le volume de distribution de la ciclosporine est de l'ordre de 3 à 5 L/kg chez le transplanté d'organe témoignant du caractère lipophile de la molécule (4). La ciclosporine se distribue dans les érythrocytes (41 à 58%), le plasma (33 à 47%), les granulocytes (5 à 12%), les lymphocytes (4 à 9%). Dans le plasma, la ciclosporine est liée aux protéines plasmatiques à hauteur de 90% en particulier aux lipoprotéines de haute densité (HDL) (5).

### **Métabolisme**

La ciclosporine est métabolisée de manière quasi-exclusive par le cytochrome P450 dans le foie et à un niveau beaucoup moins important dans le tractus gastro-intestinal et les reins. Au moins 25 métabolites ont été identifiés. Ces métabolites ne sont que faiblement responsables de l'activité de la molécule et de sa toxicité. Les métabolites majeurs sont les métabolites oxydés (M1 et M9) ainsi que le métabolite N-déméthylé (M4N). Les AUC des métabolites représentent respectivement 70%, 21% et 7,5% de l'AUC de la ciclosporine (12).

Les isoformes 3A4 et 3A5 du cytochrome P450 sont les enzymes majeurs du métabolisme et influencent de manière significative la pharmacocinétique de la ciclosporine. La clairance intrinsèque de la ciclosporine par la voie du CYP3A4 est 2,3 fois supérieure à la clairance par la voie du CYP3A5 (12). Seuls 10 à 30% des patients caucasiens expriment le CYP3A5 et vont donc métaboliser de manière plus importante la ciclosporine. Le polymorphisme de ces enzymes ainsi qu'un grand nombre de facteurs endogènes ou environnementaux peuvent également induire ou inhiber le métabolisme de la ciclosporine (alimentation, comédication, protéinémie, hématoците...).

### **Elimination**

La principale voie d'élimination de la ciclosporine est la voie biliaire sous forme de métabolites. Seuls 6% de la fraction administrée par voie orale sont éliminés par voie rénale dont seulement 0,1% sous forme inchangée. L'élimination (distribution plus élimination) de la ciclosporine est bi-phasique avec une demi-vie alpha de 2h et une demi-vie terminale de 8h (5-18h) pour la spécialité Neoral® et de 19h (10-27h) pour la spécialité Sandimmun®. La concentration à l'équilibre sera donc atteinte en 2 à 4 jours (4,5).

Ni la dialyse, ni l'altération de la fonction rénale n'influencent l'élimination de la ciclosporine (4).

## **B. Effets indésirables**

L'effet indésirable principal et le plus limitant de l'utilisation de la ciclosporine est la néphrotoxicité inhérente au traitement (4,5). Celle-ci peut revêtir deux formes : une forme aiguë, réversible et concentration-dépendante et une forme chronique avec fibrose interstitielle. Parmi les autres effets indésirables, l'hypertension artérielle, l'hypertrophie gingivale, l'hypertrichose, l'hypomagnésémie, les troubles digestifs, l'élévation des enzymes hépatiques et la neurotoxicité (tremblement des extrémités, paresthésies) sont fréquents (4,5). Plus rarement sont rapportés : des troubles neurologiques centraux et des neuropathies périphériques, des alopécies, des acnés, des algies polyarticulaires, des troubles hématologiques... (4,5)

### **2.1.1.2. Tacrolimus**

Le tacrolimus ou FK506 est une molécule cyclique de la famille des macrolides issue d'un microorganisme : *Streptomyces tsukubaensis* (Figure 2). Il est indiqué dans la prévention du rejet de greffe cardiaque, rénal et hépatique. Le tacrolimus peut également être utilisé dans le traitement de la prévention du rejet de l'allogreffe résistant à un autre traitement immunosuppresseur. La posologie recommandée est différente selon le type de transplantation : 0,1 à 0,15 mg/kg/j en transplantation hépatique; 0,1 à 0,2 mg/kg/j en transplantation rénale et 0,075 mg/kg/j en transplantation cardiaque (13). L'adaptation de la posologie doit ensuite se faire en fonction des résultats du suivi thérapeutique pharmacologique des concentrations sanguines en tacrolimus. Les posologies peuvent

également être adaptées *a priori* selon le génotype du patient pour le *CYP3A5*. Cette adaptation de posologie permet d'atteindre la zone thérapeutique plus rapidement que l'adaptation de posologie effectuée en fonction des seules concentrations sanguines en tacrolimus (14).

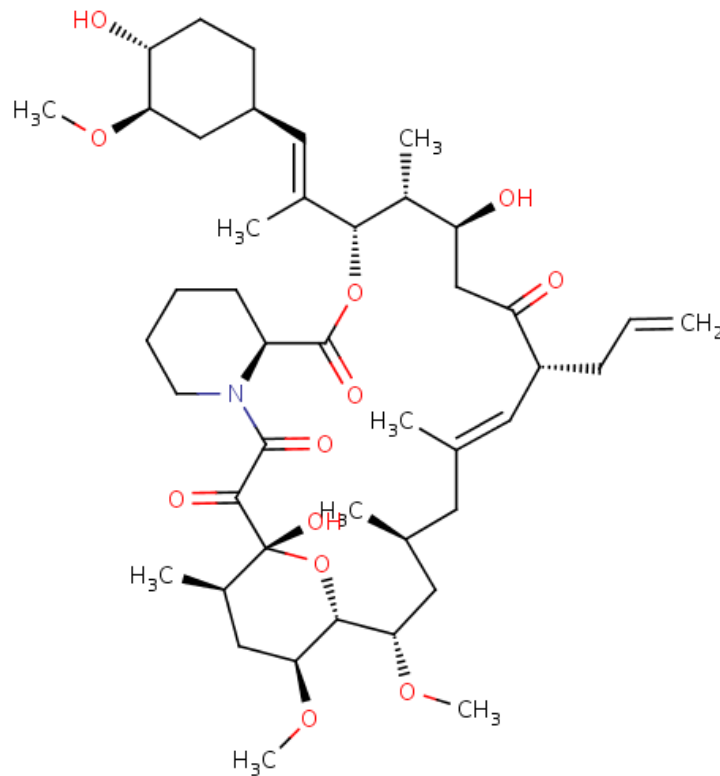


Figure 2. Structure chimique du tacrolimus d'après (15).

## A. Pharmacocinétique

### Absorption

L'absorption du tacrolimus par voie orale est généralement faible, de l'ordre de 25%, mais peut varier dans une proportion considérable (16,17). La biodisponibilité est réduite par

l'alimentation. La faible hydrosolubilité de la molécule ainsi que les altérations de la motilité digestive rapportées chez les patients transplantés pourraient être à l'origine de l'absorption erratique du tacrolimus (16). L'effet de premier passage lié au cytochrome P450 3A ainsi que l'action d'ABCB1 pourraient également limiter l'absorption de la molécule, le tacrolimus étant substrat à la fois du CYP3A4 et de la protéine ABCB1 (16,18). La concentration sanguine maximale en tacrolimus est généralement atteinte en 0,5 à 1h (16). Chez le volontaire sain, la pharmacocinétique du tacrolimus est linéaire (13).

### **Distribution**

Dans le sang, le tacrolimus se répartit essentiellement dans les érythrocytes. La liaison aux érythrocytes est concentration-dépendante avec un rapport sang/plasma plus faible à forte concentration (16). Les concentrations en tacrolimus mesurées dans le sang total sont en moyenne 15 fois supérieures aux concentrations mesurées dans le plasma (16). Le tacrolimus est très fortement lié aux protéines plasmatiques (>99,9%) principalement à l' $\alpha$ 1-glycoprotéine acide, les lipoprotéines et l'albumine (16). La C<sub>max</sub> atteinte chez le volontaire sain après une administration de 5mg est de  $29,7 \pm 7,2$  ng/mL. Chez le transplanté rénal, une administration per os de 0,02 mg/kg/j ou de 0,03 mg/kg entraine respectivement une C<sub>max</sub> de  $19,2 \pm 10,3$  ng/mL et de  $24,2 \pm 15,8$  ng/mL. Chez le transplanté hépatique, une dose orale de 0,03 mg/kg/j entraine une C<sub>max</sub> de  $68,5 \pm 30,0$  ng/mL et chez le transplanté cardiaque des doses orales de 0,075 mg/kg/j et de 0,15 mg/kg/j entraînent respectivement des C<sub>max</sub> de  $14,7 \pm 7,8$  ng/mL et  $24,5 \pm 13,7$  ng/mL (13). Le tacrolimus diffuse largement dans les tissus y compris dans le placenta et le lait maternel (19).

Les données de pharmacocinétiques obtenues dans les essais de phase I chez le volontaire sain pour le tacrolimus à libération immédiate et le tacrolimus à libération modifiée sont rapportés dans le tableau 1 (20).

Tableau 1. Paramètres pharmacocinétiques rapportés chez le volontaire sain d'après (20).

Type of study	Drug	$t_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)	$AUC_{\infty}$ (ng • h/mL)
<b>Single-dose crossover study</b>				
Prograf® 1.5 mg vs Advagraf® 1.5 mg	Prograf®	1.4	7.4	74.3
	Advagraf®	3.0	2.3	65.6
Prograf® 5.0 mg vs Advagraf® 5.0 mg	Prograf®	2.0	26.7	297.0
	Advagraf®	2.0	9.2	198.0
<b>Multiple-dose crossover study</b>				
Prograf® 1.0 mg bid vs Advagraf® 2.0 mg od	Prograf®	1.0	6.1	70.7
	Advagraf®	2.0	5.8	83.7
Prograf® 2.0 mg bid vs Advagraf® 4.0 mg od	Prograf®	1.0	14.9	160
	Advagraf®	2.0	11.1	148

## Métabolisme

Le tacrolimus est métabolisé de manière intense dans le foie et l'intestin par les enzymes du système P450 du cytochrome et moins de 0,5% du tacrolimus est retrouvé sous forme inchangée dans les urines et les feces (21). Ainsi, l'insuffisance hépatocellulaire induit une diminution de la clairance hépatique du médicament et une accumulation systémique du tacrolimus (17).

Le CYP3A5 joue un rôle encore prépondérant comparativement au CYP3A4 dans le métabolisme du tacrolimus. De nombreuses études ont montré que le génotype du CYP3A5 influençait fortement le métabolisme. Ainsi, les rapports concentration sur dose ou AUC sur dose sont beaucoup plus faibles chez les patients exprimant le CYP3A5 (CYP3A5\*1) que chez



les patients n'expriment pas le CYP3A5 (CYP3A5\*3) (22,23). Plus de 15 métabolites pourraient exister. Les métabolites les plus importants sont le M1, M2, M3 et M6 produits par le CYP3A4 (M1, M2, M3) et le CYP3A5 (M1, M2, M3 et M6) (24,25). Un grand nombre de facteurs environnementaux et endogènes influencent le métabolisme et contribuent à la variabilité de la pharmacocinétique chez le patient (comédications, âge, fonction hépatique...) (17).

### **Elimination**

Le tacrolimus est majoritairement éliminé par voie biliaire sous forme de métabolites. La clairance rapportée chez 16 volontaires sains est de  $0,041 \pm 0,008$  L/h.kg après une dose de 5 mg per os; de  $0,083 \pm 0,050$  L/h.kg chez 26 transplantés rénaux traités par 0,02 mg/kg/12h administrés par voie intraveineuse; de  $0,053 \pm 0,017$  L/h.kg chez 17 transplantés hépatiques ayant reçu 0,05 mg/kg/12h par perfusion intraveineuse et de  $0,051 \pm 0,015$  L/h.kg chez 11 transplantés cardiaques traités par 0,01 mg/kg/j en perfusion continue (13).

### ***B. Effets indésirables***

Comme la ciclosporine, le tacrolimus présente une toxicité rénale liée à son utilisation. Les autres principaux effets indésirables sont l'apparition d'une neurotoxicité, d'un diabète iatrogène, de troubles gastro-intestinaux, d'infections. Ces effets sont plus fréquemment présents à fortes concentrations (17). Le tacrolimus peut également être à l'origine d'une hypertension artérielle.

Les effets neurotoxiques sévères semblent être plus fréquents chez le transplanté hépatique et notamment le patient transplanté pour une hépatite virale B ou C (17).

### **2.1.2 Inhibiteurs de la mammalian target of rapamycine (m-TOR)**

Le sirolimus et l'évérolimus sont les deux molécules de la classe des inhibiteurs de m-TOR utilisées dans la prévention du rejet de transplantation solide. Les inhibiteurs de m-TOR inhibent la prolifération cellulaire en bloquant la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à S. Cette inhibition est médiée par la formation d'un complexe entre la molécule et le FKBP-12, comme le tacrolimus. Le complexe ainsi formé inhibe la protéine kinase m-TOR qui provoque un arrêt du cycle cellulaire à la phase G1 via la phosphatidylinositol-kinase de type 3 (PI 3-k) et la protéine kinase B (Akt) (26). Cette inhibition de la prolifération cellulaire entraîne une diminution de la prolifération lymphocytaire par blocage de la synthèse de nucléotides et ainsi de la prolifération des cellules B et T activées par l'interleukine-2. Bien que partageant la même cible cellulaire que le tacrolimus (FKBP-12), les inhibiteurs de m-TOR peuvent être associés à cette molécule avec un maintien de la synergie d'effet immunosuppresseur (27). Les inhibiteurs de m-TOR sont généralement associés aux inhibiteurs de la calcineurine afin de permettre une diminution des concentrations et par conséquent de la toxicité rénale de ces derniers. Les traitements par inhibiteurs de m-TOR permettent également parfois d'éliminer complètement les inhibiteurs de calcineurine soit précocément (de un à trois mois) soit même *de novo*. Il semble néanmoins que de telles approches thérapeutiques ne puissent être appliquées qu'à certains patients à faible risque immunologique et au prix d'une augmentation de la fréquence de rejet.

### 2.1.2.1 Sirolimus

Le sirolimus est une molécule de la famille des macrolides isolée à partir d'un champignon, *Streptomyces hygroscopicus* (Figure 3) (28). Baptisé initialement rapamycine, le sirolimus a été découvert sur l'île de Pâques (Rapa nui) et était, à l'origine, utilisé pour ses propriétés antifongiques dans les années 70 avant que ses propriétés immunosuppressives ne soient découvertes en 1988 (28).

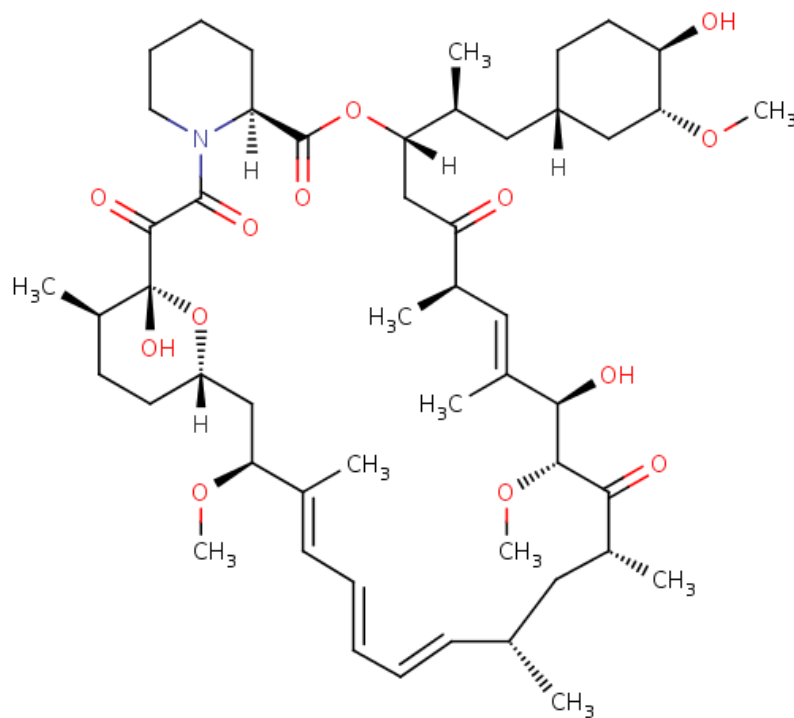


Figure 3. Structure chimique du sirolimus d'après (29).

## **A. Pharmacocinétique**

### **Absorption**

La biodisponibilité du sirolimus est faible, allant de 14% en moyenne pour la solution buvable à 27% en moyenne pour les comprimés enrobés (30). La Cmax est atteinte en 0,5 à 3h (31). L'alimentation augmente l'absorption du sirolimus avec une AUC plus élevée de 35% lorsque le médicament est pris au cours d'un repas (32).

### **Distribution**

Dans le sang, le sirolimus se répartit essentiellement dans les érythrocytes (31). Le volume de distribution du sirolimus est élevé en raison de son importante lipophilie. Selon les études, le volume de distribution rapporté est de 5,6 à 16,7 L/kg (31).

### **Métabolisme**

Le métabolisme du sirolimus prend place essentiellement dans l'intestin et dans le foie via le cytochrome P450 3A4 et dans une moindre mesure, le cytochrome P450 3A5 (31,33). Les deux principales voies de métabolisme sont la voie de la O-déméthylation et la voie d'hydroxylation (31,34). Ces métabolites représentent moins de 10% de l'activité immunosuppressive de la molécule (31).

## **Elimination**

L'élimination du sirolimus s'effectue par voie biliaire à plus de 90% et seuls 2% sont retrouvés sous forme inchangée dans les urines (31).

## ***B. Effets indésirables***

Les effets indésirables rapportés lors de l'utilisation du sirolimus sont essentiellement des effets de classe et sont donc communs à l'évérolimus. Un risque de thrombose de l'artère hépatique, de perte du greffon et de décès des patients transplantés hépatiques a limité son indication à la transplantation rénale (35). Une hyperlipidémie concentration-dépendante est fréquemment rapportée laquelle entraîne un sur-risque cardiovasculaire pour le patient (36,37). La molécule provoque également une toxicité hématologique avec des thrombocytopénies d'apparition précoce en cours de traitement, disparaissant rapidement, et des anémies et leucopénies d'apparition plus tardive et pouvant persister (38). Ces anémies répondent peu à la supplémentation en fer et sont également fréquemment résistantes à l'érythropoïétine. Elles peuvent nécessiter un changement de thérapie pour du mycophénolate sodique (39). Rarement (1 à 3% des cas), des pneumopathies interstitielles ont été décrites. Cet effet indésirable grave nécessite la suspension du traitement.

Parmi les autres effets indésirables décrits, les infections, les protéinuries, les œdèmes périphériques et les aphtoses (attribuées à la réactivation d'infection à Herpes) prédominent (35).

### 2.1.2.2 Everolimus

L'évérolimus est, comme le sirolimus, un macrolide qui présente un effet antiprolifératif et immunosuppresseur très important. La molécule présente néanmoins des caractéristiques de stabilité, de solubilité ainsi qu'un profil pharmacocinétique plus favorable que le sirolimus (Figure 4) (26). L'évérolimus a été autorisé en Europe en 2003 dans le cadre de la prévention du rejet de greffe rénale, cardiaque et hépatique en association avec la ciclosporine ou le tacrolimus et des corticoïdes.

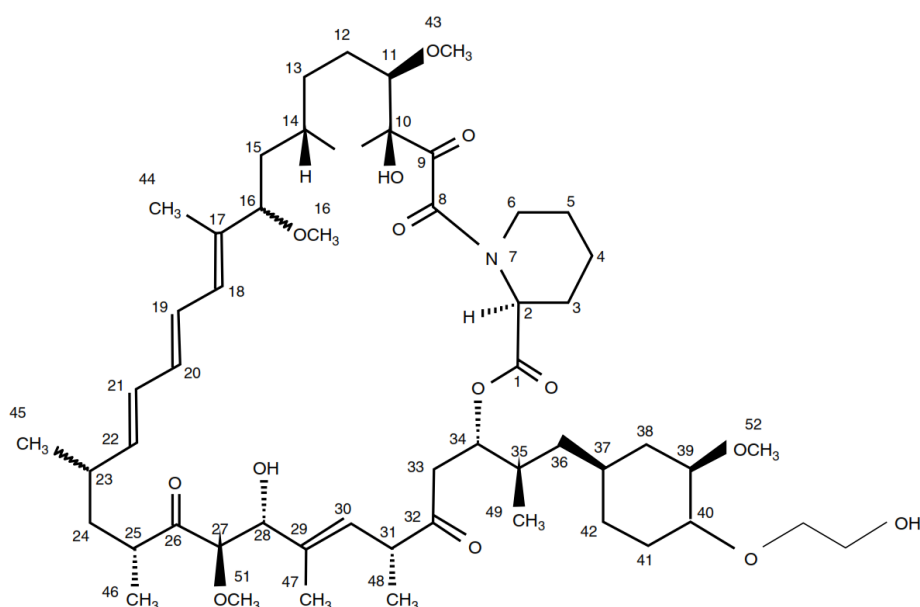


Figure 4. Structure chimique de l'évérolimus d'après Kirchner *et al.* (26).

La posologie doit être adaptée en fonction du suivi thérapeutique pharmacologique des concentrations sanguines (40).

## **A. Pharmacocinétique**

### **Absorption**

L'évérolimus présente une biodisponibilité faible, de l'ordre de 16%, et la concentration maximale est obtenue chez le volontaire sain ou le transplanté 0,5 à 2,5 heures en moyenne après la prise orale (26,41). Cette biodisponibilité est réduite par l'alimentation : la Cmax et l'AUC sont respectivement réduites de 60% et 16% lors de l'administration avec un repas gras. L'évérolimus est également un substrat d'ABCB1 qui peut limiter l'absorption de la molécule au niveau de la barrière intestinale (42). Néanmoins, dans les études menées chez le patient transplanté, l'évérolimus présente une pharmacocinétique linéaire après administration de doses allant de 0,25 à 25 mg (26).

### **Distribution**

Aux concentrations thérapeutiques, plus de 75% de l'évérolimus diffuse dans les globules rouges, ce qui justifie un suivi thérapeutique pharmacologique dans le sang total. Dans le plasma, la molécule est très liée aux protéines plasmatiques (26). L'état d'équilibre est généralement atteint en 7 jours avec un facteur 3 d'accumulation comparativement aux valeurs obtenues après la première dose. La concentration sanguine minimale mesurée à l'équilibre présente une bonne corrélation avec l'AUC ( $R^2=0,88$ ). La variabilité inter-individuelle est élevée (avec un coefficient de variation de l'AUC rapporté de 85,4%) ainsi que la variabilité intra-individuelle (coefficient de variation de l'AUC de 40,8%) (43). La concentration sanguine maximale moyenne après une administration d'une dose unique de

4 mg chez le volontaire sain est de  $44,2 \pm 13,3$  ng/mL et l'AUC moyenne de  $219 \pm 69$  ng.h/mL (44). Chez le transplanté rénal, les concentrations minimales moyennes rapportées à l'équilibre après des doses de 0,5 mg, 1 mg et 2 mg deux fois par jour sont respectivement de  $1,5 \pm 1,8$  ng/mL,  $4,7 \pm 2,6$  ng/mL et  $9,5 \pm 5,2$  ng/mL; les C<sub>max</sub> moyennes de respectivement  $5,0 \pm 2,9$  ng/mL,  $11,6 \pm 4,4$  ng/mL et  $21,9 \pm 10,5$  ng/mL et les AUC moyennes de respectivement  $34 \pm 23$  ng.h/mL,  $81 \pm 34$  ng.h/mL et  $164 \pm 78$  ng.h/mL (Tableau 2). Les concentrations ou les AUC rapportées à la dose administrée sont, pour leur part, très proches confirmant le caractère linéaire de la cinétique de la molécule (26,43).

Tableau 2. Paramètres pharmacocinétiques de l'évérolimus chez le transplanté rénal d'après Kirchner et al (26).

Parameter and unit	0.5mg	1mg	2mg
C <sub>min</sub> (µg/L)	$1.5 \pm 1.8$	$4.7 \pm 2.6$	$9.5 \pm 5.2$
t <sub>max</sub> (h)	2 (1–5)	2 (1–5)	2 (1–8)
C <sub>max</sub> (µg/L)	$5.0 \pm 2.9$	$11.6 \pm 4.4$	$21.9 \pm 10.5$
Dose-normalised C <sub>max</sub> (µg/L/mg)	$10.0 \pm 5.8$	$11.6 \pm 4.4$	$11.0 \pm 5.3$
AUC (µg • h/L)	$34 \pm 23$	$81 \pm 34$	$164 \pm 78$
Dose-normalised AUC (µg • h/L • mg)	$68 \pm 46$	$81 \pm 34$	$82 \pm 39$

**AUC** = area under the concentration-time curve; **C<sub>max</sub>** = maximum blood concentration; **C<sub>min</sub>** = trough blood concentration; **t<sub>max</sub>** = time to C<sub>max</sub>.



## **Métabolisme**

Le métabolisme de l'évérolimus est majoritairement hépatique, et également intestinal. La molécule est métabolisée au niveau hépatique principalement par le cytochrome 2C8 (CYP2C8) puis par le CYP3A4 et dans une moindre mesure par le CYP3A5 (45). Ainsi, il existe quatre métabolites : l'hydroxy-évéroliumus, le dihydroxy-everolimus, le démethyl-everolimus et le métabolite à cycle ouvert. L'hydroxy-everolimus est le métabolite le plus important avec une AUC équivalente à la moitié de l'AUC de la molécule mère (26). L'inhibition et l'induction du système enzymatique du cytochrome P450 par d'autres médicaments pourrait donc influencer sur la pharmacocinétique de l'évérolimus. Des interactions médicamenteuses ont d'ailleurs été rapportées avec des inhibiteurs comme la ciclosporine ou des inducteurs comme la rifampicine (44,46). Néanmoins, plusieurs modèles pharmacocinétiques développés par approche de population n'ont pas mis en évidence d'influence du génotype du CYP3A5 sur la pharmacocinétique de l'évérolimus chez le transplanté rénal et cardiaque, confirmant ainsi le rôle mineur de ce cytochrome dans le métabolisme de la molécule (25,26).

## **Elimination**

L'évérolimus est éliminé par voie biliaire à 98% sous forme de métabolites et moins de 2% du principe actif sont retrouvés dans l'urine sous forme inchangée (26). La demi-vie d'élimination est décrite comme variant de 18 à 35 heures (26). La clairance de l'évérolimus chez le volontaire sain a été calculée à  $19,7 \pm 5,4$  L/h après une dose unique.

## ***B. Effets indésirables***

La plupart des effets indésirables est commune avec le sirolimus. Les principaux effets indésirables rapportés de manière fréquente lors de l'utilisation de l'évérolimus sont une toxicité hématologique (dont des leucopénies très fréquentes), une hyperlipidémie, des troubles rénaux (notamment l'apparition fréquente d'une protéinurie et une exacerbation de la toxicité rénale des inhibiteurs de calcineurine, en particulier lorsque les deux classes sont associées précocement), une hypertension artérielle et des œdèmes, un retard à la cicatrisation. Les effets indésirables liés à l'immunosuppression générée par la molécule sont la survenue d'infections et de cancers avec une fréquence de 3,0% dans les essais contrôlés (3256 patients) dont 1,0% de cancers cutanés et 0,6% de lymphomes ou de syndromes lymphoprolifératifs (47).

## **2.2 Suivi thérapeutique pharmacologique des concentrations d'immunosuppresseurs**

Le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) des médicaments est la mesure de la quantité d'un analyte dans un milieu biologique dans le but d'interpréter la concentration mesurée, à l'aune des données disponibles en termes de relation concentration-effet et de concentrations attendues dans le milieu dans lequel l'analyte se trouve, afin de proposer une adaptation de la posologie du médicament permettant de maximiser l'efficacité et de minimiser la toxicité du traitement.

L'association internationale de suivi thérapeutique pharmacologique et de toxicologie clinique (IATDMCT) définit le STP comme étant : "une spécialité pluridisciplinaire visant à améliorer la prise en charge du patient en ajustant individuellement la dose de médicaments pour lesquels le bénéfice clinique du STP a été démontré dans la population générale ou dans une population particulière. Il repose sur des informations pharmacogénétiques, démographiques et cliniques a priori et/ou sur la mesure a posteriori des concentrations sanguines du médicament (suivi pharmacocinétique) ou de composés endogènes de substitution ou de paramètres biologiques d'effet (suivi pharmacodynamique) (48).

Tous les médicaments n'ont pas vocation à bénéficier de dosages et notamment de dosages sanguins. Pour que le STP présente un intérêt, il faut que le médicament candidat présente un certain nombre de caractéristiques :

- Le médicament ne doit pas présenter de relation entre dose et concentration. En d'autres termes, la concentration ne doit pas être aisément prédictible à l'aide de la seule dose administrée.

- Il doit exister une variabilité importante des concentrations du médicament pour une même dose administrée à plusieurs individus (variabilité inter-individuelle) voire au même individu lors d'occasions différentes (variabilité intra-individuelle).

- Il doit exister pour ce médicament une relation entre concentration et effet (que cela soit une relation entre concentration et efficacité ou entre concentration et toxicité).

- La marge thérapeutique du médicament, définissant la limite entre la concentration la plus basse pour laquelle un effet est obtenu et la concentration la plus élevée au delà de laquelle les effets indésirables augmentent de façon non souhaitable, doit être étroite.

Les marges thérapeutiques inférieure et supérieure définissent la zone thérapeutique, elle-même définie statistiquement à partir des essais de phase III selon une courbe gaussienne.

Les médicaments IS, eu égard à leurs propriétés pharmacologiques, sont d'excellents candidats au STP. Fait assez rare, le STP est dans tous les cas inscrit dans le résumé des caractéristiques des produits de la ciclosporine, du tacrolimus, du sirolimus et de l'évérolimus.

La méthodologie pour l'évaluation du niveau de preuve du STP a été définie par Le Guellec *et al.*, stratifiant le niveau de preuve du STP de "indispensable" à "éventuellement utile" voire "restant à évaluer" (49). La SFPT (Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique) a ainsi publié plusieurs articles de synthèse afin d'évaluer le niveau de preuve du STP des médicaments. Parmi les IS, seul l'évérolimus a bénéficié de cette synthèse et le niveau de preuve de son STP a été évalué comme étant "recommandé" (50).

### **2.2.1 Suivi thérapeutique pharmacologique de la ciclosporine**

Le STP de la ciclosporine chez le patient transplanté s'effectue généralement soit à partir de prélèvements sanguins obtenus juste avant une administration ( $C_{min}$ , concentration résiduelle ou vallée) ou obtenus deux heures après administration de ciclosporine ( $C_2$ ). Le calcul de l'AUC ou d'une "mini-AUC" étant une option complexe de STP en pratique, la mesure de la concentration sanguine en point unique est le plus souvent pratiqué. Par rapport à la  $C_{min}$ , la  $C_2$  est un meilleur reflet de l'AUC (que cela soit l'AUC de 0 à 12h ( $AUC_{0-12}$ ) ou l'AUC de 0 à 4h ( $AUC_{0-4}$ )) c'est à dire l'exposition au médicament. La corrélation entre

C<sub>2</sub> et AUC<sub>0-4</sub> est rapportée comme étant bien meilleure ( $r^2$  allant de 0,81 à 0,93) que celle entre C<sub>min</sub> et AUC<sub>0-4</sub> ( $r^2$  allant de 0,03 à 0,41) tous types de transplantation confondus (51). Le STP par mesure de la C<sub>2</sub> a démontré sa capacité à réduire le risque de rejet aigu chez le transplanté rénal et hépatique (52,53). Les zones thérapeutiques recommandées en termes de C<sub>2</sub> sont rapportées dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3. Zones thérapeutiques recommandées pour les C<sub>2</sub> en transplantation rénale d'après Levy *et al.* (51)

Months Posttransplant	Target level (µg/mL)
2	1.5
3	1.3
4-6	1.1
7-12	0.9
12+	0.8

Tableau 4. Zones thérapeutiques recommandées pour les C<sub>2</sub> en transplantation hépatique d'après Levy *et al.* (51)

Months Posttransplant	Target level (µg/mL)
0-6	1.0
6-12	0.8
>12	0.6

Néanmoins, la mesure de la  $C_2$ , si elle apparaît viable durant la période d'hospitalisation post-transplantation, est une approche complexe à mettre en œuvre en dehors de cette période. En effet, la mesure de la  $C_2$  doit être effectuée au maximum 15 minutes avant ou 15 minutes après l'heure théorique (54). Ce manque de flexibilité inhérent à ce type de STP le rend moins pertinent en pratique clinique. C'est pourquoi nombre d'équipes utilisent le suivi des concentrations sanguines résiduelles ( $C_{min}$ ) afin d'adapter les posologies en cours de traitement. Les concentrations recommandées dépendent du type de transplantation et du délai post-transplantation. Ces concentrations recommandées sont rapportées dans le tableau 5.

Tableau 5.  $C_{min}$  de ciclosporine recommandées en fonction du type de transplantation et du délai post-transplantation d'après Marquet *et al.* (6).

Type de greffe	Période précoce ( $\mu\text{g/L}$ )	Long terme ( $\mu\text{g/L}$ )
Cardiaque	250 – 350	120 – 200
Hépatique	250 – 350	100 – 200
Rénale	150 – 300	75 – 150
Pulmonaire	220 – 320	140 – 220

L'association, à distance de la transplantation, d'un inhibiteur de m-TOR avec la ciclosporine permet de diminuer encore les concentrations requises afin de prévenir le rejet de greffe. En effet, la potentialisation des effets entre ciclosporine et inhibiteurs de m-TOR permet de diminuer les exigences en termes de zone thérapeutiques. C'est pourquoi, certains patients peuvent être immunodéprimés de façon satisfaisante avec des  $C_{min}$  de 50 à 100 ng/mL

pour peu que les concentrations sanguines de l'inhibiteur de m-TOR soient également en zone thérapeutique (55).

### **2.2.2 Suivi thérapeutique pharmacologique du tacrolimus**

Les concentrations sanguines résiduelles en tacrolimus doivent être surveillées en période post-transplantation. Le lien entre les C<sub>min</sub> de tacrolimus et le rejet de transplantation ainsi qu'avec le risque de survenue d'effets indésirables a été établi, à la fois en transplantation rénale et hépatique (56,57). La C<sub>min</sub> est considérée comme étant un bon reflet de l'AUC et la C<sub>2</sub> ne semble pas être mieux corrélée à l'AUC que la C<sub>min</sub> (58). La première conférence de consensus sur le STP du tacrolimus recommandait des concentrations sanguines de 5 à 20 ng/mL quel que soit le type de transplantation (59). Les recommandations plus récentes précisent, pour les patients ne bénéficiant pas d'induction par anticorps monoclonaux, une C<sub>min</sub> sanguine cible comprise entre 10 et 15 ng/mL durant les 3 premiers mois puis diminuant vers 5 à 10 ng/mL par la suite (58). L'étude SYMPHONY, dont l'un des bras visait la minimisation des concentrations de tacrolimus chez des patients transplantés rénaux traités également par mycophénolate mofétil, corticoïdes et une induction par basiliximab, a permis de proposer en cas d'association du tacrolimus après induction et en cas de co-traitement avec l'acide mycophénolique et des corticoïdes, une C<sub>min</sub> cible de 3 à 7 ng/mL. Le bras tacrolimus présentait à 1 an le plus faible taux de rejet aigu et le profil d'épargne rénal le plus avantageux (60). A noter que les concentrations moyennes effectivement atteintes au cours de cette étude étaient proches de la limite haute recommandée ( $6,4 \pm 1,4$

ng/mL) (60). Le consensus européen recommande également une Cmin faible (3 à 7 ng/mL) en cas d'association entre tacrolimus et inhibiteur de m-TOR (Tableau 6) (58).

Tableau 6. Cmin de tacrolimus recommandées selon le type de protocole d'immunosuppression en transplantation rénale d'après Wallemacq *et al.* (58).

Proposed Target TAC C <sub>0</sub> Concentration (ng/mL)* Guidelines for Kidney Transplantation					
Time (mo)	Without Induction	IL-2R Antibody	Polyclonal Antibodies/HRI	MMF/Steroid Minimization	mTOR Inhibitors
		Tritherapy			
0-3	10-15	3-7†	5-10/10-15	10-15	3-7
3-12	5-15	3-7†	5-10/10-15	8-12	3-7
>12	5-10	3-7†	5-10/8-12	5-10	3-7

Récemment, une méta-analyse menée sur 64 études en transplantation hépatique et comparant les données des patients présentant une Cmin supérieure à 10 ng/mL à celles des patients présentant une Cmin inférieure à 10 ng/mL durant le premier mois post-transplantation a permis de conclure qu'une cible de 6 à 10 ng/mL dès la post-transplantation immédiate n'entraînait pas plus de rejet et permettait de réduire la toxicité rénale à un an du tacrolimus chez le transplanté hépatique (61).

### 2.2.3 Suivi thérapeutique du sirolimus

La posologie du sirolimus doit être adaptée individuellement à partir des concentrations sanguines résiduelles. Le lien entre les concentrations sanguines en sirolimus et l'efficacité clinique du traitement a été démontré en transplantation rénale (34). La corrélation entre Cmin et AUC du sirolimus est excellente ( $R^2 = 0.96$ ) et également liée à la survenue de rejet de greffe (62). Ainsi, les stratégies de STP du sirolimus reposent sur la mesure de la Cmin.



Chez le patient transplanté rénal, la fréquence de survenue du rejet de greffe est plus importante chez les patients présentant une Cmin inférieure à 5 ng/mL tandis qu'une Cmin supérieure à 15 ng/mL est associée à la survenue d'effets indésirables hématologiques et lipidiques (31). Le RCP du sirolimus recommande le STP en particulier dans les cas d'insuffisance hépatique, d'interactions médicamenteuses, lors de la diminution de la posologie de ciclosporine associée à la molécule. Lors de l'association à la ciclosporine, il est recommandé d'obtenir une Cmin comprise entre 4 et 12 ng/mL. La ciclosporine peut ensuite être progressivement arrêtée et une cible de sirolimus de 12 à 20 ng/mL est alors recommandée (35).

#### **2.2.4 Suivi thérapeutique de l'évérolimus**

Le STP de l'évérolimus repose également sur la mesure de la Cmin sanguine. Le résumé des caractéristiques du produit Certican® stipule qu'une surveillance régulière des concentrations sanguines de l'évérolimus est recommandée. Plusieurs études montrent une fréquence plus importante de rejet aigu chez les patients dont la Cmin est inférieure à 3 ng/mL (43,63,64). Dans les études de phase I, les patients ayant reçu une dose d'évérolimus de 7,5 mg/j présentaient davantage de leucopénies et de thrombopénies que les patients traités par une dose de 0,75 mg/j ou 2,5 mg/j suggérant une toxicité concentration dépendante laquelle était confirmée par les données pharmacocinétiques de l'étude (65). Les études de phase III ont permis de définir la limite supérieure de la zone thérapeutique comme étant une concentration sanguine de 8 ng/mL (66). En effet, chez les patients dont les Cmin étaient comprises entre 7,8 et 15 µg/mL, l'incidence des leucopénies (moins de

4000 leucocytes par  $\text{mm}^3$ ) était de 15% et celle des thrombopénies (moins de 150000 plaquettes par  $\text{mm}^3$ ) de 17%. Ainsi, la zone thérapeutique recommandée à l'équilibre pour les Cmin sanguines d'évérolimus chez le patient transplanté est de 3 à 8 ng/mL (40).

### **2.2.5 Limites du suivi thérapeutique pharmacologique des concentrations d'immunosuppresseurs**

Le STP des IS, s'il a permis de réduire la fréquence de survenue du rejet aigu de transplantation, n'est pas sans limites.

Premièrement, les zones thérapeutiques définies au cours des essais cliniques menés chez les patients transplantés l'ont été d'un point de vue « populationnel » et non individuel. C'est pourquoi le fait pour un patient d'atteindre la zone thérapeutique n'entraîne pour lui qu'une diminution du risque de rejet de greffe et de survenue d'effets indésirables mais n'est pas une vérité absolue. L'individualisation de la posologie du traitement immunosuppresseur au patient semble être une approche pouvant répondre à cette limite.

Ensuite, la mesure de la concentration sanguine en immunosuppresseur n'est qu'un reflet indirect de l'effet du médicament. De plus, la Cmin n'est également qu'un reflet de l'exposition totale au médicament. La variabilité de l'effet des IS est très importante et n'est sans doute qu'en partie reflétée par l'exposition sanguine. C'est pourquoi, certains patients peuvent présenter un rejet aigu de greffe alors même que leurs concentrations sanguines sont en zone thérapeutique. D'autres facteurs modulant l'effet de ces principes actifs impactent vraisemblablement à différents niveaux (sanguins, cellulaires, nucléaires). Aussi,

le développement de nouvelles approches de suivi thérapeutique ou de suivi pharmacodynamique pourrait prévenir ces accidents.

## **2.2.6 Modélisation pharmacocinétique par approche de population**

### **2.2.6 1 Modélisation pharmacologique**

L'un des moyens pour mieux appréhender la variabilité inhérente aux concentrations d'IS chez le patient est de modéliser leur pharmacocinétique. Si la pharmacocinétique est la discipline s'intéressant au devenir du médicament dans l'organisme par l'étude des processus d'Absorption, de Distribution, de Métabolisme et Excrétion (processus ADE) après administration chez un individu unique, la pharmacocinétique de population, quant à elle, vise à estimer les paramètres pharmacocinétiques d'un médicament administré à une population de patients à partir d'un nombre limité de dosages plasmatiques. L'unité de mesure n'est donc plus l'individu mais une population d'individus. Cette approche a été proposée par Sheiner *et al.* en 1972 (67). Il s'agit d'une approche qui mêle modélisation pharmacologique et statistique.

La modélisation en pharmacocinétique dite compartimentale permet de prévoir, par une approche mathématique, l'évolution des concentrations d'un médicament en fonction du temps, des doses administrées et des paramètres pharmacocinétiques et ainsi d'adapter la posologie de nombreux médicaments à index thérapeutique étroit, dont les IS. Le modèle compartimental comprend des variables connues (temps, dose), les paramètres pharmacocinétiques de population, appelés effets fixes, et la variabilité des paramètres au sein des sujets, appelés effets aléatoires.

Ce modèle a pour objectif de simuler les étapes du processus ADE (Figure 5). Les données vont tout d'abord permettre de construire un modèle (définition de sa structure et de ses paramètres), puis de l'identifier (estimation des valeurs numériques). Les deux phases suivantes sont la validation du modèle et son application. Deux applications principales à la modélisation pharmacocinétique sont envisageables : la simulation (utiliser les entrées pour suivre l'évolution des sorties) ou l'adaptation de posologie (contraindre les sorties pour calculer les entrées compatibles).

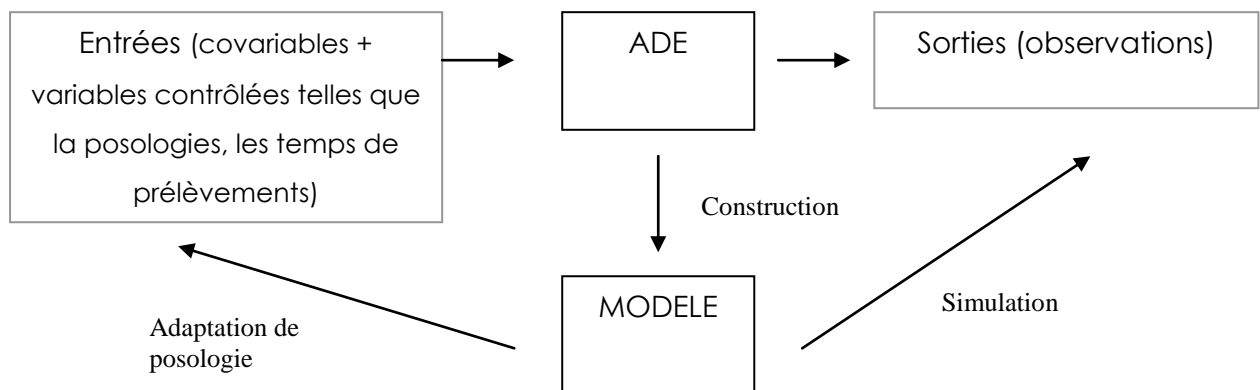


Figure 5. Relation entre modèle et système réel ADE.

Le développement de modèles permet d'avoir une description des paramètres pharmacocinétiques.

Dans ces modèles, les transferts de médicament sont représentés comme des échanges vers des compartiments traduisant l'administration et élimination du médicament. Ces modèles peuvent être simples (un compartiment avec une vitesse d'élimination proportionnelle à la

quantité restante dans le compartiment) ou plus complexes (modèles basés sur des systèmes d'équations différentielles dans lesquels il est possible d'intégrer les paramètres pharmacocinétiques du médicament ( $K_a$ ,  $V$  et  $Cl$ )).

#### **2.2.6.2 Approche de population**

Dans l'approche de population comme dans une analyse classique de pharmacocinétique, il s'agit d'obtenir des estimations de la clairance, du volume de distribution ou de la biodisponibilité d'un médicament, paramètres qui pourront être utilisés pour déterminer une posologie adéquate. Aux paramètres pharmacocinétiques traditionnels s'ajoutent des paramètres qui mesurent les différentes sources de variabilité de la population étudiée, ainsi que la mise en évidence de caractéristiques individuelles capables d'influencer la réponse. Dans l'approche de population, l'analyse des données est simultanée pour l'ensemble de la population étudiée. Le but est d'estimer les paramètres pharmacocinétiques moyens de la population ainsi que la variabilité de ces paramètres et les covariables influençant cette variabilité.

En fait, aux informations de pharmacocinétiques, s'ajoutent des informations de type statistique. Le modèle est ainsi un modèle pharmaco-statistique comportant 3 parties : un modèle structural de pharmacocinétique, un modèle de variabilité inter-individuelle et un modèle d'erreur résiduelle.

**Le modèle structural** décrit les échanges de médicament entre les compartiments (cf paragraphe sur la modélisation compartimentale). Le choix du type de modèle structural

s'effectuera en fonction des données de la littérature ou visuellement d'après la représentation des concentrations observées en fonction du temps.

**Le modèle de variabilité inter-individuelle** décrit l'écart entre les différents paramètres pharmacocinétiques moyens de la population (clairance moyenne par exemple) et les paramètres correspondants chez un individu. La variabilité inter-individuelle peut être modélisée de plusieurs façons : modèle additif ou modèle proportionnel. Un modèle additif signifie que chaque mesure présente la même précision pour chaque observation, alors que le proportionnel suppose que l'erreur est proportionnelle à l'intensité de la réponse. Le choix d'une erreur additive tend à améliorer la concordance entre prédits et observés sur les valeurs hautes et à minimiser l'influence des valeurs faibles. Le choix d'une erreur proportionnelle donne le même poids à toutes les données et les petites valeurs sont mieux prises en compte par le modèle. Différentes covariables expliquant cette variabilité peuvent être testées à ce niveau de modélisation. Il s'agit de covariables démographiques (âge, poids, taille...), biologiques (créatininémie, albuminémie, bilirubinémie...) ou de traitement (présence ou non d'un traitement par exemple un autre immunosuppresseur associé à la thérapeutique...). Plus récemment, des covariables de type génétique ont également été introduites dans les modèles de variabilité inter-individuelle. Ces covariables sont généralement liées à la présence ou l'absence d'un polymorphisme (comme par exemple le polymorphisme du cytochrome P450 3A5\*1 pour les IS).

**Le modèle d'erreur résiduelle** définira l'écart entre la concentration prédite et la concentration observée (c'est à dire l'ensemble des erreurs liées au dosage en lui-même, aux erreurs de renseignement des données (temps de prélèvement...)). L'erreur peut être modélisée de façon additive, proportionnelle ou mixte (combinant les deux approches précédentes).

Le modèle pharmaco-statistique peut également contenir une partie dont l'objectif est de décrire la variabilité inter-occasion si celle-ci existe. La variabilité inter-occasion décrit les différences qui peuvent apparaître chez un même individu en différentes occasions d'évaluation des paramètres. Il s'agit de ce qui est communément appelé en pharmacocinétique la variabilité intra-individuelle. Pour que cette variabilité puisse être observée, il est nécessaire que les données relevées le soient sur un intervalle de temps important avec répétition des administrations du médicament.

L'une des méthodes les plus utilisées pour établir un modèle pharmaco-statistique de données est la technique dite NONMEM (non linear mixed effects models) qui est également le nom d'un logiciel permettant cette modélisation.

### ***2.2.6.3 Analyse des données***

L'analyse des données nécessite tout d'abord de choisir le modèle structural pharmacocinétique puis le modèle d'erreur à appliquer aux données formatées pour être utilisées par le logiciel de pharmacocinétique de population. Le modèle structural ne doit pas être biaisé, ce qui peut être mis en évidence par le calcul des résidus pondérés  $((\text{concentration observée} - \text{concentration prédite})/\text{concentration prédite})$  en fonction du temps. Le choix du modèle d'erreur peut se faire par visualisation de l'absence de biais sur le graphique des résidus pondérés en fonction des concentrations prédites. A la première étape, le modèle initial ne contiendra pas de covariables. A partir de ce modèle vont être estimés les paramètres moyens de la population. L'inclusion de covariables dans le modèle permet d'augmenter la performance prédictive du modèle. Il permet de réduire l'écart



entre les concentrations observées et les concentrations prédites. L'influence des différentes covariables sur le modèle sera testée de façon dite "ascendante". Les covariables testées doivent avoir une signification « logique » (effet de covariables décrivant la fonction hépatique pour un médicament fortement métabolisé par exemple) et pouvoir être expliquées physiologiquement. Le choix des covariables à intégrer au modèle peut être réalisé graphiquement. Chaque covariable va ainsi être implémentée successivement au modèle initial avec pour finalité deux objectifs : faire diminuer significativement la fonction objective (fonction estimant la qualité de l'ajustement entre les concentrations prédites et observées sur l'ensemble de la population étudiée, c'est à dire l'adéquation du modèle aux données de la population) avec une limite de significativité définie par un  $p < 0,05$  et faire diminuer l'erreur inter-individuelle et résiduelle tout en minimisant les biais éventuels. A l'issue de cette phase ascendante, l'ensemble des covariables influençant significativement le modèle va être agrégé au modèle puis les variables vont être retirées une à une et de manière aléatoire au modèle. Les covariables qui seront conservées dans le modèle final sont alors les covariables qui feront augmenter significativement ( $p < 0,01$ ) la fonction objective. Le but de cette phase sera également de ne conserver que les covariables non redondantes, c'est à dire les covariables n'expliquant pas les mêmes informations quant à la variabilité du modèle. Une fois les covariables d'intérêt sélectionnées, on obtient alors le modèle final. Ce dernier doit être caractérisé par une absence de biais et une amélioration visuelle graphique de l'ajustement entre les valeurs de concentrations prédites et observées.

#### **2.2.6.4 Validation du modèle**

Après élaboration du modèle final, il convient de valider ce modèle. Il est possible de valider un modèle de manière interne (à partir des données utilisées pour la modélisation ou de données non utilisées pour la modélisation mais colligées de manière contemporaine à ces données) ou externe (à partir d'un jeu de données n'ayant pas servi à la modélisation). Les solutions pour la validation interne sont le plus souvent : data splitting, bootstrap, jack-knife, visual predictive check ou validation externe.

Pour la **validation interne**, il est possible à partir des données relevées d'en réserver une partie (un quart ou plus fréquemment un tiers) pour la validation du modèle. Dans cette approche dite "**data splitting**", seules les deux-tiers (ou trois-quarts) des données seront utilisées pour l'élaboration du modèle. Si la validation apparaît satisfaisante, les données peuvent alors être regroupées afin de réaliser une estimation finale.

Dans l'approche appelée "**bootstrap**", il s'agit de recréer une nouvelle base de données avec le même nombre de sujets, à partir de la base utilisée pour la modélisation, par tirage au sort avec remise. Les paramètres du nouveau modèle sont calculés. Le tirage au sort est alors effectué à nouveau et le processus répété 1000 fois. L'objectif est que les paramètres calculés lors des 1000 répétitions ne diffèrent pas en termes de moyenne et d'écart-type des paramètres de la base d'origine (68).

La procédure dite "**jack-knife**" consiste à retirer aléatoirement un sujet de la base de données initiale et à recalculer les paramètres de ce nouveau modèle. La procédure est répétée un grand nombre de fois et comme pour le bootstrap, l'objectif de validation est que les valeurs moyennes et écart-types des paramètres calculés soient identiques aux paramètres calculés avec la base initiale (69).

La validation par "**visual predictive check**" est une procédure de validation utilisant le modèle final afin de simuler les données de la base 1000 fois. Cette procédure permet alors d'obtenir des concentrations simulées en très grand nombre. A partir de ces concentrations simulées sont calculés les 5ème et 95ème percentiles de la répartition de ces données. L'objectif est que les concentrations observées soient réparties de manière homogène autour de la médiane des concentrations simulées et que moins de 5% de ces valeurs observées ne soient à l'extérieur de l'intervalle défini par les 5ème et 95ème percentiles des valeurs simulées (70).

**La validation externe** nécessite le recours à une seconde base de données issue d'une autre étude et servant de comparatif au modèle à valider. Cette approche est l'approche idéale mais est rarement possible car il est très rare de disposer d'un second jeu de données.

### 2.2.7 Dosage des immunosuppresseurs dans les cellules mononuclées

Le site d'action de tous les IS étant une protéine intracellulaire (une phosphatase, la calcineurine, pour la ciclosporine et le tacrolimus; une kinase, m-TOR, pour le sirolimus et l'évérolimus; une enzyme, l'inosine monophosphate deshydrogénase, pour l'acide mycophénolique...), le dosage intracellulaire des IS (et en particulier dans les cellules mononuclées voire idéalement dans les lymphocytes T) présente un intérêt théorique indéniable. La fraction de l'immunosuppresseur présente au site d'action (c'est à dire dans la cellule) est en effet la fraction du médicament disponible afin d'exercer son effet. Selon le même principe que pour tout tissu, cette fraction diffusible représente une partie de la fraction libre du médicament, seule fraction du médicament pouvant passer les barrières et membranes et diffuser dans les tissus de l'organisme, par opposition à la fraction du médicament liée aux protéines plasmatiques (Figure 6).

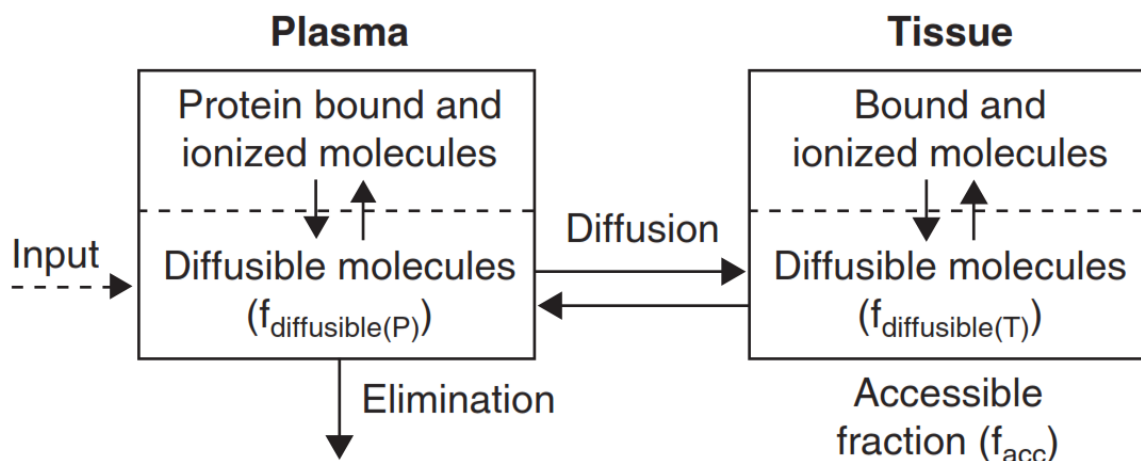


Figure 6. Distribution tissulaire des médicaments, adapté de Landersdorfer et al (71).

Pour ce qui est des IS, il apparaît intéressant de mesurer la concentration intracellulaire des molécules au niveau du lymphocyte ou pour plus de facilité au niveau des cellules mononuclées ou peripheral blood mononuclear cells (PBMC). La séparation de ces cellules des autres éléments figurés du sang est aujourd'hui standardisée et ne nécessite qu'une procédure simple reposant en partie au moins sur l'utilisation d'un gradient de ficoll.

Cette approche a déjà été proposée pour d'autres classes thérapeutiques comme les antirétroviraux et notamment les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine dont seule la forme intracellulaire est active (72,73).

Il faut cependant noter que les résultats du dosage dans les PBMC d'un même immunosuppresseur sont susceptibles d'être différents d'un type de transplantation d'organe à l'autre puisque les modifications physiologiques (et donc pharmacocinétiques) provoquées par le remplacement d'un rein, d'un foie ou d'un cœur seront différentes, en particulier en ce qui concernera la fraction libre de l'immunosuppresseur. Par exemple, la transplantation hépatique risque de modifier la clairance de l'immunosuppresseur, par modification du métabolisme, tandis que la transplantation cardiaque modifiera la distribution de l'immunosuppresseur par modification du débit sanguin. Lors de la transplantation hépatique, il peut également y avoir une modification de la fixation protéique qui aura pour conséquence une modification de la fraction libre et donc potentiellement de la fraction diffusible dans le lymphocyte.

La détermination des concentrations en IS dans les PBMC présentera un intérêt uniquement en cas d'absence ou de faible corrélation avec la concentration sanguine. Dans le cas contraire, on jugera que la concentration sanguine de l'immunosuppresseur est un reflet suffisamment fidèle de la concentration dans les PBMC pour se dispenser de déterminer directement cette dernière. Inversement, s'il n'y a pas ou très peu de lien entre la

concentration sanguine et la concentration dans les PBMC, le dosage de l'immunosuppresseur dans les PBMC peut être pertinent. Les IS étant des substrats des cytochromes et des protéines de transport et en particulier du CYP3A5 et d'ABCB1, protéines qui sont le jeu d'un polymorphisme génétique important et qui peuvent être induites ou inhibées par des xénobiotiques, leur concentration, et en particulier leur concentration libre, et donc leur diffusion dans les PBMC, peut être largement modifiée (24,74). ABCB1 peut notamment jouer un rôle prépondérant dans l'exclusion des IS des PBMC. En effet, cette pompe d'efflux est, entre autres localisations, présente à la surface du lymphocyte et peut donc limiter la diffusion des IS au niveau de leur site d'action et ainsi diminuer leurs effets (75). L'expression et la fonctionnalité de cette protéine d'efflux sont variables d'un individu à l'autre et peuvent être modulées par l'action de paramètres environnementaux. Il existe d'autres protéines de transport localisées sur la membrane du lymphocyte dont le rôle, vis à vis des traitements IS, n'a, à ce jour, pas été élucidé (76). L'effet des cytochromes et des protéines de transport pourrait en partie expliquer une absence de corrélation entre les concentrations sanguines et les concentrations dans les PBMC d'IS et être à l'origine d'importantes variations des effets de ces médicaments.

### 2.2.8 Détermination de l'activité de la calcineurine

La calcineurine est une sérine-thréonine phosphatase qui, une fois activée par complexation calcium-dépendante avec la calmoduline, va pouvoir déphosphoryler des facteurs de croissance (et en particulier NFAT) afin de permettre leur translocation vers le noyau du lymphocyte. En tant que cible terminale des inhibiteurs de calcineurine, l'activité de cette phosphatase représente actuellement l'un des marqueurs pharmacodynamiques les plus pertinents lors d'un traitement par cette classe d'immunosuppresseurs.

D'autres travaux se sont attachés à déterminer l'inhibition de la synthèse de l'interleukine-2, cytokine produite en aval de la calcineurine et ayant un rôle pléiotrope dans l'activation immunitaire menant au rejet de greffe, de l'interféron gamma ou la régulation de NFAT en tant que marqueurs pharmacodynamiques de l'effet des inhibiteurs de calcineurine (77–79). Néanmoins, la détermination de l'activité calcineurine est le marqueur pharmacodynamique pour lequel la littérature scientifique est la plus diserte. Des travaux explorant les liens existants entre exposition sanguine en ciclosporine ou tacrolimus et activité de la calcineurine ont ainsi été publiés dans des cohortes de patients transplantés hépatiques (80–82) ou rénaux (83).

Deux méthodes permettent la détermination de l'activité de la calcineurine. La première est une méthode faisant appel à la radioactivité par la mesure d'un substrat marqué par le phosphore 32 (84). La manipulation des radioéléments étant délicate et soumise à autorisations particulières, il lui est préféré une méthode ne faisant pas intervenir ce type de mesure. La seconde méthode, initialement développée par Enz *et al.*, utilise la mesure de substrats non-radioactifs phosphorylés par une protéine kinase et déphosphorylés par la

calcineurine par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (85). C'est cette seconde méthode modifiée et améliorée qui a été utilisée dans le présent travail.



### 3. Objectifs

Du fait de la variabilité pharmacocinétique et pharmacodynamique précédemment décrites et de la persistance de résultats insatisfaisants en matière de prévention des rejets aigus de greffes, l'objectif général de ce travail est d'optimiser l'individualisation des traitements IS. Nous nous intéresserons plus particulièrement à un inhibiteur de m-TOR (Everolimus) et un inhibiteur de la calcineurine (Tacrolimus).

En premier lieu, nous testerons une **approche pharmacocinétique de population** en vue de définir des covariables permettant d'adapter les posologies d'IS chez les patients traités.

L'objet choisi pour ce modèle est **l'évérolimus**, prescrit chez des patients transplantés cardiaques.

Le deuxième élément d'optimisation thérapeutique est le **dosage intracellulaire** des immunosuppresseurs.

Les IS agissant dans le lymphocyte, nous avons développé des méthodes de dosage dans les cellules mononuclées qui permettent de doser le médicament directement sur son site d'action. De ce fait, les concentrations mesurées pourraient constituer un meilleur reflet de l'effet de l'immunosuppresseur comparativement à la mesure classique de la concentration sanguine.

Cette méthode sera appliquée à deux IS, **l'évérolimus** et le **tacrolimus** et la relation entre concentrations sanguines et concentrations dans les cellules mononuclées sera étudiée.

En troisième lieu, nous allons étudier les concentrations dans les cellules mononuclées conjointement à un nouveau paramètre de suivi pharmacologique et d'ajustement posologique chez les patients traités par **tacrolimus** : **l'activité de la calcineurine**.

Nous allons tester l'hypothèse selon laquelle la mesure directe de l'effet pharmacologique pourrait constituer un meilleur marqueur d'efficacité anti-rejet que le dosage des concentrations circulantes.

L'amélioration des connaissances en lien avec ces résultats pourrait permettre le développement d'essais cliniques visant à évaluer la capacité des nouveaux outils que sont le STP intracellulaire des concentrations d'IS et le suivi pharmacodynamique (activité de la protéine cible du médicament) à prédire le rejet aigu de transplantation et pourrait également permettre d'expliquer la survenue de rejet aigu chez les patients dont les concentrations sanguines d'IS sont en zone thérapeutique (Figure 7).

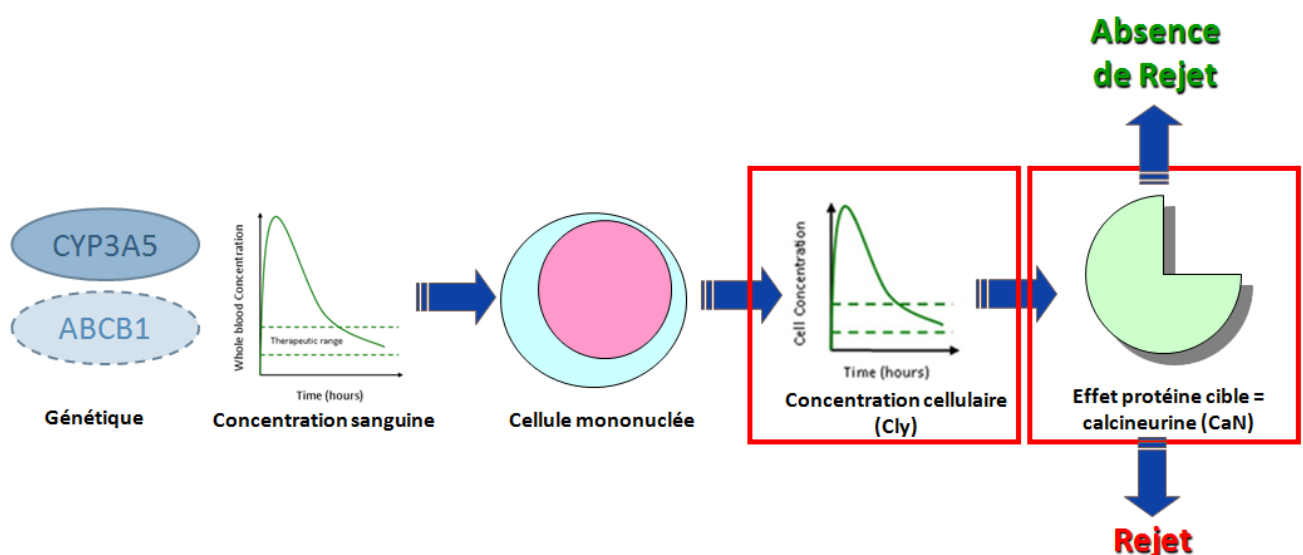


Figure 7. Représentation de l'hypothèse soutenant ce travail de doctorat.

## **4. Matériels et méthodes**

Nous allons dans cette partie décrire l'ensemble des matériels et méthodes développés dans le cadre de nos essais.

### **4.1 Pharmacocinétique de population**

#### **4.1.1 Patients et collection des données**

Les patients transplantés cardiaques traités par évérolimus et bénéficiant d'un suivi thérapeutique ont été inclus prospectivement durant les 22 mois de l'étude. Les patients avaient donné leur accord pour participer à l'étude. En raison de l'utilisation de données génétiques, les patients inclus avaient donné leur consentement afin que ces examens soient réalisés. L'évérolimus était administrée aux patients dans le cadre d'une multithérapie par ciclosporine ou tacrolimus ou mycophénolate mofétil et corticoïdes. Les patients ont reçu 0,75 mg d'évérolimus deux fois par jour puis les posologies ont été adaptées afin de maintenir les concentrations sanguines en évérolimus entre 3 et 8 ng/mL.

Les prélèvements utilisés pour cette étude étaient ceux du suivi thérapeutique pharmacologique sanguin de l'évérolimus et aucun autre prélèvement n'a été demandé aux patients autres que celui nécessaire à ce suivi. Les données démographiques (âge, poids, taille, sexe, délai depuis la transplantation), de traitement (présence ou absence de corticoïdes, posologie de corticoïdes, présence ou absence de ciclosporine, posologie de

ciclosporine, concentrations sanguines en ciclosporine mesurées par technique immuno-enzymatique sur X-Pand dimension (Siemens, Munich, Allemagne)), biologiques (protéinémie, albuminémie, bilirubinémie totale, créatininémie, clairance de la créatinine calculée par la formule de Cockcroft et Gault, alanine aminotransférase, aspartate aminotransférase, hématoците) et génétique (polymorphisme du génotype *CYP3A5* et *ABCB1*) ont été relevées et colligées.

#### **4.1.2 Dosage sanguin de l'évérolimus**

Les dosages d'évérolimus ont été effectués à partir des prélèvements du suivi thérapeutique pharmacologique usuel des patients par une méthode immunologique avec détection par polarisation de fluorescence (FPIA) (Tdx, Abbott, Rungis, France) et des réactifs Bio-Merieux diagnostics (Marcy L'étoile, France). La méthode était linéaire de 2 à 30 ng/mL avec une limite de quantification à 2 ng/mL. Le risque d'interférence et de réactivité croisée avec les métabolites a été estimée comme minime avec cette méthode (86).

#### **4.1.3 Génotypage**

Le génotypage des patients a été effectué à partir de sang total recueilli sur EDTA. Les single nucleotides polymorphisms étudiés étaient le *CYP3A5* 6986 A>G (Rs number 776,746 ; allèle *CYP3A5\*3*) déterminé par discrimination allélique par TaqMan sur un automate ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) et le *ABCB1* 3435 C>T (Rs number 1,045,642) déterminé par PCR restriction après amplification via le système GeneAmp PCR

2400 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) suivie d'une restriction par l'enzyme Mbol (Sigma, St Quentin Fallavier, France).

#### 4.1.4 Modélisation pharmacocinétique

La modélisation a été effectuée à l'aide du logiciel NONMEM version 6. L'analyse de population a été effectuée en utilisant la méthode d'estimation conditionnelle du premier ordre avec la routine ADVAN2 TRANS2. Les concentrations résiduelles d'évérolimus ont été modélisées selon un modèle à 1 compartiment avec une absorption et une élimination linéaire.

L'effet des covariables sur le modèle était évalué par la réalisation d'un test de  $\chi^2$  effectué sur la différence de fonction objective entre le modèle structural sans covariable et le modèle incluant les covariables. Les covariables étaient conservées dans le modèle si leur implémentation dans le modèle induisait une diminution de la fonction objective de 6,63 points. A chaque étape de la construction du modèle, l'amélioration de celui-ci était évalué par l'accord entre les concentrations observées et prédites, l'amélioration de la précision des paramètres estimés et la réduction de la variabilité inter-individuelle et de l'erreur aléatoire.

L'influence de l'inclusion des covariables était systématiquement testée comme suit :

Pour les variables booléennes (exemple de la présence/absence de ciclosporine) :

$$CL/F = TV(CL) \times (1 + \Theta_{CSA})^{CSA}$$

où CL/F est la clairance apparente de l'évérolimus, TV(CL) la valeur typique de la clairance,  $\Theta_{CSA}$  le facteur d'influence de la ciclosporine sur le modèle et CSA le facteur indiquant la présence (CSA = 1) ou l'absence (CSA = 0) de ciclosporine dans la thérapeutique du patient.

Pour les variables continues (exemple de la bilirubinémie) :

$$CL/F = TV(CL) \times (MedBILI/BILI)^{\Theta_{bili}}$$

où CL/F est la clairance apparente de l'évérolimus, TV(CL) la valeur typique de la clairance, MedBILI la médiane des valeurs de bilirubine, BILI la valeur de la bilirubinémie du patient et  $\Theta_{BILI}$  le facteur d'influence de la bilirubinémie.

Pour les variables génétiques (exemple du CYP3A5) :

$$CL/F = TV(CL) \times [(1 + \Theta^{CYP3A5*3/*3})^{CYP3A5*3/*3} + (1 + \Theta^{CYP3A5*1})^{CYP3A5*1/*3 + CYP3A5*1/*1}]$$

où CL/F est la clairance apparente de l'évérolimus, TV(CL) la valeur typique de la clairance,  $\Theta^{CYP3A5}$  les facteurs d'influence respectifs des différents génotypes et CYP3A5 le facteur indiquant la présence ou l'absence des différents génotypes.

Dans cette approche, les génotypes expresseurs du *CYP3A5* (\*1/\*3 et \*1/\*1) étaient poolés. Cette approche a également été utilisée pour tester le génotype *ABCB1* et les génotypes expresseurs d'*ABCB1* (*ABCB1 CT* et *CC*) ont également été poolés.

Après test des covariables, un modèle intermédiaire est obtenu. Les covariables sont ensuite retirées du modèle intermédiaire une à une et de façon aléatoire afin de ne conserver que celles qui influençaient le plus le modèle. Une augmentation de 10,8 points de la fonction objective était fixée comme limite pour conserver une covariable dans le modèle final.

#### **4.1.5 Validation du modèle**

Le modèle a été validé selon deux procédures distinctes. Premièrement, avec la méthode du bootstrap, la précision et la robustesse du modèle ont été évaluées en simulant 1000 fois le modèle par réarrangement des données originelles du modèle en un nouveau jeu de données avec une combinaison différentes des sujets. Les valeurs des paramètres estimés par le bootstrap ont ensuite été comparées aux valeurs issues du modèle.

La seconde procédure de validation mise en œuvre a été le visual predictive check. Au cours de cette procédure, 1000 simulations des données originales ont été effectuées dans le but de simuler des concentrations ainsi que leur intervalle de prédiction à 95%. La superposition des données observées aux données simulées permet d'évaluer le recouvrement des valeurs. Une faible proportion des valeurs observées doit être à l'extérieur de l'intervalle de prédiction.

#### **4.1.6 Conclusion**

Lors de ce travail de doctorat, nous avons modélisé la pharmacocinétique de l'évérolimus chez le transplanté cardiaque en utilisant un modèle pharmacocinétique à un compartiment avec absorption et élimination linéaire à l'aide du logiciel NONMEM version 6 (87). Le modèle de variabilité inter-individuelle était un modèle exponentiel tandis que le modèle d'erreur résiduel était le modèle additif. La validation du modèle était interne et a fait appel à deux procédure : d'une part le "bootstrap" et d'autre part le "visual predictive check".

## 4.2 Dosages intracellulaires d'immunosuppresseurs

### 4.2.1 Séparation et purification des PBMC

D'un point de vue pratique, la première étape du dosage des immunosuppresseurs dans les PBMC sera la séparation des cellules mononuclées du reste du sang. Cette étape peut être effectuée à l'aide de dispositifs stériles prêts à l'emploi contenant un liquide permettant une séparation selon un gradient de densité. Nous avons utilisé initialement les dispositifs BD Vacutainer CPT tubes (BD, Le pont de Claix, France) puis les dispositifs Unisep-U02 (Novamed, Jérusalem, Israël) au cours de nos travaux. Les dispositifs Unisep-U02 possèdent un insert plastique permettant une meilleure séparation des types cellulaires. Le liquide permettant la mise en œuvre du gradient de densité est un mélange de polysucrose et de metrizoate de sodium dont la densité est de 1,077 g/mL. Le sang total recueilli sur héparine est dilué volume à volume avec le milieu de culture (Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) L-glutamate, Novamed, Jérusalem, Israël). L'étape de séparation fait appel à une centrifugation du dispositif dans lequel est disposé le sang dilué, à 1200 G pendant 20 minutes à 18°C. Pour une séparation optimale, le ralentissement de la centrifugeuse ne doit pas être trop rapide, c'est pourquoi le frein a été désactivé. Les PBMC se présentent alors comme un anneau blanchâtre relativement homogène flottant au dessus de l'insert plastique, à l'interface entre le plasma et le liquide dont la densité est légèrement supérieure à la densité des cellules mononuclées. Les érythrocytes et les polynucléaires sédimentent au fond du dispositif au cours de l'opération de séparation (Figure 8).



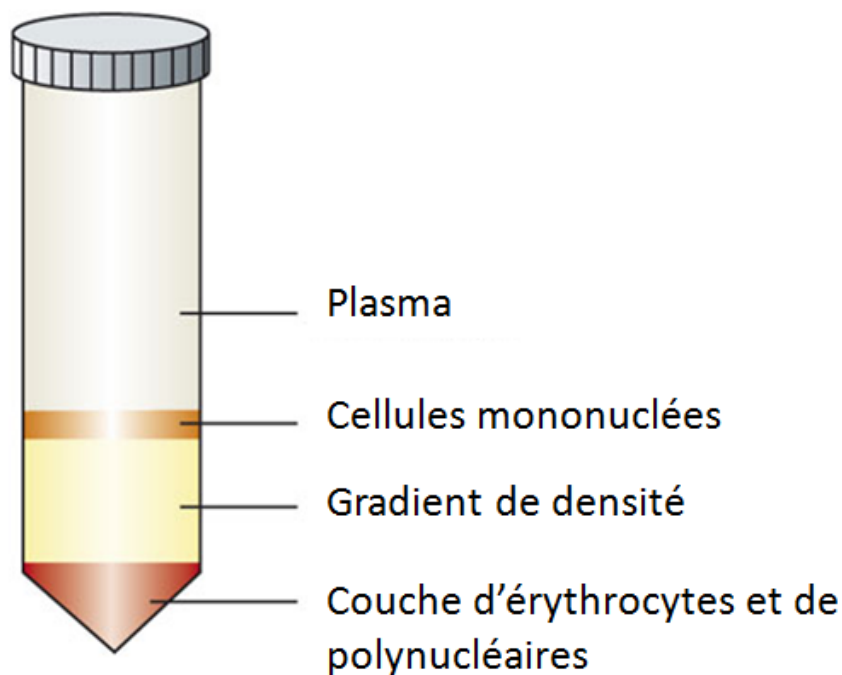


Figure 8. Séparation des cellules mononuclées. Adapté de Munoz *et al.* (88)

La couche de PBMC va alors être recueillie soit en versant la phase supérieure dans un nouveau tube (étape rendue possible uniquement avec les tubes Unisep en raison de la présence de l'insert en plastique), soit en prélevant directement l'anneau cellulaire avec une pipette. Les PBMC sont ensuite purifiés par lavages successifs. Le plasma contenant les PBMC est additionné de Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) jusqu'à atteindre un volume d'environ 10 mL puis le tube est mis à centrifuger à 350 G pendant 10 minutes et à 4°C. La réalisation de cette étape à 4°C permet d'éviter le fonctionnement des pompes d'efflux et ainsi la sortie éventuelle de l'immunosuppresseur de la cellule. A l'issue de la centrifugation, la phase supérieure sera éliminée jusqu'à 1 mL en prenant garde de ne pas remettre en suspension le culot cellulaire. Cette étape de lavage est réalisée deux fois.

#### 4.2.2 Numération cellulaire

Le culot cellulaire est alors remis en suspension et homogénéisé par vortex, le volume mesuré précisément puis un échantillon, correspondant à 1/10<sup>ème</sup> du volume, est utilisé pour la numération des cellules. Le tube est à nouveau centrifugé puis le surnageant éliminé. Le culot cellulaire est remis en suspension dans du méthanol afin de provoquer la lyse cellulaire et congelé à -80°C jusqu'à dosage.

Lors de la phase de préparation du dosage, les échantillons sont agités puis évaporés sous azote. Afin que les résultats de dosages soient comparables d'un sujet à un autre, il est essentiel de normaliser le résultat en le rapportant au nombre de cellules dans le prélèvement. Ainsi, le dosage intracellulaire nécessite-t-il une numération des cellules présentes dans le prélèvement après séparation. Les numérations cellulaires sont réalisées par cytométrie en flux simple initialement puis avec marquage des sous-types cellulaires pour les travaux les plus récents. Comme nous le verrons par la suite, l'identification précise des populations de leucocytes est importante et nécessite un marquage des antigènes spécifiques des leucocytes humains. En effet, une simple différenciation des cellules par densité peut mener à une contamination des prélèvements par d'autres populations leucocytaires, par exemple des polynucléaires neutrophiles. Il apparaît idéal d'obtenir une contamination inférieure à 5% des cellules mononuclées par les polynucléaires neutrophiles.

#### **4.2.3 Mise au point du dosage des immunosuppresseurs dans les PBMC par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem**

Cette étape nécessite une méthode d'une sensibilité et d'une spécificité suffisantes justifiant le recours à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). En effet, le dosage intracellulaire implique la détermination avec certitude de concentrations de l'ordre de quelques picogrammes par million de cellules et la LC-MS/MS apparaît comme étant la technique la plus à même de répondre à ce challenge. La procédure permettant la détermination des concentrations d'immunosuppresseurs dans les PBMC apparaît comme étant plus complexe que la détermination des concentrations sanguines. Néanmoins, elle demeure suffisamment simple pour autoriser une mesure de cette concentration en un temps compatible avec une adaptation de la posologie lors de l'administration suivante de l'immunosuppresseur.

La gamme de calibration et les contrôles de qualité ont été préparés à partir de PBMC obtenus auprès de volontaires sains ayant effectué un don au laboratoire d'immunologie du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière de l'Assistance-Publique des Hôpitaux de Paris. Les PBMC sont numérisés et aliquotés par fractions de 1 million puis remis en suspension dans du méthanol afin d'atteindre un volume de 1 mL. Ces aliquots seront supplémentés par des solutions standard préparées à partir de poudres mères d'évérolimus (Novartis, Huningue, France) ou de tacrolimus (Sigma, St Quentin Fallavier, France) en fonction de la technique de dosage utilisée. Les points de calibration pour l'évérolimus étaient les suivants : 0 - 1,25 - 2,5 - 3,75 - 5 - 7,5 - 10 - 12,5 ng/million de PBMC tandis que ceux utilisés pour le tacrolimus

étaient respectivement : 12,5 - 25 - 50 - 100 - 150 - 200 - 250 pg/million de PBMC. Trois niveaux de contrôles de qualité étaient également utilisés à 2,5 ; 5 et 10 ng/million de PBMC pour l'évérolimus et deux niveaux de contrôle à 50 et 200 pg/million de PBMC pour le tacrolimus. Les standards et contrôles étaient mis à agiter puis après centrifugation à 2300 G pendant 5 minutes, l'intégralité du surnageant était prélevé et mis à évaporer à température ambiante sous flux d'azote. Le résidu était ensuite repris par 200 µL de méthanol et une partie (50 µL, pour ce qui est du dosage du tacrolimus) ou la totalité (pour le dosage de l'évérolimus) transférée dans un tube avant l'étape d'extraction. Les immunosuppresseurs sont extraits par ajout au résidu de 200 µL (évérolimus) ou 100 µL (tacrolimus) de sulfate de zinc 0,1 M, 250 µL d'eau de qualité LC-MS/MS additionnée d'étalon interne (Ascomycine) (Sigma, St Quentin Fallavier, France) afin d'atteindre une concentration de 20 µg/mL puis 150 µL d'acétonitrile. Après centrifugation à 15000 G pendant 4 minutes, 20 µL du surnageant étaient injectés dans le système LC-MS/MS.

Celui-ci se composait d'une pompe Acquity UPLC Waters et d'un détecteur Acquity TQD Waters (Milford, MA, USA). La séparation des composés était obtenue sur une colonne MassTrak TDM C18 Waters 2.1 x 10 mm (St Quentin en Yvelines, France) maintenue à 55°C. Les composés étaient élués selon un gradient à un débit de 400 µL/min. La phase mobile était constituée d'un solvant A (2 mmol/L d'acétate d'ammonium et 0,1 % d'acide formique dans de l'eau de qualité LC-MS/MS) et d'un solvant B (2 mmol/L d'acétate d'ammonium et 0,1 % d'acide formique dans de l'acétonitrile de qualité LC-MS/MS). La proportion de chaque phase était de 50% initialement et maintenue au cours de l'analyse des composés de 0 à 0,6 minutes, puis était portée à 100% de B de 0,6 à 1,2 minutes et enfin à nouveau à 50/50 (V/V) de 1,2 minutes jusqu'à la fin du run. De l'argon était utilisé comme gaz de collision et une ionisation des composés était obtenue en mode positif selon les conditions

suivantes : capillaire : 1,0 KV ; énergie de collision 20 eV pour l'étalon interne et 15 eV pour l'évérolimus et le tacrolimus. La tension du cône échantillon était portée à 30 V pour l'étalon interne et 25 V pour les immunosuppresseurs. La désolvatation était assurée par un débit d'azote de 900 L/h et une température de 350°C.

La détection des composés était effectuée en mode multiple reaction monitoring (MRM). Les transitions suivies étaient respectivement pour l'évérolimus, le tacrolimus et l'étalon interne : 975,5 → 908,5 (m/z) ; 821,5 → 768,5 (m/z) et 809,5 → 756,5 (m/z). La quantification des composés était effectuée par calcul du ratio entre les aires chromatographiques obtenues pour les immunosuppresseurs et celles obtenues pour l'étalon interne avec une acquisition effectuée sur le logiciel Masslynx v4,1 (Waters, St Quentin en Yvelines, France) (Figure 9).

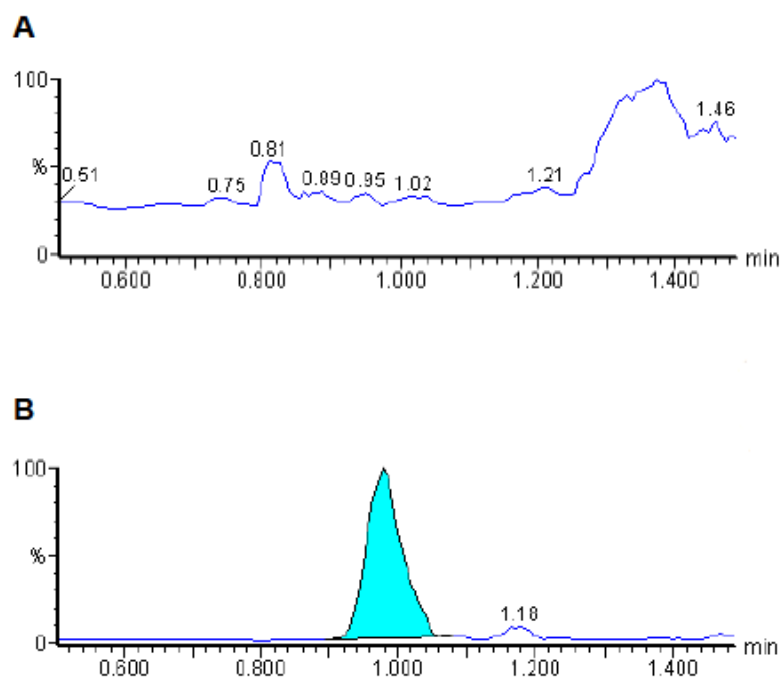


Figure 9. Exemples de chromatogrammes obtenus lors du dosage de l'évérolimus dans les PBMC après extraction d'un plasma blanc (A) et du plasma d'un patient transplanté cardiaque traité par évérolimus.

#### **4.2.4 Validation des méthodes de dosage**

La méthode de dosage a été validée selon les recommandations publiées par l'ICH (89). Les critères suivants ont été évalués : répétabilité, fidélité intermédiaire, linéarité, sélectivité, limite de quantification, effet de matrice et rendement d'extraction.

##### **4.2.4.1 Répétabilité**

La répétabilité de la méthode a été déterminée en réalisant au cours d'une même journée 6 contrôles de qualité à 3 niveaux de concentration 2,5 ; 5 et 10 ng/mL pour l'évérolimus et à 2 niveaux de concentration 50 et 200 pg/million de PBMC pour le tacrolimus ; en calculant la précision et l'exactitude de la méthode. La précision est déterminée en calculant le coefficient de variation (CV), exprimé en pourcentage, qui correspond au rapport de l'écart-type obtenu à chaque niveau de contrôle pour les valeurs mesurées sur la moyenne des valeurs obtenues pour le même niveau de contrôle. L'objectif étant dans ce cas que le CV soit inférieur à 15% pour tous les niveaux de concentration testés. L'exactitude est déterminée en calculant le recouvrement entre la valeur de concentration théorique et la valeur de concentration mesurée. Cette valeur est exprimée en pourcentage avec pour objectif l'obtention d'un recouvrement compris entre 95 et 105% pour tous les niveaux de contrôle.

#### **4.2.4.2 Fidélité intermédiaire**

La fidélité intermédiaire a été déterminée au cours de la mise au point du dosage en réalisant trois séries de mesures de 6 contrôles de qualité à trois niveaux de concentrations différents (2,5 ; 5 et 10 ng/mL) pour l'évérolimus et deux niveaux de concentration (50 et 200 pg/million de PBMC) pour le tacrolimus. Ces trois séries de mesures étaient effectuées au cours de trois jours différents. L'objectif de la fidélité intermédiaire est de s'assurer du maintien dans le temps des qualités de justesse et d'exactitude de la méthode au cours du temps.

Pour l'évérolimus, à partir des mesures effectuées au cours de ces trois séries, le CV et le recouvrement sont calculés pour chaque niveau de concentration. Les objectifs étaient les mêmes qu'à l'étape de répétabilité, à savoir, un CV inférieur à 15% et un recouvrement compris entre 95 et 105%.

Pour le tacrolimus, au cours de la validation de cette méthode, l'exactitude a été évaluée pour chacune des concentrations équivalentes au point de la gamme de calibration de la méthode (c'est à dire de 12,5 pg/million de PBMC à 250 pg/million de PBMC). Ce paramètre a été calculé à partir de mesures effectuées en triplicate pour chaque niveau de concentration au cours de trois jours différents. L'exactitude est exprimée en pourcentage avec pour objectif l'obtention d'un recouvrement compris entre 95 et 105% pour tous les niveaux de concentration.

#### **4.2.4.3 Linéarité**

La linéarité a été testée pendant trois jours consécutifs en calculant le coefficient de détermination ( $R^2$ ) de la droite de calibration. Celui-ci devait être supérieur à 0,98.

#### **4.2.4.4 Spécificité**

La spécificité de la méthode a été étudiée par analyse d'extraits de PBMC obtenus chez plusieurs patients transplantés cardiaques. Ces extraits ne devaient pas contenir de substance pouvant être à l'origine d'un signal pouvant être confondu avec l'évérolimus ou le tacrolimus.

#### **4.2.4.5 Limite de quantification**

La limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte pouvant être quantifiée précisément. Il doit s'agir d'une concentration pour laquelle au cours des mesures répétées, le CV doit être inférieur à 15%.

#### **4.2.4.6 Rendement et effet de matrice**

Le rendement d'extraction a été évalué dans la matrice constituée par les PBMC en comparant les aires chromatographiques d'évérolimus ou de tacrolimus obtenues : 1/ directement après surcharge d'évérolimus ou tacrolimus préparé dans du méthanol et



ajouté après extraction de PBMC dépourvu d'évérolimus ou de tacrolimus et 2/ après extraction, les PBMC étant surchargés par de l'évérolimus ou du tacrolimus. Ces surcharges ont été effectuées à partir de lots différents de PBMC. Le rapport obtenu correspond au rendement de l'extraction. La procédure a été répétée 3 fois pour chacun des trois niveaux de contrôle afin de tester le rendement sur l'ensemble de la gamme de calibration. La même opération est également effectuée pour l'étalon interne.

L'effet de matrice a également été évalué au cours de la validation de la méthode. Cinq contrôles de qualité à 5 ng/mL pour l'évérolimus, 50 et 200 pg/million de PBMC pour le tacrolimus et à 2 ng/mL pour l'étalon interne ont été préparés. Ces concentrations étaient obtenues : d'une part en surchargeant post-extraction un volume de méthanol ayant subi la procédure d'extraction de la méthode et d'autre part en surchargeant post-extraction des PBMC dépourvus d'évérolimus, de tacrolimus ou d'étalon interne. La comparaison des aires chromatographiques obtenues ne doit pas différer afin de pouvoir conclure à l'absence d'effet de matrice. En effet, une différence de signal entre ces deux surcharges effectuées post-extraction afin d'obtenir une même concentration ne pourrait être le fait que d'une extinction ou d'une surexpression de signal lié à la matrice constituée par les PBMC.

#### **4.2.5 Conclusion**

Au cours de ce travail de doctorat, nous avons développé 2 méthodes de dosages intracellulaires des IS par LC-MS/MS sur TQD Waters (Milford, MA, USA). Ces deux méthodes ont été validées conformément aux recommandations de la FDA (89). Les critères de validation utilisés lors de l'étape de validation étaient les suivants : linéarité, répétabilité,

fidélité intermédiaire, exactitude, limite de quantification, rendement et effet de matrice. Ces méthodes ont, par la suite, fait l'objet d'une application clinique chez le patient transplanté afin d'évaluer leur faisabilité en pratique clinique. La première méthode a permis la détermination des concentrations en évérolimus dans les PBMC par LC-MS/MS (90). La seconde a permis la détermination des concentrations de tacrolimus dans les PBMC par LC-MS/MS (91). Ces deux méthodes ont ensuite été appliquées à une cohorte de patients transplantés cardiaques. La méthode de dosage du tacrolimus dans les PBMC a également été appliquée, chez 10 patients transplantés hépatiques de novo, lors d'une étude visant à décrire la relation existant entre les concentrations sanguines de tacrolimus, les concentrations intracellulaires de tacrolimus et l'effet sur la protéine cible de la molécule, la calcineurine. Ces différents travaux seront abordés dans la partie résultat de ce travail.

### 4.3 Détermination de l'activité de la calcineurine

La séparation des PBMC du sang total est effectuée comme précisé précédemment dans le paragraphe 4.2.1. Les cellules sont lysées par adjonction de 20  $\mu$ L d'un tampon de lyse constitué de KCl 1M,  $MgCl_2$  1M, Tris-HCl pH 8,3 1M, Nonidet P40 (Sigma, St Quentin Fallavier, France), Tween 20 (Sigma, St Quentin Fallavier, France) et dithiothreitol (DTT) (Sigma, St Quentin Fallavier, France) et stockées à  $-80^\circ C$  jusqu'à analyse et au maximum 1 mois. L'activité de la phosphatase est évaluée grâce à un peptide substrat préparé à façon (Bachem, Bubendorf, Suisse) et dont la séquence (D-L-D-V-P-I-P-G-R-F-D-R-R-V-S-V-A-A-E) correspond à la sous-unité RII d'une protéine kinase Adénosine monophosphate cyclique (cAMP) dépendante (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Ce peptide (3,6 mg), dissous dans 4 mL de tampon HEPES (50 mM, pH = 7,4) additionné de 10 mM d'acétate d'ammonium, 1 mM d'adénosine triphosphate (ATP), 1 mM de cAMP et 1 mM d'acide éthylène glycol tétraacétique (EGTA) est phosphorylé par la kinase. L'initiation de la réaction se fait à  $30^\circ C$  par addition de 3  $\mu$ g/mL de protéine kinase pendant 15 minutes.

La mesure de la transformation du peptide phosphorylé est effectuée avant initiation de la réaction puis après 30 min, 60 min et 90 min. Le peptide phosphorylé va permettre d'évaluer par la suite le niveau de phosphorylation résiduelle et donc par retour l'activité phosphatasique de la calcineurine.

En raison de la présence physiologique de plusieurs autres phosphatases pouvant donner lieu à interférence durant la réaction par compétition avec la calcineurine, il est nécessaire d'inhiber de manière spécifique ces phosphatases interférentes. Ainsi, l'acide okadaïque est utilisé afin d'inhiber l'action de deux phosphatases (PP1 et PP2A). Une troisième

phosphatase (PP2C) nécessite, pour son activation, la présence de magnésium dans le milieu réactif. Ainsi, l'utilisation d'un milieu réactif dépourvu de magnésium permet également de parer aux réactions interférentes avec cette phosphatase (Figure 10).

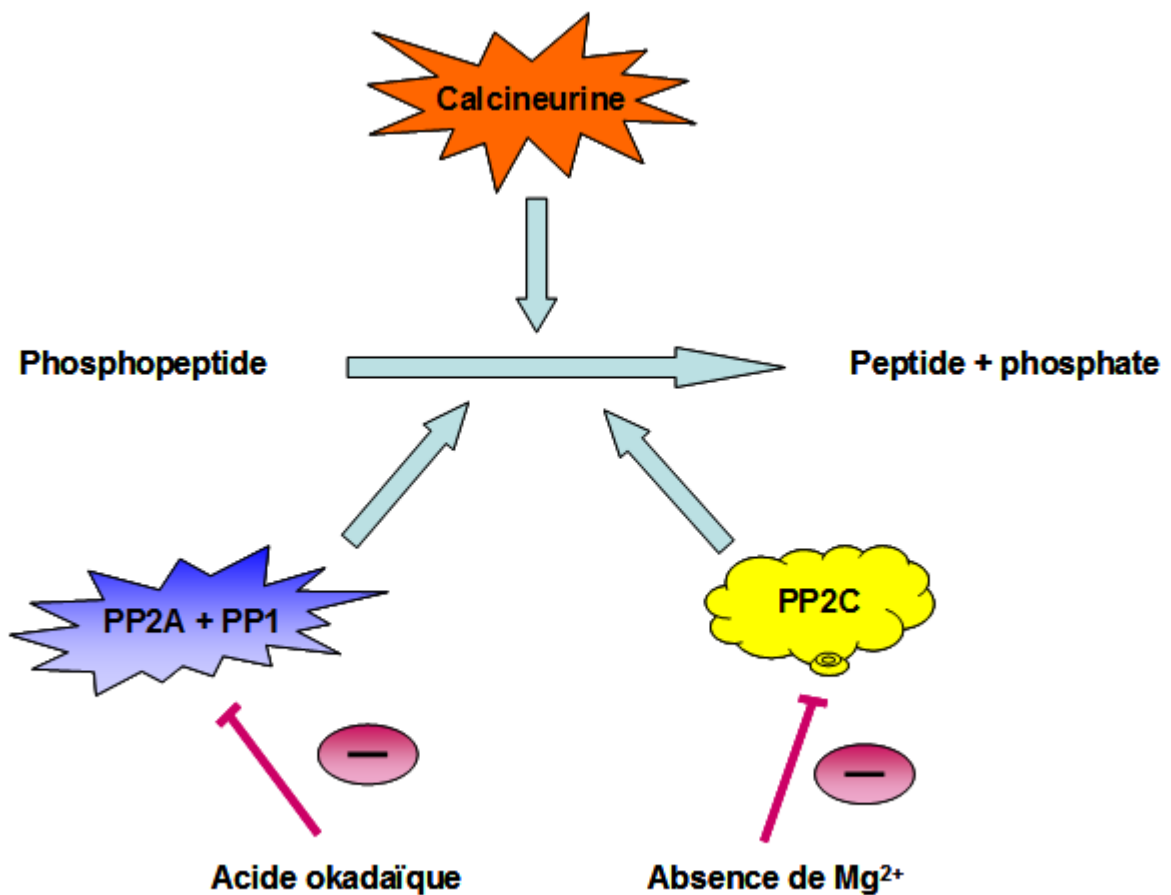


Figure 10. Principe de l'inhibition des phosphatases interférentes lors de la détermination de l'activité de la calcineurine.

L'activité phosphatasique de la calcineurine est mesurée à 30°C dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl, 0,1 mM d'EGTA, 0,5 mM de dithiothreitol, 0,3 mg/mL d'albumine sérique bovine (BSA), 0,1 µM de calmoduline, 1 mM de chlorure de manganèse et 1 µM de

chlorure de calcium. Les aliquots de PBMC sont mélangés à 160  $\mu\text{L}$  de ce tampon et 500 nM d'acide okadaïque puis mis à incuber à 30°C pendant 15 min avant ajout du substrat. Après 10 min de réaction, un aliquot de 100  $\mu\text{L}$  est prélevé et les quantités de peptide phosphorylé et déphosphorylé sont mesurées par une méthode chromatographique liquide couplée à une détection par ultraviolet (HPLC-UV) à 205 nm (Figure 11).

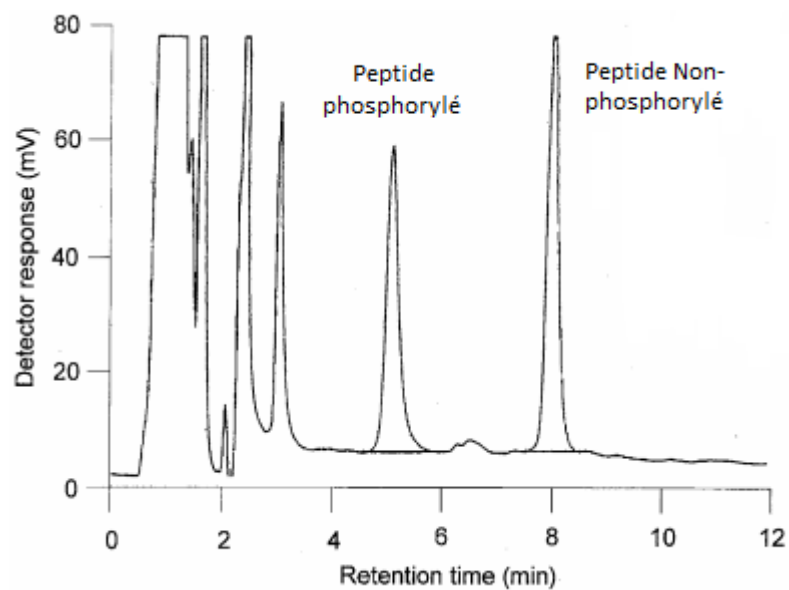


Figure 11. Exemple de chromatogramme obtenu par HPLC-UV lors de la détermination de l'activité de la calcineurine. Adapté de Blanchet *et al.* (92).

La stabilité des prélèvements de PBMC à -80° ayant été évaluée comme étant satisfaisante jusqu'à 1 mois, la détermination de l'activité de la calcineurine doit être effectuée dans le mois suivant le prélèvement et la séparation cellulaire.

#### **4.3.1 Conclusion**

Cette méthode de détermination de l'activité de la calcineurine a pu être appliquée lors de l'étude conjointe des concentrations sanguines et intracellulaires de tacrolimus et de l'activité de la calcineurine menées chez le transplanté hépatique dans le but de décrire la relation existant entre les concentrations sanguines de tacrolimus, les concentrations intracellulaires de tacrolimus et l'effet sur la protéine cible de la molécule, la calcineurine.

## **5. Résultats**

### **5.1 1<sup>ère</sup> étude : Elaboration d'un modèle pharmacocinétique de l'évérolimus chez le transplanté cardiaque par approche de population (Annexe 1 – Article 1)**

#### **5.1.1 Rationnel**

L'objectif de cette étude était de mettre au point et de valider un modèle de la pharmacocinétique de l'évérolimus chez le transplanté cardiaque par une approche de population et ce, à partir de données du suivi thérapeutique pharmacologique usuel des patients suivis au sein du Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière (Paris). Ce travail a pour objectif d'identifier les covariables, y compris génétiques, influençant la pharmacocinétique de l'évérolimus chez ces patients et de prédire les concentrations en évérolimus afin de proposer des adaptations de posologie individualisées. Lors de l'initiation de ce travail de doctorat, un seul modèle de la pharmacocinétique de l'évérolimus par approche de population avait été publié (93). Peu de temps avant la publication de cette partie de notre travail, un modèle concernant le patient transplanté rénal a également été publié (94).

### 5.1.2 Patients et collection des données

Cinquante neuf patients (13 femmes et 46 hommes) traités par évérolimus ont été inclus dans cette étude. Les patients étaient transplantés depuis un délai de 26 à 6621 jours. Les inclusions se sont faites prospectivement pendant 22 mois. Dix patients avaient reçu de l'évérolimus *de novo* tandis que les 49 autres ont été préalablement traités par mycophénolate mofétil ou azathioprine puis par évérolimus. Quarante-deux patients recevaient une association de ciclosporine ( $155,5 \pm 58,1$  mg/jour) et d'évérolimus. Les autres patients recevaient en association avec l'évérolimus, du tacrolimus ( $n = 12$ ) ou du mycophénolate mofétil ( $n = 4$ ). Les posologies de prednisone ou prednisolone reçue par les patients s'étaient de 5 à 100 mg/jour (moyenne  $14,7 \pm 7,6$  mg/jour).

Les patients inclus présentaient un génotype *CYP3A5* AA, GA et GG selon la fréquence suivante : 6,7%, 17,8% et 75,5% et un génotype *ABCB1* CC, CT et TT selon la fréquence suivante : 37,8%, 48,9% et 13,3%. L'ensemble de ces données a été utilisé pour la modélisation pharmacocinétique et est présenté dans le tableau 7.



Tableau 7. Données démographiques, biologiques et thérapeutiques des 59 patients inclus dans l'étude d'après (95). BW : Bodyweight (Poids), TGO : Aspartate aminotransférase, TGP : Alanine aminotransferase, EVE : Everolimus.

<b>Patients</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>Median</b>	<b>Range</b>
<b>Physiological characteristics</b>				
Age (yrs)	50	14	53	17–80
BW (kg)	72	16	70	44–129
Postoperative day (d)	1590	1786	826	26–6621
<b>Biological parameters</b>				
Protein (g/L)	72.8	5.8	73	58–91
Albumin (g/L)	42.1	3.9	42	28–52
Creatinine ( $\mu\text{mol/L}$ )	148.7	50.2	145	55–380
Total bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	9.2	4.5	8	2–33
TGO (UI/mL)	36.7	29.3	29	11–265
TGP (UI/mL)	34.1	27.4	27	8–221
Hematocrit (%)	36.3	5.3	35.6	23–55
<b>Comedications</b>				
<b>Cyclosporine</b>				
No. patients	47	—	—	—
Dose (mg/24 h)	155.5	58.1	157	40–350
<b>Oral corticosteroids</b>				
No. patients	59	—	—	—
Oral corticosteroid dose (mg)	14.7	7.6	12.5	5–100
<b>EVE treatment</b>				
<b>EVE</b>				
No. samples	775	—	—	—
EVE concentration (ng/mL)	6.1	2.7	5.8	2.0–18.1
EVE dose per day (mg)	1.4	0.5	1.5	0.5–5

### 5.1.3 Modélisation pharmacocinétique par approche de population

Au total, 775 concentrations résiduelles d'évérolimus étaient disponibles pour la mise au point du modèle. La répartition des concentrations résiduelles est représentée figure 12.

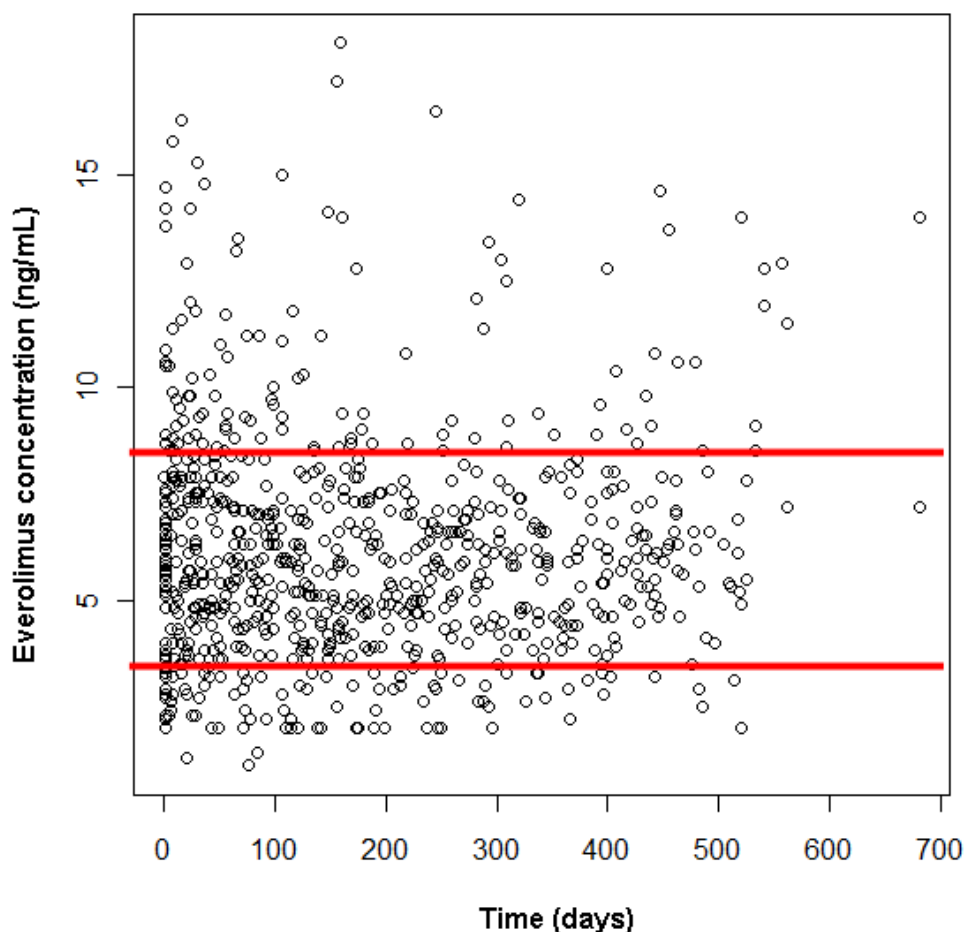


Figure 12. Concentrations résiduelles d'évérolimus (ng/mL) mesurées chez les 59 patients de l'étude (n=775 points)

Les patients inclus ont bénéficié en moyenne de 13,1 dosages au cours de la période d'inclusion avec des extrêmes allant de 3 à 36 dosages. Les paramètres du modèle structural étaient la clairance et le volume de distribution de l'évérolimus. Puisque uniquement des

concentrations résiduelles étaient disponibles, la constante d'absorption ( $K_a$ ) était fixée à 6,0 par heure selon les valeurs décrites dans la littérature (93). La variabilité inter-individuelle était décrite de manière la plus satisfaisante avec un modèle d'erreur exponentiel selon la formule suivante :

$$CL = TV(CL) \times EXP(\eta_{jCL})$$

où CL est la clairance de l'évérolimus, TV(CL) la valeur typique de la clairance et  $\eta_{jCL}$  une variable aléatoire distribuée selon une moyenne de 0 et une variance de  $\omega^2_{CL}$  qui peut être estimée par le logiciel et qui représente la variabilité pharmacocinétique existant entre les patients de la population.

L'erreur résiduelle était décrite au mieux par un modèle d'erreur proportionnel et additif selon la formule suivante :

$$C_{ij} = C_{pred\ ij} + (a + C_{pred\ ij}) \times \varepsilon_{ij}$$

où  $C_{ij}$  représente les concentrations observées,  $C_{pred\ ij}$  les concentrations prédites par le modèle pharmacocinétique, et  $\varepsilon_{ij}$  la différence entre les concentrations observées et les concentrations prédites, variable distribuée aléatoirement centrée sur 0 et de variance  $\sigma^2$ .

Il n'y avait aucun impact de la variabilité inter-occasion sur le modèle.

Aucune covariable testée (sexe, poids, âge, taille, délai post-opératoire, présence ou absence de corticoïdes, posologie des corticoïdes, présence ou absence de ciclosporine, posologie de ciclosporine, concentration résiduelle de ciclosporine, protéinémie,

créatininémie, hémocrite, aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase, bilirubinémie) n'influençait significativement le volume de distribution de l'évérolimus. Aucune des variables suivantes n'influençait significativement la clairance de l'évérolimus : poids, âge, taille, délai post-opératoire, présence ou absence de corticoïdes, posologie des corticoïdes, posologie de ciclosporine, concentration résiduelle de ciclosporine, protéinémie, créatininémie, hémocrite, aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase. Le sexe, la bilirubinémie et la présence ou l'absence de ciclosporine étaient les facteurs influençant la clairance de l'évérolimus avec des diminutions de la fonction objective de 8,7 ; 19,0 et 37,6 points respectivement.

De manière intéressante, aucune des covariables génétiques testées (*CYP3A5* et *ABCB1*) n'influençait significativement le modèle. La clairance apparente de l'évérolimus semblait plus importante chez les patients exprimant le *CYP3A5* (\*1/\*1 et \*1/\*3) que chez les patients ne l'exprimant pas, sans que la différence soit significative même si une tendance en ce sens était notable (figure 13). Le génotype *ABCB1* n'influençait pas le modèle.

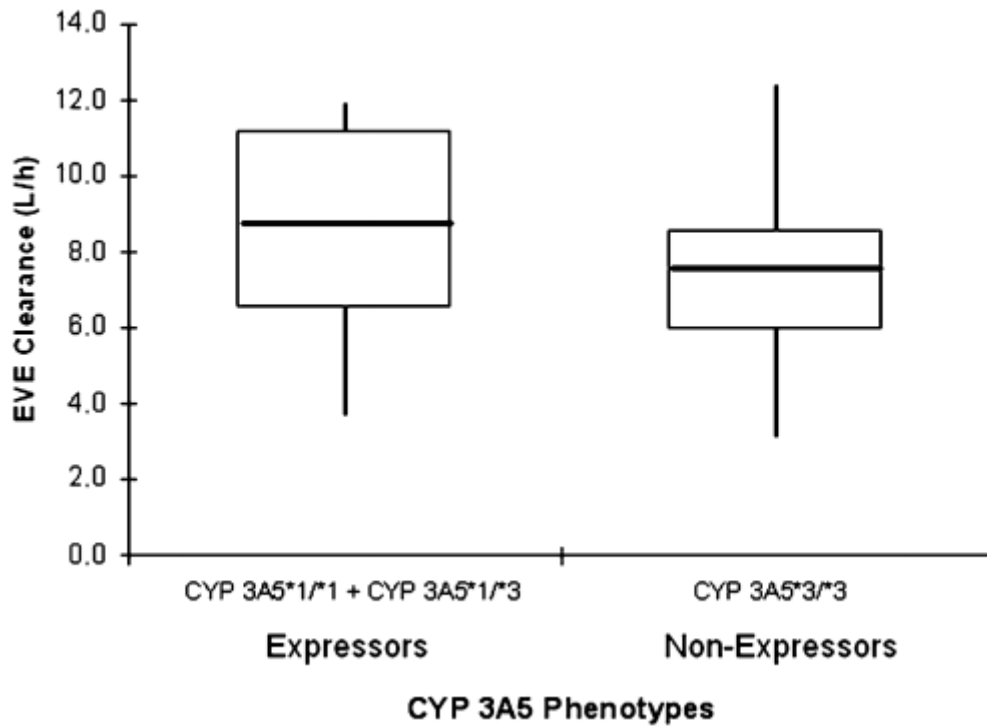


Figure 13. Répartition des clairances d'évérolimus en fonction des génotypes *CYP3A5* des patients inclus dans l'étude.

Le modèle intermédiaire a donc permis d'identifier trois variables d'intérêt qui ont été évaluées. La variable « sexe du patient » n'a pas atteint l'objectif et n'a pas été conservée dans le modèle final.

A l'issue de cette procédure, le modèle final décrivant la clairance de l'évérolimus était :

$$CL/F = 3,33 \times [(8/BILI)^{0,28} + 2,05^{CSA}]$$

où CL/F est la clairance apparente de l'évérolimus, BILI la valeur de la bilirubinémie du patient et CSA le facteur décrivant la présence (CSA = 1) ou l'absence (CSA = 0) de ciclosporine dans le traitement du patient.

L'estimation des paramètres pharmacocinétiques de l'évérolimus par le modèle était comparable à celle faite dans les travaux de Kovarik *et al.* avec une clairance apparente de  $3,33 \pm 0,20$  L/h et un volume de distribution de  $146 \pm 33$  L (93).

Le tableau 8 présente la synthèse des effets des covariables sur la clairance.

Tableau 8. Résumé des effets significatifs des covariables testées sur la clairance apparente de l'évérolimus d'après (95).

Parameter	Covariate Relationship	Objective Function (OFV)	$\Delta$ OFV	BSV (%)	Influential Factors	RSE	RSE Eta
Sex	Structural model	2040.7	—	30.3	—	9.4	24.1
	$CL/F = TV(CL) \times (1 + \theta_{SEX})^{SEX}$	2032.0	-8.7	28.3	TV (CL) = 6.92 $\theta_{SEX} = 0.42$	8.7 38.1	28.6 —
Bilirubinemia	$CL/F = TV (CL) \times (8/BILI)^{\theta_{BILI}}$	2021.7	-19.0	30.6	TV (CL) = 7.51 $\theta_{BILI} = 0.15$	8.5 33.4	24.5 —
Cyclosporine	$CL/F = TV (CL) \times (1 + \theta_{CSA})^{CSA}$	2003.1	-37.6	27.6	TV (CL) = 6.52 $\theta_{CSA} = 0.64$	6.5 35.2	26.6 —
	Final model $CL/F = TV(CL) \times [(8/BILI)^{\theta_{BILI}} + (1 + \theta_{CSA})^{CSA}]$	1987.1	-53.6	27.5	TV (CL) = 3.33 $\theta_{BILI} = 0.28$ $\theta_{CSA} = 2.05$	6.0 32.2 20.6	26.0 — —

Between-subject variability (BSV) was calculated as the square root of the interindividual error value (Eta) and was expressed as a percentage. Residual standard error (RSE) was calculated as the standard error of TV (CL) over the TV (CL) value, and residual standard error of Eta (RSE Eta) was calculated as the standard error of Eta over the Eta value.

Les graphiques des concentrations prédites par le modèle et/ou des concentrations individuelles prédites par le modèle en fonction des concentrations observées ainsi que le graphique des résidus individuels pondérés en fonction du temps ne montraient pas de biais (Figure 14.)

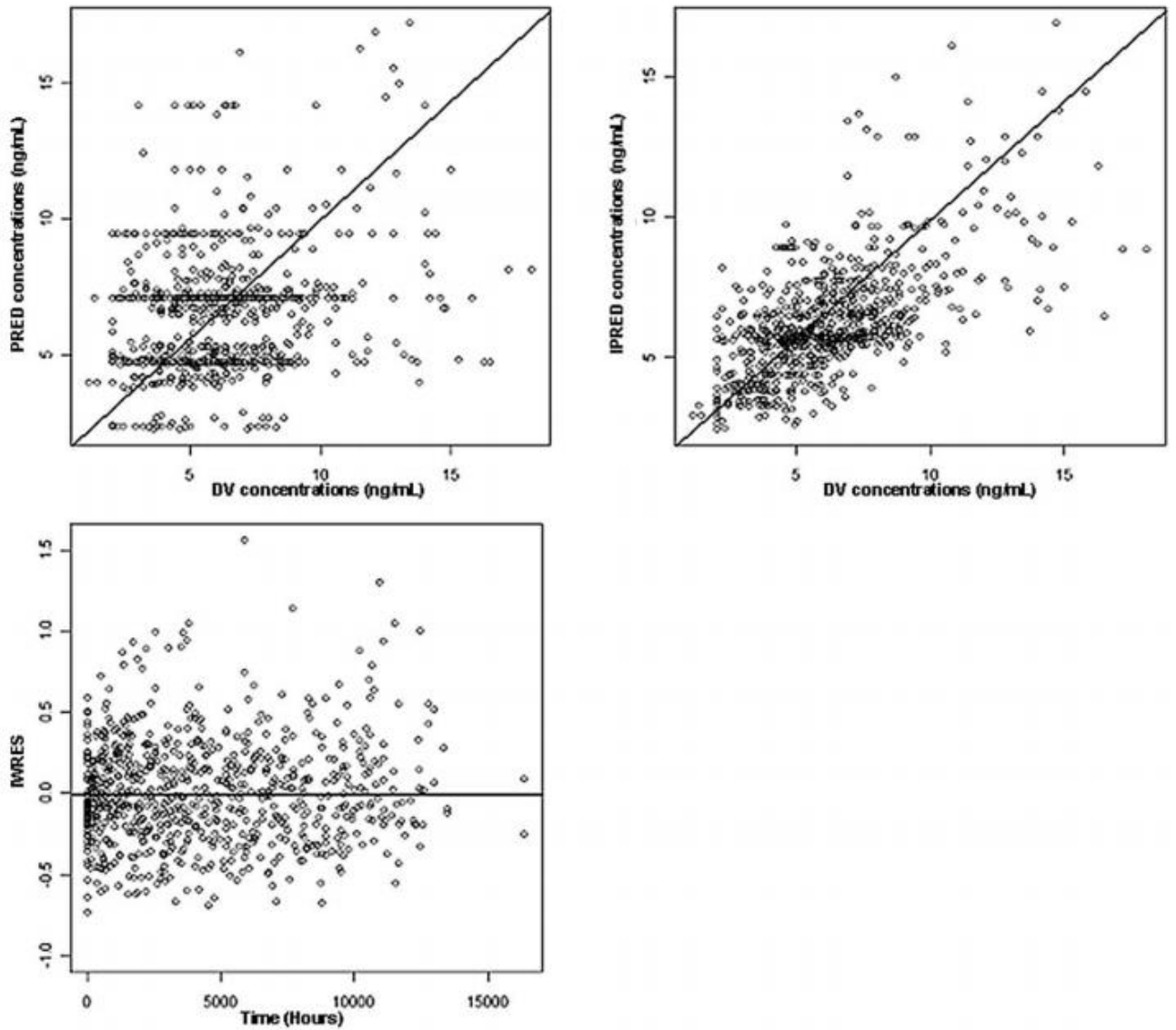


Figure 14. Graphiques des concentrations prédites (PRED) en fonction des concentrations observées (DV), des concentrations individuelles prédites (IPRED) en fonction des concentrations observées (DV) et des résidus individuels pondérés (IWRES) en fonction du temps (TIME) d'après (95).

#### 5.1.4 Validation du modèle

Le modèle final a été validé en utilisant la procédure du bootstrap et du visual predictive check (VPC).

La moyenne  $\pm$  écart-type de chacun des paramètres du modèle final était comprise entre les 2,5ème et 97,5ème percentiles des valeurs obtenues au cours du bootstrap (tableau 9).

Tableau 9. Paramètres pharmacocinétiques de l'évérolimus obtenus chez 59 transplantés cardiaques et par la méthode du bootstrap d'après (95).

Parameter	Original Data Set		Bootstrap	
	Mean	SD	Median	Percentiles 2.5th–97.5th
<b>Structural model</b>				
Apparent clearance				
TV ( $CL_{min}$ ), L/h	3.33	0.20	3.37	3.02–4.00
$\theta$ -Bilirubinemia	0.28	0.09	0.27	0.10–0.47
$\theta$ -Cyclosporine	2.05	0.42	2.03	1.20–2.82
Apparent volume of distribution				
V (L)	146	33	152	99–298
Absorption constant				
Ka fixed (h)	6.0	—	6.0	—
<b>Statistical model</b>				
Residual additive variance, $\delta^2$ (ng/mL)	0.611	0.358	0.638	0.001–1.440
Residual proportional variance, $\delta^2$ (%)	0.090	0.014	0.088	0.060–0.117
$\omega CL_{min}$ (%)	0.076	0.020	0.077	0.044–0.136



Par la méthode du VPC, les données observées ont ensuite été superposées à l'intervalle de prédiction : seules 2,06% des concentrations étaient à l'extérieur de l'intervalle de prédiction (Figure 15).

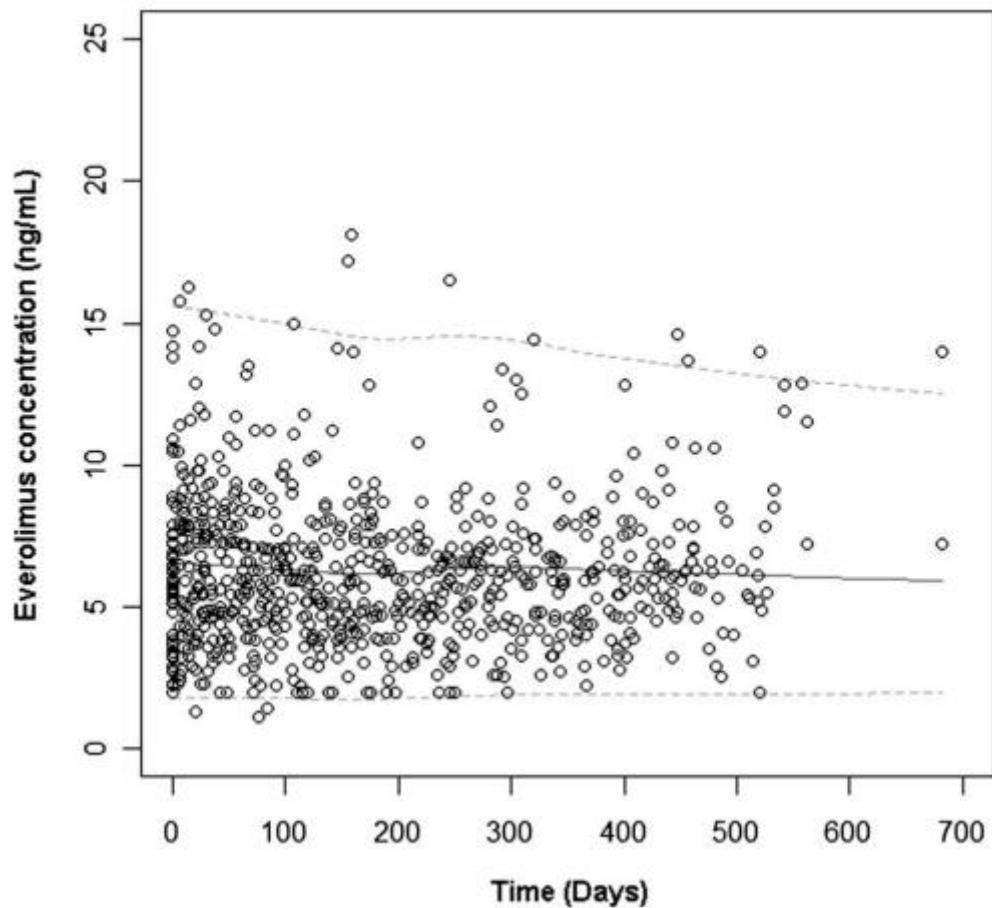


Figure 15. Résultat obtenu par la procédure du visual predictive check (VPC). Les lignes en pointillés représentent les 2,5<sup>ème</sup> et 97,5<sup>ème</sup> percentiles, la ligne continue le 50<sup>ème</sup> percentile des concentrations prédites.

### 5.1.5 Conclusions

Ce travail a permis de mettre au point le premier modèle de pharmacocinétique de population de l'évérolimus chez le transplanté cardiaque. Un certain nombre de covariables censées influencer la pharmacocinétique de l'évérolimus, notamment les génotypes *CYP3A5* et *ABCB1*, n'ont pas été mis en évidence au cours de ce travail. En revanche, la bilirubinémie ainsi que l'association à la ciclosporine sont des déterminants majeurs de la pharmacocinétique de l'évérolimus. La prédiction des concentrations d'évérolimus chez le transplanté cardiaque est rendue possible par ce modèle et doit permettre de limiter les sous- et sur-expositions lors des traitements par cet immunosuppresseur.

## 5.2 Dosages intracellulaires d'immunosuppresseurs

### 5.2.1 2<sup>nd</sup>e étude : dosage de l'évérolimus dans les PBMC (Annexe 2 – Article 2)

#### 5.2.1.1 Rationnel :

Le second outil d'optimisation de l'utilisation des IS élaboré a consisté en la mise au point d'une méthode de dosage de l'évérolimus dans les PBMC. L'évérolimus étant une molécule présentant une importante variabilité pharmacocinétique, notamment en raison de sa forte fixation aux protéines plasmatiques et de son caractère substrat des cytochromes 3A5, 3A4 et 2C8 ainsi que d'ABCB1, ses concentrations sanguines apparaissent comme étant imprévisibles (26,42,45). Ces caractéristiques pharmacocinétiques peuvent également modifier sa distribution intracellulaire et, par conséquent, son efficacité. Le lymphocyte étant le compartiment-effet de l'évérolimus, les PBMC apparaissent comme une matrice biologique plus intéressante que le sang total dans l'évaluation de l'efficacité du traitement. Cette étude décrit la validation d'une méthode de dosage de l'évérolimus dans les PBMC et son application clinique chez des patients transplantés cardiaques.

La technique analytique choisie est la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. La méthode de dosage a été validée selon les recommandations publiées par l'ICH (89) sur les critères suivants : répétabilité, fidélité intermédiaire, linéarité, sélectivité, limite de quantification, effet de matrice et rendement d'extraction.

### **5.2.1.2 Résultats :**

Validation de la méthode :

La validation de la méthode analytique a montré que celle-ci était spécifique (absence de composés interférents séparés et détectés dans les mêmes conditions que l'évérolimus), linéaire, fidèle et permettait de quantifier des concentrations de 1,25 ng/mL (CV 14,7%) (Tableau 9).

#### **5.2.1.2.1 Répétabilité**

Au cours de la validation de la méthode de dosage de l'évérolimus dans les PBMC, la justesse était de 12,4% ; 6,4% et de 8,5% respectivement pour les trois niveaux de contrôle tandis que l'exactitude était de 102,2% ; 101,0% et 97,1% respectivement pour les trois niveaux de contrôle testés (Tableau 9).

#### **5.2.1.2.2 Fidélité intermédiaire**

Les valeurs de CV et de recouvrement au cours des essais de fidélité intermédiaire étaient, respectivement pour les trois niveaux de contrôle, de 12,0 % ; 6,4% et 11,0% pour le CV et de 99,5% ; 96,6% et 99,8% pour ce qui est du recouvrement (Tableau 10).

### 5.2.1.2.3 Linéarité

La linéarité a été testée pendant trois jours consécutifs en calculant le coefficient de détermination ( $R^2$ ) de la droite de calibration. Celui-ci devait être supérieur à 0,98. Les droites de calibrations étaient linéaires sur l'ensemble de la gamme d'étalonnage avec des coefficients de détermination allant de 0,984 à 0,997.

Tableau 10. Critères de validation de la méthode de dosage de l'évérolimus dans les PBMC d'après (90). CV : Coefficient de variation

Theoretical EVE concentration (ng/mL)	Extraction recovery (n = 6)	Accuracy % (n = 18)	CV%	
			Intraday (n=)	Interday (n=)
2.5	87.1	99.5	12.1	12.0
5.0	83.4	96.6	6.4	6.4
10.0	79.4	99.8	8.5	11.0

### 5.2.1.2.4 Spécificité

La spécificité de la méthode a été étudiée par analyse d'extraits de PBMC obtenus chez plusieurs patients transplantés cardiaques. Ces extraits ne contenaient pas d'évérolimus et aucun autre pic chromatographique n'interférait avec l'évérolimus. Aucune interférence analytique n'a été rapportée au cours de ces essais.

#### **5.2.1.2.5 Limite de quantification**

La limite basse de quantification de la méthode a été choisie comme étant le premier point de la gamme de calibration dans les PBMC. Le CV a été évalué à partir de la répétition de 3 surcharges de PBMC déterminées afin d'atteindre la concentration du premier point de gamme. La limite de quantification a ainsi pu être fixée à 1,25 ng/mL avec un CV de 14,7%.

#### **5.2.1.2.6 Rendement et effet de matrice**

Le rendement moyen pour l'extraction de l'évérolimus a varié entre 79 et 87% selon le niveau de concentration testé. L'effet matrice était de 91,7% (évérolimus 5 ng/mL).

#### **5.2.1.3 Application clinique chez le patient transplanté cardiaque**

Après mise au point et validation de la méthode de dosage, celle-ci a été appliquée chez le patient transplanté cardiaque. Les concentrations sanguines ont été mesurées chez 36 patients transplantés cardiaques à partir de sang total collecté sur EDTA. Ces patients étaient traités par évérolimus depuis un minimum de 6 mois au moment de leur inclusion dans l'étude. Ils étaient considérés comme à l'état stable à la fois en ce qui concerne leur transplantation et du point de vue de leur traitement immunosuppresseur. Aucune modification de posologie dans les cinq jours précédant l'inclusion du patient dans l'étude n'était autorisée. Les patients étaient informés de la réalisation de l'étude et avaient donné leur consentement à leur participation.

Ces patients recevaient une dose moyenne d'évérolimus de  $1,34 \pm 0,79$  mg/j (posologies allant de 0,5 à 5 mg/j). Les patients étaient également traités par ciclosporine ou tacrolimus et corticoïdes. Les concentrations mesurées étaient des concentrations résiduelles, le prélèvement étant effectué  $12 \pm 1$  h après administration de l'évérolimus. Une fois la détermination de la concentration sanguine en évérolimus effectuée par LC-MS/MS, le sang total restant était utilisé afin de déterminer les concentrations en évérolimus dans les PBMC (Figure 16). Ainsi, aucun prélèvement supplémentaire autre que celui requis usuellement pour le suivi thérapeutique pharmacologique des concentrations d'IS n'était demandé aux patients inclus dans l'étude. La procédure d'extraction des cellules et leur numération était celle décrite dans les paragraphes précédents. Les prélèvements sanguins des patients contenaient de 0,5 à 12,5 millions de PBMC et les concentrations mesurées allaient de 40 à 470 pg/million de cellules.

Le volume moyen d'un PBMC étant de 200 femtolitres, un million de cellules équivalent à environ 200 nanolitres (96,97). Les concentrations mesurées au cours de l'étude variaient donc de 0,20  $\mu\text{g/mL}$  à 2,35  $\mu\text{g/mL}$ . Comparativement aux concentrations mesurées dans le sang total, les concentrations mesurées dans les PBMC apparaissent donc comme étant environ mille fois plus élevées que dans le sang ( $\mu\text{g/mL}$  versus  $\text{ng/mL}$ ). Le facteur de diffusion de l'évérolimus du sang vers les PBMC est donc de l'ordre de 100 à 1000.

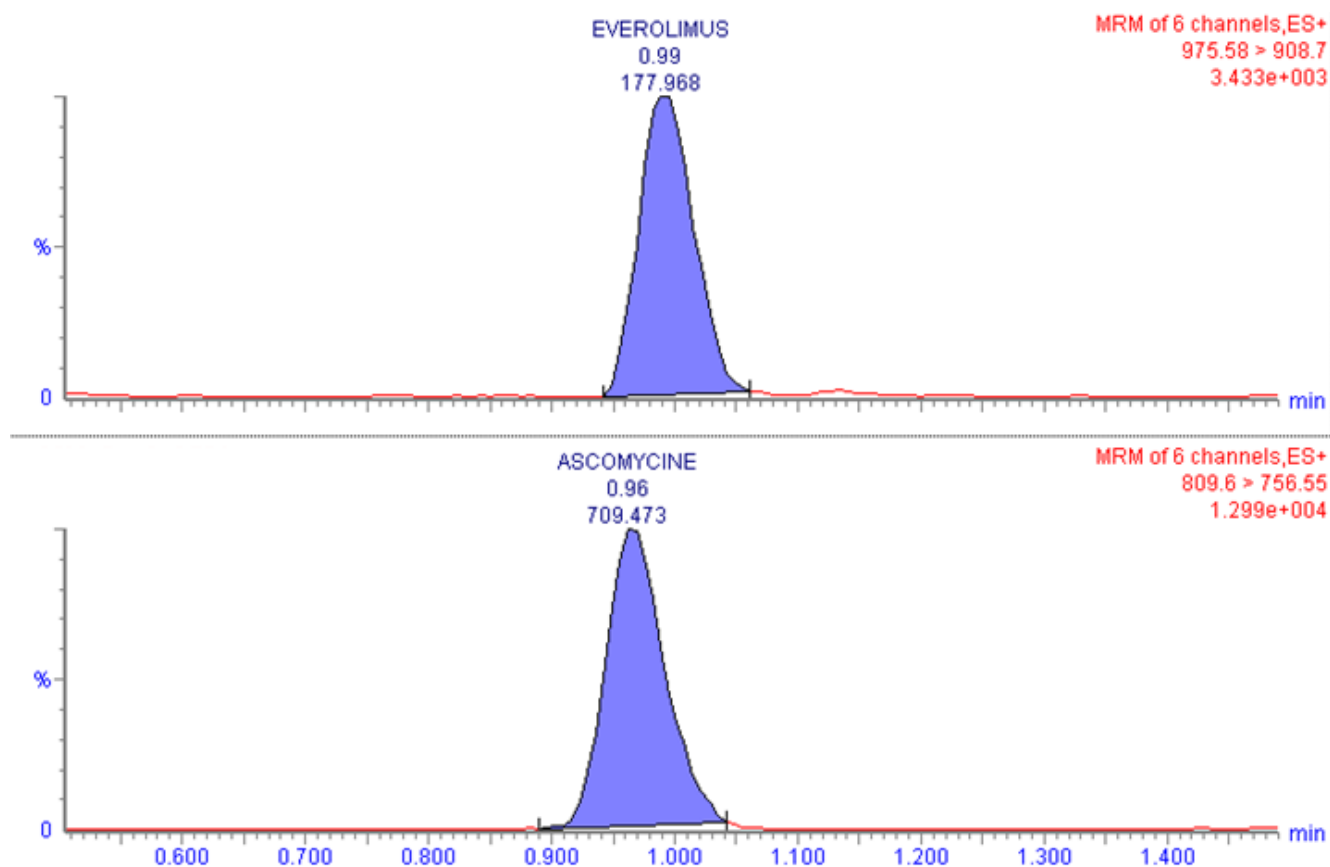


Figure 16. Exemple de chromatogrammes d'évérolimus et d'étalon interne obtenus chez un patient transplanté cardiaque traité par 0,75 mg d'évérolimus matin et soir.

Nous avons ensuite étudié la relation entre les concentrations sanguines en évérolimus et les concentrations en évérolimus dans les PBMC chez les 36 patients inclus. La corrélation entre les deux types de concentrations était faible mais mise en évidence par le test de la pente de la droite de régression ( $r^2 = 0,558$  ;  $p = 0,0002$ ) (Figure 17).



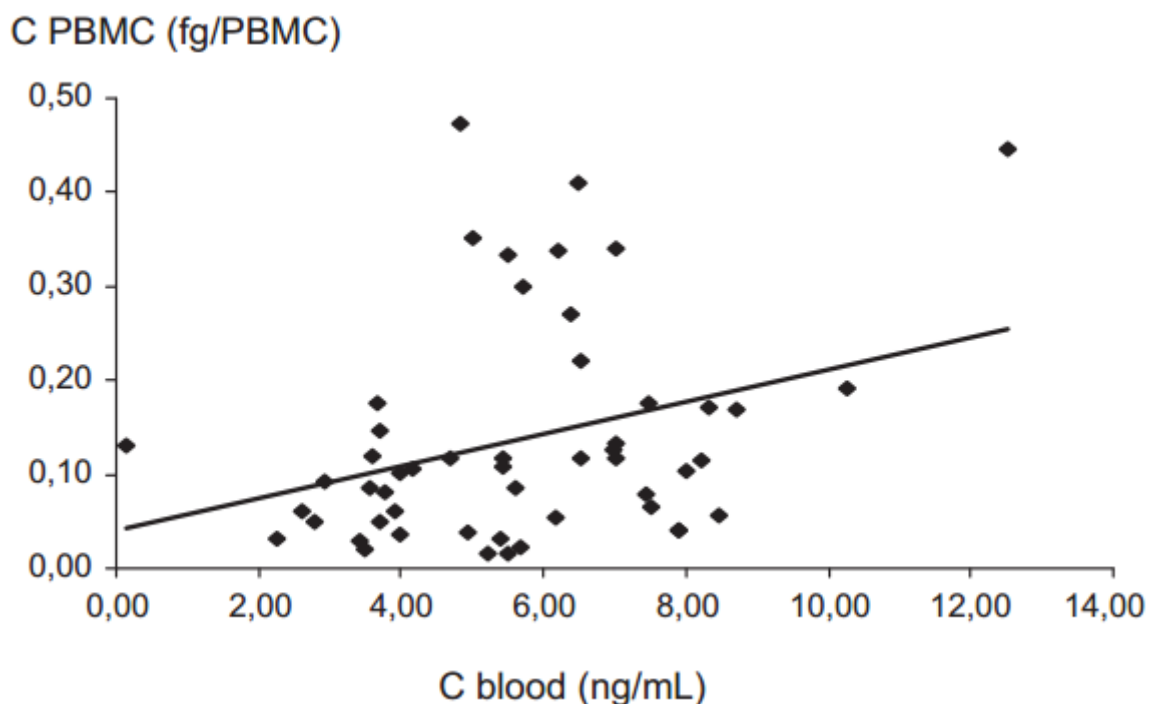


Figure 17. Concentrations en évérolimus dans les PBMC en fonction des concentrations sanguines en évérolimus chez 36 patients transplantés cardiaques à l'équilibre de leur traitement.

#### **5.2.1.4 Conclusion**

Nous avons pu mettre au point et valider une méthode de dosage de l'évérolimus dans les cellules mononuclées de patients transplantés. La méthode s'est montrée robuste et sensible et apparait comme un nouvel outil de monitoring des traitements par évérolimus.

La corrélation existant entre les concentrations sanguines et les concentrations intracellulaires ne permet pas d'invalider le STP tel qu'il est réalisé en routine, à savoir par mesure des concentrations sanguines totales. En l'absence de données cliniques rapportées chez les patients de cette étude, nous ne pouvons pas conclure à une supériorité de l'une ou de l'autre de ces méthodes.

La corrélation entre concentrations sanguines et intracellulaire montre que dans le cas de l'évérolimus, le facteur de variabilité interindividuelle identifié (activité du transporteur ABCB1) n'est peut être pas déterminant. L'hypothèse selon laquelle le dosage intracellulaire de l'évérolimus serait un meilleur moyen de prévention du rejet n'a pas pu être vérifiée par nos essais. Néanmoins, cette hypothèse était justifiée par le fait que la fraction intracellulaire est la fraction effectivement active.

### **5.2.2 3<sup>ème</sup> étude : Dosages du tacrolimus dans les PBMC (Annexe 3 - Article 3)**

#### **5.2.2.1 Rationnel**

Le troisième outil élaboré au cours de ce travail de doctorat a été une méthode de dosage du tacrolimus dans les cellules mononuclées. Comme l'évérolimus, le tacrolimus est une molécule qui présente une variabilité pharmacologique extrêmement importante liée à un métabolisme hépatique médié par les cytochromes, et en particulier le CYP3A5, et à un caractère substrat des transporteurs de médicament, notamment ABCB1 (24,98). La protéine ABCB1 peut jouer un rôle clef dans la diffusion intracellulaire du tacrolimus en raison de sa localisation au niveau de la membrane du lymphocyte. Ainsi, elle peut limiter, par efflux de la molécule, l'entrée du tacrolimus au niveau de son site d'action. L'expression et la fonctionnalité de ce transporteur peuvent par ailleurs être modulées génétiquement et/ou sous l'effet d'autres médicaments inducteurs ou inhibiteurs. La variabilité des concentrations intracellulaires en tacrolimus se trouve alors renforcée. C'est pourquoi, il nous est apparu pertinent de mettre au point une méthode de dosage du tacrolimus dans les PBMC afin de pouvoir évaluer, au plus proche du site d'action, les concentrations en immunosuppresseur. Les concentrations en tacrolimus dans les PBMC, en tant que compartiment cible du médicament, pourraient ainsi constituer un meilleur reflet de l'effet immunosuppresseur du médicament que ne le sont les concentrations sanguines.

La méthode de dosage a tout d'abord été validée selon les recommandations publiées par l'ICH (89) avec évaluation des critères de répétabilité, fidélité intermédiaire, linéarité, limite de quantification, effet de matrice et rendement d'extraction.

Un certain nombre de données existant déjà sur la pharmacocinétique du tacrolimus dans les PMBC de patients transplantés rénaux et hépatiques, nous avons centré l'application clinique découlant de la mise au point de ce travail sur la pharmacocinétique du patient transplanté cardiaque.

### **5.2.2.2 Résultats**

#### **5.2.2.2.1 Répétabilité**

La précision de la méthode a été déterminée en réalisant, au cours d'une même journée, 6 contrôles de qualité à 2 niveaux de concentration 50 et 200 pg/million de PBMC.

Dans le cas de la méthode de dosage du tacrolimus dans les PBMC, la justesse était de 8,6 et 9,0% pour les contrôles à 50 et 200 pg/million PBMC.

#### **5.2.2.2.2 Fidélité intermédiaire**

La fidélité intermédiaire a été déterminée en réalisant trois séries de mesures de 6 contrôles de qualité à deux niveaux de concentrations différents (50 et 200 pg/million de PBMC). L'objectif est un CV inférieur à 15%. Ces valeurs étaient, respectivement pour les deux niveaux de contrôle, de 2,8% et 8,8%.

Pour l'exactitude, le recouvrement variait de 95,6% à 99,9% sur l'ensemble des niveaux de concentration testés.

#### **5.2.2.2.3 Linéarité**

Les droites de calibrations étaient linéaires sur l'ensemble de la gamme d'étalonnage (de 12,5 à 250 pg/million de cellules) avec des coefficients de détermination allant de 0,984 à 0,997.

#### **5.2.2.2.4 Limite de quantification**

La limite basse de quantification de la méthode a été choisie comme étant le premier point de la gamme de calibration dans les PBMC car celui-ci présentait un CV inférieur à 15% lors de la répétition des mesures à cette concentration. La limite de quantification a ainsi pu être fixée à 12,5 pg/million de PBMC.

#### **5.2.2.2.5 Rendement et effet de matrice**

Le rendement moyen de la méthode pour le tacrolimus était de 97,2% et 103,4% pour les 2 niveaux de contrôle.

L'effet de matrice calculé pour le tacrolimus à 50 et 200 pg/million de PBMC était respectivement de 96,1% et 97,7%. L'effet de matrice calculé pour l'étalon interne à la concentration de 2 ng/mL était de 96,0%.

#### **5.2.2.2.6 Application clinique de la méthode de dosage du tacrolimus dans les PBMC chez le patient transplanté cardiaque**

Comme rappelé précédemment, des données de pharmacocinétique du tacrolimus dans les PBMC de patients transplantés rénaux et hépatiques avaient déjà été rapportées dans la littérature (99–101). En revanche, aucune donnée n'existait en ce qui concerne la pharmacocinétique du tacrolimus dans les PBMC de patients transplantés cardiaques. Ainsi, vingt-quatre patients (16 hommes et 8 femmes) transplantés cardiaques ont été inclus au cours d'une période de 4 mois. Ces patients étaient traités par tacrolimus initialement à la posologie de 2 mg matin et soir puis la posologie était adaptée en fonction des résultats du suivi thérapeutique pharmacologique avec des cibles de concentration résiduelle de 10 à 15 ng/mL au cours des 3 premiers mois de traitement puis de 5 à 10 ng/mL par la suite. Les patients recevaient également un traitement par acide mycophénolique administré sous forme de mycophénolate mofétil (1g matin et soir) et des corticoïdes. Au moment de leur inclusion, 5 patients recevaient la forme à libération modifiée de tacrolimus tandis que les 23 autres recevaient la forme à libération immédiate de tacrolimus. Au moment de leur inclusion, les patients recevaient en moyenne  $2,6 \pm 2,0$  mg de tacrolimus matin et soir. La concentration sanguine résiduelle moyenne, mesurée chez les patients de l'étude le jour de la détermination des concentrations en tacrolimus dans les PBMC, était de  $8,1 \pm 2,6$  ng/mL. Outre les données relatives au traitement médicamenteux des patients, les données démographiques (âge, poids, taille, indice de masse corporelle (IMC), délai depuis la transplantation) et biologiques (protidémie, albuminémie, créatininémie, clairance de la créatinine calculée par la formule de MDRD, bilirubinémie, aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase et hématoците) ont également été relevées. Ces données sont

rapportées dans le tableau 11. Les patients présentaient des paramètres biologiques compris dans les valeurs normales à l'exception toutefois d'une créatininémie moyenne élevée ( $125,9 \pm 59,7 \mu\text{mol/L}$ ) sans doute en lien avec une longue exposition des patients au tacrolimus (70 mois en moyenne) vraisemblablement à l'origine d'une néphrotoxicité cumulative.

Tableau 11. Caractéristiques démographiques, biologiques et de traitement des 24 patients transplantés cardiaques au moment de leur inclusion dans l'étude.

Patients	Mean	SD	Median	Range
<i>Physiological characteristics</i>				
Age (years)	50	13.2	53	19-65
Body weight (kg)	69	13.2	68	50-99
Size (cm)	169	8.6	169	155-188
Post-operative day (days)	2106	2430	1255	65-9556
<i>Biological parameters</i>				
Protein (g/L)	64.2	5.9	66	53-71
Albumin (g/L)	42.3	4.4	43	32-47
Creatinine ( $\mu\text{mol/L}$ )	125.9	59.7	108	68-305
Total bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	8.2	4.2	7	3-18
SGOT (UI/mL)	31.4	17.1	27	17-86
SGPT (UI/mL)	27.1	24.8	20	11-110
Hematocrit (%)	36.9	5.6	37	27.9-48.5
<i>TAC treatment</i>				
Tacrolimus				
TAC concentration (ng/mL)	8.1	2.6	7.9	4.3-18.3
TAC dose (mg/12 h)	2.6	2.0	2.0	0.5-9
TAC concentrations in PBMC (ng/million PBMCs)	0.040	0.029	0.034	0.005-0.150

Au cours des 4 mois de l'étude, 28 prélèvements (sang total sur EDTA) obtenus de 24 patients ont été analysés. Il s'agissait de prélèvements obtenus dans le cadre du suivi

thérapeutique pharmacologique usuel de ces patients et aucun prélèvement supplémentaire n'a été nécessaire à la réalisation de ce travail. Quoi qu'il en soit, les patients étaient informés de la réalisation du protocole et étaient libres de refuser d'y participer. Après dosage par LC-MS/MS du tacrolimus dans le sang total, les échantillons subissaient la procédure décrite plus haut afin de permettre la détermination des concentrations en tacrolimus dans les PBMC. Les patients présentaient des concentrations en tacrolimus dans les PBMC très variables : de 5 à 150 pg/million de PBMC (soit 25 à 750 ng/mL), avec une moyenne à  $40 \pm 29$  pg/million de PBMC (200 ng/mL) et un CV de 71,4% supérieur au CV des concentrations sanguines (32,6%). Le ratio moyen de concentration intracellulaire sur sanguine était d'environ 25.

Nous avons ensuite recherché les corrélations existantes entre : la dose et les concentrations en tacrolimus dans les PBMC et les concentrations sanguines en tacrolimus et les concentrations en tacrolimus dans les PBMC. Il n'existait pas de corrélation entre la dose et la concentration en tacrolimus dans les PBMC ( $r^2 = 0,130$  ;  $p = 0,059$ ) (Figure 18).

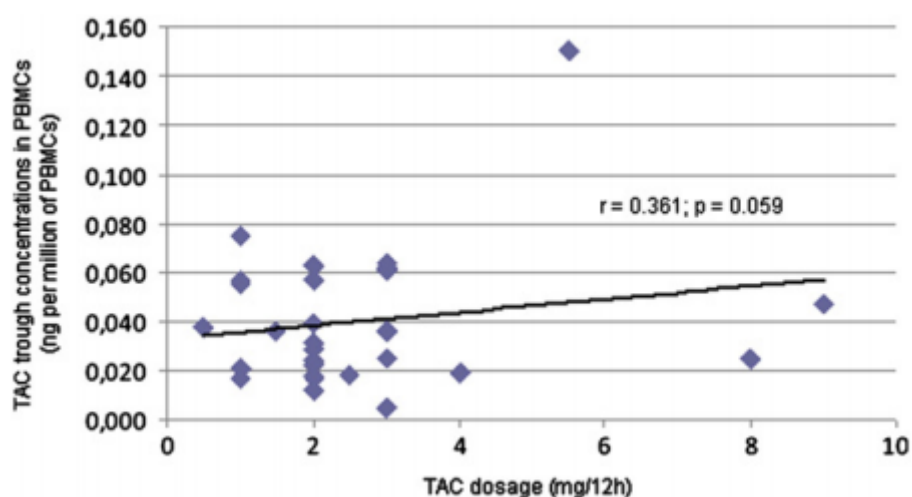


Figure 18. Concentration en tacrolimus dans les PBMC en fonction du dosage de tacrolimus chez 24 patients transplantés cardiaques.



Il n'existait pas non plus de corrélation entre les concentrations sanguines en tacrolimus et les concentrations en tacrolimus dans les PBMC des patients ( $r^2 = 0,067$  ;  $p = 0,183$ ) (Figure 19).

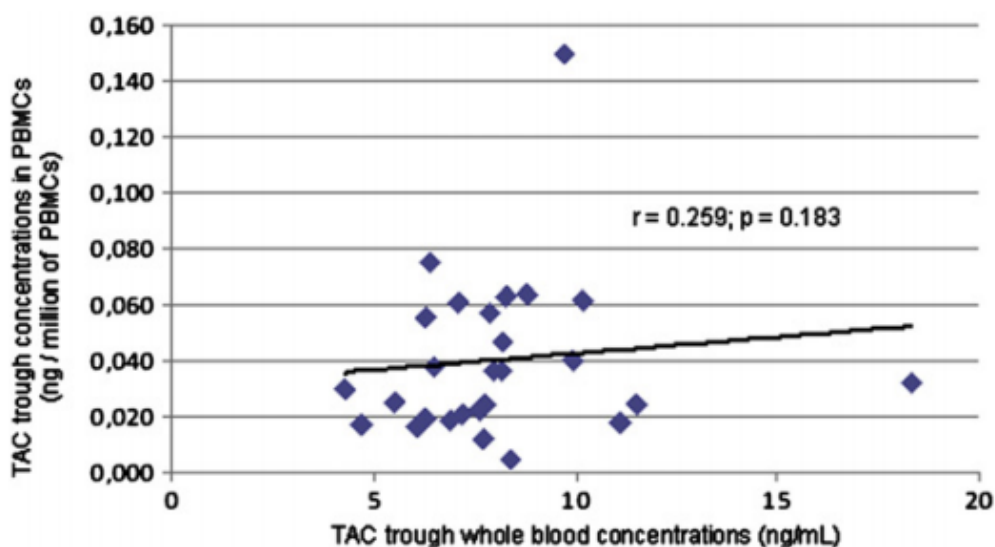


Figure 19. Concentration en tacrolimus dans les PBMC en fonction des concentrations sanguines en tacrolimus chez 24 patients transplantés cardiaques.

Les corrélations entre les concentrations en tacrolimus dans les PBMC et le poids, la taille, l'IMC, l'hématocrite, la protidémie, l'albuminémie, la bilirubinémie, et les transaminases ont également été recherchées mais aucun lien entre ces différents facteurs et la concentration intracellulaire n'a pu être démontré. En revanche, la corrélation (inverse) entre créatininémie et concentration en tacrolimus dans les PBMC atteignait quasiment la significativité ( $r^2 = 0,151$  ;  $p = 0,051$ ) sans qu'il soit possible de fournir une explication au lien potentiel qui pourrait exister entre les concentrations intracellulaires et la créatininémie.

### **5.2.2.3 Conclusion**

Ce travail nous a donc permis de mettre au point et de valider une méthode de dosage du tacrolimus dans les cellules mononuclées de patients transplantés. La linéarité de la méthode, de 12,5 à 250 pg/million de cellules, permet d'envisager une utilisation de cette méthode pour des patients à la phase immédiate post-transplantation (patients potentiellement très déplétés en PBMC) comme pour des patients à distance de leur transplantation. Le process analytique est certes plus long que le dosage sanguin du tacrolimus mais peut malgré tout être effectué suffisamment rapidement pour permettre une adaptation de posologie lors de l'administration suivante de l'immunosuppresseur. Le coût de la procédure est également plus important que celui du dosage sanguin, néanmoins le surcoût reste minime au regard de la possibilité de réduire la fréquence du rejet de greffe. L'utilisation de cette méthode au cours d'essais cliniques pourrait permettre de délimiter une zone thérapeutique intracellulaire et d'en déterminer l'intérêt en pratique clinique.

### **5.3 4<sup>ème</sup> étude : Pharmacocinétique et pharmacodynamie du tacrolimus en transplantation hépatique** (Annexe 4 – Article 4)

#### **5.3.1 Rationnel**

La dernière partie de ce travail de doctorat avait pour but d'explorer la relation qui peut exister entre les concentrations sanguines de tacrolimus, les concentrations intracellulaires de tacrolimus et l'effet sur la protéine cible, la calcineurine. En effet, une meilleure connaissance de cette relation peut permettre d'expliquer la survenue de rejets chez des patients dont les concentrations sanguines de tacrolimus sont en zone thérapeutique. Le choix du tacrolimus plutôt que l'évérolimus pour cette partie repose sur le fait que cette molécule pourrait être un meilleur substrat du CYP3A5 et d'ABCB1 que ne l'est l'évérolimus. Les résultats présentés précédemment dans ce travail vont d'ailleurs dans ce sens. D'une part, le modèle de pharmacocinétique de population que nous avons établi démontre que le génotype du *CYP3A5* et d'*ABCB1* n'impacte pas sur la pharmacocinétique sanguine de l'évérolimus ; le contraire ayant été rapporté dans la littérature pour le tacrolimus (102–104). D'autre part, l'application clinique du dosage de l'évérolimus dans les PBMC montre une corrélation, bien que médiocre, entre concentrations sanguines et concentrations dans les PBMC des patients, ce qui pourrait confirmer l'hypothèse que les concentrations sanguines reflètent partiellement les concentrations dans les PBMC et que, par conséquent, CYP3A5 et d'ABCB1 retentissent faiblement sur la diffusion de l'évérolimus vers la cellule mononucléée. Les résultats de l'application clinique de la méthode de dosage du tacrolimus dans les PBMC vont, au contraire, dans le sens d'un probable impact important de ces

covariables sur la diffusion du tacrolimus dans les PBMC. Cette conclusion a, par ailleurs, déjà été rapportée dans la littérature pour cette molécule (100).

### **5.3.2 Résultats**

#### ***5.3.2.1 Patients et collection des données***

Dix patients transplantés hépatiques de novo ont été inclus dans cette sous-étude de l'étude CYPTAC'H (identifiant Clinicaltrials.gov : NCT01388387). Les patients étaient inclus s'ils étaient âgés de plus de 18 ans, traités par tacrolimus et avaient donné un consentement écrit afin de participer à l'étude. Le protocole a été approuvé par le comité de protection de la personne Ouest V. Les patients bénéficiaient de pharmacocinétiques complètes à J1 et à J7 en 10 points de prélèvement (avant puis 20 min, 40 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 360 min, 540 min et 720 min après administration de tacrolimus). Le jour des cinétiques, les données démographiques (âge, poids, taille, temps d'ischémie froide, poids du greffon et score MELD des patients), de traitement (posologie du tacrolimus) et biologiques (hématocrite, protéinémie, albuminémie, créatininémie, bilirubinémie totale et libre, aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase, phosphatase alcaline et clairance de la créatinine calculée par la méthode MDRD) étaient relevées. Les caractéristiques démographiques et biologiques des patients à J1 et J7 sont présentées dans les tableaux 12 et 13.

Tableau 12. Caractéristiques démographiques des 10 patients transplantés hépatiques inclus dans l'étude (moyenne  $\pm$  écart-type).

	Mean
Age (year)	56.4 $\pm$ 10.9
Body weight (kg)	69.4 $\pm$ 16.6
Cold ischemia (minutes)	592.4 $\pm$ 230.1
Graft weight (g)	1536.0 $\pm$ 482.6
MELD score	20.4 $\pm$ 7.7

Tableau 13. Paramètres biologiques à J1 et J7 de leur traitement par tacrolimus des patients inclus (moyenne  $\pm$  écart-type).

	day-1	day-7	p
Hematocrit (%)	37.5 $\pm$ 7.9	28.7 $\pm$ 2.9	0.055
Protein (g/L)	50.7 $\pm$ 8.8	50.9 $\pm$ 8.2	0.36
Albumin (g/L)	32.4 $\pm$ 8.2	32.7 $\pm$ 2.5	0.94
Total bilirubin ( $\mu$ mol/L)	136 $\pm$ 161	125 $\pm$ 126	0.96
Conjugated bilirubin ( $\mu$ mol/L)	67 $\pm$ 74	71 $\pm$ 69	0.80
ASAT (UI/L)	1181 $\pm$ 1456	87 $\pm$ 92	0.023 <sup>b</sup>
ALAT (UI/L)	738 $\pm$ 1021	144 $\pm$ 117	0.039 <sup>b</sup>
ALP (UI/L)	107 $\pm$ 31	170.4 $\pm$ 79	0.021 <sup>b</sup>
Creatinine ( $\mu$ mol/L)	126 $\pm$ 88	130 $\pm$ 93	0.31
Creatinine clearance <sup>a</sup> (mL/min)	74.0 $\pm$ 27.1	74.0 $\pm$ 39.1	0.27

ALP: alkaline phosphatase; ALAT: Alanine aminotransferase; ASAT: Aspartate aminotransferase

Results are expressed as mean  $\pm$  SD

<sup>a</sup>The creatinine clearance was estimated using the simplified Modification of Diet in Renal Disease (aMDRD) formula

<sup>b</sup>Statistically significant result

Au cours du protocole, les patients étaient suivis pendant 6 mois avec une attention particulière portée à la survenue de rejet de transplantation.

### ***5.3.2.2 Dosages sanguins, intracellulaires et détermination de l'activité calcineurine***

Le dosage sanguin était effectué par LC-MS/MS selon une méthode adaptée d'une technique de dosage publiée (105). Après dosage sanguin du tacrolimus, les prélèvements sanguins subissaient la procédure décrite dans le paragraphe 5.2.1 afin de séparer les cellules mononuclées du reste des éléments figurés du sang. Les cellules étaient ensuite comptées et séparées en deux aliquots, l'un dédié au dosage de tacrolimus dans les PBMC, l'autre à la détermination de l'activité de la calcineurine. Les concentrations intracellulaires étaient mesurées selon la méthode décrite dans le paragraphe 4.2.3 (91). La détermination de l'activité de la calcineurine était effectuée selon la méthode décrite dans le paragraphe 4.3 (92).

Les concentrations sanguines maximales étaient mesurées à 180 min à J1 et 60 min à J7 et atteignaient respectivement  $13,0 \pm 9,6$  ng/mL et  $8,8 \pm 5,0$  ng/mL. Les concentrations résiduelles étaient respectivement de  $6,9 \pm 3,1$  ng/mL et  $5,4 \pm 3,1$  ng/mL à J1 et J7. Les AUC<sub>0-12</sub> correspondantes à J1 et J7 étaient de  $111,8 \pm 65,9$  ng.h/mL and  $81,2 \pm 37,2$  ng.h/mL (Figure 20).

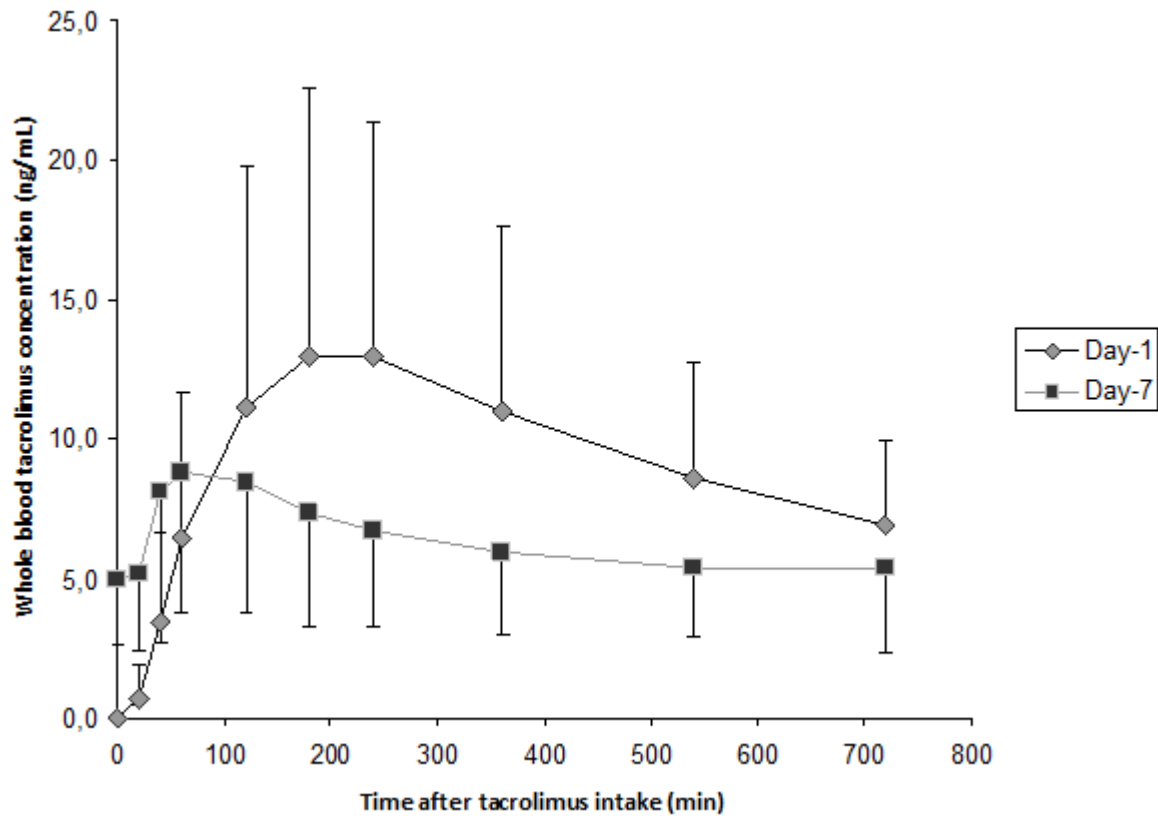


Figure 20. Concentrations sanguines moyennes en tacrolimus à J1 (losanges) et J7 (carrés) post-transplantation chez les 10 patients de l'étude. Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

Une importante contamination des prélèvements de PBMC par des polynucléaires neutrophiles lors de la séparation cellulaire, nous a obligés à rapporter les concentrations intracellulaires non pas par million de PBMC mais par million de leucocytes. Ainsi, les concentrations maximales intracellulaires en tacrolimus étaient respectivement de  $116,9 \pm 114,7$  pg/million de leucocytes ( $585 \pm 574$  ng/mL) à 180 min à J1 et de  $68,3 \pm 48,9$  pg/million de leucocytes ( $342 \pm 245$  ng/mL) à 360 min à J7. Les concentrations résiduelles intracellulaires étaient de  $71,3 \pm 78,5$  et  $39,5 \pm 38,8$  pg/million de leucocytes à J1 et J7, c'est-à-dire respectivement  $357 \pm 396$  et  $180 \pm 194$  ng/mL. Les AUC<sub>0-12</sub> correspondantes étaient

de  $909,2 \pm 903,7$  pg.h/million de leucocytes ( $4,55 \pm 4,52$   $\mu\text{g.h/mL}$ ) and  $673,0 \pm 603,0$  pg.h/million de leucocytes ( $3,37 \pm 3,02$   $\mu\text{g.h/mL}$ ) (Figure 21). Le ratio des AUC<sub>0-12</sub> intracellulaires sur sanguines à J1 et J7 présentait une large variabilité : de 5,2 à 70 (moyenne  $40,3 \pm 23,3$ ) à J1 ; et de 8,0 to 114,8 (moyenne  $49,3 \pm 45,6$ ). Les paramètres pharmacocinétiques des patients sont résumés dans le tableau 14.

Tableau 14. Paramètres pharmacocinétiques des patients inclus dans l'étude à J1 et J7 de l'initiation du traitement par tacrolimus (moyenne  $\pm$  écart-type).

	Day-1	Day-7
Dose (mg/12h)	$2.05 \pm 0.93$	$1.67 \pm 1.12$
Dose per kg (mg/kg.12h)	$0.034 \pm 0.012$	$0.032 \pm 0.017$
<b>Blood pharmacokinetics</b>		
C <sub>max</sub> (ng/mL)	$13.0 \pm 9.6$	$8.8 \pm 5.0$
C <sub>12h</sub> (ng/mL)	$6.9 \pm 3.1$	$5.4 \pm 3.1$
AUC <sub>0-12</sub> (ng.h/mL)	$111.8 \pm 65.9$	$81.2 \pm 37.2$
<b>Intracellular pharmacokinetics</b>		
C <sub>max</sub> (pg/million leukocytes)	$116.9 \pm 114.7$	$68.3 \pm 48.9$
C <sub>12h</sub> (pg/million leukocytes)	$71.3 \pm 78.5$	$39.5 \pm 38.8$
AUC <sub>0-12</sub> (pg.h/million leukocytes)	$909.2 \pm 903.7$	$673.0 \pm 602.0$
<b>Intracellular diffusion ratio</b>		
Intracellular AUC <sub>0-12</sub> / Whole-blood AUC <sub>0-12</sub>	$40.3 \pm 23.3$	$49.3 \pm 45.6$

Note: C<sub>max</sub>: maximum concentration over the dosing interval; C<sub>12h</sub>: concentration measured 12 hours after tacrolimus intake; AUC<sub>0-12</sub>: AUC over the dosing interval



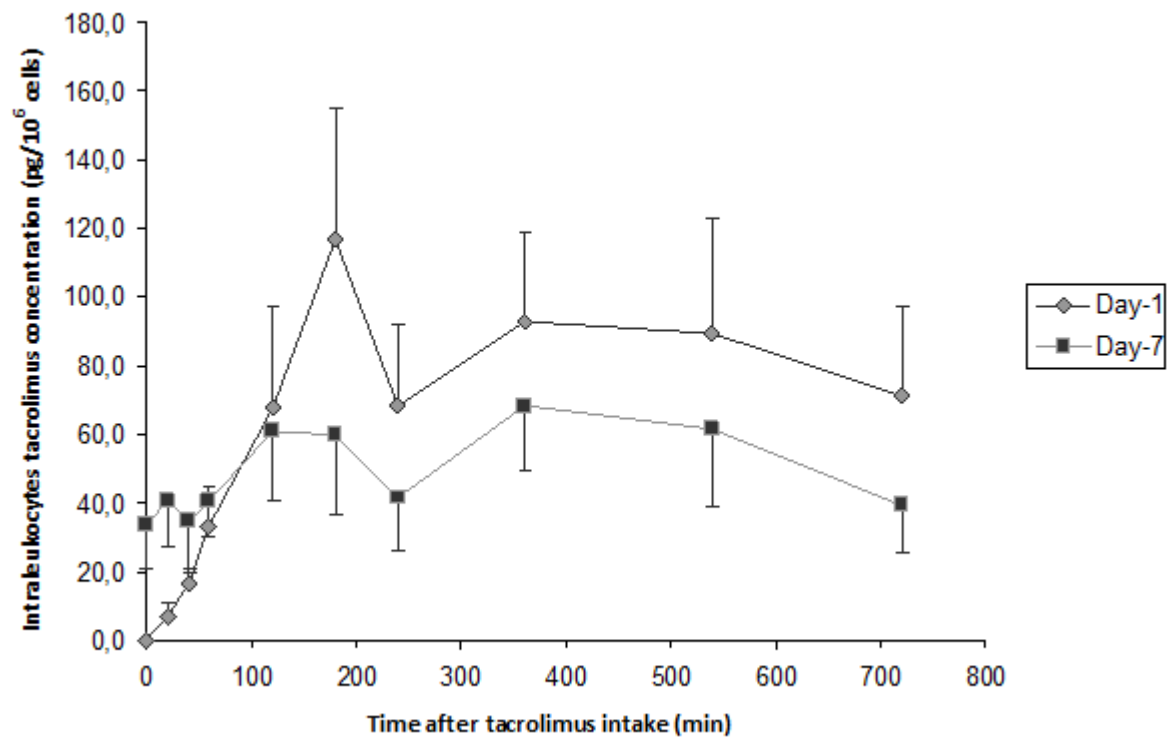


Figure 21. Concentrations intracellulaires moyennes en tacrolimus à J1 (losanges) et J7 (carrés) post-transplantation chez les 10 patients de l'étude. Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

La figure 22 présente l'activité de la calcineurine à J1 et J7. A J1, l'activité de la calcineurine varie de manière contemporaine de la concentration sanguine et de la concentration intracellulaire. Ainsi, le nadir de l'activité de la calcineurine à J1 ( $-38 \pm 16\%$ ) était proche du pic de concentration sanguine et intracellulaire. A J7, l'inhibition de l'activité de la calcineurine était limitée ( $\pm 15\%$ ). Les AUC moyennes de calcineurine ( $AUC_{0-12CNA}$ ) n'étaient pas significativement différentes à J1 et J7 ( $AUC_{0-12CNA} = 404,2 \pm 251,1$  versus  $472,8 \pm 382,9$  pmol/min/ $10^6$  leucocytes,  $p = 0,95$ ). Pour un même patient, la variation de l' $AUC_{0-12CNA}$  entre J1 et J7 était en moyenne de  $1,17 \pm 0,65$ .

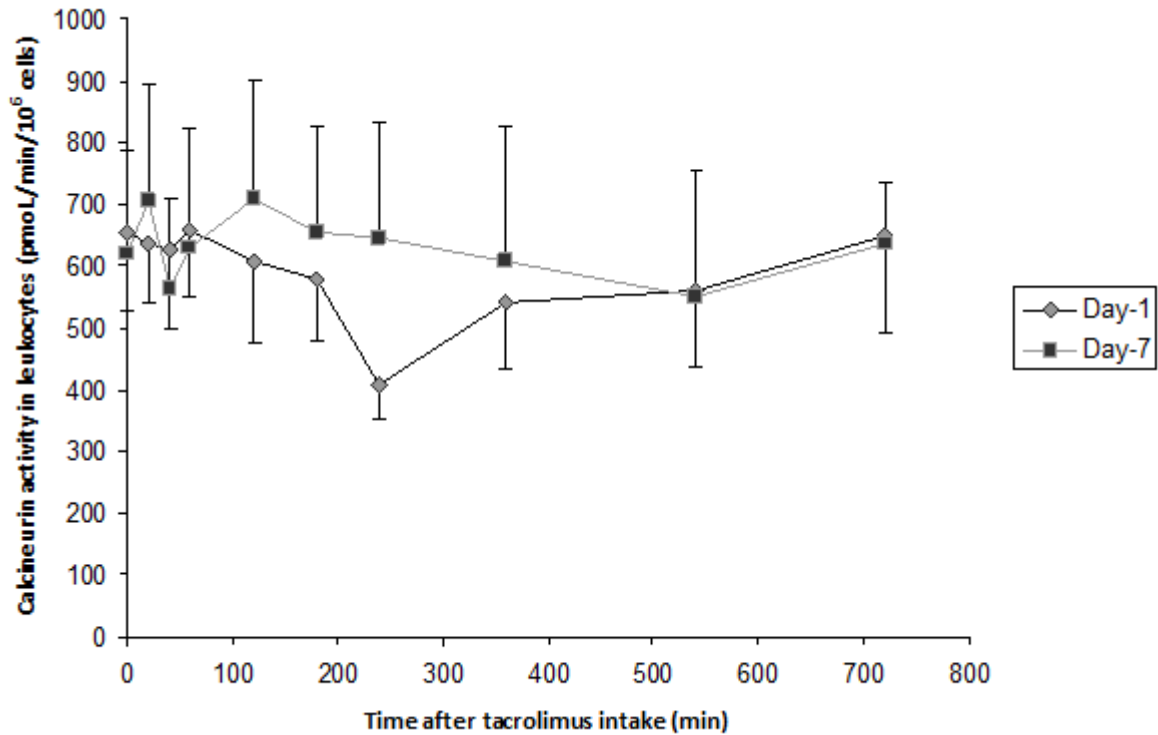


Figure 22. Activité moyenne de la calcineurine chez les patients de l'étude à J1 (losanges) et J7 (carrés). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

Une corrélation entre les expositions sanguines et intracellulaires exprimées par les AUC respectives ainsi qu'avec les AUC<sub>0-12CNA</sub> a été recherchée à J1 et à J7. Il y avait une relation entre les AUC<sub>0-12</sub> sanguines et intracellulaires ( $\rho = 0,69$ ;  $p = 0,04$ ) laquelle disparaissait à l'état d'équilibre, c'est à dire à J7 ( $p = 0,75$ ). Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre AUC<sub>0-12</sub> sanguines et AUC<sub>0-12CNA</sub> à J1 ( $p = 0,92$ ) ou J7 ( $p = 0,10$ ) ni entre AUC<sub>0-12</sub> intracellulaire et AUC<sub>0-12CNA</sub> à J1 ( $p = 0,71$ ) ou J7 ( $p = 0,92$ ). Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les AUC<sub>0-12</sub> sanguines à J1 et J7 ( $p = 0,25$ ), les AUC<sub>0-12</sub> intracellulaires ( $p = 0,38$ ) ou entre les AUC<sub>0-12CNA</sub> à J1 et J7 ( $p = 0,74$ ). De manière similaire, les ratios de diffusion du tacrolimus (rapport AUC intracellulaire / AUC sanguin) n'étaient pas significativement différents entre J1 et J7 ( $p = 1,00$ ).

Nous avons également recherché les corrélations existant entre les valeurs moyennes de concentrations sanguines et d'inhibition de l'activité de la calcineurine ainsi qu'entre les valeurs moyennes de concentrations intracellulaires et ce à J0 puis à J7. Une relation significative inverse entre concentrations sanguines et inhibition de la calcineurine existait à J1 ( $p = 0,03$  ;  $\rho = -0,770$ ) mais disparaissait à l'équilibre ( $p = 0,77$ ). Aucune relation entre concentrations intracellulaires et inhibition de la calcineurine n'a pu être démontrée à J1 ( $p = 0,15$ ) ou J7 ( $p = 0,94$ ).

### **5.3.2.3 Suivi clinique des patients**

Durant le suivi clinique des patients, un seul des dix patients inclus a présenté un rejet aigu cellulaire. Le rejet a débuté 17 jours après la transplantation. Une biopsie hépatique a été effectuée et le grade du rejet était de 4 sur l'échelle de BANFF. Ce patient avait une exposition sanguine au tacrolimus proche de la valeur moyenne du groupe à J1 (81,3 ng.h/mL versus  $111,8 \pm 65,9$  ng.h/mL) et à J7 (70,0 ng.h/mL versus  $81,2 \pm 37,2$  ng.h/mL) mais une exposition intracellulaire quasiment 4 fois inférieure à la moyenne du groupe (respectivement 186,2 pg.h/million de leucocytes et 112,2 pg.h/million leucocytes à J1 et J7). Ce patient présentait également le plus faible ratio d'AUC à l'équilibre (8,0 contre une moyenne de  $49,3 \pm 45,6$ ). Enfin, l'activité de la calcineurine de ce patient a augmenté entre J1 et J7 avec une  $AUC_{0-12CNA}$  qui passait de 90.7 pmol/min/ $10^6$  leucocytes à 189.5 pmol/min/ $10^6$  leucocytes. Ce patient présentait la plus forte élévation de l'activité calcineurine avec un rapport AUC J7 sur AUC J1 de 2,09 contre une moyenne de  $1,17 \pm 0,65$ .

#### **5.3.2.4 Conclusion**

Le suivi des concentrations intracellulaires et le suivi de l'activité de la calcineurine sont parmi les nouveaux biomarqueurs d'évaluation de l'effet immunosuppresseur du traitement et donc de la survenue du rejet aigu cellulaire. L'amélioration des connaissances quant au lien existant entre les concentrations sanguines, intracellulaires du tacrolimus et l'activité de la calcineurine apparaît nécessaire afin de planifier de futurs essais cliniques évaluant prospectivement la valeur prédictive de ces biomarqueurs. Ce travail rapporte également, chez le patient transplanté hépatique, des profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques complets du tacrolimus.

## 6. Discussion générale

### 6.1 Modélisation par approche de population de la pharmacocinétique de l'évérolimus chez le transplanté cardiaque

Au cours de ce travail, nous avons développé un **modèle de la pharmacocinétique de l'évérolimus chez le patient transplanté cardiaque par une approche de population**. Il s'agit du premier modèle élaboré pour ce médicament dans cette population de patients transplantés. Ce modèle permet d'obtenir une estimation des paramètres pharmacocinétiques de l'évérolimus et notamment de sa clairance apparente ( $Cl/F = 3,33 \pm 0,20$  L/h) et de son volume de distribution ( $Vd = 146 \pm 33$  L), cohérents avec les paramètres pharmacocinétiques publiés dans les modèles développés chez les patients transplantés rénaux (93,94). Les données étaient finalement décrites au mieux à l'aide d'un modèle à 1 compartiment tandis que Moes *et al.* décrivait un modèle à 2 compartiments (94). Cette différence pourrait être due à l'utilisation quasi-exclusive dans notre travail de concentrations résiduelles d'évérolimus. Malgré un nombre de prélèvements importants par individu (13,1 dosages par patient en moyenne), les temps de prélèvements étaient assez redondants puisque les données du modèle étaient issues de la pratique clinique courante, c'est à dire principalement des prélèvements effectués en résiduel. Dans le travail de Moes *et al.*, l'accès à des mesures de concentrations plus riches permettent sans doute de tester des modèles plus complexes que ne le permettent les données du suivi thérapeutique pharmacologique usuel des transplantés de notre étude. L'objectif de Moes *et al.* était en

effet d'estimer l'exposition des patients à l'évérolimus par estimation de leur AUC et la modélisation a, dans ce cas, dû être effectuée à partir de profils pharmacocinétiques complets.

Dans notre modèle, les covariables permettant d'expliquer la variabilité inter- et intra-individuelle de la pharmacocinétique de l'évérolimus étaient : la bilirubinémie ainsi que la présence ou l'absence de ciclosporine dans le traitement. Un grand nombre d'autres covariables ont été testées mais n'ont pas montré d'influence significative sur le modèle. Ces variables avaient été choisies car pouvant potentiellement faire varier les concentrations d'évérolimus. Ainsi, en raison du caractère lipophile du principe actif, de sa large distribution dans les tissus, de sa liaison aux protéines plasmatiques et de son métabolisme hépatique, l'évérolimus pourrait voir ses concentrations varier selon la taille, le poids ou le sexe des patients par effet sur le volume de distribution ou la clairance (26). De même, les patients âgés, présentant fréquemment une diminution des concentrations en protéines plasmatiques aussi bien que des modifications métaboliques, pourraient également voir leurs concentrations sanguines varier. Cependant, l'influence de ces paramètres n'était pas suffisante pour qu'ils soient retenus dans notre modèle et aucune des covariables démographiques (poids, taille, sexe et âge) n'a été retenue dans le modèle final. Ces résultats sont similaires à ceux décrits par Kovarik *et al.* dans un modèle chez le patient transplanté rénal (93). Même si dans l'étude de Kovarik, le poids et l'âge des patients étaient des covariables incluses dans le modèle final, les auteurs avaient estimé qu'elles n'avaient aucune influence cliniquement pertinente (93). En revanche, dans le travail de Moes *et al.*, le poids idéal des patients influençait significativement le volume de distribution (94). Dans le travail de Kovarik, l'ethnie des patients avait une forte influence

sur la clairance du médicament. Les patients noirs avaient une clairance apparente de l'évérolimus supérieure de 20% comparativement aux patients blancs (93).

En ce qui concerne les paramètres biologiques susceptibles d'influencer la pharmacocinétique de l'évérolimus, nous avons testé :

- la protéinémie et l'albuminémie, déterminants importants de la fixation protéique du principe actif
- la créatininémie, un marqueur du débit de filtration glomérulaire, déterminant essentiel de l'élimination rénale
- l'hématocrite, dont les variations peuvent modifier les concentrations de l'évérolimus, molécule principalement répartie dans les érythrocytes
- les transaminases, marqueurs de la lyse hépatique
- la bilirubinémie, marqueur de l'activité hépatique

De manière attendue, l'évérolimus étant un principe actif dont la liaison protéique est modérée et dont l'élimination se fait minoritairement sous forme inchangée dans les urines, la protéinémie, l'albuminémie et la créatininémie ne sont pas ressorties comme covariables influençant la pharmacocinétique. En revanche, la bilirubinémie avait un impact important sur la variabilité des concentrations. Ce résultat paraît logique puisque l'évérolimus présente un métabolisme hépatique quasi-exclusif et à mesure que la bilirubinémie va augmenter, les fonctions métaboliques et d'épuration du foie vont diminuer, réduisant parallèlement le métabolisme et l'élimination du médicament (26). Les patients inclus dans notre étude présentaient des bilirubinémies variables (de 2 à 33  $\mu\text{mol/L}$ ), associées à d'importantes différences pharmacocinétiques de l'évérolimus. L'impact de la bilirubinémie sur la cinétique de l'évérolimus a déjà été rapporté dans une étude menée chez des patients insuffisants hépatiques modérés. Huit de ces patients et huit patients contrôles recevaient 2

mg d'évérolimus et les concentrations sanguines en évérolimus ainsi que la fixation protéique étaient comparées entre les deux groupes. Les AUC des patients étaient corrélées à leur bilirubinémie ( $r^2 = 0,74$ ) (et également à l'albuminémie) (106). La clairance de l'évérolimus était réduite de 53% dans le groupe de patients insuffisants hépatiques tandis que la fixation protéique n'était pas différente entre les groupes ( $73,8 \pm 3,6\%$  versus  $73,5 \pm 2,5\%$  pour le groupe contrôle) (106).

Pour ce qui est des traitements associés, la présence de ciclosporine était le facteur prépondérant de variation de la clairance de l'évérolimus dans notre modèle : la présence de ciclosporine diminuait considérablement la clairance de l'évérolimus. La ciclosporine et l'évérolimus sont tous deux substrats du CYP3A4 et d'ABCB1, une interaction médicamenteuse à type de compétition au niveau des cytochromes et des transporteurs apparaît donc comme possible (107). Ces résultats sont cohérents avec les données de Kovarik *et al.*, lesquels rapportent une augmentation de la C<sub>max</sub> de 82% et de l'AUC de 168% après prise de 2 mg d'évérolimus en dose unique lors de l'adjonction de ciclosporine (175 mg de ciclosporine micro-émulsionnée) chez 24 volontaires sains (46). L'influence majeure de la ciclosporine sur la cinétique de l'évérolimus a également été confirmée chez le patient transplanté cardiaque. Dans une étude conduite par Brandhorst *et al.*, 6 transplantés cardiaques traités par évérolimus, dont la posologie était adaptée afin d'atteindre la zone thérapeutique (3 à 8 ng/mL), et par ciclosporine dont la posologie était adaptée afin d'atteindre une concentration sanguine résiduelle de 60 à 80 ng/mL, bénéficiaient d'une conversion vers un traitement par évérolimus et tacrolimus, dont la posologie était adaptée afin d'atteindre une concentration sanguine résiduelle de 6 à 10 ng/mL. Deux profils pharmacocinétiques étaient mesurés à l'équilibre chez ces patients,



avant puis après conversion. Après conversion vers le tacrolimus, les AUC d'évérolimus étaient en moyenne réduites de 48% (108).

Les corticoïdes avaient été associés à une diminution des concentrations en tacrolimus dans un modèle de pharmacocinétique de population chez le transplanté rénal (109). Une dose supérieure à 25mg de prednisone entraînait une augmentation de la clairance du tacrolimus (109). L'hypothèse d'un effet inducteur des corticoïdes sur le CYP3A était avancée par les auteurs en s'appuyant sur le lien ( $r^2 = 0,88$  ;  $p = 0,02$ ) établi entre posologie en corticoïdes et clairance du tacrolimus mis en évidence dans une autre étude menée chez 303 transplantés rénaux (110). Dans notre modèle, la posologie de corticoïdes n'influçait pas les concentrations d'évérolimus. L'effet dominant de la ciclosporine, inhibiteur du CYP3A, sur la clairance de l'évérolimus pourrait gommer un éventuel effet des corticoïdes. Cette absence d'effet pourrait être également mise sur le compte du fait que l'évérolimus est un moins bon substrat du CYP3A5 que le tacrolimus.

Les polymorphismes du *CYP3A5* et d'*ABCB1* (exon 26 ; 3435 C→T) ont également été testés au cours de notre étude afin de déterminer leur impact sur la pharmacocinétique de l'évérolimus. En tant que substrat de ce cytochrome et de la protéine de transport ABCB1, l'évérolimus est susceptible de voir ses concentrations varier chez les patients présentant des variants fonctionnels ou non-fonctionnels de ces protéines.

Le polymorphisme du *CYP3A5* pourrait donc expliquer partiellement la variabilité inter-individuelle de l'évérolimus comme le suggèrent les différences de concentrations rapportées entre patients noirs et patients blancs, groupe pour lesquels les répartitions des polymorphismes du *CYP3A5* sont très différents (93). Le polymorphisme du *CYP3A5* a déjà été proposé comme variable explicative de la variabilité d'autres IS. Ainsi, nombre de modèles pharmacocinétiques par approche de population du tacrolimus incluent la

covariable génétique *CYP3A5* chez les transplantés hépatiques, rénaux ou pulmonaires (103,111,112). Il apparaissait donc intéressant de tester ces covariables génétiques pour l'évérolimus. Dans notre modèle, le polymorphisme du *CYP3A5* n'influait pas significativement la clairance de l'évérolimus. Jacobsen *et al.* ont montré que l'évérolimus était métabolisé par le *CYP3A5* mais également par le *CYP3A4* et le *CYP2C8* (45). Néanmoins, l'affinité de l'évérolimus était, dans ce travail *in-vitro*, bien supérieure pour le *CYP2C8* et le *CYP3A4* que pour le *CYP3A5* (45). Cet élément explique peut être que nous n'ayons pas pu mettre en évidence de lien entre le génotype *CYP3A5* et les concentrations en évérolimus. L'absence d'effet du polymorphisme du *CYP3A5* a également été rapportée chez 28 transplantés rénaux et confirmée *in-vitro* sur des microsomes hépatiques (113). Par ailleurs, cette variable a également été testée de manière infructueuse dans le travail de modélisation de Moes *et al.* (94).

Comme rappelé précédemment, l'évérolimus est un substrat d'*ABCB1*, pompe d'efflux ubiquitaire, localisée notamment au niveau de la barrière intestinale et de la membrane lymphocytaire (42). Plusieurs « single nucleotide polymorphisms » (SNP) d'*ABCB1* ont été décrits : dans l'exon 12 (1236 C→T), dans l'exon 21 (2677 C→T/A) et dans l'exon 26 (3435 C→T) (75). C'est ce dernier SNP, le plus largement étudié, qui a été choisi au cours de notre travail. Des variations d'expression de cette protéine d'ordre génétique ou en lien avec une interaction médicamenteuse ont été décrites pour de nombreux médicaments (75). Le rôle du génotype *ABCB1* dans la variabilité de la pharmacocinétique des IS reste débattu. Dans notre étude, le génotype *ABCB1* n'influait pas la pharmacocinétique de l'évérolimus. L'ensemble de ces résultats suggère que l'évérolimus n'est pas un « bon » substrat du *CYP3A5* et d'*ABCB1*. La faible fréquence du génotype *ABCB1 TT* (13,3%) dans la population de l'étude pourrait également être à l'origine de la non observation d'un impact du

polymorphisme d'ABCB1 sur la pharmacocinétique de notre population de transplantés cardiaques.

Malgré des résultats cohérents avec la littérature et les hypothèses initiales, ce travail présente cependant des limites. Premièrement, le modèle a été élaboré en utilisant uniquement des concentrations résiduelles, puisque issu du suivi thérapeutique pharmacologique standard de l'évérolimus. L'addition de prélèvements effectués entre 0 et 12 heures pourrait améliorer la précision du modèle. Une autre limite de cette étude tient à la méthode de dosage sanguin de l'évérolimus. En effet, les méthodes immuno-enzymatiques peuvent être le jeu de réactions croisées entre l'évérolimus et ses métabolites et peuvent également exposer à des interférences avec des substances endogènes comme cela a déjà été décrit pour d'autres IS (114,115). Ainsi, même si des évaluations rassurantes de la cross-réactivité de ces méthodes ont été effectuées (86), le dosage par méthode immuno-enzymatique surestime parfois les concentrations d'évérolimus, comparativement au dosage par LC-MS/MS (116). Cependant, au moment de la réalisation de ce travail, la méthode de dosage par LC-MS/MS n'était pas disponible.

La mise au point de ce modèle de pharmacocinétique de population de l'évérolimus pourrait cependant permettre une meilleure prédiction des concentrations chez le transplanté cardiaque et ainsi prévenir les sur- et sous-exposition en évérolimus dans cette population de patients. Ce modèle peut maintenant être utilisé en pratique courante afin d'optimiser, chez le patient transplanté cardiaque, les traitements IS comprenant de l'évérolimus.

## 6.2 Dosages des immunosuppresseurs dans les PBMC

La mise au point de méthodes de dosage de l'évérolimus et du tacrolimus dans les PBMC rend possible l'évaluation et le suivi des concentrations de ces IS directement au niveau de leur compartiment d'effet. Cette modalité de suivi thérapeutique des IS, bien que n'ayant pas encore été évaluée du point de vue clinique, pourrait être plus pertinente que la mesure des concentrations sanguines totales.

Les données concernant les inhibiteurs de m-TOR sont peu nombreuses. La méthode de dosage de l'évérolimus développée au cours de ce travail est à notre connaissance la seule dans ce domaine (90). Une méthode de dosage du sirolimus dans les lymphocytes de patients transplantés rénaux a été publiée en 2007. Les dosages étaient réalisés soit par HPLC soit par une méthode immuno-enzymatique et, de ce fait, rendent peu pertinente la prise en compte des résultats. Les données cliniques de cette étude, n'ont, à ce titre, pas été intégrées dans notre travail de revue sur les concentrations intracellulaires d'IS et présenté en annexe du présent document (117).

Au cours de notre travail, les concentrations en évérolimus mesurées chez 36 patients transplantés cardiaques présentaient une large variabilité, allant de 40 à 470 pg/million de PBMC. Nous rapportons également une faible corrélation entre les concentrations résiduelles sanguines et dans les PBMC ( $r^2 = 0,558$  ;  $p = 0,0002$ ). Les concentrations en évérolimus dans les PBMC ne sont donc qu'imparfaitement reflétées par les concentrations sanguines en évérolimus, ce qui les rend d'autant plus intéressantes. Nous pouvons déduire de nos résultats que la concentration en évérolimus dans les PBMC ne peut pas être parfaitement prédite par la simple mesure de la concentration sanguine. Il existe, certes, un lien entre les deux types de concentrations mais avec une variabilité importante. Une fois

encore, l'hypothèse du rôle d'ABCB1 en tant que variable directrice de la diffusion de la molécule vers la cellule mononucléée peut être avancée. En effet, ABCB1 étant localisé à la surface du lymphocyte, il est possible d'imaginer que cette pompe d'efflux limite la diffusion de l'évérolimus du compartiment plasmatique vers le lymphocyte. L'expression et la fonctionnalité d'ABCB1 sont régulées par des facteurs génétiques (polymorphisme) et environnementaux (xénobiotiques, par exemple). L'expression et la fonctionnalité ABCB1 sont donc sujettes à une variabilité importante pouvant être la cause de divergences entre les concentrations sanguines et dans les PBMC d'évérolimus. Cependant, contrairement au tacrolimus, l'évérolimus apparaît comme un bien moins bon substrat d'ABCB1 et du CYP3A5. Les études *in-vitro* montrent en effet que le CYP3A5 n'a qu'un rôle mineur dans le métabolisme de l'évérolimus et n'intervient que secondairement après le CYP2C8 et le CYP3A4 (45,113). Ces données confirment les premiers résultats suggérés par le modèle de population présenté dans le paragraphe précédent.

La diffusion de l'évérolimus dans les PBMC a été estimée au cours de notre travail par évaluation des concentrations intracellulaires rapportées aux concentrations sanguines. Le rapport, de l'ordre de 100 à 1000, est en faveur d'une diffusion importante de la molécule dans les PBMC. Cette diffusion est bien plus importante que celle décrite par l'équipe de Wallemacq (calculée à environ 30) pour le tacrolimus et peut s'expliquer par une fixation protéique plus faible de l'évérolimus (100). L'hypothèse d'un transport de médicament moins efficace de l'évérolimus (notamment par ABCB1) peut également être avancée. Ces deux éléments (fixation protéique et effet des transporteurs de médicaments) peuvent concourir à expliquer cette différence.

A la lumière de ces résultats, ce travail de recherche a été poursuivi en focalisant nos efforts sur le tacrolimus, IS meilleur substrat d'ABCB1 et du CYP3A5, pour lequel les nouveaux outils d'optimisation du monitoring pourraient être plus pertinents que pour l'évérolimus.

Les premières méthodes de dosage des IS anticalcineurine dans les PBMC ont été décrites dans la littérature pour la ciclosporine. Le dosage dans les PBMC et les lymphocytes T a été publié en 2007 par Ansermot *et al.*, Lepage *et al.*, et Falck *et al.* (118–120). Ansermot *et al.* ont appliqué leur méthode de dosage chez le volontaire sain puis chez des patients transplantés rénaux (n = 41), hépatiques (n = 20) et pulmonaires (n = 2) (121,122). Dans l'étude menée chez le volontaire sain, aucune corrélation n'a pu être établie entre les AUC de la ciclosporine dans les PBMC et le sang (121). Dans le travail mené chez les patients transplantés, une faible corrélation est rapportée entre les Cmin sanguines et les PBMC ( $r^2 = 0,30$  ;  $p < 0,00005$ ) (122). La méthode de dosage de Lepage *et al.* a été appliquée chez 20 transplantés rénaux avec, à nouveau, un lien faible entre les Cmin sanguines et les PBMC ( $r^2 = 0,16$  ;  $p < 0,01$ ) (119). Les résultats de ces études permettent principalement de montrer la faisabilité de tels dosages.

Dans le cas du tacrolimus, la diffusion de la molécule du sang vers la cellule mononuclée a pu être évaluée en comparant les concentrations intracellulaires et sanguines. Les travaux de Capron *et al.* chez le transplanté rénal rapportent une concentration moyenne dans les PBMC de l'ordre de 80 pg/million de PBMC (c'est-à-dire de 400 ng/mL) pour une concentration sanguine moyenne de l'ordre de 13 ng/mL (100). S'en suit que le rapport entre concentration intracellulaire et sanguine est d'environ 30. Cette valeur est cohérente avec la valeur retrouvée dans nos travaux en comparant les AUC intracellulaire et sanguine (rapport calculé de 25 à 49,3 à l'équilibre dans les études 3 et 4).

La recherche de corrélation entre concentrations sanguines et dans les PBMC menée dans les différents travaux cités préalablement rapporte l'absence de relation entre ces concentrations, aussi bien chez les patients transplantés cardiaques, rénaux ou hépatiques (91,99,101). Nos résultats confirment, chez le patient transplanté cardiaque, les données déjà publiées. Ces résultats signifient que la concentration sanguine en tacrolimus ne reflète pas la concentration au niveau du compartiment effet et n'est donc pas un bon reflet de l'effet thérapeutique. Le tacrolimus étant un bon substrat du CYP3A5 mais aussi et surtout d'ABCB1, pompe d'efflux située au niveau de la membrane du lymphocyte (et des cellules mononuclées en général), la variabilité en termes d'expression et de fonctionnalité de ces protéines pourrait être à l'origine des différences notables entre les concentrations sanguines et intracellulaires en tacrolimus. L'impact du polymorphisme du gène *ABCB1* codant pour la protéine ABCB1 a déjà été démontré par Capron *et al.* qui ont mis en évidence une différence entre les concentrations en tacrolimus dans les PBMC de 96 transplantés rénaux pour les principaux génotypes *ABCB1 1199G>A*, *3435C>T* et *2677G>T/A* (100). Les patients dont le génotype entraînait une protéine non fonctionnelle présentaient des concentrations en tacrolimus significativement supérieures aux patients dont le génotype entraînait une protéine fonctionnelle. La présence de l'allèle muté entraînait une accumulation du tacrolimus dans les PBMC d'un facteur 1,3 à 1,4 (100). Le même résultat était mis en évidence au cours de ce travail pour le génotype du *CYP3A5*. C'est également cette hypothèse que nous avançons afin d'expliquer l'absence de corrélation que nous rapportons entre concentrations sanguines et dans les PBMC en tacrolimus chez nos patients transplantés cardiaques ( $r^2 = 0,067$ ;  $p = 0,183$ ) (91). L'absence de corrélation entre concentrations sanguines et concentrations intracellulaires dans notre étude confirme que

la concentration sanguine en tacrolimus n'est pas un bon reflet de la concentration en tacrolimus dans les PBMC.

Le polymorphisme du *CYP3A5* et d'*ABCB1* pourrait également être à l'origine de la plus grande variabilité que nous avons décrite pour les concentrations en tacrolimus dans les PBMC (CV = 71,4%), comparativement à celle des concentrations sanguines (CV = 32,6%) (91). La plus forte variabilité des concentrations intracellulaires a déjà été rapportée pour la ciclosporine par Ansermot *et al.*, chez 87 volontaires sains (121). Outre les facteurs génétiques précités, un certain nombre d'autres covariables peut influencer sur la pharmacocinétique intracellulaire du tacrolimus. Le tacrolimus étant une molécule très liée aux protéines plasmatiques et seule la fraction non liée du médicament étant susceptible de diffuser vers son site d'action, la liaison protéique, notamment à l' $\alpha$ 1-glycoprotéine et à l'albumine, est susceptible de modifier les concentrations en tacrolimus dans les PBMC. L'hématocrite pourrait également influencer sur la diffusion du tacrolimus : une diminution de l'hématocrite pourrait entraîner une augmentation de la fraction libre du tacrolimus, molécule fortement concentrée dans les érythrocytes, et ainsi sa diffusion vers d'autres fractions d'éléments figurés du sang tels que les PBMC. La protéinémie et l'hématocrite des patients seraient ainsi inversement corrélées aux concentrations en tacrolimus dans les PBMC et permettraient d'expliquer une partie de la variabilité des concentrations intracellulaires dans l'étude menées par Capron *et al.* (100). Dans notre travail, aucun lien n'a pu être mis en évidence, ni entre concentrations dans les PBMC et protéinémie (ou albuminémie) ni entre concentrations dans les PBMC et hématocrite, peut-être en raison d'un manque de puissance lié au faible effectif de patients (91). Par ailleurs, l'impact de différentes covariables biologiques peut être très différente d'une population de transplantés à une autre. En effet, les modifications physiologiques seront différentes selon



que l'organe greffé est un foie, un rein ou un cœur. Les transplantés hépatiques sont susceptibles d'expérimenter des changements de leur métabolisme lié d'une part à la reprise de fonction plus ou moins complète et plus ou moins rapide du greffon et d'autre part au polymorphisme entre greffon et donneur. Ces changements modifieront les concentrations sanguines d'IS ainsi que la clairance hépatique de la fraction libre de ces médicaments et donc la fraction diffusible vers le lymphocyte. Les transplantés rénaux et hépatiques pourront voir leur taux de protéines plasmatiques varier, ce qui modifiera également la fraction diffusible du médicament en modifiant la liaison protéique. Enfin, les transplantés cardiaques verront leur débit cardiaque varier, ce qui impliquera une modification de la distribution des molécules immunosuppressives.

Alors que le génotype *CYP3A5* apparaît dans nombre de publications comme le facteur déterminant de la pharmacocinétique sanguine du tacrolimus, c'est le génotype *ABCB1* qui semble conditionner la diffusion du tacrolimus dans le lymphocyte. Les doses nécessaires à l'atteinte des objectifs de concentrations en tacrolimus sont influencées par le génotype *CYP3A5* chez le transplanté rénal, cardiaque ou hépatique (123–125). L'effet du génotype *ABCB1*, quant à lui, a rarement été mis en évidence comme un facteur conditionnant la posologie de tacrolimus nécessaire à l'atteinte des cibles de concentrations sanguines (126,127).

Cependant, bien que théoriquement intéressantes, les approches d'adaptation initiale de posologie du tacrolimus en fonction du polymorphisme du *CYP3A5* ne semblent pas avoir d'impact clinique, probablement du fait que l'accès au suivi thérapeutique pharmacologique est habituel et aisé (128,129). D'autres approches doivent ainsi être proposées qui auraient des avantages au point de vue clinique (rejet aigu cellulaire, perte du greffon, décès).

Le polymorphisme d'*ABCB1* semble, pour sa part, jouer un rôle critique quant à la diffusion du tacrolimus au niveau de son site d'effet et pourrait, alors que son effet systémique apparaît modéré, avoir un impact clinique supérieur à celui du *CYP3A5*. La mesure des concentrations dans les PBMC pourrait donc être un marqueur direct du risque de rejet de greffe.

C'est ce que suggèrent les travaux de l'équipe du Professeur Pierre Wallemacq menés chez 90 patients transplantés hépatiques. Les patients de cette étude monocentrique étaient traités par monothérapie de tacrolimus (dose initiale de 0,025 mg/kg/j en 2 prises) après induction par sérum polyclonal anti-lymphocytaire. L'objectif de concentration résiduelle sanguine était fixé à 6 ng/mL mais était dépassé à l'équilibre (concentration résiduelle moyenne à J7 de  $8,9 \pm 3,0$  ng/mL). Les patients bénéficiaient d'une biopsie systématique à J7, avec calcul du score de BANFF, et les concentrations résiduelles en tacrolimus dans les PBMC étaient mesurées après 1, 3, 5 et 7 jours. Les concentrations en tacrolimus dans les PBMC étaient significativement plus faibles chez les 37 patients présentant un rejet à J3 ( $21,6 \pm 13,3$  pg/million PBMC versus  $78,6 \pm 36,5$  pg/million PBMC) , J5 ( $27,6 \pm 12,2$  pg/million PBMC versus  $83,8 \pm 32,6$  pg/million PBMC) et J7 ( $33,8 \pm 16,7$  pg/million PBMC versus  $90,9 \pm 41,2$  pg/million PBMC) sans qu'il y ait de différence en terme de concentrations sanguines entre les patients en rejet et les patients indemnes de rejet (99). Parmi les 90 patients de l'étude 10,8% ont développé un rejet ayant nécessité un traitement par de fortes doses de corticoïdes. Ces patients présentaient également des concentrations résiduelles dans les PBMC significativement inférieures à celles des patients indemnes de rejet à J3 ( $21,1 \pm 8,9$  pg/million PBMC versus  $78,6 \pm 36,5$  pg/million PBMC). Les concentrations à J5 et J7 étaient également inférieures mais de manière non significative. Enfin, à J7, alors qu'il n'y avait aucune corrélation entre concentrations sanguines et score

de BANFF calculé ( $r^2 = 0,028$  ;  $p = 0,598$ ), une excellente corrélation était rapportée entre les concentrations en tacrolimus dans les PBMC et le score de BANFF ( $r^2 = 0,900$  ;  $p = 0,001$ ) (99). L'utilisation du tacrolimus en monothérapie au cours de cette étude présente, en outre, l'intérêt d'éliminer le biais qui peut exister au cours d'études évaluant l'intérêt des concentrations intracellulaires lors de multithérapies immunosuppressives. Cette étude constitue à ce jour le plus fort argument de l'intérêt clinique de la mesure des concentrations intracellulaires en tacrolimus chez le patient transplanté.

Il semble que les concentrations intracellulaires en anticalcineurine pourraient diminuer au cours des quelques jours précédents la survenue d'un rejet de greffe et constituer ainsi un marqueur prédictif intéressant du rejet. Cette hypothèse est soutenue par le travail publié par Flack *et al.* en 2008. Dans cette étude monocentrique menée chez 20 patients transplantés rénaux traités par ciclosporine (10 mg/kg/j puis adaptation par la mesure des  $C_2$  sanguines) les concentrations en ciclosporine étaient mesurées dans les lymphocytes T des patients. Un sous-groupe de 9 patients avait bénéficié, en outre, de pharmacocinétiques complètes de la ciclosporine sur 12h afin de déterminer leur exposition sanguine et intracellulaire, traduite par l' $AUC_{0-12}$ . Les concentrations en ciclosporine dans les lymphocytes T diminuaient en moyenne de  $27,1 \pm 14,6\%$  ( $p = 0,014$ ) 3 jours avant la survenue d'un rejet objectivé par une élévation de plus de 20% de la créatinine et confirmé par biopsie (130). Quatre des 9 patients ayant bénéficié d'une cinétique de ciclosporine ont présenté un rejet. Bien que cet échantillon soit faible, les  $AUC_{0-12}$  intracellulaires de ces patients étaient significativement plus faibles ( $265 \pm 18,2$  ng.h/ $10^6$  lymphocytes versus  $747 \pm 221$  ng.h/ $10^6$  lymphocytes ;  $p = 0,004$ ) que celles observées chez les 5 patients n'ayant pas présenté de rejet (130). A contrario, les  $AUC_{0-12}$  sanguines étaient quasiment identiques dans les 2 groupes ( $8388 \pm 2668$  ng.h/mL versus  $8031 \pm 1058$  ng.h/mL), confirmant bien le

découplage entre l'exposition sanguine et l'exposition dans les lymphocytes. Malgré un effectif limité ( $n = 9$ ), la différence au niveau des concentrations intracellulaires résiduelles ( $p = 0,087$ ) et au pic ( $p = 0,061$ ) atteignaient presque la significativité entre les 2 groupes (130). Le travail de Falck *et al.* présente l'avantage d'une détermination des concentrations de ciclosporine dans la population leucocytaire d'intérêt, les lymphocytes T. Les PBMC représentent, en quelque sorte, un milieu cellulaire enrichi en lymphocytes comparativement au sang total. L'utilisation des PBMC comme matrice pour le dosage présente le triple intérêt d'être donc un milieu approchant le milieu idéal (les lymphocytes, idéalement les lymphocytes T voire pourquoi pas les lymphocytes T activés), de permettre une séparation facile par utilisation d'un simple gradient de Ficoll et d'autoriser une sensibilité moindre de la méthode de dosage intracellulaire. En effet, le dosage effectué sur une population cellulaire constituée de lymphocytes et de monocytes génère nécessairement une concentration plus élevée que le dosage sur les seuls lymphocytes, en particulier dans une population de patients fréquemment lymphopéniques.

Notre équipe a récemment publié une revue des travaux récents publiés sur le dosage intracellulaire des IS. L'ensemble de ces données de concentrations en IS mesurées chez les patients au cours de ces études est colligé dans le tableau 15.

Tableau 15. Concentrations dans les PBMC ou les lymphocytes rapportées dans la littérature de 2003 à 2013, extrait de Lemaitre *et al.* (Annexe 5 - Article 5) (131).

Drug	Patients	Transplant	Mean dose	Day of measurement	Concentration; in PBMC or lymphocytes (mean ± SD)			Rejection	References
					Cmin (ng/million cells)	Cmax (ng/million cells)	AUC (ng.h/million cells)		
Cyclosporine	19	Healthy volunteers	2 mg/kg	1	-	26.1	82.2 <sup>a</sup>	NA	[11]
	41	Kidney	2.6 mg/kg	steady-state	2.2	-	-	NA	[12]
	20	Liver	1.9 mg/kg	steady-state	1.7	-	-	NA	[12]
	3	Lung	2.8 mg/kg	steady-state	4	-	-	NA	[12]
	20	Kidney	6 mg/kg/d <sup>b</sup>	steady-state	3.8 ± 3.7	-	-	No	[13]
	4	Kidney	205 ± 99.1 mg/d	steady-state	26.5 ± 17.3	256 ± 149	747 ± 221 <sup>c</sup>	No	[14] <sup>d</sup>
	5	Kidney	188 ± 25.0 mg/d	steady-state	8.6 ± 4.0	86.1 ± 27.5	265 ± 18.2 <sup>c</sup>	Yes	[14] <sup>d</sup>
Tacrolimus	53	Liver	0.025 mg/kg/d <sup>e</sup>	7	90.9 ± 41.2	-	-	No	[16] <sup>f</sup>
	37	Liver	0.025 mg/kg/d <sup>e</sup>	7	33.8 ± 16.7	-	-	Yes	[16] <sup>g</sup>
	24	Heart	5.2 ± 4.0 mg/d	steady-state	40.0 ± 29.0	-	-	NA	[17]
	94	Kidney	0.20 mg/kg/d <sup>h</sup>	7	71.6 ± 19.4	-	-	NA	[18]
	64	Kidney	0.20 mg/kg/d <sup>h</sup>	steady-state	76.6 ± 19.9	-	-	NA	[18]
Everolimus	36	Heart	1.34 mg/d	steady-state	138 ± 112	-	-	NA	[19]

<sup>a</sup> AUC<sub>0-24</sub>.

<sup>b</sup> initially, then adapted to 150–300 ng/mL.

<sup>c</sup> AUC<sub>0-12</sub>.

<sup>d</sup> T-lymphocyte concentrations.

<sup>e</sup> initially, then adapted to 6 ng/mL.

<sup>f</sup> Banff score 0–5.

<sup>g</sup> Banff score 6–9.

<sup>h</sup> initially, then adapted to 10–20 ng/mL.

La fréquence du rejet aigu cellulaire est présumée faible (<10%) par certains auteurs, ce qui ne justifie pas, selon eux, un investissement conséquent en recherche afin de tenter de réduire ce taux. Cependant, lorsque le rejet est exploré, par exemple en systématisant les biopsies, sa fréquence apparaît élevée, jusqu'à 30% à 1 an chez le patient transplanté hépatique par exemple (132). La définition du rejet aigu à partir de critères cliniques et biologiques, à l'exclusion des rejets prouvés par biopsie, sous-estime vraisemblablement la fréquence du rejet aigu cellulaire. Ainsi, Abraham *et al.* ont montré qu'il existait des anomalies histologiques mises en évidence par biopsie chez les patients transplantés hépatiques n'ayant aucune perturbation biologique (133). Les conséquences de ces rejets infra-cliniques restent méconnues. Certaines études menées chez le transplanté rénal

accréditent la thèse de l'absence d'impact des rejets infra-cliniques sur la survie du greffon (134,135) tandis que d'autres auteurs montrent que ces rejets peuvent entraîner des altérations histologiques ainsi qu'une immunisation à l'origine de rejets humoraux et de la perte du greffon (136,137). Par ailleurs, bien que la fréquence et la sévérité de ces rejets aient toutes deux diminué au cours des dernières années, ces résultats n'ont pas permis d'obtenir une augmentation de la survie à long terme du greffon rénal (138). Dans l'hypothèse d'un impact clinique immédiat ou à distance de ces rejets faibles ou infra-cliniques, une intervention thérapeutique précoce, guidée par des dosages intracellulaires, pourrait être intéressante.

De plus, la tendance actuelle à la minimisation des concentrations d'IS dans le but de limiter leur toxicité implique l'utilisation d'outils fins d'évaluation de l'effet immunosuppresseur des traitements. Les outils de dosage intracellulaire développés au cours de ce travail peuvent concourir au succès de ce type de stratégies en permettant la détection précoce de patients présentant des concentrations faibles qui pourraient être plus à risque de développer un rejet de transplantation. L'autre voie d'amélioration thérapeutique est de privilégier des multithérapies sans inhibiteurs de calcineurine. Cette dernière classe d'IS reste actuellement la classe pivot du traitement prophylactique et lorsqu'elle ne fait pas partie de la stratégie thérapeutique, il convient d'optimiser au maximum les autres classes d'IS utilisées. Dans ce type de stratégies, les inhibiteurs de m-TOR, et notamment l'évérolimus, peuvent avoir une place importante et leur dosage dans les PBMC peut contribuer à une utilisation optimisée de la molécule.

### 6.3 Pharmacocinétique-Pharmacodynamique du tacrolimus en transplantation hépatique

Quelques études se sont proposées d'explorer le lien existant entre concentrations sanguines d'IS et activité de la calcineurine (80–82,139) ou entre les concentrations sanguines et intracellulaires en tacrolimus (99–101) chez le transplanté hépatique, mais notre travail est la première présentation de la relation entre concentrations sanguines, intracellulaires et activité de la calcineurine au sein d'un même groupe de patients. L'intérêt de ce travail est également de proposer des données de pharmacocinétiques intracellulaires complètes du tacrolimus, avec notamment l'évaluation d'AUCs, là où la plupart des études menées jusqu'alors ne présentaient que des résultats de concentrations résiduelles. Le principal résultat de ce travail est l'absence de corrélation entre les expositions sanguines, intracellulaires et l'aire sous la courbe d'activité de la calcineurine ( $AUC_{0-12CNA}$ ) à J1 et J7 post-transplantation.

La variabilité de l'exposition intracellulaire en tacrolimus était élevée (CV de l'AUC = 89,5%) et supérieure à celle de l'exposition sanguine (CV de l'AUC = 45,8%) suggérant une très grande différence de diffusion du tacrolimus au site d'effet d'un patient à un autre. Le dosage précoce du tacrolimus dans les PBMC pourrait ainsi permettre d'identifier les patients chez qui le tacrolimus diffuse peu au niveau du site d'action, c'est à dire à risque de développer un rejet, et ainsi permettre une intervention thérapeutique afin de prévenir cet évènement. Capron *et al.* ont montré que les concentrations résiduelles en tacrolimus dans les PBMC étaient significativement plus faibles à J7 chez les patients transplantés hépatiques présentant un rejet de greffe que chez les patients sans rejet (99). Une

corrélation étroite a également été démontrée par ces auteurs entre le score de BANFF et les concentrations résiduelles en tacrolimus dans les PBMC alors même qu'aucun lien n'existait avec les concentrations résiduelles sanguines (99). Dans un autre travail mené par Fukudo *et al.* chez 21 patients transplantés hépatiques traités par tacrolimus et évaluable au point de vue de l'efficacité du traitement, l'activité moyenne de la calcineurine était significativement plus faible au cours des 14 premiers jours de traitement pour les patients présentant un rejet de greffe (80). Néanmoins, les concentrations résiduelles sanguines de ces patients étaient également plus faibles que celles des patients indemnes de rejet (80). Boleslawski *et al.* rapportent, dans une cohorte de 11 transplantés hépatiques traités par tacrolimus, une plus forte activité de la calcineurine chez les patients en rejet (140). Bien que non statistiquement significatif ( $p = 0,06$ ), activité de la calcineurine et concentrations en tacrolimus étaient inversement corrélées (140).

Au cours du rejet de greffe, l'activité de la calcineurine pourrait s'élever comme le suggèrent Fukudo *et al.* et une diminution de l'exposition en tacrolimus dans les lymphocytes, et donc dans les PBMC, est attendue (139). Malheureusement, les travaux menés jusqu'à présent n'avaient jamais évalué à la fois l'activité de la calcineurine et l'exposition intracellulaire en tacrolimus.

De manière similaire aux travaux de Blanchet *et al.*, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre les concentrations mesurées en tacrolimus une semaine après transplantation et l'activité de la calcineurine (82). Dans notre travail, ni l'exposition intracellulaire, ni l'exposition sanguine n'étaient reliées à l'activité de la calcineurine. De manière intéressante, au cours de l'étude, seul un patient a présenté un rejet aigu cellulaire (grade Banff 4) 17 jours après sa transplantation. Ce patient présentait à la fois une exposition sanguine à l'équilibre proche de la moyenne des patients de l'étude (70,0 ng.h/mL versus



81,2 ± 37,2 ng.h/mL), une exposition intracellulaire 4 fois inférieure à la moyenne du groupe, le plus faible ratio de diffusion intracellulaire du tacrolimus et la plus forte augmentation de l'activité de la calcineurine entre le premier et le septième jour de l'étude. Cette observation, même si elle reste à confirmer, pourrait témoigner de l'intérêt de la mesure de la concentration intracellulaire au cours de la première semaine comme suggéré par Capron *et al.* (99). La détermination de la concentration en tacrolimus dans les PBMC, bien que sans doute moins directement reliée à l'effet immunosuppresseur du traitement, présente l'intérêt d'être plus accessible techniquement que la détermination de l'activité de la calcineurine.

Ces résultats doivent néanmoins être interprétés avec prudence et notre étude doit davantage être considérée comme une étude de faisabilité permettant la réalisation d'essais cliniques dont le but sera d'évaluer la pertinence de l'exposition intracellulaire en tacrolimus et de la détermination de l'activité de la calcineurine en tant que marqueurs prédictifs du rejet de greffe. En effet, l'effectif étudié au cours de cette étude est faible (10 patients). Deuxièmement, la variabilité de l'activité de la calcineurine est élevée, que ce soit pour des raisons analytiques liées à une absence de standardisation de l'examen ou, comme cela a déjà été rapporté, en raison de l'indication de la transplantation et peut limiter la mise en évidence d'une relation exposition en tacrolimus - activité de la calcineurine (141,142). La même remarque vaut également pour la détermination de la concentration intracellulaire. Enfin, dans notre étude, une importante contamination des PBMC par des neutrophiles a été notée au cours de l'étape de séparation des cellules. Cette contamination nous a contraint à rapporter les concentrations en tacrolimus, non pas par million de PBMC, mais par million de leucocytes. Des contaminations importantes par des neutrophiles lors de la séparation des PBMC ont déjà été rapportées chez les patients de réanimation lors des

phases de sepsis ainsi que dans certaines pathologies auto-immunes comme le lupus (143,144). L'hypothèse avancée dans le cas de nos patients pourrait être une dégranulation d'une partie des polynucléaires neutrophiles à la phase de post-transplantation hépatique immédiate ce qui diminuerait la densité de ces cellules lesquelles se retrouveraient alors au même niveau que les PBMC lors de la séparation par densité. La phase de numération avec marquage des sous-populations cellulaires par cytométrie de flux, nous a permis de mettre en évidence cette contamination laquelle peut être passée inaperçue lors d'études ayant utilisé des techniques de numération sans marquage. Les travaux menés dans le futur sur cette thématique devront impérativement prendre en compte la possibilité de marquer les sous-types cellulaires à la phase de numération. Aucune étude n'ayant à ce jour évalué la capacité de diffusion du tacrolimus au sein de différentes population de leucocytes, il est impossible d'exclure que la diffusion ne soit pas identique entre les PBMC et les neutrophiles. La concentration rapportée dans les leucocytes pourrait alors présenter un biais vis à vis de la concentration dans les PBMC. L'identification des différentes sous-populations de leucocytes au cours de l'étape de numération des cellules apparaît donc comme un point crucial.

A contrario, l'activité de la calcineurine dans différentes populations de leucocytes a été étudiée chez le volontaire sain et est connue (145).

Le profil d'inhibition de la calcineurine présenté au cours de notre étude apporte un éclairage intéressant sur un certain nombre de points. En effet, à J1, l'inhibition de la calcineurine est maximale 4h après administration du tacrolimus avec une inhibition moyenne de 38% de la valeur initiale de l'activité. Ce minimum d'activité est pratiquement contemporain de la concentration maximale sanguine et de la concentration maximale intracellulaire, lesquelles sont atteintes 3h après administration du tacrolimus. En revanche,

à J7, le profil moyen d'inhibition de la calcineurine est relativement plat avec une inhibition comprise en permanence autour de 15% de la valeur initiale. Ces résultats s'inscrivent tout à fait dans la lignée des données d'activité de la calcineurine obtenues *in-vitro* et chez le patient transplanté. En effet, Blanchet *et al.* suggèrent que l'inhibition de l'activité de la calcineurine dans des PBMC, directement exposés à des doses croissantes de tacrolimus, atteint un maximum autour de 50% (145). Une inhibition incomplète de l'activité de la phosphatase est également obtenue (64%) dans le lymphocyte T soumis à des concentrations saturantes de tacrolimus dans les travaux de Kung *et al.* (146). Cette inhibition incomplète pourrait être due à la quantité limitée de FKBP12 dans le cytoplasme (146). Ces résultats suggèrent que l'effet immunosuppresseur du tacrolimus pourrait s'exercer au travers d'une autre voie en plus de celle habituellement décrite. Chez les patients transplantés hépatiques, Fukudo *et al.* ont estimé la concentration sanguine en tacrolimus diminuant l'activité de la calcineurine de moitié ( $EC_{50}$ ) comme étant égale à 26,4 ng/mL (80). Ces résultats sont cohérents avec les données de nos travaux. En effet, la  $C_{max}$  sanguine moyenne de nos patients à J1 est de 13,0 ng/mL et l'inhibition maximale obtenue de 38%, tandis qu'à J7, la  $C_{max}$  sanguine moyenne de nos patients n'est que de 8,8 ng/mL pour une inhibition négligeable. Les faibles niveaux de concentrations sanguines des patients de notre étude sont vraisemblablement à l'origine de la faible inhibition décrite au cours de ce travail. Millan *et al.* montrent que l'activité de la calcineurine mesurée 2h après administration était reliée à l'AUC du tacrolimus et Blanchet *et al.*, que l'activité de la calcineurine mesurée 2h après administration était reliée à la concentration sanguine en tacrolimus mesurée 2h après la prise (92,147). De son côté, Koefoed-Nielsen *et al.* rapportent qu'aucun lien entre aucun des temps de prélèvement de mesure du tacrolimus ne présentait de corrélation avec cette aire sous la courbe (148).

L'originalité de notre travail est donc également de présenter des profils d'inhibition de la calcineurine chez des transplantés hépatiques pour lesquels les concentrations résiduelles sanguines sont d'emblée ajustées sur un objectif minimisé (6 à 10 ng/mL). En effet, la récente méta-analyse de Rodriguez-Peralvarez *et al.* a montré que, chez les transplantés hépatiques, une cible de concentrations sanguines résiduelles de 6 à 10 ng/mL maintenue au cours du premier mois post-transplantation n'entraînait pas plus de rejet aigu cellulaire qu'une cible de concentration supérieure à 10 ng/mL tout en diminuant la néphrotoxicité du traitement (61). Cette minimisation de la cible de concentrations ne s'entend, évidemment, que dans le cadre de multithérapies d'IS avec des corticoïdes et de l'acide mycophénolique ou un inhibiteur de m-TOR, schémas avec lesquels la fréquence du rejet aigu cellulaire est maîtrisée. Dans notre travail, l'activité moyenne de la calcineurine mesurée avant la prise de tacrolimus à J7 n'était pas significativement différente de l'activité moyenne basale avant initiation du traitement ( $655 \pm 401$  vs  $621 \pm 469$  pmol/min/ $10^6$  leucocytes ;  $p = 0,11$ ). Ce résultat suggère que le maintien de l'activité de la calcineurine au niveau de l'activité basale du patient par une faible exposition au tacrolimus pourrait suffire à prévenir le rejet. Néanmoins, l'absence de relation entre l'exposition sanguine et l'activité de la calcineurine explique vraisemblablement qu'une faible proportion de patients développe un rejet de greffe à exposition sanguine égale.

Même si nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien entre concentrations intracellulaires et activité de la calcineurine au cours de ce travail, on peut présumer que la mesure de la concentration au niveau du site d'effet du médicament pourrait être plus étroitement liée à l'effet du médicament sur la protéine cible. C'est ce que laisse envisager les résultats de dosage du tacrolimus dans les PBMC obtenus par Capron *et al.* chez le patient transplanté hépatique. Les patients de cette étude, traités par monothérapie de

tacrolimus, développaient davantage de rejets aigus lorsque leur concentration en tacrolimus dans les PBMC étaient faibles, laissant augurer que la survenue du rejet était liée à une faible exposition en tacrolimus au site d'effet (99). Les patients de notre étude étaient tous traités par tacrolimus, acide mycophénolique et corticoïdes ce qui peut diluer une éventuelle relation entre concentration et effet. Dans le travail de Capron *et al.*, une sous-exposition en tacrolimus au niveau des PBMC entraînant un défaut d'effet IS du médicament ne pouvait être compensée par l'effet d'un autre médicament.

Nous avons étudié, pour la première fois, la relation entre concentration sanguine en tacrolimus, concentration en tacrolimus dans les PBMC et activité de la calcineurine. Les résultats de notre travail pourraient être en faveur d'une valeur prédictive plus importante de la détermination de l'activité de la calcineurine comparativement à la mesure des concentrations sanguines ou intracellulaires. Néanmoins, l'un des écueils majeurs de l'utilisation en routine d'un tel moyen de monitoring est la très grande variabilité du paramètre, laquelle empêche d'établir une "zone thérapeutique". Le patient est, en quelque sorte, son propre témoin pour ce qui est de l'activité de cette phosphatase. Le maintien de l'activité de la calcineurine d'un patient au niveau de son niveau basal pourrait être un objectif suffisant à l'équilibre d'un traitement par trithérapie d'IS pour prévenir le rejet de greffe en transplantation hépatique. La détermination de la concentration en tacrolimus dans les PBMC pourrait également présenter un intérêt. La grande variabilité mise en évidence pour les concentrations intracellulaires aussi bien que pour l'activité de la calcineurine pourrait être à l'origine de la grande variabilité des effets rencontrés chez le patient transplanté pour une même concentration sanguine mesurée. Cette variabilité peut-être en partie expliquée par le rôle des transporteurs d'efflux présents à la surface de la membrane du lymphocyte et qui pourrait moduler la diffusion du tacrolimus vers son site

d'action. L'ensemble de nos résultats ne permettent pas de trancher quant à la modalité la plus pertinente de monitoring de l'effet d'IS et doivent conduire à la réalisation d'essais cliniques permettant d'évaluer le dosage du tacrolimus dans les PBMC ou la détermination de l'activité de la calcineurine en tant que marqueurs prédictifs du rejet de greffe. Les modalités de mesures de ces paramètres (prélèvements effectués en résiduel, 2h après administration du tacrolimus, au pic ou évaluation complète de l'AUC) restent également à définir.

## 7. Conclusion générale

En dépit des efforts faits dans la prise en charge du patient transplanté et notamment en ce qui concerne les traitements IS, la fréquence du rejet de greffe reste importante et diminue peu. Il est donc licite de chercher à mettre en œuvre des actions d'optimisation des thérapies immunosuppressives. Nous avons, au cours de ce travail de doctorat, développé de nouveaux outils permettant un meilleur usage des IS : un modèle de pharmacocinétique de population de l'évérolimus permettant de mieux prédire les concentrations sanguines en évérolimus chez le patient transplanté cardiaque et deux méthodes de dosage des IS, d'une part de l'évérolimus et d'autre part du tacrolimus, dans les PBMC. Ces outils ont ensuite été évalués cliniquement chez le patient.

Nous avons pu également explorer la relation entre concentrations sanguines, concentrations intracellulaires et effet sur la protéine cible du tacrolimus chez le patient transplanté hépatique et ainsi améliorer les connaissances de la relation pharmacocinétique-pharmacodynamique de cette molécule. Ceci a permis jeter les bases nécessaires à la réalisation d'essais cliniques permettant d'évaluer la pertinence d'un suivi des concentrations intracellulaires et/ou de l'activité de la calcineurine dans la prévention de rejet de transplantation.

L'utilisation de ces outils doit concourir à la diminution de la fréquence du rejet de greffe et à l'amélioration globale de la prise en charge du patient transplanté d'organe.

## 8. Perspectives

Nous avons pour projet de développer sur cette thématique une véritable recherche translationnelle afin d'explorer *in-vitro* et jusqu'au lit du patient les questions restées en suspens à l'issue de ce travail de doctorat. Deux projets ont ainsi obtenu les accords réglementaires nécessaires afin d'être menés à bien.

Le premier projet (DIFF-TAC) (Annexe 7 – Protocole 2) visera à étudier la diffusion du tacrolimus dans les cellules mononuclées et l'impact de la pompe d'efflux ABCB1 sur cette diffusion, lesquels n'ont pas, à ce jour, été étudiés. La cinétique d'effet du médicament sur la calcineurine au sein des cellules mononuclées est également méconnue.

C'est pourquoi nous proposons d'étudier la diffusion *in-vitro* du tacrolimus dans les cellules mononuclées de prélèvements sanguins obtenus auprès de patients hémochromatosiques bénéficiant d'un traitement d'entretien par saignée ainsi que l'effet du tacrolimus sur la calcineurine sur ces mêmes cellules mononuclées par mesure de son activité. Nous proposons également de déterminer l'effet des protéines de transport et notamment de la pompe d'efflux ABCB1 sur la diffusion du tacrolimus et sur l'activité de la calcineurine par inhibition d'ABCB1.

Le second projet (OPTILTH) (Annexe 6 – Protocole 1) aura pour objectif de déterminer la valeur d'un monitoring de l'effet IS par suivi des concentrations en tacrolimus dans les PBMC et/ou détermination de l'activité de la calcineurine chez le patient transplanté hépatique.



L'étude visera à déterminer si le suivi thérapeutique longitudinal des concentrations intracellulaires en tacrolimus et/ou le suivi de l'activité de la calcineurine sont des marqueurs plus pertinents que le suivi des concentrations sanguines en tacrolimus dans le cadre de la prévention du rejet de greffe. Pour atteindre cet objectif, nous proposons d'identifier i) les relations existant entre a) la dose de tacrolimus administrée et les concentrations sanguines et intracellulaires en tacrolimus, b) les concentrations intracellulaires en tacrolimus et l'activité de la calcineurine, ii) l'impact des génotypes CYP 3A5 des donneurs et receveurs et ABCB1 des receveurs sur les relations dose-concentration du tacrolimus, et iii) le lien entre l'activité de la calcineurine et les signes cliniques de rejet, chez le patient transplanté hépatique, traité par tacrolimus à libération immédiate ou prolongée.

## 9. Références

1. Agence de la Biomédecine. Greffe d'organe : données générales et méthodes.
2. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996 Sep;80(3 Pt 2):S40–45.
3. Liu J, Farmer JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 1991 Aug 23;66(4):807–15.
4. Neoral Accessdata Fda [Internet]. Fda.gov; 2009 [cited 2014 Jul 16]. Available from: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2009/050715s027,050716s028lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/050715s027,050716s028lbl.pdf)
5. Sandimmune Accessdata Fda [Internet]. Fda.gov; 2012 [cited 2014 Jul 16]. Available from: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2012/050573s035,050574s043,050625s049lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/050573s035,050574s043,050625s049lbl.pdf)
6. Marquet P. Suivi thérapeutique pharmacologique : pour l'adaptation de posologie des médicaments. Elsevier. 2004. 539 p.
7. DrugBank, editor. Cyclosporine [Internet]. DrugBank. 2013 [cited 2014 Jun 9]. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00091>

8. Ptachcinski RJ, Venkataramanan R, Rosenthal JT, Burckart GJ, Taylor RJ, Hakala TR. Cyclosporine kinetics in renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther.* 1985 Sep;38(3):296–300.
9. Thervet E, Anglicheau D, Legendre C, Beaune P. Role of pharmacogenetics of immunosuppressive drugs in organ transplantation. *Ther Drug Monit.* 2008 Apr;30(2):143–50.
10. Elens L, van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, van Schaik RHN. CYP3A4\*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics.* 2013 Jan;14(1):47–62.
11. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II. *Clin Pharmacokinet.* 2010 Apr;49(4):207–21.
12. Dai Y, Iwanaga K, Lin YS, Hebert MF, Davis CL, Huang W, et al. In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochem Pharmacol.* 2004 Nov 1;68(9):1889–902.
13. Prograf Accessdata Fda [Internet]. Fda.gov; 2009 [cited 2014 Jul 17]. Available from: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2009/050708s027,050709s021lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/050708s027,050709s021lbl.pdf)
14. Thervet E, Lorient MA, Barbier S, Buchler M, Ficheux M, Choukroun G, et al. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther.* 2010 Jun;87(6):721–6.

15. DrugBank, editor. Tacrolimus [Internet]. DrugBank. 2013 [cited 2014 Jun 9]. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00864>
16. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet*. 1995 Dec;29(6):404–30.
17. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(10):623–53.
18. Zhang Y, Benet LZ. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(3):159–68.
19. Jain A, Venkataramanan R, Fung JJ, Gartner JC, Lever J, Balan V, et al. Pregnancy after liver transplantation under tacrolimus. *Transplantation*. 1997 Aug 27;64(4):559–65.
20. Barraclough KA, Isbel NM, Johnson DW, Campbell SB, Staatz CE. Once- versus twice-daily tacrolimus: are the formulations truly equivalent? *Drugs*. 2011 Aug 20;71(12):1561–77.
21. Möller A, Iwasaki K, Kawamura A, Teramura Y, Shiraga T, Hata T, et al. The disposition of <sup>14</sup>C-labeled tacrolimus after intravenous and oral administration in healthy human subjects. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 1999 Jun;27(6):633–6.
22. Macphee IAM, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A, et al. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5\*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation*. 2005 Feb 27;79(4):499–502.

23. Zhang X, Liu Z, Zheng J, Chen Z, Tang Z, Chen J, et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus concentration in the early stage after renal transplantation. *Clin Transplant*. 2005 Oct;19(5):638–43.
24. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet*. 2010 Mar;49(3):141–75.
25. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, et al. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 2006 May;34(5):836–47.
26. Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(2):83–95.
27. Dumont FJ, Kastner C, Iacovone F Jr, Fischer PA. Quantitative and temporal analysis of the cellular interaction of FK-506 and rapamycin in T-lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Jan;268(1):32–41.
28. Kahan BD, Chang JY, Sehgal SN. Preclinical evaluation of a new potent immunosuppressive agent, rapamycin. *Transplantation*. 1991 Aug;52(2):185–91.
29. DrugBank, editor. Sirolimus [Internet]. DrugBank. 2013 [cited 2014 Jun 9]. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00877>
30. Weir MR, Diekmann F, Flechner SM, Lebranchu Y, Mandelbrot DA, Oberbauer R, et al. mTOR inhibition: the learning curve in kidney transplantation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2010 May 1;23(5):447–60.

31. Mahalati K, Kahan BD. Clinical pharmacokinetics of sirolimus. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(8):573–85.
32. Zimmerman JJ, Ferron GM, Lim HK, Parker V. The effect of a high-fat meal on the oral bioavailability of the immunosuppressant sirolimus (rapamycin). *J Clin Pharmacol.* 1999 Nov;39(11):1155–61.
33. Anglicheau D, Le Corre D, Lechaton S, Laurent-Puig P, Kreis H, Beaune P, et al. Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2005 Mar;5(3):595–603.
34. Stenton SB, Partovi N, Ensom MHH. Sirolimus: the evidence for clinical pharmacokinetic monitoring. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(8):769–86.
35. Rapamune Accessdata Fda [Internet]. Fda.gov; 2007. Available from: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2007/021083s030,021110s038lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2007/021083s030,021110s038lbl.pdf)
36. Morrisett JD, Abdel-Fattah G, Hoogeveen R, Mitchell E, Ballantyne CM, Pownall HJ, et al. Effects of sirolimus on plasma lipids, lipoprotein levels, and fatty acid metabolism in renal transplant patients. *J Lipid Res.* 2002 Aug;43(8):1170–80.
37. Groth CG, Bäckman L, Morales JM, Calne R, Kreis H, Lang P, et al. Sirolimus (rapamycin)-based therapy in human renal transplantation: similar efficacy and different toxicity compared with cyclosporine. Sirolimus European Renal Transplant Study Group. *Transplantation.* 1999 Apr 15;67(7):1036–42.

38. Kahan B. Toxicity spectrum of inhibitors of mammalian target of rapamycin in organ transplantation: etiology, pathogenesis and treatment. *Expert Opin Drug Saf.* 2011 Sep;10(5):727–49.
39. Augustine JJ, Rodriguez V, Padiyar A, Bodziak KA, Schulak JA, Hricik DE. Reduction in erythropoietin resistance after conversion from sirolimus to enteric coated mycophenolate sodium. *Transplantation.* 2008 Aug 27;86(4):548–53.
40. Shihab F, Christians U, Smith L, Wellen JR, Kaplan B. Focus on mTOR inhibitors and tacrolimus in renal transplantation: Pharmacokinetics, exposure-response relationships, and clinical outcomes. *Transpl Immunol.* 2014 Jun;31(1):22–32.
41. Mabasa VH, Ensom MHH. The role of therapeutic monitoring of everolimus in solid organ transplantation. *Ther Drug Monit.* 2005 Oct;27(5):666–76.
42. Laplante A, Demeule M, Murphy GF, Béliveau R. Interaction of immunosuppressive agents rapamycin and its analogue SDZ-RAD with endothelial P-gp. *Transplant Proc.* 2002 Dec;34(8):3393–5.
43. Kovarik JM, Kahan BD, Kaplan B, Lorber M, Winkler M, Rouilly M, et al. Longitudinal assessment of everolimus in de novo renal transplant recipients over the first post-transplant year: pharmacokinetics, exposure-response relationships, and influence on cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Jan;69(1):48–56.
44. Kovarik JM, Hartmann S, Figueiredo J, Rouilly M, Port A, Rordorf C. Effect of rifampin on apparent clearance of everolimus. *Ann Pharmacother.* 2002 Jun;36(6):981–5.

45. Jacobsen W, Serkova N, Hausen B, Morris RE, Benet LZ, Christians U. Comparison of the in vitro metabolism of the macrolide immunosuppressants sirolimus and RAD. *Transplant Proc.* 2001 Mar;33(1-2):514–5.
46. Kovarik JM, Kalbag J, Figueiredo J, Rouilly M, Frazier OL, Rordorf C. Differential influence of two cyclosporine formulations on everolimus pharmacokinetics: a clinically relevant pharmacokinetic interaction. *J Clin Pharmacol.* 2002 Jan;42(1):95–9.
47. Zortress Accessdata Fda [Internet]. Fda.gov; 2013 [cited 2014 Jul 17]. Available from: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2013/021560s006lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/021560s006lbl.pdf)
48. Watson I, Potter J, Yatscoff R, Fraser A, Himberg JJ, Wenk M. Editorial. *Ther Drug Monit.* 1997;19(2):125.
49. Le Guellec C, Simon N, Hulot JS, Billaud EM. Méthodologie pour l'évaluation du niveau de preuve du suivi thérapeutique pharmacologique. *La Lettre du pharmacologue. EdikmarkSanté.* 2009;29–34.
50. Goirand F, Royer B, Hulin A, Saint-Marcoux F, Groupe Suivi Therapeutique Pharmacologique de la Societe Francaise de Pharmacologie et de Therapeutique. [Level of evidence for therapeutic drug monitoring of everolimus]. *Thérapie.* 2011 Feb;66(1):57–61.
51. Levy G, Thervet E, Lake J, Uchida K, Consensus on Neoral C(2): Expert Review in Transplantation (CONCERT) Group. Patient management by Neoral C(2) monitoring: an international consensus statement. *Transplantation.* 2002 May 15;73(9 Suppl):S12–18.



52. Thervet E, Pfeffer P, Scolari MP, Toselli L, Pallardó LM, Chadban S, et al. Clinical outcomes during the first three months posttransplant in renal allograft recipients managed by C2 monitoring of cyclosporine microemulsion. *Transplantation*. 2003 Sep 27;76(6):903–8.
53. Levy G, Burra P, Cavallari A, Duvoux C, Lake J, Mayer AD, et al. Improved clinical outcomes for liver transplant recipients using cyclosporine monitoring based on 2-hr post-dose levels (C2). *Transplantation*. 2002 Mar 27;73(6):953–9.
54. Kahan BD, Keown P, Levy GA, Johnston A. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs in clinical practice. *Clin Ther*. 2002 Mar;24(3):330–350; discussion 329.
55. Schiff J, Cole E, Cantarovich M. Therapeutic monitoring of calcineurin inhibitors for the nephrologist. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2007 Mar;2(2):374–84.
56. Laskow DA, Vincenti F, Neylan JF, Mendez R, Matas AJ. An open-label, concentration-ranging trial of FK506 in primary kidney transplantation: a report of the United States Multicenter FK506 Kidney Transplant Group. *Transplantation*. 1996 Oct 15;62(7):900–5.
57. Venkataramanan R, Shaw LM, Sarkozi L, Mullins R, Pirsch J, MacFarlane G, et al. Clinical utility of monitoring tacrolimus blood concentrations in liver transplant patients. *J Clin Pharmacol*. 2001 May;41(5):542–51.

58. Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufroid V, Holt DW, Johnston A, et al. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit.* 2009 Apr;31(2):139–52.
59. Jusko WJ, Thomson AW, Fung J, McMaster P, Wong SH, Zylber-Katz E, et al. Consensus document: therapeutic monitoring of tacrolimus (FK-506). *Ther Drug Monit.* 1995 Dec;17(6):606–14.
60. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gürkan A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2007 Dec 20;357(25):2562–75.
61. Rodríguez-Perálvarez M, Germani G, Darius T, Lerut J, Tsochatzis E, Burroughs AK. Tacrolimus trough levels, rejection and renal impairment in liver transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2012 Oct;12(10):2797–814.
62. Zimmerman JJ. Exposure-response relationships and drug interactions of sirolimus. *AAPS J.* 2004;6(4):e28.
63. Kovarik JM, Tedesco H, Pascual J, Civati G, Bizot M-N, Geissler J, et al. Everolimus therapeutic concentration range defined from a prospective trial with reduced-exposure cyclosporine in de novo kidney transplantation. *Ther Drug Monit.* 2004 Oct;26(5):499–505.
64. Vitko S, Tedesco H, Eris J, Pascual J, Whelchel J, Magee JC, et al. Everolimus with optimized cyclosporine dosing in renal transplant recipients: 6-month safety and

- efficacy results of two randomized studies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2004 Apr;4(4):626–35.
65. Kahan BD, Wong RL, Carter C, Katz SH, Von Fellenberg J, Van Buren CT, et al. A phase I study of a 4-week course of SDZ-RAD (RAD) quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant recipients. *Transplantation.* 1999 Oct 27;68(8):1100–6.
  66. Kovarik JM, Kaplan B, Tedesco Silva H, Kahan BD, Dantal J, Vitko S, et al. Exposure-response relationships for everolimus in de novo kidney transplantation: defining a therapeutic range. *Transplantation.* 2002 Mar 27;73(6):920–5.
  67. Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon KL. Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage. *Comput Biomed Res Int J.* 1972 Oct;5(5):411–59.
  68. Ette EI. Stability and performance of a population pharmacokinetic model. *J Clin Pharmacol.* 1997 Jun;37(6):486–95.
  69. Ette EI, Ludden TM. Population pharmacokinetic modeling: the importance of informative graphics. *Pharm Res.* 1995 Dec;12(12):1845–55.
  70. Jadhav PR, Gobburu JVS. A new equivalence based metric for predictive check to qualify mixed-effects models. *AAPS J.* 2005;7(3):E523–531.
  71. Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M, Holzgrabe U, Sörgel F. Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48(2):89–124.
  72. Slusher JT, Kuwahara SK, Hamzeh FM, Lewis LD, Kornhauser DM, Lietman PS. Intracellular zidovudine (ZDV) and ZDV phosphates as measured by a validated

- combined high-pressure liquid chromatography-radioimmunoassay procedure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992 Nov;36(11):2473–7.
73. Pruvost A, Becher F, Bardouille P, Guerrero C, Creminon C, Delfraissy JF, et al. Direct determination of phosphorylated intracellular anabolites of stavudine (d4T) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM.* 2001;15(16):1401–8.
74. MacPhee IAM. Pharmacogenetic biomarkers: cytochrome P450 3A5. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2012 Sep 8;413(17-18):1312–7.
75. Chinn LW, Kroetz DL. ABCB1 pharmacogenetics: progress, pitfalls, and promise. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Feb;81(2):265–9.
76. Giraud C, Manceau S, Treluyer J-M. ABC transporters in human lymphocytes: expression, activity and role, modulating factors and consequences for antiretroviral therapies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010 May;6(5):571–89.
77. Vafadari R, Bouamar R, Hesselink DA, Kraaijeveld R, van Schaik RHN, Weimar W, et al. Genetic polymorphisms in ABCB1 influence the pharmacodynamics of tacrolimus. *Ther Drug Monit.* 2013 Aug;35(4):459–65.
78. Millán O, Rafael-Valdivia L, Torrademé E, López A, Fortuna V, Sánchez-Cabus S, et al. Intracellular IFN- $\gamma$  and IL-2 expression monitoring as surrogate markers of the risk of acute rejection and personal drug response in de novo liver transplant recipients. *Cytokine.* 2013 Feb;61(2):556–64.

79. Billing H, Breil T, Schmidt J, Tönshoff B, Schmitt CP, Schmitt C, et al. Pharmacodynamic monitoring by residual NFAT-regulated gene expression in stable pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2012 Mar;16(2):187–94.
80. Fukudo M, Yano I, Masuda S, Fukatsu S, Katsura T, Ogura Y, et al. Pharmacodynamic analysis of tacrolimus and cyclosporine in living-donor liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2005 Aug;78(2):168–81.
81. Yano I, Masuda S, Egawa H, Sugimoto M, Fukudo M, Yoshida Y, et al. Significance of trough monitoring for tacrolimus blood concentration and calcineurin activity in adult patients undergoing primary living-donor liver transplantation. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012 Mar;68(3):259–66.
82. Blanchet B, Duvoux C, Costentin CE, Barrault C, Ghaleh B, Salvat A, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment of tacrolimus in liver-transplant recipients during the early post-transplantation period. *Ther Drug Monit*. 2008 Aug;30(4):412–8.
83. Brunet M, Campistol JM, Millán O, Vidal E, Esforzado N, Rojo I, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic correlations of cyclosporine therapy in stable renal transplant patients: evaluation of long-term target C(2). *Int Immunopharmacol*. 2003 Jul;3(7):987–99.
84. Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 May 1;89(9):3686–90.

85. Enz A, Shapiro G, Chappuis A, Dattler A. Nonradioactive assay for protein phosphatase 2B (calcineurin) activity using a partial sequence of the subunit of cAMP-dependent protein kinase as substrate. *Anal Biochem.* 1994 Jan;216(1):147–53.
86. Strom T, Haschke M, Boyd J, Roberts M, Arabshahi L, Marbach P, et al. Crossreactivity of isolated everolimus metabolites with the Innofluor Certican immunoassay for therapeutic drug monitoring of everolimus. *Ther Drug Monit.* 2007 Dec;29(6):743–9.
87. Boeckmann AJ, Sheiner LB, Beal SL. NONMEM user's guide, Part V, Introductory Guide. San Francisco, CA: University of California; 1992.
88. Munoz NM, Leff AR. Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection. *Nat Protoc.* 2006;1(6):2613–20.
89. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) [Internet]. 2005 [cited 2014 Jun 19]. Available from: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)
90. Rouillet-Renoleau F, Lemaitre F, Antignac M, Zahr N, Farinotti R, Fernandez C. Everolimus quantification in peripheral blood mononuclear cells using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2012 Jul;66:278–81.

91. Lemaitre F, Antignac M, Fernandez C. Monitoring of tacrolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells: application to cardiac transplant recipients. *Clin Biochem.* 2013 Oct;46(15):1538–41.
92. Blanchet B, Hulin A, Duvoux C, Astier A. Determination of serine/threonine protein phosphatase type 2B PP2B in lymphocytes by HPLC. *Anal Biochem.* 2003 Jan 1;312(1):1–6.
93. Kovarik JM, Hsu CH, McMahon L, Berthier S, Rordorf C. Population pharmacokinetics of everolimus in de novo renal transplant patients: impact of ethnicity and comedications. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Sep;70(3):247–54.
94. Moes DJAR, Press RR, den Hartigh J, van der Straaten T, de Fijter JW, Guchelaar H-J. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of everolimus in renal transplant patients. *Clin Pharmacokinet.* 2012 Jul 1;51(7):467–80.
95. Lemaitre F, Beziau E, Goldwirth L, Fernandez C, Farinotti R, Varnous S, et al. Population pharmacokinetics of everolimus in cardiac recipients: comedications, ABCB1, and CYP3A5 polymorphisms. *Ther Drug Monit.* 2012 Dec;34(6):686–94.
96. Kuse R, Schuster S, Schübbe H, Dix S, Hausmann K. Blood lymphocyte volumes and diameters in patients with chronic lymphocytic leukemia and normal controls. *Blut.* 1985 Apr;50(4):243–8.
97. Segel GB, Cokelet GR, Lichtman MA. The measurement of lymphocyte volume: importance of reference particle deformability and counting solution tonicity. *Blood.* 1981 May;57(5):894–9.

98. Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem*. 1993 Mar 25;268(9):6077–80.
99. Capron A, Lerut J, Latinne D, Rahier J, Haufroid V, Wallemacq P. Correlation of tacrolimus levels in peripheral blood mononuclear cells with histological staging of rejection after liver transplantation: preliminary results of a prospective study. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2012 Jan;25(1):41–7.
100. Capron A, Mourad M, De Meyer M, De Pauw L, Eddour DC, Latinne D, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms influence tacrolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells after renal transplantation. *Pharmacogenomics*. 2010 May;11(5):703–14.
101. Capron A, Musuamba F, Latinne D, Mourad M, Lerut J, Haufroid V, et al. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometric assay for tacrolimus in peripheral blood mononuclear cells. *Ther Drug Monit*. 2009 Apr;31(2):178–86.
102. Bergmann TK, Hennig S, Barraclough KA, Isbel NM, Staatz CE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult kidney transplant patients: impact of CYP3A5 genotype on starting dose. *Ther Drug Monit*. 2014 Feb;36(1):62–70.
103. Gómez-Bravo MA, Salcedo M, Fondevila C, Suarez F, Castellote J, Rufian S, et al. Impact of donor and recipient CYP3A5 and ABCB1 genetic polymorphisms on tacrolimus dosage requirements and rejection in Caucasian Spanish liver transplant patients. *J Clin Pharmacol*. 2013 Nov;53(11):1146–54.



104. Musuamba FT, Mourad M, Haufroid V, Delattre IK, Verbeeck RK, Wallemacq P. Time of drug administration, CYP3A5 and ABCB1 genotypes, and analytical method influence tacrolimus pharmacokinetics: a population pharmacokinetic study. *Ther Drug Monit.* 2009 Dec;31(6):734–42.
105. Seger C, Tentschert K, Stöggel W, Griesmacher A, Ramsay SL. A rapid HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus and everolimus in human blood samples. *Nat Protoc.* 2009;4(4):526–34.
106. Kovarik JM, Sabia HD, Figueiredo J, Zimmermann H, Reynolds C, Dilzer SC, et al. Influence of hepatic impairment on everolimus pharmacokinetics: implications for dose adjustment. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Nov;70(5):425–30.
107. Kovarik JM, Curtis JJ, Hricik DE, Pescovitz MD, Scantlebury V, Vasquez A. Differential pharmacokinetic interaction of tacrolimus and cyclosporine on everolimus. *Transplant Proc.* 2006 Dec;38(10):3456–8.
108. Brandhorst G, Tenderich G, Zittermann A, Oezpeker C, Koerfer R, Oellerich M, et al. Everolimus exposure in cardiac transplant recipients is influenced by concomitant calcineurin inhibitor. *Ther Drug Monit.* 2008 Feb;30(1):113–6.
109. Antignac M, Barrou B, Farinotti R, Lechat P, Urien S. Population pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in kidney transplant patients. *Br J Clin Pharmacol.* 2007 Dec;64(6):750–7.

110. Undre NA, Schäfer A. Factors affecting the pharmacokinetics of tacrolimus in the first year after renal transplantation. European Tacrolimus Multicentre Renal Study Group. *Transplant Proc.* 1998 Jun;30(4):1261–3.
111. Benkali K, Rostaing L, Premaud A, Woillard J-B, Saint-Marcoux F, Urien S, et al. Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of tacrolimus exposure in renal transplant recipients on a new once-daily formulation. *Clin Pharmacokinet.* 2010 Oct;49(10):683–92.
112. Monchaud C, de Winter BC, Knoop C, Estenne M, Reynaud-Gaubert M, Pison C, et al. Population pharmacokinetic modelling and design of a Bayesian estimator for therapeutic drug monitoring of tacrolimus in lung transplantation. *Clin Pharmacokinet.* 2012 Mar 1;51(3):175–86.
113. Picard N, Rouguieg-Malki K, Kamar N, Rostaing L, Marquet P. CYP3A5 genotype does not influence everolimus in vitro metabolism and clinical pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2011 Mar 27;91(6):652–6.
114. D'Alessandro M, Mariani P, Mennini G, Severi D, Berloco P, Bachetoni A. Falsely elevated tacrolimus concentrations measured using the ACMIA method due to circulating endogenous antibodies in a kidney transplant recipient. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2011 Jan 30;412(3-4):245–8.
115. Murthy JN, Davis DL, Yatscoff RW, Soldin SJ. Tacrolimus metabolite cross-reactivity in different tacrolimus assays. *Clin Biochem.* 1998 Nov;31(8):613–7.

116. Dailly E, Deslandes G, Hourmant M, Petit T, Renaud C, Treilhaud M, et al. Comparison between a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay and a fluorescent polarization immunoassay to measure whole blood everolimus concentration in heart and renal transplantations. *J Clin Lab Anal.* 2008;22(4):282–5.
117. Masri M, Rizk S, Barbari A, Stephan A, Kamel G, Rost M. An assay for the determination of sirolimus levels in the lymphocyte of transplant patients. *Transplant Proc.* 2007 May;39(4):1204–6.
118. Ansermot N, Fathi M, Veuthey J-L, Desmeules J, Hochstrasser D, Rudaz S. Quantification of cyclosporine A in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry using a column-switching approach. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Sep 15;857(1):92–9.
119. Lepage JM, Lelong-Boulouard V, Lecouf A, Debruyne D, Hurault de Ligny B, Coquerel A. Cyclosporine monitoring in peripheral blood mononuclear cells: feasibility and interest. A prospective study on 20 renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2007 Dec;39(10):3109–10.
120. Falck P, Guldseth H, Asberg A, Midtvedt K, Reubsæet JLE. Determination of ciclosporin A and its six main metabolites in isolated T-lymphocytes and whole blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Jun 1;852(1-2):345–52.
121. Ansermot N, Rebsamen M, Chabert J, Fathi M, Gex-Fabry M, Daali Y, et al. Influence of ABCB1 gene polymorphisms and P-glycoprotein activity on cyclosporine

- pharmacokinetics in peripheral blood mononuclear cells in healthy volunteers. *Drug Metab Lett.* 2008 Apr;2(2):76–82.
122. Crettol S, Venetz J-P, Fontana M, Aubert J-D, Ansermot N, Fathi M, et al. Influence of ABCB1 genetic polymorphisms on cyclosporine intracellular concentration in transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics.* 2008 Apr;18(4):307–15.
123. De Jonge H, de Loor H, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. In vivo CYP3A4 activity, CYP3A5 genotype, and hematocrit predict tacrolimus dose requirements and clearance in renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2012 Sep;92(3):366–75.
124. Lesche D, Sigurdardottir V, Setoud R, Oberhänsli M, Carrel T, Fiedler GM, et al. CYP3A5\*3 and POR\*28 genetic variants influence the required dose of tacrolimus in heart transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2014 Apr 15;
125. Provenzani A, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P, Vizzini G, Salis P, et al. Influence of CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and other factors on tacrolimus dosing in Caucasian liver and kidney transplant patients. *Int J Mol Med.* 2011 Dec;28(6):1093–102.
126. Macphee IAM, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, et al. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation.* 2002 Dec 15;74(11):1486–9.
127. Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Bowman P, et al. Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene

- polymorphisms. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2003 Apr;3(4):477–83.
128. Van Gelder T, Hesselink DA. Dosing tacrolimus based on CYP3A5 genotype: will it improve clinical outcome? *Clin Pharmacol Ther.* 2010 Jun;87(6):640–1.
129. Kuypers DRJ. Pharmacogenetic vs. concentration-controlled optimization of tacrolimus dosing in renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2010 Nov;88(5):595–596; author reply 597.
130. Falck P, Asberg A, Guldseth H, Bremer S, Akhlaghi F, Reubsaet JLE, et al. Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine a precedes acute rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2008 Jan 27;85(2):179–84.
131. Lemaitre F, Antignac M, Verdier M-C, Bellissant E, Fernandez C. Opportunity to monitor immunosuppressive drugs in peripheral blood mononuclear cells: where are we and where are we going? *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc.* 2013 Aug;74:109–12.
132. Boudjema K, Camus C, Saliba F, Calmus Y, Salamé E, Pageaux G, et al. Reduced-dose tacrolimus with mycophenolate mofetil vs. standard-dose tacrolimus in liver transplantation: a randomized study. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2011 May;11(5):965–76.
133. Abraham SC, Poterucha JJ, Rosen CB, Demetris AJ, Krasinskas AM. Histologic abnormalities are common in protocol liver allograft biopsies from patients with normal liver function tests. *Am J Surg Pathol.* 2008 Jul;32(7):965–73.

134. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2012 Feb;12(2):388–99.
135. Vereerstraeten P, Abramowicz D, de Pauw L, Kinnaert P. Absence of deleterious effect on long-term kidney graft survival of rejection episodes with complete functional recovery. *Transplantation*. 1997 Jun 27;63(12):1739–43.
136. Cosio FG, Grande JP, Wadei H, Larson TS, Griffin MD, Stegall MD. Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2005 Oct;5(10):2464–72.
137. Moreso F, Ibernón M, Gomà M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2006 Apr;6(4):747–52.
138. Meier-Kriesche H-U, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2004 Mar;4(3):378–83.
139. Fukudo M, Yano I, Katsura T, Ito N, Yamamoto S, Kamoto T, et al. A transient increase of calcineurin phosphatase activity in living-donor kidney transplant recipients with acute rejection. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2010;25(5):411–7.

140. Boleslawski E, Conti F, Sanquer S, Podevin P, Chouzenoux S, Batteux F, et al. Defective inhibition of peripheral CD8+ T cell IL-2 production by anti-calcineurin drugs during acute liver allograft rejection. *Transplantation*. 2004 Jun 27;77(12):1815–20.
141. Van Rossum HH, Romijn FPHTM, Sellar KJ, Smit NPM, van der Boog PJM, de Fijter JW, et al. Variation in leukocyte subset concentrations affects calcineurin activity measurement: implications for pharmacodynamic monitoring strategies. *Clin Chem*. 2008 Mar;54(3):517–24.
142. Blanchet B, Hurtova M, Roudot-Thoraval F, Costentin CE, Barrault C, Jouault H, et al. Deficiency in calcineurin activity in liver transplantation candidates with alcoholic cirrhosis or hepatocellular carcinoma. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 2009 Sep;29(8):1152–7.
143. Van den Akker ELT, Baan CC, van den Berg B, Russcher H, Joosten K, Hokken-Koelega ACS, et al. Ficoll-separated mononuclear cells from sepsis patients are contaminated with granulocytes. *Intensive Care Med*. 2008 May;34(5):912–6.
144. Kaplan MJ. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Dec;7(12):691–9.
145. Blanchet B, Hulin A, Ghaleh B, Giraudier S, Jouault H, Astier A. Distribution of calcineurin activity in blood cell fractions and impact of tacrolimus inhibition. *Fundam Clin Pharmacol*. 2006 Apr;20(2):137–44.
146. Kung L, Halloran PF. Immunosuppressants may limit calcineurin inhibition by cyclosporine and tacrolimus at high drug concentrations. *Transplantation*. 2000 Jul 27;70(2):327–35.

147. Millán O, Brunet M, Campistol JM, Faura A, Rojo I, Vidal E, et al. Pharmacodynamic approach to immunosuppressive therapies using calcineurin inhibitors and mycophenolate mofetil. *Clin Chem*. 2003 Nov;49(11):1891–9.
148. Koefoed-Nielsen PB, Karamperis N, Højskov C, Poulsen JH, Jørgensen KA. The calcineurin activity profiles of cyclosporin and tacrolimus are different in stable renal transplant patients. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2006 Oct;19(10):821–7.



## 10. Annexes

### Articles publiés :

#### Article 1

Lemaitre F, Bezian E, Goldwirt L, Fernandez C, Farinotti R, Varnous S, et al. Population pharmacokinetics of everolimus in cardiac recipients: comedications, ABCB1, and CYP3A5 polymorphisms. Ther Drug Monit. 2012 Dec;34(6):686–94.

**Article 2**

Roullet-Renoleau F, Lemaitre F, Antignac M, Zahr N, Farinotti R, Fernandez C. Everolimus quantification in peripheral blood mononuclear cells using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal. 2012 Jul;66:278–81.

**Article 3**

Lemaitre F, Antignac M, Fernandez C. Monitoring of tacrolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells: application to cardiac transplant recipients. Clin Biochem. 2013 Oct;46(15):1538–41.

**Article 4**

Lemaitre F, Blanchet B, Latournerie M, Antignac M, Houssel-Debry P, Verdier MC, Derru M, Camus C, Le Priol J, Roussel M, Zheng Y, Fillatre P, Curis E, Bellissant E, Boudjema K, Fernandez C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in liver transplant recipients: inside the white blood cells. *Article soumis à Clinical Biochemistry*.

**Article 5**

Lemaitre F, Antignac M, Verdier M-C, Bellissant E, Fernandez C. Opportunity to monitor immunosuppressive drugs in peripheral blood mononuclear cells: where are we and where are we going? *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc.* 2013 Aug;74:109–12.

**Protocoles de recherche ayant obtenu une autorisation réglementaire :**

***Protocole 1***

Protocole OPTILTH - Optimisation des thérapeutiques immunosuppressives : élaboration d'un modèle pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD) de population en transplantation hépatique. Avis Favorable CCTIRS N°14.344 du 21 mai 2014.

**Protocole 2**

Protocole DIFF-TAC - Etude de la diffusion cellulaire du tacrolimus au travers de la membrane des cellules mononuclées. Avis favorable Comité d'éthique du CHU de Rennes N°13-44 du 12 juillet 2013.

**Résumé :**

En dépit de l'utilisation intensive du suivi thérapeutique pharmacologique des concentrations d'immunosuppresseurs chez le transplanté d'organe, la fréquence du rejet aigu a peu diminué au cours de ces dernières années et ce dernier peut survenir chez le patient alors même que ses concentrations sanguines sont en zone thérapeutique. C'est pourquoi la recherche d'améliorations de ce suivi thérapeutique ainsi que la recherche de nouveaux moyens de monitoring sont des axes pertinents d'investigation en pharmacologie des immunosuppresseurs. Au cours de ce travail, deux méthodes analytiques ont été développées par LC-MS/MS pour le dosage intracellulaire de l'évérolimus et du tacrolimus. La pharmacocinétique de l'évérolimus chez le transplanté cardiaque a été modélisée par une approche de population et une étude clinique a été réalisée en vue de rapprocher les concentrations sanguines et intracellulaires de tacrolimus et l'effet sur la protéine cible, la calcineurine. Ces travaux ont permis de jeter les bases nécessaires à la réalisation d'essais cliniques permettant d'évaluer la pertinence d'un suivi des concentrations intracellulaires et/ou de l'activité de la calcineurine dans la prévention de rejet de transplantation.

L'utilisation de ces outils doit concourir à la diminution de la fréquence du rejet de greffe et à l'amélioration globale de la prise en charge du patient transplanté d'organe.

**Mots-clés :**

Immunosuppresseurs ; Everolimus ; Tacrolimus ; Transplantation ; Pharmacocinétique ; Pharmacodynamie ; Suivi thérapeutique pharmacologique ; Pharmacocinétique de population ; Lymphocytes ; Cellules mononuclées ; Intracellulaire.

EA 4123 "Barrières Physiologiques et Réponses Thérapeutiques"

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11  
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »  
5, rue Jean Baptiste Clément  
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®